

سیمبیولوژی مسیر متابولیکی تولید بیوبوتانول از گونه‌ی کلاسترید یوم استوبوتیلیکوم

نوشین اسدی¹، محمدهادی جزینی^{2*}، کیخسرو کریمی³

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده‌ی مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

2- استادیار، دانشکده‌ی مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

3- دانشیار، دانشکده‌ی مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان

* اصفهان، کد پستی 8415683111

m.h.jazini@cc.iut.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/5/19 پذیرش مقاله: 95/10/20)

چکیده - بوتانول به‌عنوان سوختی با قابلیت ترکیب آسان‌تر با بنزین و محصولات هیدروکربنی شناخته می‌شود که ارزش حرارتی بیشتری نسبت به اتانول دارد. گونه‌ی کلاسترید یوم استوبوتیلیکوم قادر به تولید چشمگیر بوتانول است. استون و اتانول محصولات دیگر مسیر متابولیکی این گونه‌ی میکروبی هستند. مدل‌های ساده توصیف‌کننده‌ی تولید این محصولات مانند مونود دارای محدودیت در پیش‌بینی فرایندهای درون سلولی هستند. بیان ریاضی تولید متابولیت‌های درون سلولی به‌عنوان روشی جهت بهینه‌سازی تولید محصول مورد نظر به‌ویژه در مهندسی متابولیسم سلولی کاربرد دارد. در این پژوهش از مدل ساختارمند مسیر متابولیک سلولی به‌منظور توصیف و پیش‌بینی نحوه تغییرات پویای متابولیت‌های درون و برون سلولی برای گونه‌ی کلاسترید یوم استوبوتیلیکوم استفاده شد. معادلات مدل توسط ابزار شبیه‌سازی مسیر متابولیک SimBiology حل گردید و نتایج حاصل از حل با مقدار آزمایشگاهی مقایسه شد که نشان‌دهنده‌ی تطابق مناسب بود. تأثیرپذیری تولید بوتانول از بوتیریت و استات بررسی گردید و نتایج نشان‌دهنده‌ی افزایش تولید بوتانول در حضور این مواد در محیط کشت است. حضور بوتیریت در محیط کشت تأثیر بیشتری هم بر تولید بوتانول و هم در کاهش زمان رسیدن به حداکثر تولید دارد. غلظت بوتانول تولیدی با غلظت اولیه‌ی استات 100 میلی‌مولار و بوتیریت صفر برابر با 120/48 میلی‌مولار است و برای غلظت اولیه‌ی بوتیریت برابر با 100 میلی‌مولار و استات صفر برابر با 138/35 میلی‌مولار است. به علت برگشت‌پذیر نبودن تولید استون در مسیر متابولیک، این ماده بر تولید بوتانول تأثیر ندارد ولی حذف آن از مسیر سلولی سبب افزایش تولید می‌شود.

کلیدواژه‌گان: بیوبوتانول، مدل‌سازی، سیمبیولوژی، کلاسترید یوم استوبوتیلیکوم، مسیر متابولیک.

1- مقدمه

چالش تأمین انرژی جهان و محدودیت منابع سوخت‌های فسیلی و اتمام پذیر بودن آن‌ها از یک طرف و آلودگی‌های زیست‌محیطی ناشی از مصرف و تولید آن‌ها از طرف دیگر موجب شده است تا بشر با استفاده از پیشرفت‌های نوین در علم به شناسایی منابع جایگزین مناسب بپردازد. انرژی تجدید پذیر راه‌گشای تولید انرژی بی‌پایان و نویدبخش آینده‌ای پاک است. بر اساس پیش‌بینی سازمان مدیریت اطلاعات انرژی آمریکا¹ میزان استفاده‌ی از انرژی تجدید پذیر در تولید برق در سال 2040 افزایشی به میزان 7 درصد نسبت به سال 2000 خواهد داشت [1]. در میان منابع مختلف انرژی تجدید پذیر، زیست‌توده دارای بیشترین سهم در تولید این انرژی است [2]. روش‌های متنوعی برای دستیابی به انرژی زیستی ذخیره‌شده در زیست‌توده پیشنهاد شده است. به‌طورکلی این روش‌ها به فرایندهای بیوشیمیایی مانند تخمیر و فرایندهای ترموشیمیایی مانند پیرولیز دسته‌بندی می‌شوند [3]. با استفاده از فرایندهای بیوشیمیایی می‌توان این انرژی را از طریق مسیرهای سلولی 2 و در طی واکنش‌های زیستی که توسط آنزیم‌ها کاتالیز می‌گردد، به سوخت‌های زیستی تبدیل نمود [4]. بیوتانول از جمله سوخت‌های زیستی است که می‌تواند به‌عنوان جایگزینی مناسب برای سوخت‌های فسیلی در آینده مطرح گردد. خوردگی کمتر و حلالیت پایین‌تر در آب نسبت به اتانول، امتزاج‌پذیری بیشتر با بنزین در غلظت‌های بالا بدون نیاز به اصلاح وسیله‌ی نقلیه نسبت به اتانول، انرژی حرارتی بالاتر و فشار بخار کمتر از جمله ویژگی‌های این سوخت است که برتری آن را نسبت به اتانول نشان می‌دهد [5]. پتانسیل سنجی تولید این سوخت نیازمند ارزیابی‌های فنی و اقتصادی است که بخشی از آن به‌صورت مطالعات آزمایشگاهی انجام می‌شود. مطالعه‌ی سینتیک سلولی از جمله موارد موردنیاز این ارزیابی‌ها است. سینتیک سلولی عبارت

است از بررسی ارتباط میان نرخ رشد و تولید محصول متابولیکی میکروارگانیسم در یک محیط مشخص و مدل سینتیکی، مدلی است که این رشد را به‌صورت ریاضی بیان می‌نماید [6]. سینتیک سلولی را می‌توان به دو دسته ساختارمند³ و بی‌ساختار⁴ تقسیم نمود [7]. در مدل ساختارمند، فرایندهای داخل سلولی به‌طور صریح مورد بررسی قرار می‌گیرد. در این نوع مدل رفتار یک سلول و رشد آن به اجزای داخلی آن و نرخ رشد آن‌ها ربط داده می‌شود. در مدل بی‌ساختار صرف‌نظر از فرایندهای داخل سلولی روابطی میان رشد سلولی و شرایط محیط کشت آن را بررسی می‌کند. بدیهی است که مدل‌های ساده مانند مونود نمی‌تواند برخی از پدیده‌های موجود در سیستم بیولوژیکی مانند نحوه‌ی تولید آنزیم‌های درون‌سلولی را پیش‌بینی کند. مدل‌سازی مسیر متابولیکی سلولی به‌منظور بهینه‌سازی و طراحی بیوراکتورها و همچنین بررسی تأثیر مواد مختلف در محیط کشت بر رشد سلولی و تولید متابولیت‌ها مورد توجه قرار گرفته است [8-10]. بیوتانول در طی مسیر متابولیکی استون-بوتانول-اتانول و عمدتاً توسط گونه‌های کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم⁵ تولید می‌شود [11]. پاپوتساکیس (1984) مدلی بر اساس استوکیومتری مسیر متابولیک گونه‌های کلاستریدیوم پیشنهاد داد [12]. و تروبا و همکارانش (1986) مدل ریاضی برای محیط کشت ناپیوسته‌ی گونه‌ی کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم بر اساس سنتز متابولیت‌ها گزارش کردند [13]. دسای و همکارانش (1999) مسیر تشکیل اسید را در گونه‌ی کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم مدل‌سازی کردند [14]. شینتو و همکارانش (2008) مدلی پویا برای توصیف مسیر متابولیکی زایلوز و گلوکز در میکروارگانیسم‌های کلاستریدیوم پیشنهاد دادند [15]. کیم و همکارانش (2012) پارامترهای مدلی سینتیکی تخمیر استون-بوتانول- اتانول را توسط الگوریتم ژنتیک تخمین زدند [16]. تأثیر pH بر مسیر متابولیک تولید

³ Structured⁴ Unstructured⁵ Clostridium acetobutylicum¹ U.S. Energy Information Administration (EIA)² Cell pathways

می‌گردد که سپس به مسیر گلایکولیز وارد می‌شوند [11]. لازم به ذکر است گلوکز و زایلوز از جمله قندهای غالب⁷ حاصل از هیدرولیز کاه برنج هستند [18] بنابراین برای شبیه‌سازی فرمانتور خوراک‌دهی شده با مواد حاصل از هیدرولیز کاه برنج برای گونه‌ی کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم می‌بایست هر دو مسیر در نظر گرفته شوند.

