جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

آنالیز فلاکسهای متابولیکی در رشد و تولید محصول ثانویه برای *Streptomyces coelicolor*

راستیان زهرا[۱]، عبدی رضا، نعیم پور فرشته

۱.دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشکدهٔ مهندسی شیمی دانشگاه علم و صنعت ایران

E-mail: zoya_ras@yahoo.com

چکیده

در این تحقیق به آنالیز فلاکسهای متابولیکی در رشد و تولید محصول (آنتی بیوتیک Actinorhodin) S. coelicolor پرداخته شده است. ابتدا شبکه واکنشهای متابولیکی جمع آوری گردید (۱۶۰ واکنش) و سپس مدل استوکیومتری بر اساس موازنه های جرمی بدست آورده شد. دستگاه معادلات حاصل، برای ماکزیمم نمودن توابع هدف "رشد" و "تولید اکتینورودین" از طریق برنامه ریزی خطی با استفاده از نرم افزار Lingo7 حل گردید. توزیع فلاکسها در غالب یک نقشه متابولیکی همراه با مقادیر عددی فلاکسها بر اساس نتایج محاسباتی ارائه شد. نتایج آزمایشگاهی بدست آمده در یک بیوراکتور (۵ لیتری) با مقادیر محاسبه شده شدت های ویژه رشد و تولید محصول در چند مورد مقایسه و بررسی گردید.

واژه های کلیدی: آنالیز فلاکسهای متابولیکی؛ استرپتومایسس؛ شدت ویژه رشد؛ توزیع فلاکسها؛ تولید اکتینورودین

مقدمه

مهندسی متابولیکی شاخه ای از بیوتکنولوژی میباشد که در دهه های اخیر مورد توجه زیادی قرار گرفته است [۱]. مهندسی متابولیکی را میتوان بهبود جهت داده شده تولید محصول و یا خواص سلولی از طریق ایجاد تغییر در واکنشهای خاص بیوشیمیایی و یا اضافه نمودن واکنشهای جدید با استفاده از تکنولوژی DNA نوترکیب تعریف نمود [۲]. اولین قدم در بهبود فعالیتهای سلولی تعیین تغییرات بهینه در سلول میباشد. کلیه فعالیت های سلولی از طریق یک شبکه بشدت مرتبط از واکنشهای بیوشیمیایی شامل مسیرهای متابولیکی انجام میگیرد. فلاکس (شدت ویژه واکنشها) جز اساسی فیزیولوژی سلولی و مهمترین پارامتر مسیرهای متابولیکی است. نقش اولیه مهندسی متابولیکی اندازه گیری و فهم کنترل فلاکسها در درون سلول میباشد. آنالیز فلاکسهای متابولیکی به عنوان یکی از ابزارهای مهندسی متابولیکی، درجهٔ درگیری مسیرهای متابولیکی را در فرآیند کلی متابولیسم بر اساس یک مدل استوکیومتری (حاصل از موازنهٔ جرمی متابولیتهای درون سلولی) مشخص مینماید. این آنالیز میتواند توزیع بهینه فلاکس ها برای طراحی منطقی متابولیسم سلولی در رسیدن به اهداف از پیش تعیین شده (ماکزیمم نمودن رشد یا تولید محصول) را تعیین نماید. بررسی اثر شرایط محیطی و ژنتیکی مختلف بر توزیع فلاکسها در مسیرهای متابولیکی میتواند منجر به شناسایی یا انتخاب محیط کشت و گونهٔ بهتر و تغییرات ژنتیکی مفیدتر گردد [۳]. در این تحقیق آنالیز فلاکسهای متابولیکی استرپتو ماسیس ها بعلت اهمیت صنعتی آنها مورد بررسی قرار گرفته است و توزیع فلاکسها هنگام بهینه سازی رشد (تولید تودهٔ زیستی) و تولید اکتینورودین (آنتی‌بیوتیک رنگی تولید شده توسط S. coelicolor که در کارهای تحقیقاتی مورد استفاده قرار می گیرد) بدست آورده شده است.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تئوری و روشها

