

مدل سازی شبکه های متابولیکی متانوتروف های هوازی و بی هوازی در مقیاس ژنوم و مقایسه بازدهی آنها به منظور دستیابی به حداکثر زیست توده با هدف تأمین غذای دام و طیور

محمد علیزاده^۱، رضا محمدی^{۲*}، رسول خلیل زاده^۳

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی مولکولی، مرکز تحقیقات علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
 ۲- دکترای تخصصی بیوانفورماتیک، استادیار، مرکز تحقیقات علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.
 ۳- دکترای تخصصی مهندسی شیمی-بیوتکنولوژی، دانشیار، مرکز تحقیقات علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

* صندوق پستی: ۱۷۷۴-۱۵۸۷، تهران، ایران
 rezamohammadi@mut.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۲

دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۶

چکیده

متانوتروف ها میکروارگانیسم هایی هستند که با استفاده از متان به عنوان منبع کربن و انرژی، نقش مهمی در چرخه زیستی کربن دارند و به دلیل توان بالای تولید پروتئین تک یاخته ای، گزینه ای ارزشمند در صنایع زیستی محسوب می شوند. در این پژوهش، به بررسی افزایش تولید زیست توده در شرایط هوازی و غیرهوازی برای سه گونه متانوتروف *Methylococcus capsulatus* (Bath) *Methylomicrobium album* و *Methanoperedens nitroreducens* در محیط *in silico* پرداخته است. ابتدا مدل های متابولیکی این میکروارگانیسم ها (*iJV803*، *iMcBath* و *iMN22HE*) بازسازی و با استفاده از جعبه ابزار COBRA در محیط MATLAB تحلیل شدند. انتخاب واکنش های اصلاح شده بر اساس تحلیل حساسیت شار و مرور منابع علمی مرتبط با نقاط کلیدی در مسیر اکسیداسیون متان و متابولیسم نیتروژن انجام شد. سپس، آنالیز شار متابولیکی (FBA) با هدف ارزیابی زیست توده در حالت پایه و بهینه شده انجام و به مقایسه

کپی رایت © ۲۰۲۵، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس (TMU Press). این مقاله به صورت دسترسی آزاد منتشر شده و تحت مجوز بین المللی Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 قرار دارد. بر اساس این مجوز، شما می توانید این مطلب را در هر قالب و رسانه ای کپی، بازنشر و بازآفرینی کنید و یا آن را ویرایش و بازسازی نمایید، به شرط آنکه نام نویسنده را ذکر کرده و از آن برای مقاصد غیرتجاری استفاده کنید.

نتایج با یکدیگر پرداخته شد. نتایج نشان داد که پس از تغییرات متابولیکی اعمال شده، میزان شار زیست توده *Methylococcus capsulatus*، *Methylomicrobium album* و *Methanoperedens nitroreducens* نسبت به حالت پایه، به ترتیب ۲/۲۸، ۱/۹۴ و ۱/۲۵ برابر افزایش یافت. همچنین، نتایج، تحلیل حساسیت و تغییرپذیری شار نشان دادند که نتایج مدل نسبت به تغییر در نرخ جذب سوسترا پایدار است. با توجه به افزایش چشمگیر زیست توده *Methylococcus capsulatus* (Bath) و بر خورداری از کاربردهای زیستی و صنعتی شناخته شده و نیز در اختیار داشتن فناوری کشت آن نسبت به سایر متانوتروف ها، پیشنهاد می شود تغییرات متابولیکی این مدل در محیط آزمایشگاهی بررسی شود تا به کاربردهای زیستی و صنعتی بیشتری از آن دست یافته شود.

کلید واژگان: مدل سازی شبکه متابولیک، سیستم بیولوژی، متانوتروف، زیست توده

۱- مقدمه

امنیت غذایی، مفهومی چند بعدی به جهت بررسی دسترسی افراد به غذای کافی، سالم و مغذی است [۱]. بنابراین، یکی از مسائل با اهمیت در این زمینه، تامین غذای دام و طیور، به عنوان یکی از مهمترین منابع دریافت انرژی و مواد غذایی، می باشد [۲]. پروتئین تک یاخته^۱ (SCP) اصطلاحی است که به توده سلولی میکروبی اطلاق می شود و به عنوان غذای انسان و خوراک دام و طیور استفاده می شود. در بسیاری از کشورها، گاز طبیعی، که به طور عمده از متان تشکیل شده، به عنوان ماده خام مهمی مورد توجه قرار گرفته است. زیست توده باکتریایی حاصل از متان، حاوی بیش از ۷۵ درصد پروتئین خام است و غنی از اسیدهای آمینه ضروری مانند لیزین و ویتامین ها نیز می باشد. متان به راحتی و به طور مستمر در محلول قابل اندازه گیری است، به آسانی از محصول نهایی جدا می شود و احتمال آلودگی با سایر میکروارگانیسم ها به حداقل می رسد. همچنین، فرایند تولید آن مؤثر و نسبتاً اقتصادی است [۳ و ۴].

متانوتروف ها میکروارگانیسم هایی هستند که از متان به عنوان تنها منبع کربن و انرژی استفاده می کنند. بیش از

۳۰ سال است که باکتری های اکسیدکننده متان توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده اند. این باکتری ها به دلیل ویژگی های منحصر به فرد میکروبیولوژیکی و متابولیک خود، پتانسیل صنعتی بالایی دارند و همین امر موجب افزایش علاقه به مطالعه و بهره برداری از آنها شده است [۵]. این دسته از میکروارگانیسم ها، با ویژگی های متابولیکی منحصر به فرد خود، متان را از طریق اکسیداسیون هوازی و بی هوازی مصرف می کنند. در شرایط هوازی، این فرایند توسط آنزیم های مونواکسیژنازی pMMO^۲ و sMMO^۳ انجام می شود که متان را به متانول و سپس به فرمالدئید تبدیل می کنند. پس از فرمالدئید، دو مرحله اکسیداسیون دیگر برای جذب کربن استفاده می شوند [۶]. *Methylococcus capsulatus* (Bath) یک باکتری متانوتروف هوازی گرم منفی و عضو گاما پروتئوباکترها است که نقش مهمی در چرخه کربن و تولید SCP برای خوراک دام و طیور دارد. این باکتری با بیان هر دو نوع آنزیم مونواکسیژناز فعالیت می کند، اما نحوه انتقال الکترون آن به pMMO همچنان در حال بررسی است [۷]. گونه *Methylomicrobium album* BG8 نیز، یکی دیگر از متانوتروف های هوازی متعلق به گروه گاما پروتئوباکترها،