3- معادلات مدل مسیر متابولیکی

3-1- معادلات نرخ‌های سینتیکی⁸

نرخ‌های سینتیکی مشخص شده بر روی شکل‌های 1 و 2 توسط معادلات (1) تا (25) بیان می‌گردد [15]. از آن جایی که در نبود سوبسترا مسیر متابولیکی غیرفعال می‌شود از ضریب F در معادلات استفاده می‌شود (F=0 عدم وجود سوبسترا و F=1 حضور سوبسترا در محیط).

$$r_1 = \frac{V_{max1}[Glucose][Biomass]}{K_{m1} + [Glucose]} \times F \quad (1)$$

$$r_2 = \frac{V_{max2}[F6P][Biomass]}{K_{m2} + [F6P]} \times F \quad (2)$$

$$r_2 = \frac{V_{max3}[G3P][Biomass]}{K_{m3} + [G3P]} \times F \quad (3)$$

$$r_4 = \frac{V_{max4}[Lactate][Biomass]}{K_{m4} + [Lactate]} \times F \quad (4)$$

$$r_5 = \frac{V_{max5}[Pyruvate][Biomass]}{K_{m5} + [Pyruvate]} \times F \quad (5)$$

$$r_6 = \frac{V_{max6}[Pyruvate][Biomass]}{K_{m6} + [Pyruvate]} \times F \quad (6)$$

$$r_7 = \frac{V_{max7}[Acetate][Biomass]}{K_{m7} + [Acetate]} \times F \quad (7)$$

$$r_8 = V_{max8} \left(\frac{1}{1 + \frac{K_{m8A}}{[Acetate]}} \right) \left(\frac{1}{1 + \frac{K_{m8B}}{[ACoA]}} \right) [Biomass] \quad (8)$$

$$r_9 = \frac{V_{max9}[ACoA][Biomass]}{K_{m9} + [ACoA]} \times F \quad (9)$$

$$r_{10} = \frac{V_{max10}[ACoA][Biomass]}{K_{m10} + [ACoA]} \times F \quad (10)$$

$$r_{11} = \frac{V_{max11}[ACoA][Biomass]}{K_{m11} + [ACoA]} \times F \quad (11)$$

استون- بوتانول- اتانول در مطالعه‌ای توسط میلان و همکارانش (2013) مدل‌سازی شد [17].

در پژوهش پیش رو هدف شبیه‌سازی تولید استون- بوتانول- اتانول توسط توصیف ریاضی مسیر متابولیکی میکروارگانیزم کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم است. از ابزار سیمپولوزی به منظور این شبیه‌سازی استفاده گردید. تأثیرپذیری متابولیت‌های برون سلولی مانند بوتیریت، استات و استون بر تولید سایر متابولیت‌ها و همچنین نحوه‌ی تغییرات پویای متابولیت‌های درون سلولی به‌عنوان برخی از کاربردهای شبیه‌سازی مسیر متابولیک سلولی در این پژوهش مورد بحث قرار گرفت و چگونگی تغییرات و نقاط بهینه برای غلظت بوتانول و نسبت غلظت بوتانول به مجموع غلظت‌های استون و اتانول، با ترکیب نتایج حاصل از شبیه‌سازی با نرم‌افزار Design Expert محاسبه گردید.

2- شبیه‌سازی سینتیک مسیر متابولیک گونه‌ی

کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم

مسیر متابولیک گونه‌های کلاستریدیوم تولیدکننده‌ی استون- بوتانول- اتانول شامل دو فاز کلی اسید زائی¹ و حلال زائی² است. دیاگرام مسیر متابولیکی گونه‌ی میکروبی کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم در شکل‌های 1 و 2 نشان داده شده است که به ترتیب بیانگر مسیر امبدن- میرهوف- پارس (EMP³) از گلوکز و مسیر پنتوز فسفات (PP⁴) از زایلوز است [15]. هگزوزها⁵ یا قندهای شش کربنه طی مسیر EMP متابولیزه می‌شوند که در آن 1 مول هگزوز به 2 مول پیروات و 2 مول خالص ATP و NADH تبدیل می‌شود. پنتوزها⁶ یا قندهای پنج کربنه طی مسیر PP به پنتوز-5- فسفات تبدیل می‌گردد که در مراحل بعد به فروکتوز-6- فسفات و گلیسرالدهید-3- فسفات تبدیل

¹ Acidogenesis

² Solventogenesis

³ Embden-Meyerhof-Parnas

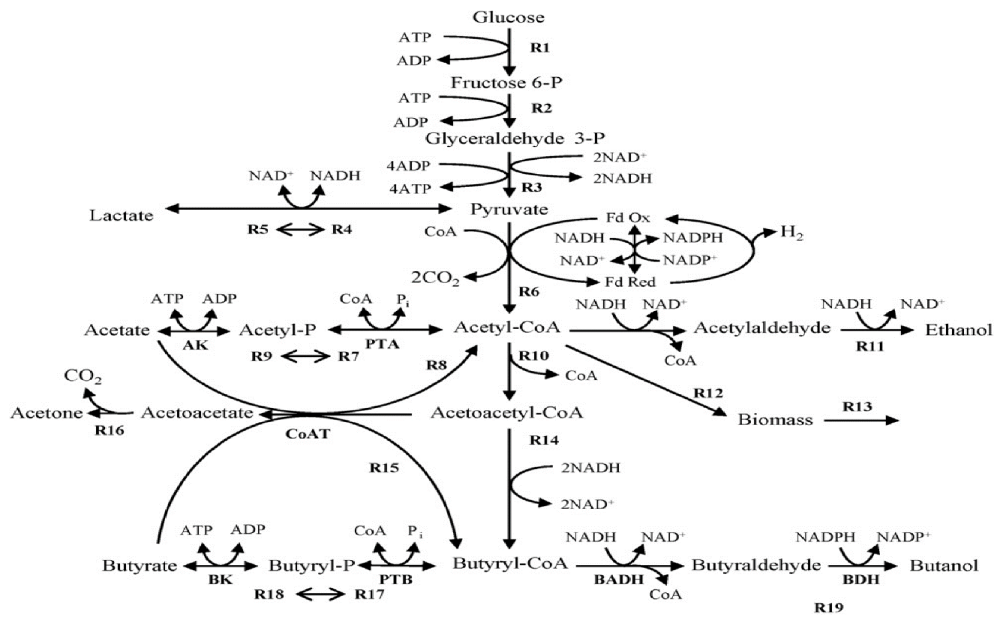
⁴ pentose phosphate

⁵ Hexose

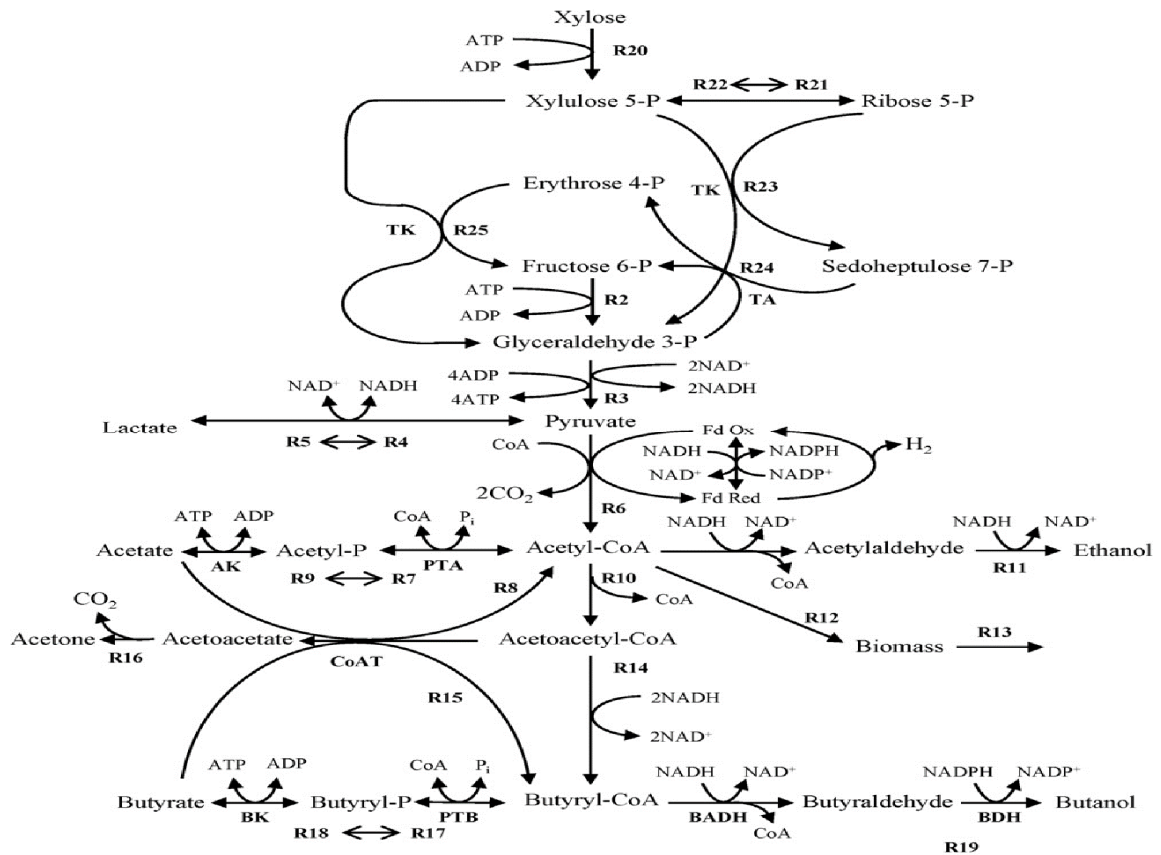
⁶ Pentose

⁷ Predominant sugars

⁸ Kinetic rate equations



شکل 1 مسیر متابولیکی گونه‌ی میکروبی کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم از گلوکز (مسیر EMP) [15].