در این آنالیز ابتدا شبکه واکنشهای بیوشیمیایی مربوط به میکروارگانیسم مورد نظر برای تبدیل منابع کربن و انرژی به اجزا، تودهٔ سلولی (متابولیتهای واسطه ای، واحدهای ساختمانی ماکرومولکولها و ATP) تشکیل داده شد. با نوشتن موازنهٔ جرمی برای هر متابولیت درون سلولی در حالت پایدار بصورت زیر یک دستگاه معادلات بدست آورده شد که در آن

$$S \cdot v = b$$

S ماتریس ضرایب

b بردار سرعت ویژهٔ دفع مواد از سلول

v بردار فلاکسهای مجهول

می‌باشند (در مورد جذب مواد غذایی از محیط b منفی می‌شود) [٤]. از آنجاییکه تعداد واکنشها معمولاً از تعداد متابولیتها بیشتر است، تعداد فلاکسهای مجهول از تعداد معادلات بیشتر شده و در نتیجه یک دستگاه معادلات جبری خطی خواهیم داشت که بینهایت جواب دارد. با تعیین یک تابع هدف و بهینه سازی آن می توان فلاکسهای مجهول را بدست آورد. تابع هدف در آنالیز فلاکسهای متابولیکی می تواند سرعت رشد ویژه، سرعت جذب سوبسترا، یا سرعت تولید محصول باشد. برای حل دستگاه معادلات از نرم افزار برنامه ریزی خطی Lingo7 که می‌تواند مدلهای خطی و غیر خطی را حل نماید استفاده شده است [٥].

نتایج و بحث

در این شبکه مسیرها و واکنشهای زیر با توجه به متابولیسم استرپتومایسسها در نظر گرفته شده است: مسیر گلیکولیز (Glycolysis)، گلوکونئوژنس (Gluconeogenesis)، پنتوز فسفات (Pentose phosphate)، چرخهٔ اسید سیتریک (Citric acid cycle) مسیر گلیوکسیلات (Glyoxylate)، واکنشهای آناپلروتیک (Anaplerotic)، مصرف آمونیوم، نیترات، سولفات، فسفات، تنفس هوازی (Oxidative phosphorhylation) ، واکنشهای اسید فولیک (Folic acid)، فعالیت ترنس هیدروژناز (Transhydrogenase)، بیوسنتز اسیدهای آمینه، نوکلئوتیدها، سنتز اسید چرب، بیوسنتز ماکرومولکولهای تشکیل دهندهٔ سلول مانند DNA و RNA، پروتئین، فسفولیپید و گلیکوژن [٦و٧و٨و٩و١٠و١١]. مسیر انتنردودوروف (Entner-Doudoroff) که از مسیرهای شکست گلوکز میباشد در استرپتومایسسها دیده نشده است [١٢]. این شبکه دربردارندهٔ حدود ١٦٠ واکنش بیوشیمیایی میباشد. با موازنهٔ جرمی برای هر متابولیت درون سلولی یک دستگاه با تعداد ١١٢ معادله و ١٥٦ مجهول (فلاکسهای مجهول) حاصل گردید.

در محاسبات انجام گرفته نسبت فسفر به اکسیژن (P/O ratio) در اکسیداسیون هوازی در مورد NADH، ٢ و در مورد $FADH_2$، ١/٣٣ فرض شده است [١٢]. درصد وزنی هر یک از واحدهای ساختمانی تشکیل دهندهٔ ماکرومولکولها و نیز درصد هر ماکرومولکول در یک گرم از تودهٔ زیستی بر مبنای اطلاعات منبع [١٣] در نظر گرفته شده اند. توده زیستی عمدتا شامل پروتیئن، اسیدهای نوکلئیک، فسفولیپیدها و منابع ذخیره کربنی در نظر گرفته شده است.