³ Soluble methane monooxygenases

¹ Single-cell protein

² Particulate methane monooxygenases

مقدار بهینه شده بود که بیانگر پایداری مدل‌ها و وجود تنها یک فضای کوچک از پاسخ‌های ممکن است. میزان شار واکنش زیست توده در مدل‌های متابولیکی مورد نظر بر حسب واحد $\text{mmol gDW}^{-1} \text{h}^{-1}$ نشان داده شده که متناسب با نرخ رشد (μ) میکروارگانیسم‌ها در نظر گرفته شده است. تابع هدف مدل‌ها، بهینه‌سازی واکنش زیست توده برای افزایش بازده آن تحت شرایط حالت پایا بود. پس از به دست آمدن مقدار شار مرتبط با زیست توده توسط آنالیز FBA در میکروارگانیسم‌های مورد نظر، با قرار دادن آن در رابطه‌ی زیر، زمان تقسیم سلولی هر یک از آنها محاسبه شد:

$$\text{زمان دو برابر شدن سلول} = \frac{\ln(2)}{\text{نرخ رشد}}$$

۲-۲ بهینه‌سازی شبکه متابولیک *Methylococcus capsulatus* (iMcBath) به منظور افزایش زیست توده

مدل متابولیکی iMcBath شامل ۸۷۹ متابولیت، ۹۱۳ واکنش و ۷۳۰ ژن کد کننده پروتئین است [۷]. متانوتروف هوازی اجباری *Methylococcus capsulatus* برای اکسیداسیون متان از یک مونواکسیژناز غشایی به نام pMMO، بهره می‌برد. به واسطه عدم دسترسی به ساختار دقیق پروتئین فوق، سه فرضیه‌ی مربوط به مکانیسم انتقال الکترون به آن ارائه شده است [۷]. بنابراین، با توجه به عدم قطعیت مکانیسم دقیق به کار گرفته شده توسط میکروارگانیسم فوق، در بازسازی مدل متابولیکی فوق، سه فرضیه مختلف به صورت مجزا بررسی شد و سپس به اعمال تغییر در محدودیت‌های واکنش‌های متابولیکی در هر کدام اقدام شد.

در فرضیه‌ی اول، به مکانیسم انتقال الکترون توسط روش Uphill electron transfer پرداخته شد که واکنش مرتبط با آن به شرح زیر است:

بر این اساس، پس از جستجو و یافتن مدل‌های متابولیکی در مقیاس ژنوم برای متانوتروف‌های هدف و شناسایی مسیرهای متابولیسمی دخیل در زیست توده و قرار دادن آن به عنوان تابع هدف، به ایجاد تغییرات در محدودیت‌های واکنش‌های دخیل در زیست توده در مدل‌های متابولیکی شبکه و وارد کردن واکنش‌های مورد نیاز پرداخته شد. سپس، با انجام آنالیز تعادل شار متابولیکی^۱ (FBA) توسط جعبه ابزار COBRA و حل کننده GLPK در محیط نرم افزار متلب نسخه ۲۰۲۳a بر روی مدل‌های شبکه متابولیکی بازسازی شده، به مقایسه تغییرات زیست توده ایجاد شده میان میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه پرداخته شد.

۱-۲ آنالیز تعادل شار متابولیکی (FBA) و تحلیل تغییرپذیری شار^۲ (FVA)

آنالیز تعادل شار متابولیکی (FBA)، یک روش بسیار پر کاربرد در آنالیز شبکه‌های متابولیک بازسازی شده در سال‌های اخیر است. این آنالیز، یک روش ریاضی برای شبیه سازی شبکه‌های متابولیک در مقیاس ژنوم است که مبتنی بر محدودیت‌های فیزیکیوشیمیایی و استوکیومتری عمل کرده و فنوتیپ‌های قابل محاسبه را برای یافتن یک جواب بهینه محدود می‌کند. جعبه ابزار COBRA بر اساس رویکرد FBA طراحی شده که در بستر نرم افزار مطلب قابل به استفاده است [۱۶]. بنابراین، برای انجام آنالیز FBA برای دستیابی به میزان زیست توده میکروارگانیسم‌های مورد نظر، از جعبه ابزار CBORA در محیط نرم افزار MATLAB استفاده شد.

دامنه‌ی تغییر مجاز شار واکنش‌های کلیدی (NADH dehydrogenase, methane monooxygenase, reductase) در مدل‌های مورد مطالعه بررسی شد. نتایج نشان داد که تغییرات در این شارها کمتر از ۸ درصد از

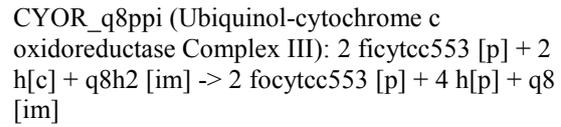
² Flux Variability Analysis

¹ Flux Balance Analysis

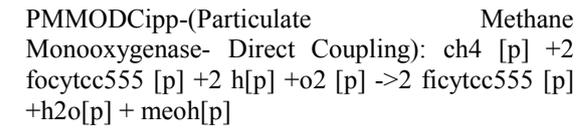
حاضر میزان مصرف متان را از حالت پایه (-mmol gDW) ۱ hr-1 به ۱۸/۴۶ mmol gDW-1 hr-1 در مدل مربوطه افزایش داده شد. در نهایت، پس از قرار دادن زیست‌توده به‌عنوان تابع هدف، مجدد آنالیز FBA را پس از اعمال تغییرات فوق انجام شد.

