

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي
خَلَقَ الْمَوَدَّعَةَ
الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي
خَلَقَ الْمَوَدَّعَةَ



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری‌های نوین

گروه بیوتکنولوژی

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست فناوری (بیوتکنولوژی) گرایش

میکروبی

ایجاد سویه پیکیا پاستوریس مقاوم به مایکوفنولیک اسید از طریق انتقال ژن

کدکننده‌ی اینوزین منوفسفات دهیدروژناز

اساتید راهنما:

دکتر ماندانا بهبهانی

دکتر باقر یخچالی

استاد مشاور:

دکتر سید صفاعلی فاطمی

پژوهشگر:

مرضیه ثنایی

بهمن ماه ۱۳۹۰

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات
و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه اصفهان است.

این پژوهش به صورت طرح تحقیقاتی با حمایت مالی و همکاری
پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ایران
انجام گردید.

پس خدای را که بر ما منّت نهاد به فرستادن گوهر یک رانه وجود « بصمیالی امر » و خستمان تمامی قول و نه
تصرفین که پیشین آفرین امرت قرار داد، خدای که ما را در شمار فرزوانی بخشید و بر تریمان داد.

در این مجال شایسته است از زحمات بی دریغ و رانه نایب های حکیمانه ی اساتید پیرینه و بزرگوارم

جناب آقایان باقری، خدوکی، تهریزد، صفا علی، فاطمی، کارخانم، دکتر ماندانا، بهبهانی

شاکر و قدردانی ز ما یم.

تقدیرم بزرگوار و مادر مهربانم:

برای مادرم که مهرش درد ام کرامتی و مقدس است

پدرم که مهرش بنایی شد برای تلاش پر شورم در کرب دانش.

چکیده

مایکوفنولیک اسید یک متابولیت ثانویه قارچی است که توسط گونه‌های مختلف پنی‌سیلیوم، به ویژه پنی‌سیلیوم بروی‌کامپکتوم تولید می‌شود. به دلیل عملکرد اختصاصی آن بر روی سلول‌های لنفوسیتی B و T و عدم تاثیر سوء بر روی سایر سلول‌های بدن نسبت به داروهای مشابه قبلی از جمله سیکلوسپورین‌ها دارای عوارض جانبی کمتری بوده و اخیراً به عنوان بازدارنده سیستم ایمنی پس از پیوند اعضا مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ماده با مهار آنزیم اینوزین منوفسفات دهیدروژناز باعث جلوگیری از انجام مرحله‌ی کلیدی سنتز نوکلئوزیدهای پورینی یعنی اکسیداسیون اینوزین منوفسفات به گوانوزین منوفسفات می‌شود. از آنجا که گوانوزین منوفسفات یکی از بلوک‌های ساختاری ماده ژنومی محسوب می‌شود لذا مایکوفنولیک اسید و مشتقات آن می‌توانند منجر به توقف سنتز DNA و RNA و در نهایت توقف رشد سلول گردند. علیرغم اهمیت این دارو و کاربردهای رو به افزایش آن، اطلاعات کمی راجع به آنزیم‌های درگیر در مسیر تولید MPA در قارچ‌های تولیدکننده‌ی این ماده موجود است. از طرفی بازدهی تولید در سویه‌های طبیعی تولید کننده MPA نیز پایین است. بنابراین، لزوم طراحی یک سیستم بیولوژیکی در تولید این ترکیب احساس می‌شود. اما با توجه به اثرات ضد میکروبی مایکوفنولیک اسید اولین گام در تولید زیستی این ماده ایجاد مقاومت در سویه‌ی میزبان است. نتایج بدست آمده از مطالعه‌ی سویه‌هایی که به طور طبیعی نسبت به این ماده مقاومت نشان می‌دهند حاکی از بیش‌بیان ژن کدکننده اینوزین منوفسفات دهیدروژناز می‌باشد؛ لذا در این پژوهش به منظور تولید سویه مقاوم به مایکوفنولیک اسید، ژن کدکننده آنزیم اینوزین منوفسفات دهیدروژناز (*impdh*) با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی توسط PCR از ژنوم قارچ پنی‌سیلیوم بروی‌کامپکتوم تکثیر شد. قطعه موردنظر در T/A وکتور همسانه‌سازی و حضور ژن به روشهای colony PCR، برش آنزیمی و تعیین توالی تأیید شد. سپس ژن مورد نظر در وکتور بیانی pPICZB کلون و برای انتقال به مخمر پیکیا پاستوریس آماده شد. انتقال ژن به سلول‌های مخمری به روش الکتروپوریشن انجام گردید و پروتئین نوترکیب تحت کنترل پروموتور AOX₁ در محیط القایی حاوی متانول بیان شد. سپس مقاومت سلول‌های نوترکیب نسبت به MPA بررسی شد. هم‌چنین میزان فعالیت آنزیم نوترکیب با بررسی میزان NADH آزادشده در محیط محاسبه گردید. نتایج بدست آمده حاکی از تولید سویه‌ی نوترکیبی است که در مقایسه با سویه‌ی وحشی ده برابر نسبت به MPA مقاوم‌تر است.