شکل 2 مسیر متابولیکی گونه‌ی میکروبی کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم از زایلوز (مسیر PP) [15].

$$\frac{d[Glucose]}{dt} = -r_1 \quad (26)$$

$$\frac{d[F6P]}{dt} = r_1 - r_2 \quad (27)$$

$$\frac{d[G3P]}{dt} = r_2 - r_3 \quad (28)$$

$$\frac{d[Pyruvate]}{dt} = r_3 + r_4 - r_5 - r_6 \quad (29)$$

$$\frac{d[Lactate]}{dt} = r_5 - r_4 \quad (30)$$

$$\frac{d[ACoA]}{dt} = r_6 + r_7 + r_8 - r_9 - r_{10} - r_{11} - r_{12} \quad (31)$$

$$\frac{d[Biomass]}{dt} = r_{12} - r_{13} \quad (32)$$

$$\frac{d[Acetate]}{dt} = r_9 - r_7 - r_8 \quad (33)$$

$$\frac{d[Ethanol]}{dt} = r_{11} \quad (34)$$

$$\frac{d[AACoA]}{dt} = r_{10} - r_8 - r_{14} - r_{15} \quad (35)$$

$$\frac{d[Acetoacetate]}{dt} = r_8 + r_{15} - r_{16} \quad (36)$$

$$\frac{d[BCoA]}{dt} = r_{14} + r_{15} + r_{17} - r_{18} - r_{19} \quad (37)$$

$$\frac{d[Butyrate]}{dt} = r_{18} - r_{15} - r_{17} \quad (38)$$

$$\frac{d[Acetone]}{dt} = r_{16} \quad (39)$$

$$\frac{d[CO_2]}{dt} = r_6 + r_{16} \quad (40)$$

$$\frac{d[Butanol]}{dt} = r_{19} \quad (41)$$

همچنین برای زایلوز در مسیر PP معادلات (42 تا 48) به جای

معادلات گلوکز قرار می گیرند:

$$\frac{d[Xylose]}{dt} = -r_{20} \quad (42)$$

$$\frac{d[X5P]}{dt} = r_{20} + r_{22} - r_{21} \quad (43)$$

$$\frac{d[R5P]}{dt} = r_{21} - r_{22} - r_{23} \quad (44)$$

$$\frac{d[S7P]}{dt} = r_{23} - r_{24} \quad (45)$$

$$\frac{d[E4P]}{dt} = r_{24} - r_{25} \quad (46)$$

$$\frac{d[F6P]}{dt} = r_{24} + r_{25} - r_2 \quad (47)$$

$$\frac{d[G3P]}{dt} = r_2 + r_{25} - r_3 - r_{24} \quad (48)$$

4- حل عددی

به منظور حل دستگاه معادلات (26) تا (48) از جعبه ابزار سیمبولوژی¹ نرم افزار متلب استفاده می شود. قبل از تعریف

$$r_{12} = \frac{V_{max12}[ACoA][Biomass]}{K_{m12} \left(1 + \frac{[Butanol]}{K_{ii12}}\right) + [ACoA] \left(1 + \frac{[Butanol]}{K_{ii12}}\right)} \quad (12)$$

$$r_{13} = k_{13}[Biomass] \quad (13)$$

$$r_{14} = \frac{V_{max14}[AACoA][Biomass]}{K_{m14} + [AACoA]} \times F \quad (14)$$

$$r_{15} = V_{max15} \left(\frac{1}{1 + \frac{K_{m15A}}{[Butyrate]}} \right) \left(\frac{1}{1 + \frac{K_{m15B}}{[AACoA]}} \right) [Biomass] \quad (15)$$

$$r_{16} = \frac{V_{max16}[Acetoacetate][Biomass]}{K_{m16} + [Acetoacetate]} \times F \quad (16)$$

$$r_{17} = \frac{V_{max17}[Butyrate][Biomass]}{K_{m17} + [Butyrate]} \times F \quad (17)$$

$$r_{18} = \frac{V_{max18}[BCoA][Biomass]}{K_{m18} + [BCoA]} \times F \quad (18)$$

$$r_{19} = \frac{V_{max19}[BCoA][Biomass]}{K_{m19} + [BCoA]} \times F \quad (19)$$

معادلات (20 تا 25) در مسیر PP برای زایلوز استفاده می شوند:

$$r_{20} = \frac{V_{max20}[Xylose][Biomass]}{K_{m20} \left(1 + \frac{[Xylose]}{K_{is12}}\right) + [Xylose] \left(1 + \frac{[Butanol]}{K_{ii20}}\right)} \quad (20)$$

$$r_{21} = \frac{V_{max21}[X5P][Biomass]}{K_{m21} + [X5P]} \quad (21)$$

$$r_{22} = \frac{V_{max22}[R5P][Biomass]}{K_{m22} + [R5P]} \quad (22)$$

$$r_{23} = V_{max23} \left(\frac{1}{1 + \frac{K_{m23A}}{[R5P]}} \right) \left(\frac{1}{1 + \frac{K_{m23B}}{[X5P]}} \right) [Biomass] \quad (23)$$

$$r_{24} = V_{max24} \left(\frac{1}{1 + \frac{K_{m24A}}{[S7P]}} \right) \left(\frac{1}{1 + \frac{K_{m24B}}{[G3P]}} \right) [Biomass] \quad (24)$$

$$r_{25} = V_{max25} \left(\frac{1}{1 + \frac{K_{m25A}}{[X5P]}} \right) \left(\frac{1}{1 + \frac{K_{m25B}}{[E4P]}} \right) [Biomass] \quad (25)$$

3-2- معادلات ناپایای تغییرات غلظت بیومس، سوپسترا

و متابولیت ها

با توجه به معادلات نرخ های سینتیکی می توان معادلات (26) تا (41) را به منظور توصیف تغییرات غلظت مواد مختلف حاضر در مسیر متابولیک سلولی نوشت [15]:

¹ SimBiology toolbox

دیآگرام سیمبیولوژی مسیر PP نشان داده شده است. در این دیآگرام معادلات (20) تا (25) جانشین معادلات گلوکز می‌شود. ارتباط میان مواد مختلف موجود در مسیر متابولیکی سلول به‌گونه‌ای انجام می‌پذیرد که معادلات (26) تا (48) برقرار گردد. ثوابت سینتیکی نرخ‌های واکنش‌های مسیر EMP و PP در جدول 1 نشان داده شده است [15].

5- نتایج و بحث

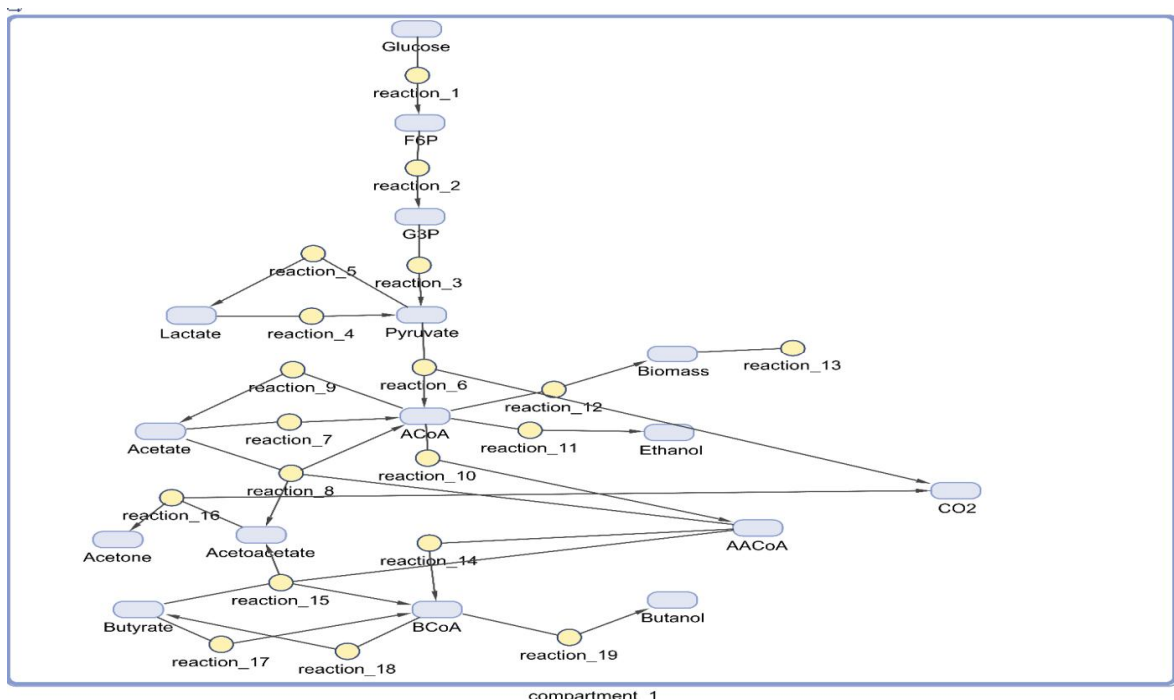
5-1- اعتبارسنجی مدل

ابتدا نتایج حاصل از شبیه‌سازی سیمبیولوژی با نتایج تجربی مقایسه می‌گردد. برای این منظور از غلظت‌های اولیه‌ی گلوکز، بیومس، استات، استون، بوتیریت و بوتانول به ترتیب برابر با $70/6$ ، $1/53$ ، 40 ، 2 ، $1/95$ و $3/83$ میلی‌مولار مندرج در پژوهش شیتو و همکاران [21] در نرم‌افزار استفاده می‌شود. شکل 5 نشان‌دهنده‌ی نتایج شبیه‌سازی و تجربی است که گویای تطابق نسبتاً مناسب مدل با نتایج تجربی به‌ویژه در پیش‌بینی روند تغییرات است.