۳-۲ بهینه‌سازی شبکه متابولیکی *Methylobacterium album* (iJV803) برای افزایش زیست‌توده

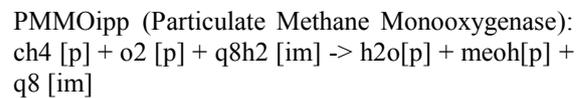
این مدل متابولیکی شامل ۱۳۶۷ متابولیت، ۱۳۵۸ واکنش و ۸۰۳ ژن کدکننده پروتئین است [۸]. در مدل مورد مطالعه فوق، همانند باکتری *Methylococcus capsulatus* در ابتدا به بررسی انواع تئوری‌های مختلف مکانیسم انتقال الکترون‌ها به PMMOها پرداخته شد. با این حال، رویکرد اصلی انتقال الکترون در مطالعه مربوطه، مکانیسم Uphill electron transfer در نظر گرفته شده است. با این وجود، نوع واکنش مربوطه، به‌صورت دو طرفه بود. بر این اساس، مطابق مدل iMcBath، واکنش فوق به‌صورت یک طرفه اصلاح شد [۷]. در ابتدا پس از قرار دادن زیست‌توده به عنوان تابع هدف، آنالیز FBA اولیه برای تخمین میزان زیست‌توده پایه این باکتری انجام شد. در ادامه، به بررسی سایر رویکردهای موثر در بهینه‌سازی زیست‌توده باکتری *Methylobacterium album* پرداخته شد. در مدل مورد مطالعه به‌صورت پایه، میزان مصرف متان توسط سیستم ۸ mmol gDW-1 hr-1 و میزان مصرف اکسیژن ۱۲ mmol gDW-1 hr-1 و میزان ATP مصرفی ۸/۳۹ hr-1 تعیین شده است. با این حال، با بررسی انجام شده در مطالعات مختلف مشاهده شد که میزان مصرف ATP مورد نیاز توسط میکروارگانیسم برای سنتز ماکرومولکول‌های مورد نیاز می‌تواند تا ۲۲/۸۷۳ hr-1 افزایش یابد [۱۹]. مقادیر تجربی نرخ‌های مصرف متان و اکسیژن متانوتروف‌ها در حداکثر نرخ رشد در دسترس نیستند [۱۸]. با این حال، مقدار مصرف متان را مطابق یک مدل متابولیکی ارائه شده برای یک متانوتروف



در فرضیه‌ی دوم، به مکانیسم انتقال الکترون توسط روش Direct Coupling پرداخته شد که واکنش مرتبط با آن به شرح زیر است:



در فرضیه‌ی سوم نیز، به مکانیسم انتقال الکترون وابسته به روش Redox-arm پرداخته شد که واکنش مربوط به آن به شرح زیر است:



برای مقایسه مجزای هر یک از فرضیه‌های مطرح شده، سایر مکانیسم‌های انتقال الکترون در مدل متابولیکی مورد نظر غیرفعال شد. بر این اساس، پس از قرار دادن زیست‌توده به‌عنوان تابع هدف در مدل مورد مطالعه، سه بار مدل متابولیکی مورد نظر آنالیز شد تا میزان زیست‌توده پایه بر اساس هر یک از فرضیه‌ها، مشخص شود. سپس، تغییرات متابولیکی که در ادامه به آنها پرداخته می‌شود، برای هر سه فرضیه انجام شد. بر این اساس، ابتدا واکنش‌های مرتبط با نیتريت ردوکتاز (شناسه R05712)، آلفاکتوگلاتارات دهیدروژناز (شناسه R08549)، ۲-آگزوگلاتارات دهیدروژناز (شناسه R01197) در مدل متابولیکی فعال شد. ژن‌های نیتريت ردوکتاز (MCA2059)، آلفاکتوگلاتارات دهیدروژناز (MCA1952) و ۲-آگزوگلاتارات دهیدروژناز (MCA1953) مرتبط با این واکنش در ژنوم *Methylococcus capsulatus* (NC_002977) شناسایی شده است. مطابق جستجوی انجام شده، میزان متان مصرفی توسط *Methylococcus capsulatus* به‌عنوان تنها منبع کربن، می‌تواند تا ۲۸/۱۰ gDW-1 hr-1 افزایش یابد [۱۸]. بنابراین، در مطالعه

دارد. بر این اساس، از آنجایی که هدف ما صرفاً ارتقا زیست توده میکروارگانیسم‌های متانوتروف می‌باشد، ابتدا به جستجوی واکنش‌های کلیدی مربوط به تولید متان پرداخته شد. بنابراین، واکنش MCR، به‌عنوان یک واکنش اصلی در متابولیسم متان شناسایی شد. به‌طوری که یا آخرین مرحله تولید متان و یا اولین مرحله اکسیداسیون متان را کاتالیز می‌کند. بر این اساس، ابتدا برای اصلاح واکنش فوق برای مصرف متان به‌صورت یک‌طرفه و نه تولید آن، واکنش متیل‌کوآنزیم M ردوکتاز (MCR) مربوطه در مدل متابولیسی فوق به‌صورت یک‌طرفه و در جهت مصرف متان، اصلاح شد. یکی از واکنش‌های دخیل در ورود اسید آمینه گلوتامات (انتقال سیم پورت سدیم با گلوتامات) در مدل مورد استفاده حذف شده بود. استفاده از گلوتامات در فیکس شدن کربن و متابولیسم نیتروژن می‌تواند نقش موثری در تولید انرژی و رشد باکتری ایفا کند و بنابراین، در مدل فوق فعال شد.

هوای دیگر (*Methylococcus buryatense* strain) (5GB1)، $18/5 \text{ gDW}^{-1} \text{ hr}^{-1} \text{ mmol}$ و میزان مصرف اکسیژن را $23/26 \text{ mmol gDW}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ ، در نظر گرفته شد [۱۸و۲۰].