کلمات کلیدی : مایکوفنولیک اسید، پنی‌سیلیوم بروی‌کامپکتوم، اینوزین منوفسفات دهیدروژناز، پیکیا پاستوریس

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل اول: مقدمه و مروری بر منابع
۱	تاریخچه مایکوفنولیک اسید
۲	۱-۱ متابولیت‌های ثانویه
۴	۲-۱ پلی‌کتیدها
۵	۱-۲-۱ پلی‌کتیدهای قارچی
۶	۳-۱ مسیر تولید پلی‌کتیدها
۸	۴-۱ تولید زیستی پلی‌کتیدها در میزبان هترولوگ
۱۰	۱-۴-۱ فاکتورهای اثرگذار بر بیان هترولوگ پلی‌کتیدها
۱۰	۱-۱-۴-۱ مقاومت سلولی
۱۰	۲-۱-۴-۱ میزان سوسترای در دسترس
۱۱	۳-۱-۴-۱ اصلاحات پس از ترجمه
۱۲	۴-۱-۴-۱ انتقال دهنده‌های غشاء‌گذر
۱۲	۵-۱-۴-۱ سایر فاکتورهای درون سلولی
۱۳	۲-۴-۱ سیستم‌های میزبانی هترولوگ برای تولید پلی‌کتیدها
۱۳	۱-۲-۴-۱ استرپتومایسس سلی کالر
۱۳	۲-۲-۴-۱ اش‌ریشیا کولی
۱۴	۳-۲-۴-۱ گیاهان
۱۴	۴-۲-۴-۱ قارچ‌ها
۱۵	۵-۱ مایکوفنولیک اسید
۱۶	۱-۵-۱ سویه‌های تولیدکننده (پنی‌سیلیوم‌ها)
۱۸	۲-۵-۱ مسیر سنتز مایکوفنولیک اسید
۱۸	۱-۲-۵-۱ تری‌نوئیدها (ایزوپرن‌ها)
۱۹	۲-۲-۵-۱ تتراکتید
۲۲	۳-۵-۱ انتخاب سویه مناسب برای تولید هترولوگ مایکوفنولیک اسید

۲۴ ۶-۱ پیکیا پاستوریس
۲۵ ۱-۶-۱ متابولیسم متانول
۲۶ ۲-۶-۱ سیستم‌های بیانی پیکیا پاستوریس
۲۸ ۱-۲-۶-۱ وکتور بیانی pPICZ
۳۱ ۷-۱ اینوزین منوفسفات دهیدروژناز
۳۳ ۱-۷-۱ نقش درمانی عوامل مهارکننده اینوزین منوفسفات دهیدروژناز
۳۴ ۲-۷-۱ نقش اینوزین منوفسفات دهیدروژناز در مقاومت به مایکوفنولیک اسید
۳۴ ۸-۱ اهداف پژوهش