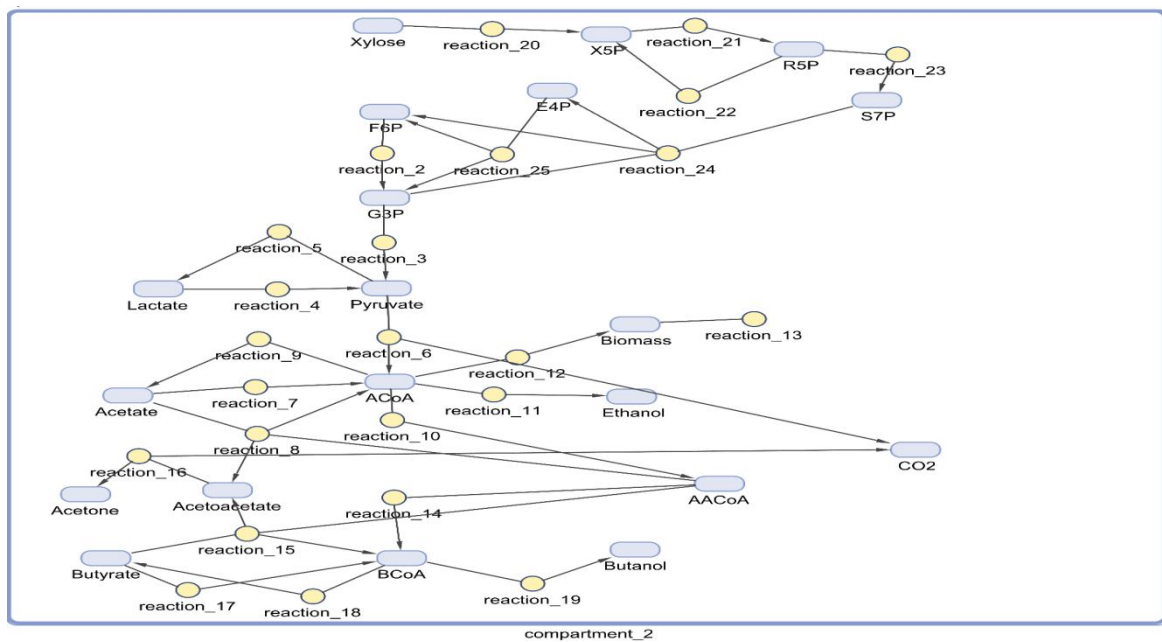
معادلات در سیمبیولوژی توجه به چگونگی مصرف سوبسترای گلوکز و زایلوز توسط گونه‌ی کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم در محیط‌های چند سوبسترای رفتار متفاوتی از خود در مصرف سوبستراها نشان می‌دهند. نتایج آزمایشگاهی [20,19] نشان‌دهنده‌ی رشد دو مرحله‌ای (Diauxic growth) برای گونه‌ی کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم است. یعنی تمایل این گونه‌ی میکروبی برای مصرف گلوکز بیش از زایلوز است و در محیط حاوی این دو سوبسترا ابتدا گلوکز مصرف شده و پس از اتمام آن زایلوز شروع به مصرف شدن می‌نماید [19].

بنابراین می‌بایست هر دسته معادلات مربوط به مصرف گلوکز و زایلوز به‌صورت جداگانه شبیه‌سازی گردد. ابتدا معادلات مصرف گلوکز با شرایط اولیه‌ی حاکم بر فرمانتور حل شده و سپس نتایج حاصل از آن به‌عنوان شرط اولیه برای معادلات زایلوز استفاده می‌گردد.

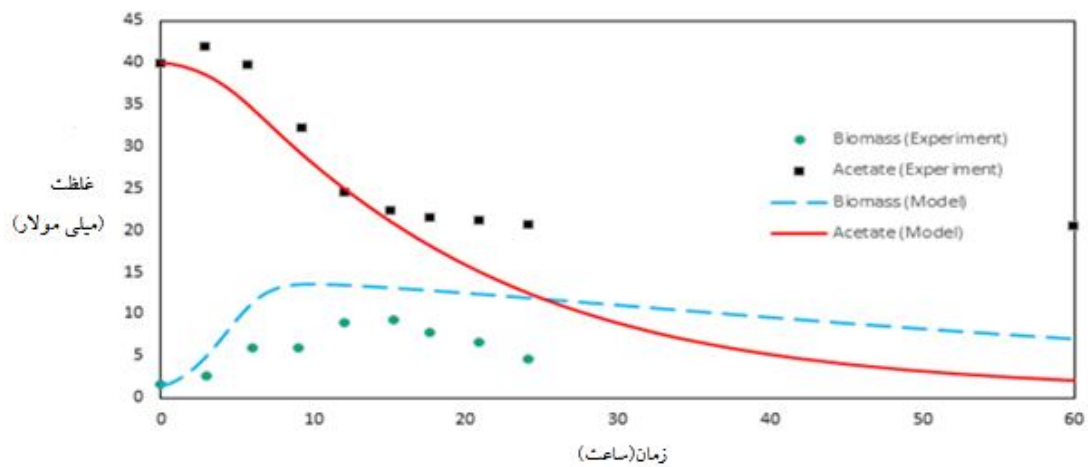
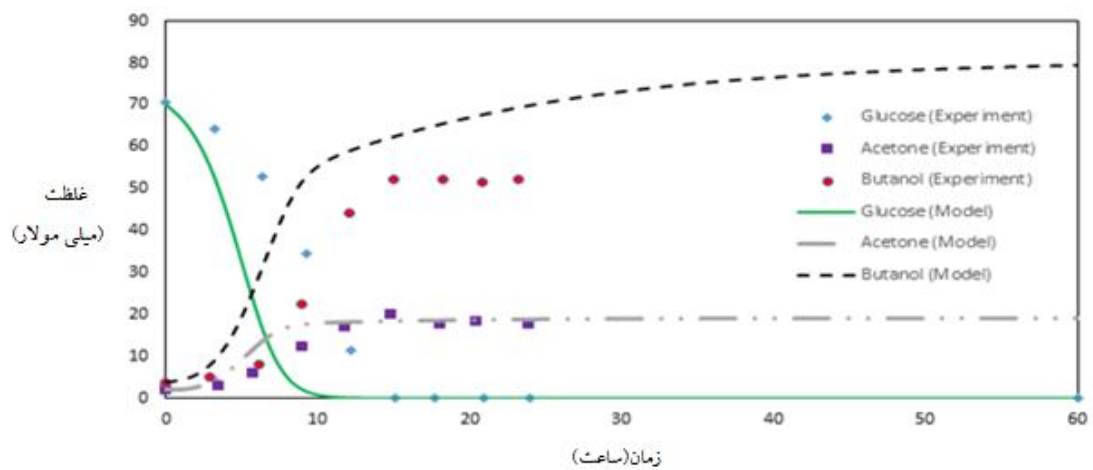
شکل 3 نمودار مسیر EMP نشان داده شده در شکل 1 بر مبنای معادلات (19) تا (19) را نشان می‌دهد. در شکل 4



شکل 3 دیآگرام شبیه‌سازی مسیر متابولیکی گونه‌ی میکروبی کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم از گلوکز (مسیر EMP) در سیمبیولوژی.



شکل 4 دیاگرام شبیه‌سازی مسیر متابولیکی گونه‌ی میکروبی کلاستریدیوم/استوبوتیلیکوم از زایلوز (مسیر PP) در سیمبولوژی



شکل 5 مقایسه‌ی نتایج تجربی [21] با نتایج شبیه‌سازی سیمبولوژی.

جدول 1 ثوابت سینتیکی نرخ‌های واکنش‌های مسیر EMP

(از R₁ تا R₁₉) و مسیر PP (از R₂₀ تا R₂₅) [15].