۲-۴ بهینه‌سازی شبکه متابولیک (iMN22HE) *Methanoperedens nitroreducens* برای افزایش زیست توده

این مدل متابولیسی، شامل ۸۱۳ واکنش، ۶۸۴ متابولیت و ۴۵۲ ژن کد کننده است [۱۷]. پس از قرار دادن زیست توده به‌عنوان تابع هدف در آنالیز FBA در حالت پایه برای میکروارگانیسم فوق، تغییرات متابولیسی مورد نظر بر روی آن اعمال شد. *M. nitroreducens* از متانوزنر معکوس با نیترات به‌عنوان گیرنده الکترون پایانی استفاده می‌کند [۲۱]. این میکروارگانیسم نوعی متانوتروف بی‌هوایی است که در برخی از شرایط قابلیت متانوزن بودن را نیز

جدول ۲ اطلاعات تکمیلی متابولیت‌های دخیل در واکنش‌های متابولیسی مربوط به مدل‌های مورد مطالعه

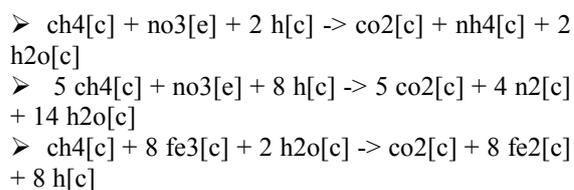
موقعیت سلولی	شناسه واکنش (ID KEGG)	نام کامل متابولیت	متابولیت (اختصار)
پری پلاسم [p]	C01070	ferricytochrome c	ficytcc553
سیتوزول [c]	C00080	H (+)	h [C]
غشای درونی [im]	C00390	Ubiquinol-8	q8h2
پری پلاسم [p]	C01071	ferrocyclochrome c	foicytcc553
پری پلاسم [p]	C00080	H (+)	h [P]
غشای درونی [im]	C17569	Ubiquinone-8	q8
پری پلاسم [p]	C01438	Methane	ch4 [p]
سیتوزول [c]	C01438	Methane	ch4 [c]
خارج سلول [e]	C00244	Nitrate	no3
سیتوزول [c]	C00011	CO ₂	co2
سیتوزول [c]	C01342	Ammonium	nh4
سیتوزول [c]	C00001	H ₂ O	h2o [c]
پری پلاسم [p]	C00001	H ₂ O	h2o [p]
سیتوزول [c]	C00697	Nitrogen	n2
سیتوزول [c]	C14819	Fe (3+)	fe3
سیتوزول [c]	C14818	Fe (2+)	fe2

nitroreducens نسبت به حالت پایه آنها، سبب افزایش محسوسی در میزان زیست توده آنها شد. به طوری که میزان زیست توده *Methylococcus capsulatus* (Bath) در مکانیسم های انتقال الکترون به روش Uphill electron transfer، Direct coupling، transfer و Redox arm، نسبت به حالت پایه، به ترتیب ۲/۲۸، ۱/۳۷ و ۲/۰۴ برابر افزایش یافته است. همچنین، میزان زمان دو برابر شدن سلولی برای مکانیسم های فوق در حالت پایه به ترتیب ۲۳۳/۶۴۵ دقیقه، ۱۵۷/۵۳ دقیقه و ۲۳۳/۶۴۵ دقیقه بوده است که در حالت تغییر یافته، کاهش قابل توجهی در آن مشاهده شد (نمودار ۱).

همچنین، تغییرات شار واکنش زیست توده متانوتروف های *Methanoperedens* و *Methylomicrobium album* BG8 نیز نسبت به حالت پایه، ترتیب ۱/۹۴ و ۱/۲۵ برابر افزایش یافته است (نمودار ۲ و نمودار ۳). بر این اساس، بیشترین میزان افزایش زیست توده نسبت به حالت پایه در میان تمامی متانوتروف های مورد مطالعه، به ترتیب مربوط به *Methylococcus capsulatus* (Bath) (با فرض در نظر گرفتن Uphill electron transfer)، *Methanoperedens* و *Methylomicrobium album* BG8 *nitroreducens* می باشد.

مطابق جستجوی انجام شده مشاهده شد که ۳ واکنش دخیل در متابولیسم متان وابسته به نیترات و آهن در متانوتروف های بی هوازی، در مدل مورد مطالعه وجود نداشت. بنابراین، به اضافه کردن واکنش های فوق به مدل متابولیکی هدف اقدام شد و آنالیز FBA مجدد انجام شد [۲۲].

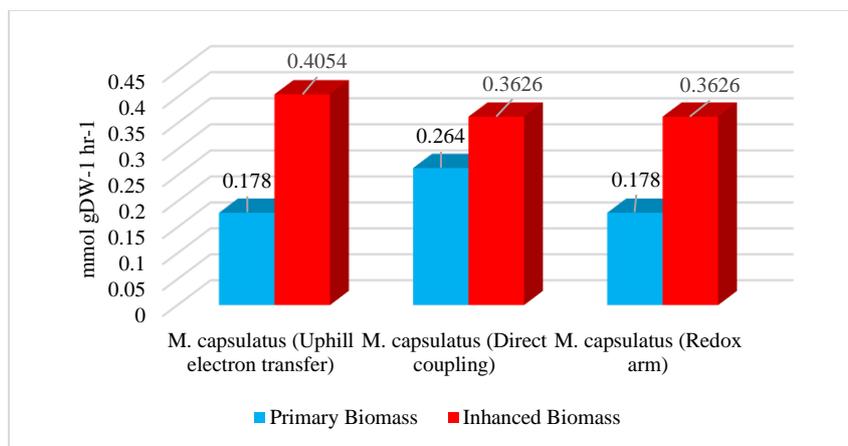
این سه واکنش فوق عبارتند از:



در جدول ۲، به ارائه اطلاعات تکمیلی در خصوص متابولیت های مربوط به تمامی واکنش های متابولیکی در ۳ میکروارگانیسم مورد مطالعه پرداخته شده است.