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۳۵ ۱-۲ مواد
۳۵ ۱-۱-۲ ریزسازواره‌ها
۳۵ ۲-۱-۲ مواد شیمیایی
۳۶ ۳-۱-۲ آنتی بیوتیک‌ها
۳۶ ۴-۱-۲ آغازگرها
۳۷ ۵-۱-۲ پلاسمیدها
۳۸ ۶-۱-۲ کیت‌های آزمایشگاهی
۳۸ ۷-۱-۲ آنزیم‌ها
۳۸ ۸-۱-۲ مارکرها
۳۸ ۹-۱-۲ محلول‌ها
۴۱ ۱۰-۱-۲ محیط‌های کشت
۴۱ ۱-۱۰-۱-۲ محیط‌های کشت باکتری
۴۱ ۲-۱۰-۱-۲ محیط‌های کشت مخمر
۴۲ ۳-۱۰-۱-۲ محیط‌های کشت قارچ
۴۲ ۴-۱۰-۱-۲ محیط‌های بیانی
۴۳ ۱۱-۱-۲ وسایل و دستگاه‌ها

۴۳ نرم افزارها و پایگاه‌های مورد استفاده	۱۲-۱-۲
۴۴ روش‌ها	۲-۲-۲
۴۶ استخراج DNA ژنومی پنی سیلیوم بروی کامپکتوم	۱-۲-۲
۴۶ DNA ژنومی بر روی ژل آگارز	۲-۲-۲
۴۷ تکثیر ژن <i>impdh</i> و انجام PCR	۳-۲-۲
۴۸ استخراج قطعات DNA به دست آمده از PCR از روی ژل	۴-۲-۲
۴۹ همسانه‌سازی قطعات DNA مورد نظر در باکتری <i>اشرشیا کلی DH5α</i> به منظور تعیین توالی	۵-۲-۲
۴۹ اتصال قطعه ژنی مورد نظر به T- Vector	۱-۵-۲-۲
۵۰ تهیه سلول‌های مستعد	۲-۵-۲-۲
۵۰ انتقال ناقل دارای قطعه DNA مورد نظر به باکتری مستعد شده	۳-۵-۲-۲
۵۱ کلنی PCR با آغازگرهای اختصاصی به منظور تأیید حضور ژن در سلول‌های تراریخت ...	۶-۲-۲
۵۱ استخراج پلاسمید از کلنی‌های کشت انبوه داده شده	۷-۲-۲
۵۱ استخراج پلاسمید به روش مینی پرپ	۱-۷-۲-۲
۵۲ استخراج پلاسمید با کیت Roche Applied Science	۲-۷-۲-۲
۵۳ برش پلاسمیدهای خالص شده با آنزیم‌های اختصاصی به منظور جداسازی قطعه ژنی ...	۸-۲-۲
۵۳ افزایش تعداد پلاسمیدهای حامل قطعه	۹-۲-۲
۵۴ برش پلاسمید pPICZB با <i>Xho I</i> و <i>EcoR I</i>	۱-۹-۲-۲
۵۴ اتصال قطعه ژنی به وکتور pPICZB	۲-۹-۲-۲
۵۴ تهیه سلول باکتری مستعد	۳-۹-۲-۲
۵۵ انتقال ناقل pPICZB حامل <i>impdh</i> به <i>اشرشیا کلی Top10</i>	۴-۹-۲-۲
۵۵ خطی کردن پلاسمید	۱۰-۲-۲
۵۵ تعیین غلظت پلاسمید	۱-۱۰-۲-۲
۵۶ برش پلاسمید با <i>Sac I</i>	۲-۱۰-۲-۲
۵۶ آماده‌سازی پلاسمید خطی شده برای الکتروپوریشن	۳-۱۰-۲-۲