شکل (١) توزیع فلاکسها در رشد ماکزیمم برای شدت ویژه مصرف گلوکز $\mu\ mol(g\ DW\ h)^{-1}$ ١٠٠ به عنوان منبع کربن را نشان میدهد. در این شدت ویژه مصرف گلوکز، ماکزیمم شدت ویژه رشد برابر با $g\ (g\ DW\ h)^{-1}$ ٠١١٩٥٩/ تودهٔ زیستی محاسبه شده است. همانطور که در شکل مشخص است مسیر گلیکولیز، چرخهٔ اسید سیتریک، عکس مسیر پنتوزفسفات، اکسیداسیون هوازی و ترنس‌هیدروژناز فعال بوده واحدهای ساختمانی ماکرومولکولهای سازندهٔ سلول در مسیر خود ساخته شده‌اند.

جهت بررسی متابولیسم در شرایط آزمایشگاهی و مقایسه آن با متابولیسم بهینه سلولی، مقایسه ای بین نتایج آزمایشگاهی و

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

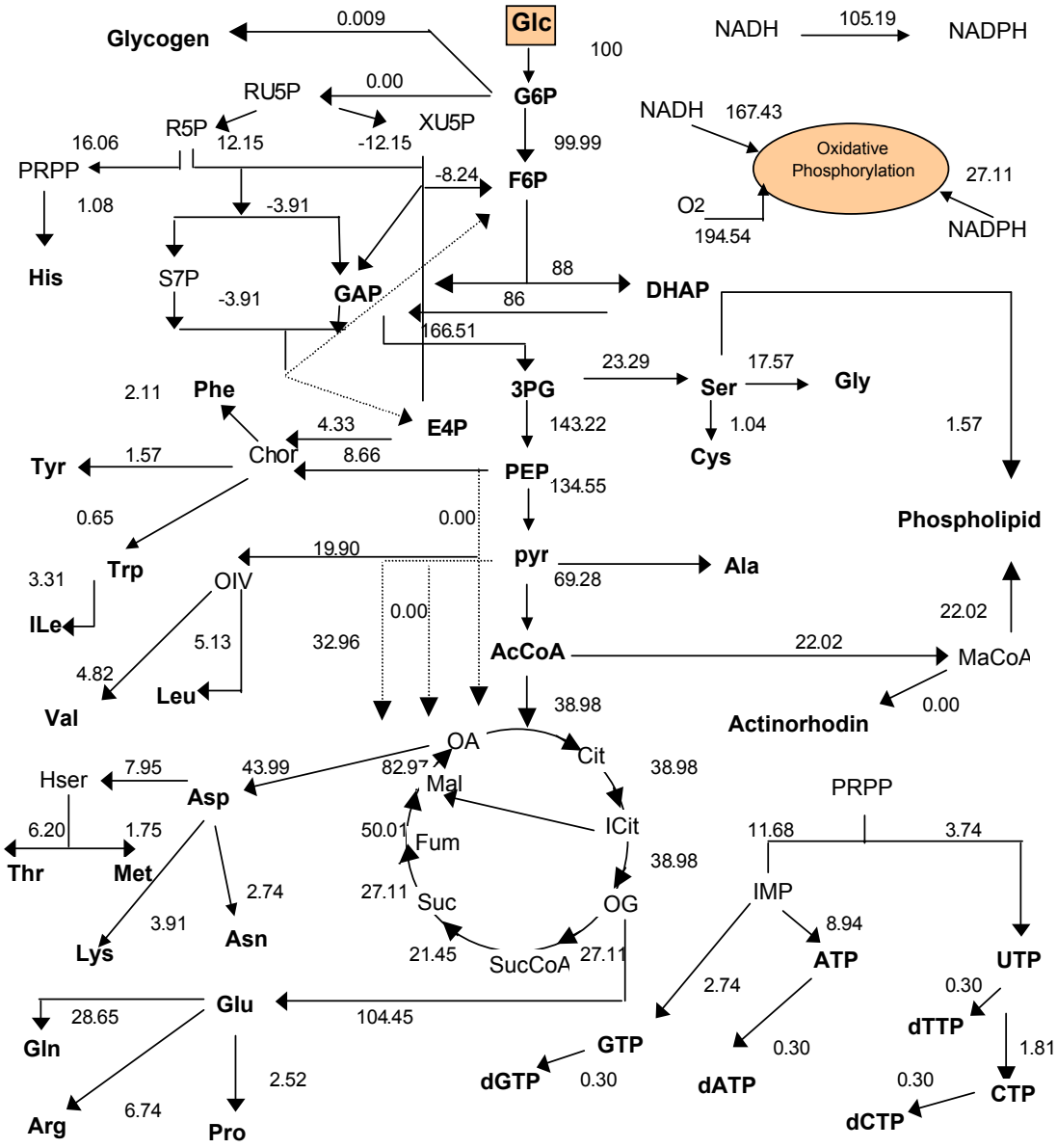
نتایج محاسباتی انجام گرفت. ابتدا داده‌های تجربی شدت رشد ویژه حاصل از کشت ناپیوستهٔ گونهٔ S. coelicolor در راکتور ۵ لیتری همراه با هوادهی [۱٤] با داده های تئوری حاصل از مدل استوکیومتری برای همان مقدار مصرف ویژه گلوکز مقایسه شده اند که نتایج در جدول (۱) نشان داده شده است. به ازای تمام مقادیر بررسی شده شدت ویژه مصرف گلوکز، مقدار تجربی شدت ویژه رشد از مقدار ماکزیمم تئوری آن کمتر می باشد. این نکته نشان می دهد که رشد به حداکثر مقدار خود نرسیده است. از دلایل این امر می توان به وجود واکنشهای دیگری که در سلول رخ میدهد ولی در مدل در نظر گرفته نشده است، اشاره نمود. افزایش مصرف انرژی مورد نیاز برای حفظ و نگهداری سلول که باعث کاهش دسترسی سلول به منابع کربنی مورد نیاز در رشد می باشد، نیز می تواند دلیل دیگری برای این امر باشد. بدلیل اینکه مرگ و تجزیهٔ سلول در مدل در نظر گرفته نشده، در زمانیکه سلول در فاز سکون یا مرگ قرار می‌گیرد برای مقدار کمی از مصرف گلوکز مقدار تئوری رشد مثبت محاسبه می‌گردد. این حالت در جدول (۱) در فاصلهٔ بین ساعات ۱۱۲-۷۸ برای سلول مشاهده می‌شود.