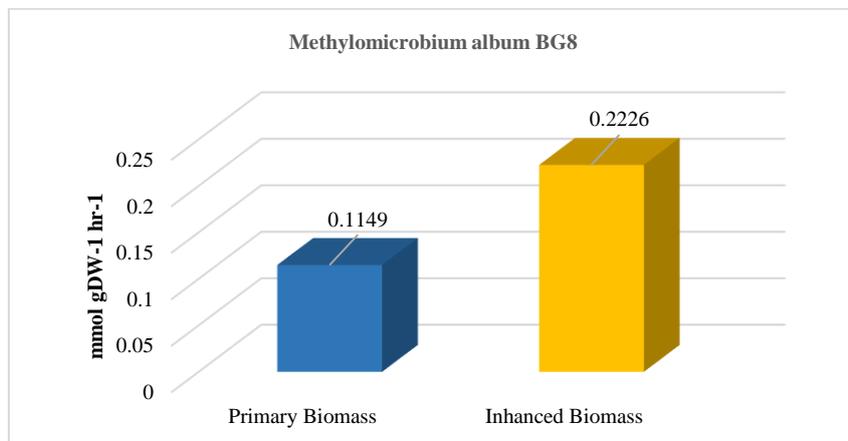
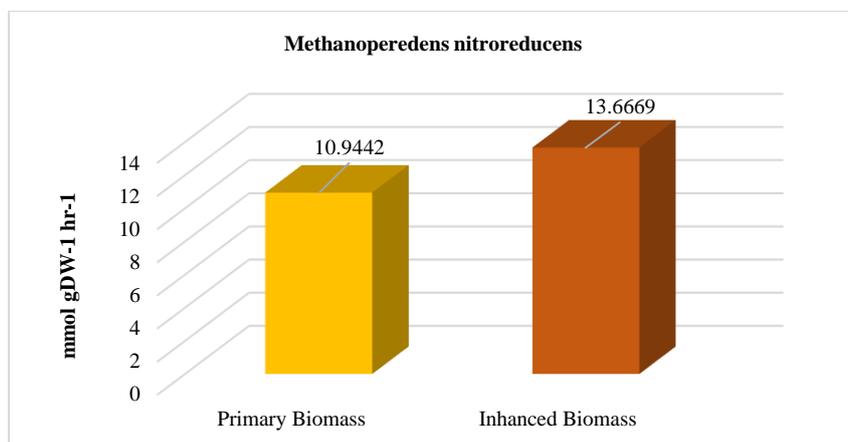
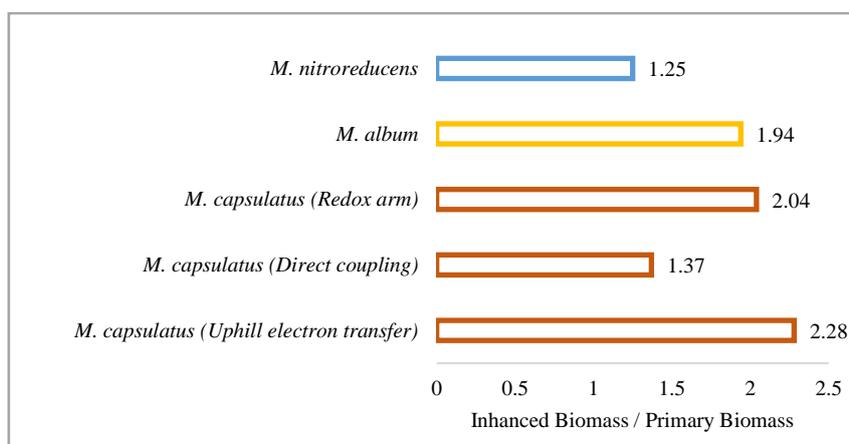
۳-نتایج

مطابق نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر مشاهده شد که بازسازی شبکه های متابولیکی متانوتروف های *Methylococcus capsulatus* (Bath) و *Methanoperedens* و *Methylomicrobium album* BG8



نمودار ۱ مقایسه میزان تغییرات شار واکنش زیست توده *Methylococcus capsulatus* (Bath) در سه حالت مکانیسم انتقال الکترون

pMMO

نمودار ۲ مقایسه میزان تغییرات زیست توده *Methylobacterium album*نمودار ۳ مقایسه میزان تغییرات زیست توده *Methanoperedens nitroreducens*

نمودار ۴ مقایسه نسبت زیست توده تغییر یافته به زیست توده اولیه در متانوتروف‌های مورد مطالعه

سال‌های اخیر، SCP تولید شده از متان، به خوبی مورد توجه قرار گرفته است [۲۳].
متان یک منبع تجدیدپذیر است که سالیانه با افزایش جمعیت و فعالیت‌های انسانی، آنت‌شار آن در حال افزایش است. در ایران نیز نرخ آنت‌شار متان به اتم‌سفر، نسبت به چهار دهه اخیر، رشدی ۱۴۵ درصدی را نشان داده است [۲۳، ۲۴].

بنابراین، بهره‌گیری از استراتژی‌های موثر در کاهش میزان متان محیط و اثرات مخرب زیست‌محیطی آن توأم با استفاده از آن به‌عنوان یک منبع ارزان قیمت کربن در جهت توسعه پروتئین‌های میکروبی می‌تواند حائز اهمیت باشد.

در نمودار ۴ و جدول ۳، به مقایسه نسبت شار واکنش زیست‌توده تغییر یافته نسبت به شار واکنش زیست‌توده اولیه در میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه پرداخته شده است. در جدول ۴، نیز به مقایسه زمان دو برابر شدن سلولی در میکروارگانیسم‌های مورد نظر پرداخته شده است.

۴- بحث

پروتئین تک سلولی (SCP یا پروتئین میکروبی) یکی از منابع پروتئین جایگزین در حال ظهور برای مقابله با چالش جهانی ناامنی غذایی است. به طوری که فراوانی نسبی بالایی از اسیدهای آمینه ضروری را داراست و در

جدول ۳ مقایسه تغییرات زیست‌توده در مدل‌های متابولیکی مورد مطالعه

مدل متابولیکی	میکروارگانیسم مورد مطالعه	مکانیسم متابولیسم متان	میزان زیست‌توده اولیه (mmol gDW-1 hr-1)	میزان زیست‌توده ثانویه (mmol gDW-1 hr-1)	نسبت تغییر زیست‌توده
iMcBath	<i>Methylococcus capsulatus</i>	متانتروف هوازی (Uphill) (transfer electron)	۰/۱۷۸۰	۰/۴۰۵۴	۲/۲۸ برابر (۱۲۷/۷۵)
iMcBath	<i>Methylococcus capsulatus</i>	متانتروف هوازی (Direct) (coupling)	۰/۲۶۴۰	۰/۳۶۲۶	۱/۳۷ برابر (+۳۷/۳۴)
iMcBath	<i>Methylococcus capsulatus</i>	متانتروف هوازی (Redox) (arm)	۰/۱۷۸۰	۰/۳۶۲۶	۲/۰۴ برابر (+۱۰۳/۷)
iJV803	<i>Methylochromium album</i> BG8	متانتروف هوازی	۰/۱۱۴۹	۰/۲۲۲۶	۱/۹۴ برابر (+۹۳/۷۳)
iMN22HE	<i>Methanoperedens nitroreducens</i>	متانتروف غیر هوازی (وابسته به احیای نیترات)	۱۰/۹۴۴۲	۱۳/۶۶۶۹	۱/۲۵ برابر (+۲۴/۸۸)