واکنش	V _{max} (h ⁻¹ l)	K _m (mM)	واکنش	V _{max} (h ⁻¹ l)	K _m (mM)
R ₁	320	46/0	R ₁₄	10/0	5/20
R ₂	40/0	10/0	R ₁₅	80/0	
R ₃	120	26/5	R ₁₆	12/0	10/0
R ₄	7/50	177	R ₁₇	35	4/90
R ₅	9/70	500	R ₁₈	100	6/10
R ₆	180	150	R ₁₉	3/15	5/00
R ₇	0/30	50/0	R ₂₀	1/09	0/026
R ₈	19/0		R ₂₁	0/83	0/026
R ₉	26/5	51/0	R ₂₂	45/0	
R ₁₀	20/0	1/00	R ₂₃	45/0	
R ₁₁	7/45	30/0	R ₂₄	45/0	
R ₁₂	8/10	1/10	R ₂₅	65/0	

بوتانول می‌شود. این در صورتی است که مطابق شکل 7 تغییرات غلظت استون بر تولید بوتانول بی‌تأثیر است. علت اصلی با توجه به

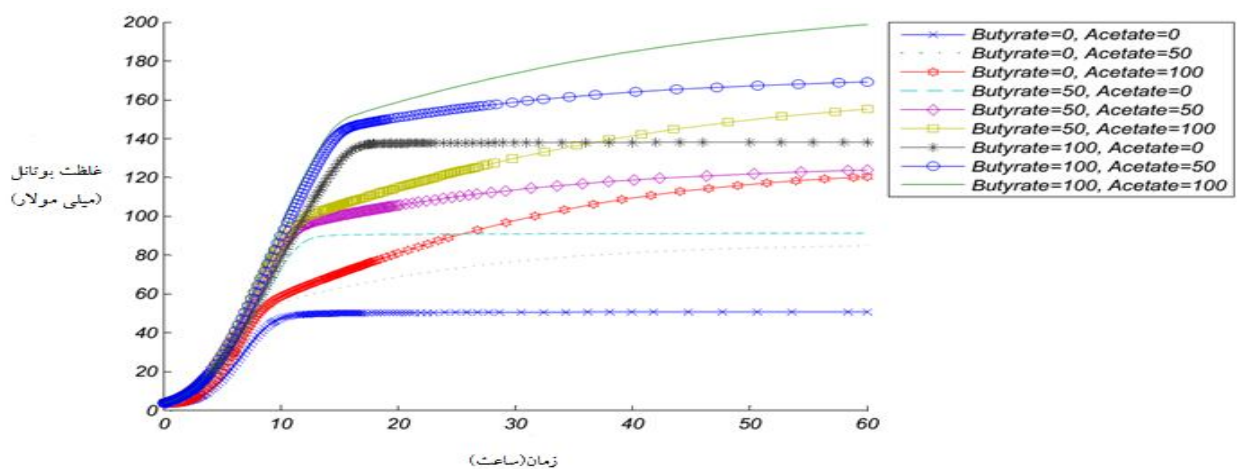
شکل 1، این است که واکنش تولید استات و بوتیریت در مسیر متابولیکی برگشت‌پذیر است، درحالی‌که برای استون این‌گونه نیست. بنابراین مازاد بوتیریت و استات به مسیر اصلی برگشته و سبب تولید بیشتر بوتانول می‌شود. هرچند استون در تولید بوتانول تأثیر نگذاشته است؛ در صورتی‌که با استفاده از روشی (همانند اصلاح ژنتیکی) بتوان مسیر تولید آن را در سلول متوقف نمود، نتیجه‌ی دیگری حاصل می‌شود. در شکل 8 با در نظر گرفتن سرعت تولید صفر برای این ماده در مسیر متابولیکی، نمودار تولید بوتانول با مقدار تولیدی آن در حضور تولید استون مقایسه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان بوتانول تولیدی در غیاب تولید استون افزایش‌یافته است که علت آن تبدیل بیشتر گلوکز به این ماده به‌جای استون است.

نکته‌ی دیگری که از شکل 6 به دست می‌آید، تأثیر بیشتر غلظت بوتیریت بر تولید بوتانول در مقایسه با استات است. برای مثال غلظت بوتانول تولیدی با غلظت اولیه‌ی استات 100 میلی‌مولار و بوتیریت صفر برابر با 120/48 میلی‌مولار است و برای غلظت اولیه‌ی بوتیریت برابر با 100 میلی‌مولار و استات صفر برابر با 138/35 میلی‌مولار است.

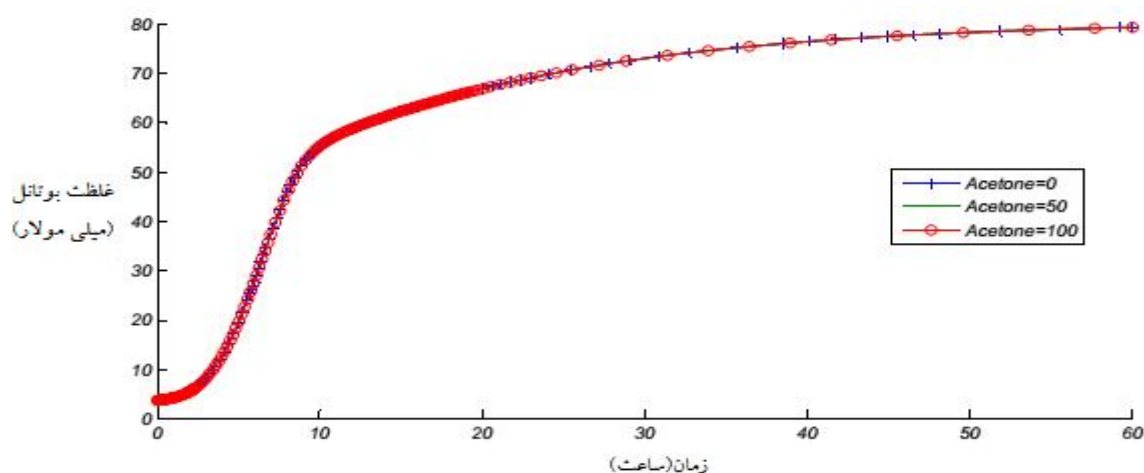
2-5- پیش‌بینی تأثیر غلظت مواد مختلف بر میزان تولید

و بهینه‌سازی تولید بوتانول

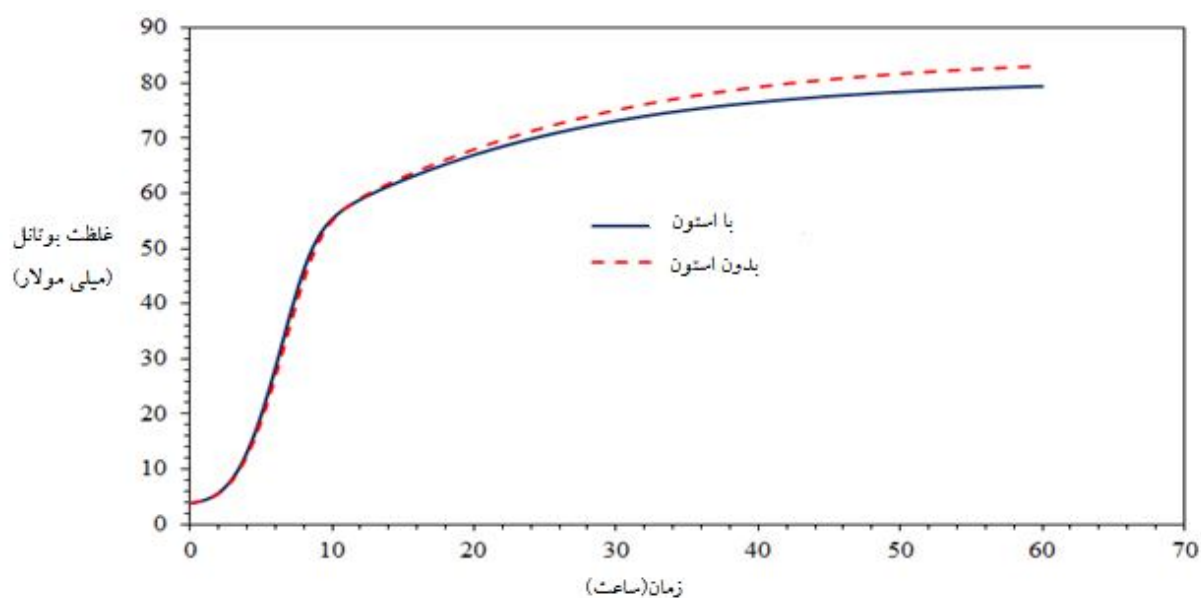
تحقیقات آزمایشگاهی گویای تأثیرپذیری غلظت بوتانول از بوتیریت موجود در محیط کشت است [22]. یکی از مزایای مدل‌سازی مسیر متابولیکی بررسی این‌گونه تأثیرها است. برای این منظور تأثیر بوتیریت و استات بر تولید بوتانول بررسی شد و نتایج آن در شکل 6 نشان داده شده است. مطابق با این نمودار، افزایش هر دو ماده سبب ازدیاد تولید



شکل 6 شبیه‌سازی تأثیر غلظت اولیه‌ی استات و بوتیریت محیط کشت بر بوتانول تولیدی.



شکل 7 شبیه‌سازی تأثیر غلظت اولیه استون محیط کشت بر بوتانول تولیدی.