این گونه از استرپتوماسیس چهار محصول تولید مینماید که همگی از آنتی بیوتیکها میباشند. یکی از این محصولات، اکتینورودین (پیگمان آبی رنگ) میباشد. در این تحقیق تولید این آنتی بیوتیک علاوه بر رشد مورد بررسی قرار گرفت. شکل (۲) توزیع فلاکسها را در تولید ماکزیمم اکتینورودین برای شدت ویژه مصرف گلوکز ۱۰۰ μ mol(g DW h)$^{-1}$ نشان میدهد. همانگونه که در شکل دیده میشود در این شدت ویژه مصرف گلوکز ماکزیمم شدت ویژه تولید اکتینورودین برابر μ mol(g DW h)$^{-1}$ ۱۲/۵ محاسبه شده است. بنابر این ماکزیمم راندمان تئوری تولید اکتینورودین برابر ۰/٤٤ گرم آنتی بیوتیک بر گرم گلوکز مصرفی میباشد. با مقایسهٔ این مقدار ماکزیمم راندمان با مقدار راندمان تجربی ۰/۰۲۳ گرم آنتی بیوتیک بر گرم گلوکز مصرفی بدست آمده در یک آزمایش نیمه‌پیوسته گونهٔ S. coelicolor در یک راکتور ۵ لیتری [۱٤] مشخص می‌شود که این باکتری از پتانسیل بالاتری برای تولید آنتی‌بیوتیک برخوردار است در حالیکه از تمام این پتانسیل استفاده نشده است. با توجه به صفر بودن فلاکس مسیرهای درگیر رشد در شکل(۲)، این کاهش راندمان می‌تواند بدلیل فعال بودن این مسیرها یا تولیدمحصولات دیگری در سلول باشد. با حذف مسیرهای اضافی که در تولید آنتی‌بیوتیک شرکت نمی‌کنند می‌توان راندمان را بالاتر برد.