جدول ۴ مقایسه زمان دو برابر شدن سلولی در میکروارگانیسم‌های مورد نظر (بر حسب دقیقه)

متانتروف	حالت پایه	حالت بهینه شده
<i>Methylochromium album</i>	۳۶۱/۶۵	۱۸۶/۸۳
<i>Methylococcus capsulatus</i> (Uphill electron transfer)	۲۳۳/۶۴۵	۱۰۲/۵۸۷
<i>Methanoperedens nitroreducens</i>	۳/۸	۳،۰۴

معطوف شده است [۲۵]. از آنجایی که سرعت اکسیداسیون کربن توسط *M. Capsulatus* از طریق pMMO ۱/۵ برابر بیشتر از حالت دیگر است [۲۶]، تمرکز بر مکانیسم‌های انتقال الکترون به pMMO می‌تواند موثر باشد. بر این اساس، سه فرضیه مطرح شده در خصوص مکانیسم احتمالی انتقال الکترون به آن به صورت مجزا بررسی شد که مطابق یافته‌های حاصل شده، مکانیسم electron Uphill transfer بیشترین میزان زیست‌توده را نسبت به دو مکانیسم دیگر باعث شده است. این مکانیسم انتقال الکترون در مدل iJV803 مربوط به *Methylomicrobium album* BG8 نیز به عنوان مکانیسم اصلی شناسایی شده است [۸]. بیشترین میزان افزایش زیست‌توده مربوط به مدل متابولیکی iMN22HE مربوط به متانوتروف بی‌هوازی *Methanoperedens nitroreducens* است که استفاده از آن با توجه به زمان‌های بسیار طولانی (۶ تا ۱۸ ماه) جهت انکوباسیون و عدم توسعه محیط‌های کشت غنی شده تجاری برای آن [۲۷]، توصیه نمی‌شود. در عوض، متانوتروف هوازی *Methylococcus (Bath) capsulatus* که پس از اعمال تغییرات، بیشترین میزان افزایش زیست‌توده را پس از متانوتروف بی‌هوازی داشته و دارای شرایط کشت راحت‌تر بوده و نیز از کاربردهای صنعتی مختلف به‌ویژه استفاده به‌عنوان پروتئین میکروبی برخوردار است، می‌تواند مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

۴-۱-۱ اعتبارسنجی مدل‌های متابولیکی مورد مطالعه

به‌طور کلی مقادیر تجربی نرخ‌های مصرف متان و اکسیژن متانوتروف‌ها در حداکثر نرخ رشد گزارش شده در دسترس نیستند [۱]. با این حال، در مطالعه‌ای میزان جذب متان *Methylococcus capsulatus* در شرایط با رشد بهینه، $28/1 \text{ mmol gDW}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ تخمین زده شده است [۱۸]. بر این اساس، این میزان مبنای مقدار جذب متان برای مدل متابولیکی iMcBath قرار گرفته است. عنوان شده است که

با پیشرفت‌های صورت گرفته در حوزه بیوتکنولوژی، امکان توسعه روش‌های جدید کشت میکروبی، شرایط تخمیر و مهندسی میکروارگانیسم‌ها، وجود دارد. به‌طوری که به‌عنوان مثال، با استفاده از باکتری متانوتروف *Methylococcus capsulatus*، تولید بالایی از پروتئین‌های میکروبی از طریق مصرف گاز طبیعی، گزارش شده است. بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف بومی‌سازی فناوری فوق و بهره‌مندی هر چه بیشتر از منابع طبیعی برای پاسخ به نیازمندی‌های موجود در صنایع مختلف، انجام شد. بنابراین، در مطالعه حاضر، بر اساس روش‌های محاسباتی، پتانسیل مسیرهای مختلف برای اکسیداسیون میکروبی متان برای افزایش تشکیل زیست‌توده میکروارگانیسم‌های *Methylococcus capsulatus (Bath)* و *Methanoperedens* و *Methylomicrobium album* BG8 *nitroreducens* ارزیابی شد. استفاده از یک رویکرد *in silico* برای محاسبه و نیز افزایش قابلیت متابولیک موجودات برای رشد و تولید ترکیبات مختلف از منبع متان، به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی، امکان ایجاد مسیرهای امیدوارکننده را برای دستیابی به این مهم، میسر می‌سازد. رویکرد اصلی در پژوهش حاضر، دستیابی به راهکارهای مهندسی متابولیک برخی از میکروارگانیسم‌های متانوتروف در جهت ساخت میکروارگانیسم‌های جدید بوده است تا بتوان از طریق آن، زیست‌توده بیشتری را بنا بر اهداف مربوطه، به‌دست آورد.

در مدل iMcBath مربوط به *Methylococcus capsulatus* [۷]، انواعی از تغییرات وابسته به اکسیداسیون هوازی متان ایجاد شد. بخش مهمی از مطالعات انجام شده در این راستا، بر کشف ساختار ژنتیکی و متابولیک منحصر به فرد آن متمرکز شده است. با این حال، بیشترین علاقه مطالعاتی به نقش و عملکرد آنزیم اولیه در متانوتروپی، متان مونواکسیژناز^۱، به‌عنوان مسئول اکسیداسیون متان به متانول

¹ Methane monooxygenase

میزان زیست‌توده بیشتر به واسطه‌ی مهندسی متابولیک متانوتروف‌های فوق به صورت عملی، مطابق با راهکارهای پیشنهاد شده در این مطالعه، می‌تواند عملی باشد. نکته آخر اینکه نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل‌ها و مدل سازی‌های بیوانفورماتیکی و زیست‌شناسی سامانه‌ها، برای تأیید نهایی، می‌بایست در آزمایشگاه و به صورت عملیاتی پیاده‌سازی شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مسئولان دانشگاه و پژوهشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر برای فراهم کردن زمینه و امکانات این پژوهش تشکر و قدردانی می‌کنند.