شکل 8 شبیه‌سازی تغییرات غلظت بوتانول با در نظر گرفتن تولید استون و بدون در نظر گرفتن تولید استون در مسیر متابولیک سلول

مسیر متابولیک سلولی می‌تواند بر میزان تولید محصول تأثیر داشته باشد؛ از این رو مطالعات آزمایشگاهی در این زمینه و به‌ویژه تأثیر سه ماده بوتیریت [24,23]، استات [26,25] و لاکتات [27] ارائه شده است. افزودن این مواد به‌عنوان ترکیبات مکمل یا حذف آن‌ها از محیط کشت نسبت سه محصول استون، بوتانول و اتانول را تغییر می‌دهد. به‌منظور بررسی تأثیر هم‌زمان تغییرات غلظت بوتیریت، استات و لاکتات از نرم‌افزار Design Expert و روش RSM

علاوه بر این زمان کمتری برای رسیدن به مقدار بیشینه بوتانول تولیدی برای هنگامی که غلظت بوتیریت در محیط بیشتر است، نیاز است. برای مثال، در غلظت بوتیریت 50 میلی‌مولار و غلظت اولیه استات صفر این زمان برابر با 13 ساعت است و برای هنگامی که غلظت استات و بوتیریت اولیه به ترتیب برابر با 100 و صفر میلی‌مولار است برابر با 55 ساعت است. همان‌طور که مشاهده شد غلظت مواد مختلف موجود در

نسبت بوتانول به مجموع استون و اتانول (R1) در شکل 9 ترسیم شده است.

جدول 2 نتایج طراحی با RSM.

بوتانول	بوتانول	لاکتات نسبت غلظت بوتانول		استات بوتیریت	
شماره (میلی مولار)	بوتانول (میلی مولار)	میلی (میلی)	میلی (میلی)	میلی (میلی)	میلی (میلی)
(R2)	اتانول (R1)	مولار	مولار	مولار	مولار
149/09	2/71	50	50	50	1
185/97	2/93	50	100	50	2
171/03	2/21	100	50	50	3
138/25	5/01	0	0	100	4
101/15	2/08	100	0	0	5
149/09	2/71	50	50	50	6
149/09	2/71	50	50	50	7
123/83	3/70	0	50	50	8
252/97	2/71	100	100	100	9
149/09	2/71	50	50	50	10
110/64	2/71	50	50	0	11
184/55	2/71	100	0	100	12
170/44	2/37	100	100	0	13
120/48	4/21	0	100	0	14
115/26	2/66	50	0	50	15
50/84	3/98	0	0	0	16
149/09	2/71	50	50	50	17
198/82	4/32	0	100	100	18
149/09	2/71	50	50	50	19
194/43	3/24	50	50	100	20

مطابق شکل 9- الف، با تغییر غلظت بوتیریت و استات، R1 می‌تواند افزایش و یا کاهش یابد و الزاماً افزایش غلظت این دو ماده سبب افزایش تولید بوتانول نسبت به دو محصول دیگر نمی‌شود. علت این موضوع به متابولیسم درون سلول باز می‌گردد. با دقت در شکل 3 مشاهده می‌شود که این دو ماده به‌طور هم‌زمان سبب تغییر غلظت بوتانول، استون و اتانول خواهد شد. نکته‌ی دیگر آن است که در غلظت‌های بالای استات و بوتیریت، مسیر تولید بوتانول غالب شده است.

مرکزی استفاده شد. بر اساس برآزش داده‌ها در این نرم‌افزار می‌توان به مدل ریاضی برای تابعیت غلظت بوتانول از این مواد دست یافت. غلظت‌های سه ماده‌ی فوق در محدوده 0 تا 100 میلی‌مولار تعیین شد و توابع هدف، غلظت بوتانول و نسبت غلظت بوتانول به مجموع غلظت‌های اتانول و استون در نظر گرفته شد. علت آنکه نسبت غلظت بوتانول به دو محصول دیگر به‌عنوان یکی از توابع هدف انتخاب گردید، آن است که با کاهش میزان استون و اتانول، فرایندهای پایین دستی به‌منظور خالص‌سازی بوتانول راحت‌تر و ارزان‌تر خواهند بود؛ ولی در مواردی که محصول به‌صورت مخلوط ABE به فروش می‌رسد، غلظت بوتانول به‌عنوان تابع هدف می‌تواند انتخاب گردد. پس از وارد نمودن مقادیر غلظت طراحی شده در نرم‌افزار Design Expert به سیمبولوژی، غلظت بوتانول و نسبت فوق محاسبه شد که نتایج آن در جدول 2 آورده شده است.

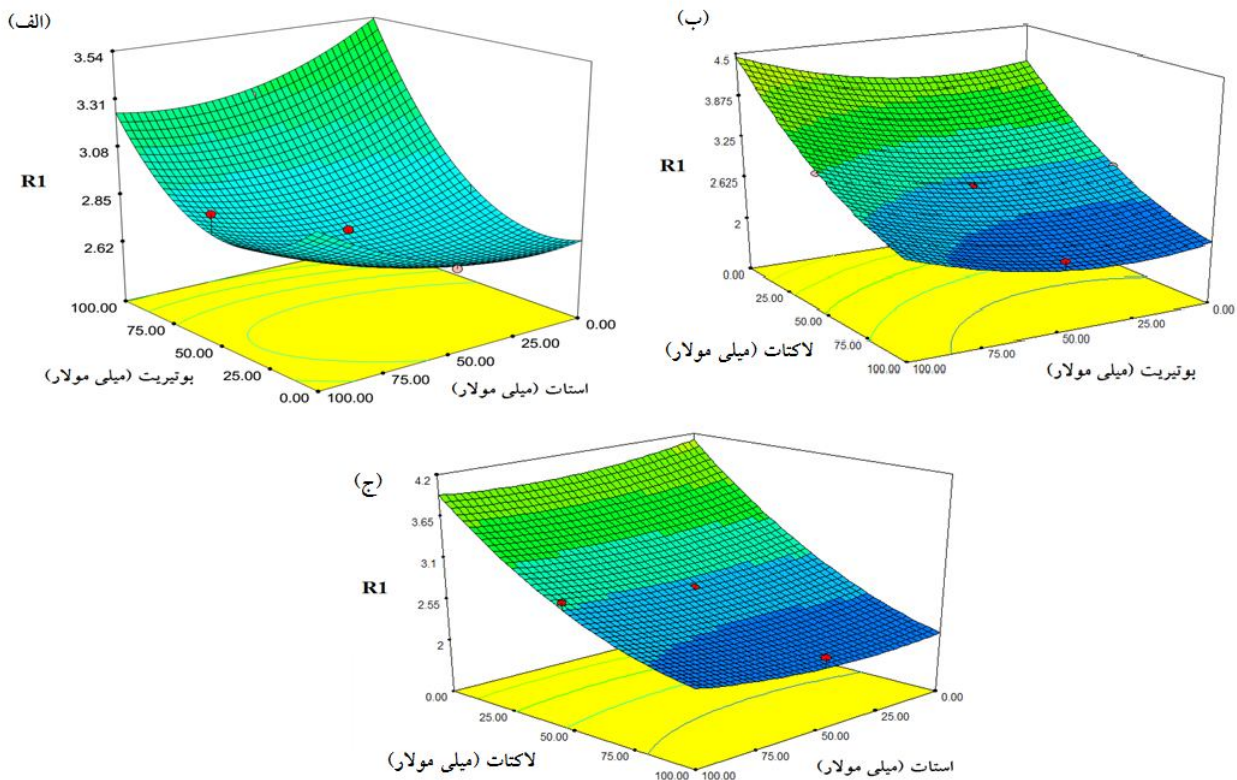
بر اساس تحلیل ANOVA در نرم‌افزار، توابع هدف (R1) و (R2) برحسب غلظت بوتیریت، استات و لاکتات به‌صورت زیر محاسبه گردید:

$$R1 = 3/99613 - 3/90356^{-3} \times \text{Butyrate} - 3/66003^{-3} \times \text{Acetate} - 0.031708 \times \text{Lactate} - 6/09326^{-5} \times \text{Butyrate} \times \text{Acetate} + 3/79803^{-5} \times \text{Acetate} \times \text{Lactate} + 1/22538^{-4} \times \text{Butyrate}^{-2} + 5/00150^{-5} \times \text{Acetate}^2 + 1/15507^{-4} \times \text{Lactate}^2$$

$$R2 = 51/69271 + 0/72108 \times \text{Butyrate} + 0/62548 \times \text{Acetate} + 0/54651 \times \text{Lactate} - 4/96748^{-4} \times \text{Butyrate} \times \text{Acetate} + 3/75363^{-4} \times \text{Acetate} \times \text{Lactate} + 1/34708^{-3} \times \text{Butyrate}^2 + 5/78678^{-4} \times \text{Acetate}^2 - 6/94484^{-4} \times \text{Lactate}^2$$

مقادیر ضریب تعیین (R2) برای معادلات فوق به ترتیب برابر با 0/9851 و 0/9995 محاسبه شد که نشان‌دهنده‌ی تطابق مناسب میان نتایج حاصل از مدل‌سازی با توابع فوق است.