۵۶ ۱۱-۲-۲ همسانه‌سازی قطعه مورد نظر در DNA ژنومی پیکیا پاستوریس
۵۷ ۱-۱۱-۲-۲ تهیه سلول مخمری مستعد
۵۷ ۲-۱۱-۲-۲ الکتروپوریشن سلول‌های مخمری مستعد
۵۸ ۱۲-۲-۲ استخراج DNA ژنومی مخمر و تأیید حضور ژن
۵۸ ۱-۱۲-۲-۲ استخراج ژنوم با روش DNA fast
۶۰ ۱۳-۲-۲ بررسی بیان اینوزین منوفسفات دهیدروژناز نوترکیب
۶۰ ۱-۱۳-۲-۲ کشت سویه نوترکیب در محیط بیانی
۶۱ ۲-۱۳-۲-۲ آماده سازی نمونه برای SDS-PAGE
۶۱ ۱۴-۲-۲ تعیین میزان پروتئین کل با روش بردفورد
۶۲ ۱۵-۲-۲ بررسی فعالیت آنزیمی
۶۲ ۱-۱۵-۲-۲ تعیین رابطه چگالی نوری با وزن خشک سلول
۶۲ ۲-۱۵-۲-۲ تعیین فعالیت آنزیم نوترکیب
۶۳ ۱۶-۲-۲ بررسی مقاومت سلول نوترکیب نسبت به مایکوفنولیک اسید

فصل سوم: نتایج

۶۴ ۱-۳ بررسی تفاوت اینوزین منوفسفات دهیدروژناز موجود در خوشه ژنی مایکوفنولیک اسید سنتاز با IMPDH پیکیا پاستوریس
۶۷ ۲-۳ استخراج DNA ژنومی پنی سیلیوم بروی کامپکتوم
۶۷ ۳-۳ تکثیر ژن اینوزین منوفسفات دهیدروژناز توسط PCR
۶۸ ۴-۳ همسانه‌سازی ژن IMPDH در وکتور pTZ ⁵ R/T
۶۹ ۵-۳ تأیید حضور ژن IMPDH در وکتور pTZ ⁵ R/T
۶۹ ۱-۵-۳ هضم آنزیمی با آنزیم‌های <i>EcoRI</i> و <i>XhoI</i> و انجام PCR
۶۹ ۲-۵-۳ تأیید از طریق توالی‌یابی
۷۳ ۶-۳ همسانه‌سازی ژن <i>impdh</i> درون وکتور بیانی pPICZB
۷۴ ۷-۳ انتقال پلاسمید pPICZB نوترکیب به درون سلول‌های مخمر پیکیا پاستوریس
۷۴ ۱-۷-۳ خطی کردن پلاسمید نوترکیب با استفاده از آنزیم <i>SacI</i>

۷۴ PCR با استفاده از	۳-۸ بررسی ورود پلاسمید به درون ژنوم مخمر با استفاده از
۷۵ SDS-PAGE	۳-۹ بررسی بیان اینوزین منوفسفات دهیدروژناز با استفاده از ژل
۷۶	۳-۱۰ بررسی نسبت پروتئین نوترکیب به پروتئین تام
۷۶	۳-۱۰-۱ تعیین غلظت پروتئین تام در ساعات مختلف به روش بردفورد
۷۷ AlphaEaseFC	۳-۱۰-۲ نسبت پروتئین نوترکیب به پروتئین تام با استفاده از نرم افزار
۷۸	۳-۱۱ اندازه گیری فعالیت آنزیم نوترکیب
۷۸ NADH	۳-۱۱-۱ نمودار استاندارد
۷۸	۳-۱۱-۲ بررسی میزان NADH تولید شده قبل و بعد از القاء
۷۹	۳-۱۱-۳ تعیین وزن خشک سلول
۸۰	۳-۱۱-۴ محاسبه میزان NADH برحسب وزن خشک سلول
۸۱	۳-۱۲ بررسی مقاومت به مایکوفنولیک اسید