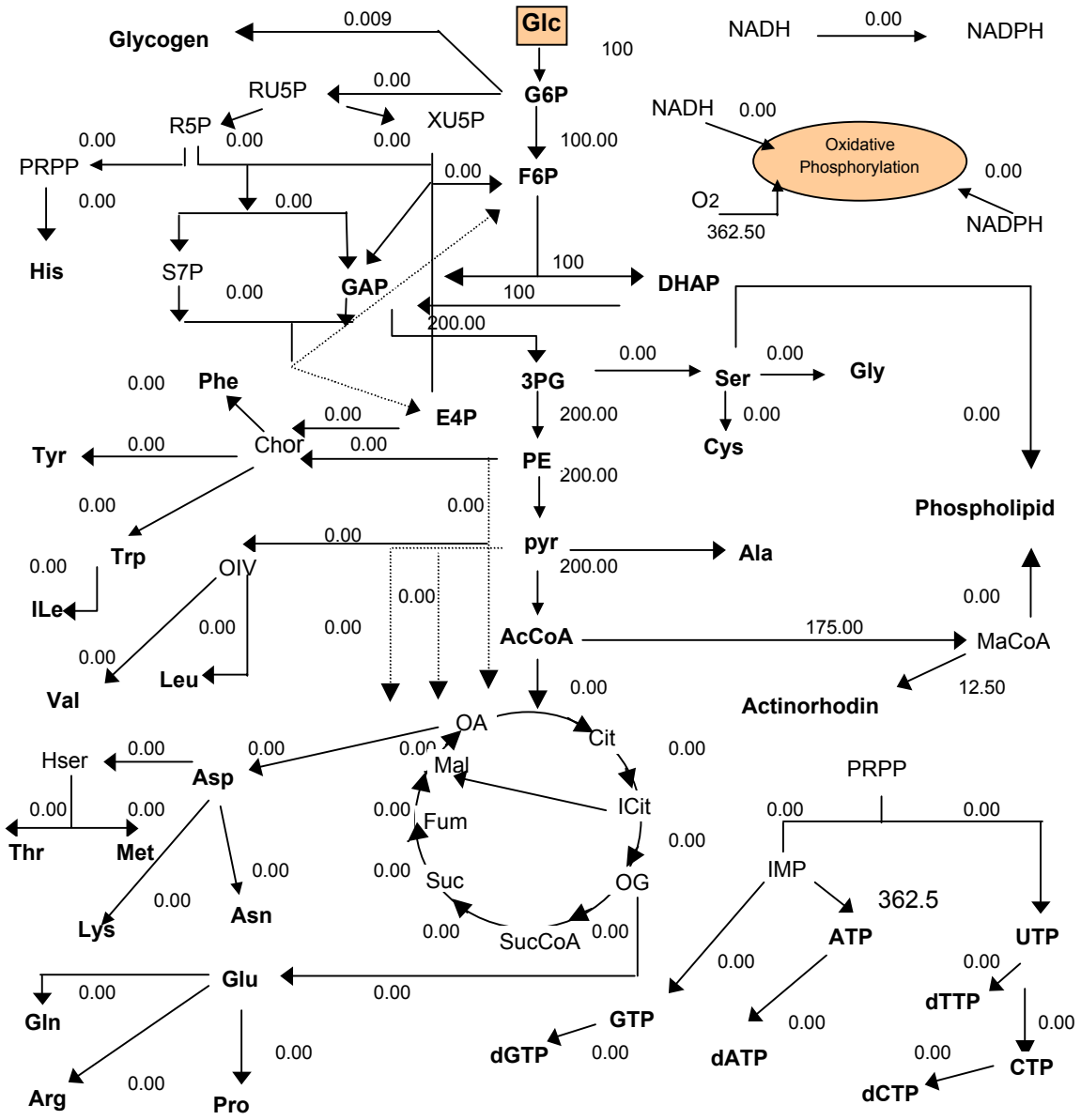
جدول۱ -شدتهای ویژه تجربی و محاسباتی برای آزمایش ناپیوسته در راکتور ۵ لیتری (شدتها بر حسب mmol(g DW h)$^{-1}$ و رشد بر حسب g(g DW h)$^{-1}$ می‌باشد)