تأییدیه اخلاقی

نویسندگان این پژوهش، اعلام می‌کنند که در پژوهش حاضر آزمایشی بر روی انسان یا حیوان صورت نگرفته است و هیچگونه آسیبی به محیط زیست وارد نشده است.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافی میان نویسندگان وجود ندارد.

سهم نویسندگان

محمد علیزاده (نویسنده اول)، نگارنده مقاله و پژوهشگر اصلی (۵۰ درصد)؛ رضا محمدی (نویسنده مسئول)، روش‌شناس و پژوهشگر کمکی (۳۰ درصد)؛ رسول خلیل‌زاده، پژوهشگر کمکی (۲۰ درصد).

منابع مالی

پژوهش حاضر، هیچگونه حمایت مالی را نداشته است.

۶- منابع

- [1] Safari, Y. (2023). Review of food security indices in Iran and the forgotten role of soil. *Land Management Journal*, 11(1), 15-29.
- [2] Ghomsheh, A., Hosseini-Yekani, A., & Mojaverian, M. (2023). Calculating the efficiency and effectiveness of livestock and

میزان مصرف متان بسیار بیشتر از آنچه توسط آنالیز FBA پیشنهاد شده، می‌باشد. نسبت مقادیر جذب اکسیژن و متان محاسبه شده توسط مدل با مقادیر تجربی موجود، تأیید می‌کند که برای رشد بهینه متانوتروف‌های هوازی، مقدار اکسیژن مورد نیاز تقریباً برابر یا کمی بیشتر در مقایسه با متان مورد نیاز است [۱۸ و ۲۸]. بر این اساس، مقدار نرخ جذب متان و اکسیژن برای متانوتروف *Methylococcus album BG8* مشابه با مقادیر تجربی مربوط به میکروارگانیسم مرتبط و هم خانواده با آن، *Methylococcus buryatense* 5GB1 به ترتیب $23/26 \text{ mmol gDW}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ و $18/5 \text{ mmol gDW}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ در مدل متابولیکی iJV803 در نظر گرفته شده است [۲۰]. این امر به دلیل عدم در اختیار داشتن داده‌های تجربی مرتبط با نرخ جذب متان و اکسیژن مربوط به میکروارگانیسم فوق انجام شده است. بر این اساس، این یک فرض و یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌باشد و نتایج ممکن است تحت تأثیر این فرض قرار گرفته باشد.

۵- نتیجه‌گیری

هدف اصلی دانش سیستم بیولوژی، بهره‌گیری از ظرفیت بزرگ علوم بین رشته‌ای همچون کامپیوتر، ریاضی و آمار برای کمک به حل مسائل زیست‌شناسی است. در این مطالعه تلاش شد قبل از ورود به محیط آزمایشگاه با نگاه زیست‌شناسی سامانه‌ها، بهینه‌سازی تولید زیست‌توده توسط متانوتروف‌های *Methylococcus (Bath)* و *Methylococcus album BG8 capsulatus* مورد ارزیابی قرار گیرد. مطابق با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر می‌توان گفت که سه مدل متابولیکی بهینه شده به کمک COBRA Tollbox در نرم‌افزار MATLAB، از توانایی بالاتری در افزایش میزان زیست‌توده نسبت به حالت پایه برخوردار بودند. در این راستا، می‌توان اذعان کرد که دست‌یابی به

- production in methane oxidation coupled with denitrification: current status, challenges, and future opportunities. *Fermentation*, 9(7), 645.
- [12] Yang, Y., Shen, L., Zhao, X., Agathokleous, E., Wang, S., Ren, B. ... & Wu, H. (2023). Long-term fertilization enhances the activity of anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction and associated microbial abundance in paddy soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 185, 109130.
- [13] Carter, E. L., Constantinidou, C., & Alam, M. T. (2024). Applications of genome-scale metabolic models to investigate microbial metabolic adaptations in response to genetic or environmental perturbations. *Briefings in Bioinformatics*, 25(1), bbad439.
- [14] Cooke, J., Delmas, M., Wieder, C., Rodríguez Mier, P., Frainay, C., Vinson, F. ... & Jourdan, F. (2024). Genome scale metabolic network modelling for metabolic profile predictions. *PLOS Computational Biology*, 20(2), e1011381.
- [15] Navid, A. (2022). A Beginner's Guide to the COBRA Toolbox. *Microbial Systems Biology: Methods and Protocols*, 339-365.
- [16] Mohammadi, R., Zahiri, J., & Niroomand, M. J. (2018). Reconstruction and modeling of integrated metabolic network of a cyanobacterium to increase the production of biofuels. *Modares Journal of Biotechnology*, 9(2), 193-199.
- [17] He, B., Cai, C., McCubbin, T., Muriel, J. C., Sonnenschein, N., Hu, S., ... & Marcellin, E. (2022). A genome-scale metabolic model of *Methanoperedens nitroreducens*: assessing bioenergetics and thermodynamic feasibility. *Metabolites*, 12(4), 314.
- [18] Gupta, A., Ahmad, A., Chothwe, D., Madhu, M. K., Srivastava, S., & Sharma, V. K. (2019). Genome-scale metabolic reconstruction and metabolic versatility of an obligate methanotroph *Methylococcus capsulatus* str. Bath. *PeerJ*, 7, e6685.
- [19] Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction. *Nature protocols*, 5(1), 93-121.
- [20] de la Torre, A., Metivier, A., Chu, F., Laurens, L. M., Beck, D. A., Pienkos, P. T., ... & Kalyuzhnaya, M. G. (2015). Genome-scale metabolic reconstructions and theoretical poultry production with the aim of achieving food security in provinces of Iran. 30(3):1-32
- [3] García Martínez, J. B., Pearce, J. M., Throup, J., Cates, J., Lackner, M., & Denkenberger, D. C. (2022). Methane single cell protein: Potential to secure a global protein supply against catastrophic food shocks. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10, 906704.
- [4] Bratosin, B. C., Darjan, S., & Vodnar, D. C. (2021). Single cell protein: A potential substitute in human and animal nutrition. *Sustainability*, 13(16), 9284.
- [5] Kuźniar, A., Furtak, K., Włodarczyk, K., Stępniewska, Z., & Wolińska, A. (2019). Methanotrophic bacterial biomass as potential mineral feed ingredients for animals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(15), 2674.
- [6] Keltjens, J. T., Pol, A., Reimann, J., & Op den Camp, H. J. (2014). PQQ-dependent methanol dehydrogenases: rare-earth elements make a difference. *Applied microbiology and biotechnology*, 98, 6163-6183.
- [7] Lieven, C., Petersen, L. A., Jørgensen, S. B., Gernaey, K. V., Herrgard, M. J., & Sonnenschein, N. (2018). A genome-scale metabolic model for *Methylococcus capsulatus* (Bath) suggests reduced efficiency electron transfer to the particulate methane monooxygenase. *Frontiers in microbiology*, 9, 2947.
- [8] Villada, J. C., Duran, M. F., Lim, C. K., Stein, L. Y., & Lee, P. K. (2022). Integrative genome-scale metabolic modeling reveals versatile metabolic strategies for methane utilization in *Methylomicrobium album* BG8. *Msystems*, 7(2), e00073-22.
- [9] Tays, C., Guarnieri, M. T., Sauvageau, D., & Stein, L. Y. (2018). Combined effects of carbon and nitrogen source to optimize growth of proteobacterial methanotrophs. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2239.
- [10] Kits, K. D., Campbell, D. J., Rosana, A. R., & Stein, L. Y. (2015). Diverse electron sources support denitrification under hypoxia in the obligate methanotroph *Methylomicrobium album* strain BG8. *Frontiers in microbiology*, 6, 1072.
- [11] Zheng, X. C., Li, H. S., Wang, Z. H., Sun, Z. F., & Zhao, L. (2023). Intermediates