با استفاده از معادلات به‌دست‌آمده، تأثیر غلظت سه ماده بر



شکل 9 تأثیر تغییرات غلظت استات و بوتیریت (غلظت لاکتات=50 میلی مولار)، (ب) لاکتات و بوتیریت (غلظت استات=50 میلی مولار) و (ج) استات و لاکتات (غلظت بوتیریت=50 میلی مولار) بر نسبت بوتانول به مجموع اتانول و استون.

بوتانول افزایش می‌یابد. این مطلب توسط مشاهدات آزمایشگاهی نیز اثبات شده است [24,28]. بر اساس شکل 3، حضور بیشتر این مواد در محیط، واکنش را به سمت تولید بوتانول و همچنین اتانول و استون پیش خواهد برد. نتایج بهینه‌سازی در محدوده تغییرات غلظت 0 تا 100 میلی مولار برای این سه ماده نیز گویای همین امر است و نقطه‌ی بهینه برای حداکثر غلظت بوتانول در غلظت‌های 100 میلی مولار از این سه ماده حاصل می‌شود. هرچند در این نقطه غلظت بوتانول برابر با 252/97 میلی مولار حساب شده است؛ ولی نسبت بوتانول به مجموع استون و اتانول کمتر از مقدار بهینه بر اساس تابع R1 است (جدول 2).

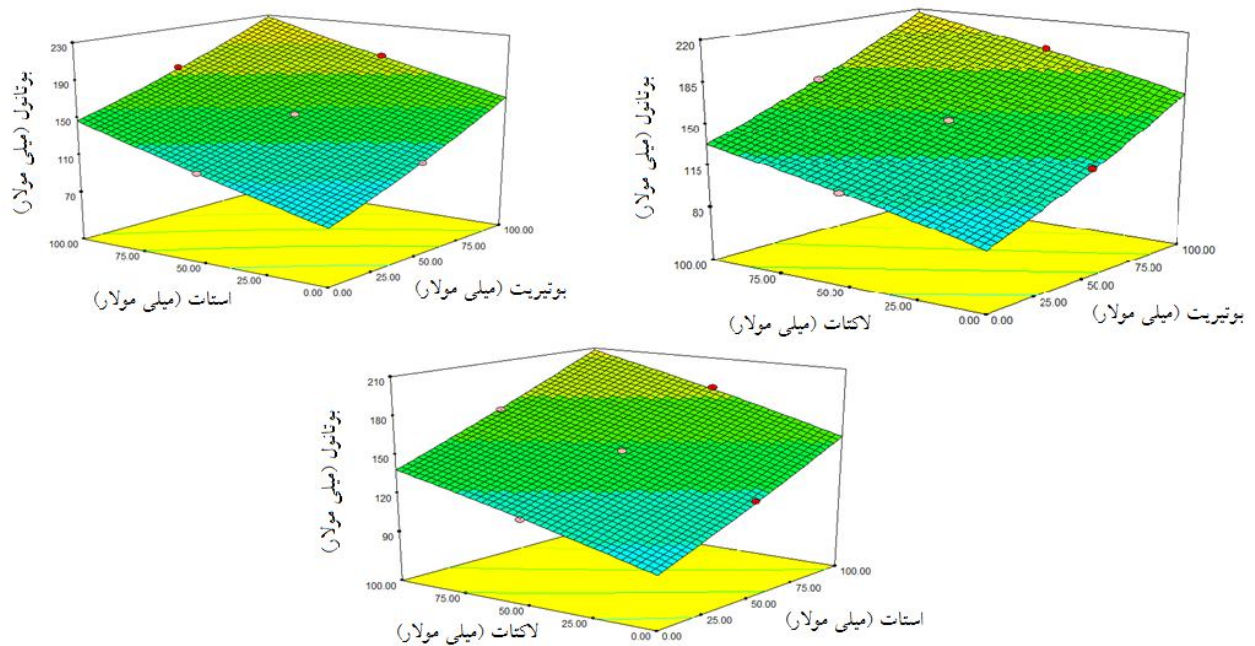
5-3- پیش‌بینی تغییرات آنزیم‌ها و مواد درون سلولی

از کاربردهای دیگر مدل‌سازی مسیر متابولیکی، پیش‌بینی زمان تولید مواد و آنزیم‌های درون سلولی است. برای بررسی

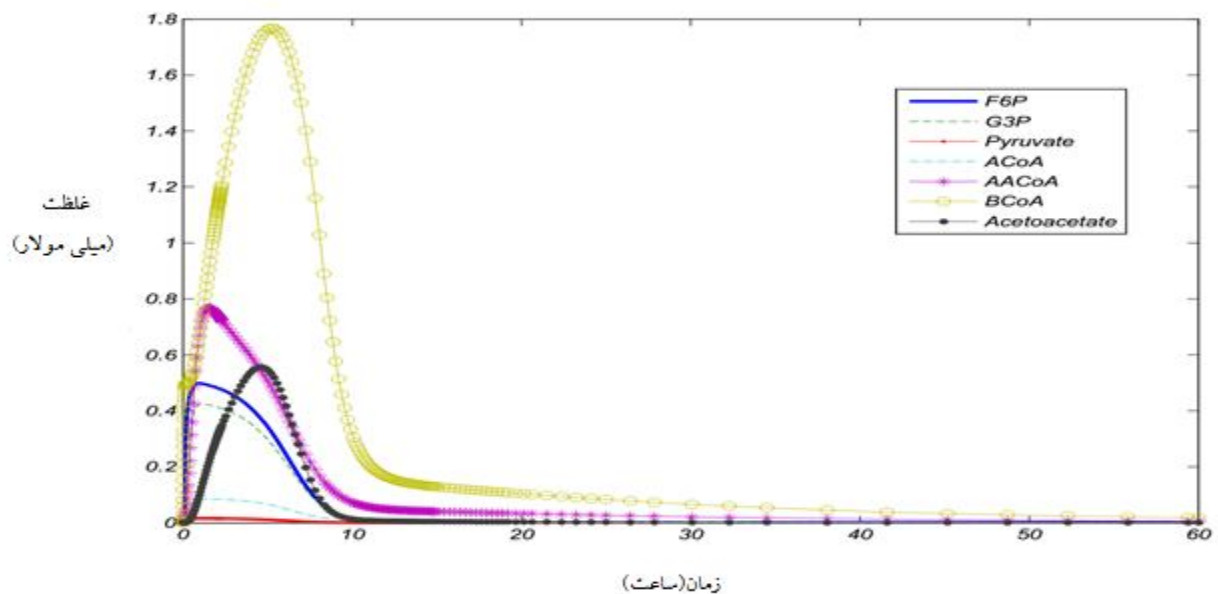
تأثیر افزایش غلظت لاکتات برخلاف تأثیر دو ماده قبل، همواره به صورت نزولی است؛ چراکه بر اساس شکل 3، هر تغییری در مقدار لاکتات ابتدا بر تولید اتانول و استون تأثیر گذاشته و سپس بر تولید بوتانول؛ بنابراین با افزایش غلظت این ترکیب، استون و اتانول بیشتر تولید می‌گردد. علاوه بر این مطابق شکل‌های 9-ب و ج، تأثیر افزایش غلظت لاکتات بسیار بیشتر از بوتیریت و استات است. با استفاده از ابزار بهینه‌سازی نرم‌افزار، حداکثر نسبت بوتانول به مجموع اتانول و استون هنگامی حاصل می‌شود که غلظت بوتیریت برابر با 100 میلی مولار و غلظت لاکتات و استات صفر باشد که در واقع همان نقطه حداکثری در جدول 2 (شماره 4) است. به‌طور مشابه نتایج حاصل از تغییرات بوتیریت، استات و لاکتات بر میزان بوتانول در شکل 10 آورده شده است. برخلاف R1، با افزایش غلظت این سه ماده غلظت

غلظت ماده‌ی غذایی دارد. در شکل 5 گلوکز در 10 ساعت اول مصرف‌شده است و تغییرات مواد مختلف در درون سلول نیز در این 10 ساعت رخ می‌دهد.

این موضوع تغییرات غلظت برخی از مواد درون‌سلولی در طول زمان برای گونه‌ی کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم مطابق با شکل 11 شبیه‌سازی شد. بر اساس این شکل مشاهده می‌شود که عمده تغییرات مواد درون‌سلولی تابعیت از



شکل 10 تأثیر تغییرات غلظت (الف) استات و بوتیریت (غلظت لاکتات=50 میلی مولار)، (ب) لاکتات و بوتیریت (غلظت استات=50 میلی مولار) و (ج) استات و لاکتات (غلظت بوتیریت=50 میلی مولار) بر غلظت بوتانول.



شکل 11 شبیه‌سازی تغییرات غلظت برخی از مواد درون‌سلولی در طول زمان برای گونه‌ی کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم

حاضر در مسیر سلولی می‌تواند بسیار مفید و کاربردی باشد؛ که نیازمند کارهای بیشتر و ترکیب با آزمایش است.