مدت زمان (ساعت)	سرعتهای ویژه تجربی		سرعتهای ویژه محاسباتی		
	مصرف گلوکز	رشد	رشد	تولید دی-اکسید کربن	مصرف اکسیژن
٤۰-٦٤	۰/۵۵۱	۰/۰٤۲	۰/۰٦۵۸	۰/٦٤۲٦	۰/۵۳٦
٦٤-۷٤	۱/۲۹۷	۰/۰٦۱	۰/۱۵۵۱	۱/۵۱۲۷	۱/۲٦۱
۷٤-۸۷	۰/۹۰۱	۰/۰۵۱	۰/۱۰۷۷	۱/۰۵۰۸	۰/۸۷٦
۸۷-۱۱۲	۰/۰۰۳	-۰/۰۱٦	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۳٤	۰/۰۰۲

شکل۱- توزیع فلاکسها در استرپتومایسسها برای ماکزیمم نمودن رشد ویژه (فلاکسها بر مبنای ۱۰۰ مول گلوکز مصرف شده نرمال شده‌اند.)



شکل۲- توزیع فلاکسها در استرپتومایسسها برای ماکزیمم نمودن تولید اکتینورودین (فلاکسها بر مبنای ۱۰۰ مول گلوکز مصرف شده نرمال شده‌اند.)



مراجع

1- Douglas C. Cameron and Tong L. T. 1993. Cellular and Metabolic Engineering: An Overview. Applied Biochemistry and Biotechnology. 38, PP. 105-140

2- Bailey JE. 1991. Toward a Science of Metabolic Engineering. Science. 252, PP. 1668-1675.

3- Stephanopoulos G. Aristidou AA. and Nielsen J. 1998. Metabolic Engineering: Principles and Metodologies. Academic Press, San Diego.

4- Savinell JM. and Palson BO. 1992. Network Analysis of Intermediary Metabolism Using Linear Optimization. I.Development of Mathematical formalism. J. Theor. Biol. 154, PP. 421-454.

5- Bazaraa M. Jarvis S. and Sherili H. D. 1990. Linear Programing and Network Flows. 2th Ed. John Wiley & Sons, Singapore.

6- Hodgson D. A. 2000 .Primary Metabolism and Its Control in Streptomyces: A Most Unusual Group of Bacteria. Advances in Microbial Physiology. 42, PP. 47- 238.

7- Mandelstam J. McQuillen K. and Dawes. I. 1982. Biochemistry of Bacterial Growth. 3rd Ed., Blackwell Scientific Publication.

8- Stryer L. 1995 .Biochemistry, W. H. Freeman and Company, 4th Ed., New York.

9- Voet D. Voet J.G. and Prrat C.W. 1998 Fundamentals of Biochemistry, John Wiley & Sons, USA.

10- Zubay G. 1998. Biochemistry. 4 th Ed. Macmillan, USA.

11- WWW. Genome. ad.jp/kegg

12- Daae E. and Ison A. P. 1999. Classification and Sensitivy Analysis of Proposed Primary Metabolic Reaction Network for Streptomyces lividans. Metabolic Engineering. 1, PP. 153-156.

13- Ingraham J. Maaloe O. and Neidhardt F. C. 1983. Growth of The Bacterial Cell. Sinauer Associates Inc., USA.

14- Naeimpoor F. 2001. Metabolic Flux Analysis in Streptomyces Coelicolor. Ph.D. Thesis. UMIST, UK.