- 161-166
- [25] Ross, M. O., & Rosenzweig, A. C. (2017). A tale of two methane monooxygenases. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 22, 307-319.
- [26] Avdeeva, L., & Gvozdev, R. (2017). Effect of copper concentration on the growth of methylococcus capsulatus (Strain M). *Chemistry Journal of Moldova*, 110-114.
- [27] Guerrero-Cruz, S., Cremers, G., van Alen, T. A., Op den Camp, H. J., Jetten, M. S., Rasigraf, O., & Vaksmaa, A. (2018). Response of the anaerobic methanotroph "Candidatus Methanoperedens nitroreducens" to oxygen stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(24), e01832-18.
- [28] Islam, T., Larsen, Ø. Torsvik, V., Øvreås, L., Panosyan, H., Murrell, J. C., & Bodrossy, L. (2015). Novel methanotrophs of the family Methylococcaceae from different geographical regions and habitats. *Microorganisms*, 3(3), 484-499.
- investigation of methane conversion in Methylococcus burkatense strain 5G (B1). *Microbial cell factories*, 14, 1-15.
- [21] Ahmadi, F., & Lackner, M. (2024). Recent findings in methanotrophs: genetics, molecular ecology, and biopotential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 60.
- [22] Ettwig, K. F., Zhu, B., Speth, D., Keltjens, J. T., Jetten, M. S., & Kartal, B. (2016). Archaea catalyze iron-dependent anaerobic oxidation of methane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(45), 12792-12796.
- [23] Ma, Y., Liu, T., Yuan, Z., & Guo, J. (2024). Single cell protein production from methane in a gas-delivery membrane bioreactor. *Water Research*, 259, 121820.
- [24] Yaghmaeian, K., Panahi Fard, M., Ahmadi Moghadam, M., Mousavi, M., Jaafarzadeh, N., Omidinasab, M. ... & Feizi, R. (2024). CH₄ and CO₂ emissions rate of Iranian municipal wastewater treatment plants using IPCC and USEPA approaches. *Environmental Health Engineering and Management Journal*. 11(2):

Reconstruction and comparison of genome-scale metabolic network models of aerobic and anaerobic methanotrophs to achieve maximum biomass efficiency (in Silico)

Mohammad Alizadeh¹, Reza Mohammadi^{2*}, Rasoul Khalilzadeh³

1. M.Sc. in Molecular Biotechnology, Research Center of Science and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

2. PhD in Bioinformatics, Assistant Professor, Research Center of Science and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

3. PhD in Chemical Engineering-Biotechnology, Associate Professor, Research Center of Science and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

rezamohammadi@mut.ac.ir

Receipt: 2025/01/06

Accepted: 2025/12/03

Abstract

Objectives: Methanotrophs are microorganisms that utilize methane as a carbon and energy source, playing a crucial role in the carbon cycle. Due to their high potential for single-cell protein (SCP) production, they are considered valuable candidates in biotechnological industries. This study aimed to investigate the enhancement of biomass production under aerobic and anaerobic methane conditions for three *methanotrophic* species *Methylococcus capsulatus* (Bath), *Methylomicrobium album* BG8, and *Methanoperedens nitroreducens* using in silico approach. The genome-scale metabolic models of these microorganisms (iMcBath, iJV803, and iMN22HE) were reconstructed and analyzed using the COBRA Toolbox in the MATLAB environment. Target reactions for optimization were selected based on flux sensitivity analysis and a comprehensive literature review identifying key reactions in methane oxidation and nitrogen metabolism. Subsequently, Flux Balance Analysis (FBA) was performed to evaluate biomass flux under baseline and optimized conditions, and the results were comparatively assessed. After the applied metabolic modifications, the biomass flux of *M. capsulatus*, *M. album*, and *M. nitroreducens* increased by 2.28, 1.94, and 1.25-fold compared to their baseline states, respectively. Moreover, flux sensitivity and variability analyses indicated that the model predictions were robust against changes in substrate uptake rates. Given the substantial increase in biomass yield of *Methylococcus capsulatus* (Bath), along with its established biotechnological relevance and available cultivation technology, it is recommended that the proposed metabolic modifications be experimentally validated to expand its potential industrial and bioprocess applications.

Keywords: Metabolic network modeling, Systems biology, Methanotrophs, Biomass