7- منابع

- [1] U.S. Energy Information Administration (EIA). AEO2014 Early Release Overview, [http://www.eia.gov/forecasts/aeo/er/pdf/0383er\(2014\).pdf](http://www.eia.gov/forecasts/aeo/er/pdf/0383er(2014).pdf). 2014.
- [2] Buchholz, T. S. (2008) Science SUoNYCoE, Management FFR. Sustainability Assessments of Bioenergy Systems Using Multi-criteria Analysis: State University of New York College of Environmental Science and Forestry.
- [3] Lanteigne, J. R., Laviolette, J. P., Chaouki, J. (2013) Biomass Pre-Treatments for Biorefinery Applications: Pyrolysis. In: Fang Z, editor. Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries: Springer Berlin Heidelberg, 229-260.
- [4] Lee, J. W. (2012) Advanced Biofuels and Bioproducts: Springer New York.
- [5] Niemistö, J., Saavalainen, P., Isomäki, R., Kolli, T., Huuhtanen, M., Keiski, R. (2013) Biobutanol Production from Biomass. In: Gupta VK, Tuohy MG, editors. Biofuel Technologies: Springer Berlin Heidelberg, 443-470.
- [6] Kovárová-Kovar, K., Egli, T. (1998) Growth Kinetics of Suspended Microbial Cells: From Single-Substrate-Controlled Growth to Mixed-Substrate Kinetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62, 646-666.
- [7] Dunn, I. J., Heinzle, E., Ingham, J., Prenosil, J. E. (2014) Biological Reaction Engineering: Dynamic Modelling Fundamentals with Simulation Examples: Wiley.
- [8] Yuan, J., Zhang, X., Zhu, X., Feng, E., Yin, H., Xiu, Z. (2014) Modelling and pathway identification involving the transport mechanism of a complex metabolic system in batch culture. Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation 19, 2088-2103.
- [9] Jones, J. A., Toparlak, Ö. D., Koffas, M. A. G. (2015) Metabolic pathway balancing and its role in the production of biofuels and chemicals. Current Opinion in Biotechnology 33, 52-59.
- [10] Berramp, X., Os-Rivera, S. J., Bennett, G. N., San, K. Y. (2002) The Effect of Increasing NADH Availability on the Redistribution of Metabolic Fluxes in Escherichia coli Chemostat

اکثر مواد تولیدی به بیشینه‌ای از تولید رسیده و سپس کاهش می‌یابند. بنابراین برای جدا یک ماده خاص از درون سلول می‌توان پیش از رسیدن به مقدار تولید حداکثر، محیط کشت را آماده برای شکست سلولی¹ قرارداد.

6- نتیجه‌گیری

در این مطالعه، کاربرد مدل‌سازی مسیر تولید متابولیت‌های درون و برون سلولی در طراحی و بهینه‌سازی سامانه‌های زیستی مورد بحث قرار گرفت. نتایج شبیه‌سازی نشان داد که حضور برخی از مواد حاضر در مسیر سلولی، در محیط کشت سبب تغییرات غلظت سایر مواد می‌شود. غلظت بوتانول تولیدی در حضور استات و بوتیریت افزایش یافت. تأثیر بوتیریت در تولید بوتانول بیشتر بود (138/35 و 120/48 میلی‌مولار به ترتیب در غلظت 100 میلی‌مولار بوتیریت و استات) و همچنین زمان رسیدن به حداکثر تولید در حضور بوتیریت کاهش یافت (از 55 ساعت در غلظت 100 میلی‌مولار استات به 13 ساعت در غلظت 50 میلی‌مولار بوتیریت). برگشت‌پذیر بودن واکنش تولید این دو ماده علت اصلی افزایش تولید بوتانول بود. استون به علت برگشت‌ناپذیری، تأثیری بر تولید بوتانول نداشت. از طرفی حذف مسیر تولید استون از مسیر متابولیکی سبب تبدیل بیشتر گلوکز به بوتانول شد. تولید متابولیت‌های درون‌سلولی تابعیت از غلظت سوبسترای محیط دارد. عمده‌ی متابولیت‌های درون‌سلولی در زمان خاصی به حداکثر غلظت خود رسیدند و سپس با کاهش غلظت سوبسترا کاهش یافتند؛ بنابراین با استفاده از مدل‌های مسیر متابولیک سلولی می‌توان روندهایی را که به‌آسانی در آزمایشگاه قابل پیش‌بینی نیستند، بررسی نمود. استفاده‌ی از این مدل‌ها در تعیین زمان خالص‌سازی و جداسازی مواد و آنزیم‌های درون‌سلولی و همچنین بهینه‌سازی تولید مواد برون سلولی از طریق پیش‌بینی تأثیر متابولیت‌های مختلف

¹ Cell disruption

- acetobutylicum. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 874-878.
- [21] Shinto, H., Tashiro, Y., Yamashita, M., Kobayashi, G., Sekiguchi, T., Hanai, T., et al. (2007) Kinetic modeling and sensitivity analysis of acetone–butanol–ethanol production. *Journal of Biotechnology* 131, 45-56.
- [22] Tashiro, Y., Takeda, K., Kobayashi, G., Sonomoto, K., Ishizaki, A., Yoshino, S. (2004) High butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in fed-batch culture with pH-Stat continuous butyric acid and glucose feeding method. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 98, 263-288.
- [23] Lee, S. M., Cho, M. O., Park, C. H., Chung, Y. C., Kim, J. H., Sang, B. I., et al. (2008) Continuous Butanol Production Using Suspended and Immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with Supplementary Butyrate. *Energy & Fuels* 22, 3459-3464.
- [24] Wang, Y., Li, X., Blaschek, H. P. (2013) Effects of supplementary butyrate on butanol production and the metabolic switch in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052: genome-wide transcriptional analysis with RNA-Seq. *Biotechnology for Biofuels* 6, 1-13.
- [25] Gao, M., Tashiro, Y., Yoshida, T., Zheng, J., Wang, Q., Sakai, K., et al. (2015) Metabolic analysis of butanol production from acetate in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 using ¹³C tracer experiments. *RSC Advances* 5, 8486-8495.
- [26] Gao, M., Tashiro, Y., Wang, Q., Sakai, K., Sonomoto, K. High acetone–butanol–ethanol production in pH-stat co-feeding of acetate and glucose. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.
- [27] Diez-Gonzalez, F., Russell, J. B., Hunter, J. B. (1995) The role of an NAD-independent lactate dehydrogenase and acetate in the utilization of lactate by *Clostridium acetobutylicum* strain P262. *Archives of Microbiology* 164, 36-42.
- [28] Gu, Y., Hu, S., Chen, J., Shao, L., He, H., Yang, Y., et al. (2009) Ammonium acetate enhances solvent production by *Clostridium acetobutylicum* EA 2018 using cassava as a fermentation medium. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36, 1225-1232.
- Cultures. *Metabolic Engineering* 4, 230-237.
- [11] Jones, D. T., Woods, D. R. (1986) Acetone–butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews* 50, 484-524.
- [12] Papoutsakis, E. T. (1984) Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria. *Biotechnology and bioengineering* 26, 174-187.
- [13] Votruba, J., Volesky, B., Yerushalmi, L. (1986) Mathematical model of a batch acetone–butanol fermentation. *Biotechnology and bioengineering* 28, 247-255.
- [14] Desai, R. P., Harris, L. M., Welker, N. E., Papoutsakis, E. T. (1999) Metabolic flux analysis elucidates the importance of the acid-formation pathways in regulating solvent production by *Clostridium acetobutylicum*. *Metab Eng* 1, 206-213.
- [15] Shinto, H., Tashiro, Y., Kobayashi, G., Sekiguchi, T., Hanai, T., Kuriya, Y., et al. (2008) Kinetic study of substrate dependency for higher butanol production in acetone–butanol–ethanol fermentation. *Process Biochemistry* 43, 1452-61.
- [16] Kim, W., Eom, M. H., Lee, S. H., Choi, J. D. R., Park, S. (2012) Kinetic Study of Metabolic Pathways in *Clostridium acetobutylicum*. 8th IFAC Symposium on Advanced Control of Chemical Processes Proceedings. Singapore.
- [17] Millat, T., Janssen, H., Thorn, G. J., King, J. R., Bahl, H., Fischer, R. J., et al. (2013) A shift in the dominant phenotype governs the pH-induced metabolic switch of *Clostridium acetobutylicum* in phosphate-limited continuous cultures. *Applied microbiology and biotechnology* 97, 6451-6466.
- [18] Wi, S., Choi, I., Kim, K., Kim, H., Bae, H. J. (2013) Bioethanol production from rice straw by popping pretreatment. *Biotechnology for Biofuels* 6, 166.
- [19] Grimmmer, C., Held, C., Liebl, W., Ehrenreich, A. (2010) Transcriptional analysis of catabolite repression in *Clostridium acetobutylicum* growing on mixtures of d-glucose and d-xylose. *Journal of Biotechnology* 150, 315-323.
- [20] Ounine, K., Petitdemange, H., Raval, G., Gay, R. (1985) Regulation and butanol inhibition of D-xylose and D-glucose uptake in *Clostridium*