فصل چهارم: نتیجه گیری و بحث

۸۳	۴-۱ نتیجه گیری
۸۶	۴-۲ پیشنهادات
۸۷	منابع و مأخذ

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۱ طبقه‌بندی پلی‌کتید سنتازها براساس ساختار و عملکرد	۷
جدول ۲-۱ ژن‌های ضروری برای انتقال به مخمر به منظور تولید هترولوگ مایکوفنولیک اسید ...	۲۵
جدول ۳-۱ پروموتورهای پیکیا پاستوریس	۲۸
جدول ۴-۱ بخش‌های ساختاری pPICZ و ویژگی‌های عملکردی آن‌ها	۳۰
جدول ۱-۲ مقادیر مورد نیاز برای انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی <i>impdh</i>	۴۷
جدول ۲-۲ شرایط دمایی انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی <i>impdh</i>	۴۷
جدول ۳-۲ مقادیر مورد نیاز برای واکنش اتصال قطعه به T/A وکتور	۴۹
جدول ۴-۲ مقادیر مورد نیاز برای واکنش هضم آنزیمی T/A وکتور نوترکیب	۵۳
جدول ۵-۲ مقادیر مورد نیاز برای واکنش اتصال قطعه به وکتور بیانی pPICZB	۵۴
جدول ۶-۲ مقادیر مورد نیاز واکنش هضم آنزیمی با <i>Sac I</i>	۵۶
جدول ۷-۲ شرایط انجام الکتروپوریشن	۵۸
جدول ۸-۲ مقادیر مورد نیاز برای واکنش PCR با پرایمرهای AOX ^۱	۵۹
جدول ۹-۲ شرایط دمایی انجام PCR با پرایمرهای AOX ^۱	۶۰
جدول ۱۰-۲ آماده‌سازی رقت‌های BSA	۶۲
جدول ۱۱-۲ مقادیر مورد نیاز برای سنجش فعالیت آنزیم	۶۳
جدول ۱-۳ فاصله تکاملی اینوزین منوفسفات دهیدروژنازهای پ.پاستوریس و پ.بروی کامپکتوم با استفاده از نرم افزار MEGA	۶۶
جدول ۲-۳ غلظت پروتئین تام در ساعات پس از القاء	۷۷
جدول ۳-۳ غلظت پروتئین نوترکیب در ساعات پس از القاء	۷۷
جدول ۴-۳ میزان NADH ($\mu\text{g/ml}$) آزادشده قبل و بعد از القاء	۷۹
جدول ۵-۳ وزن خشک سلول نوترکیب برحسب میلی‌گرم/ میلی‌لیتر	۸۰
جدول ۶-۳ میزان NADH آزاد شده برحسب وزن خشک سلول	۸۱

فهرست تصاویر

صفحه	عنوان
۲	شکل ۱-۱ ساختار مولکولی مایکوفنولیک اسید و مشتقات دارویی آن
۶	شکل ۱-۲ مسیر پایه‌ی سنتز پلی‌کتیدهای قارچی
۱۷	شکل ۱-۳ مکانیسم اثر مایکوفنولیک اسید بر سنتز پورین ها
۱۹	شکل ۱-۴ مسیر موالونات
۲۱	شکل ۱-۵ خوشه‌ی ژنی سنتز مایکوفنولیک اسید در پنی‌سیلیوم بروی کامپکتوم
۲۲	شکل ۱-۶ مسیر سنتز مایکوفنولیک اسید در پنی‌سیلیوم بروی کامپکتوم
۲۷	شکل ۱-۷ مسیر متابولیسم متانول در پیکیا پاستوریس
۲۹	شکل ۱-۸ چگونگی انتقال ژن به ژنوم پیکیا با استفاده از وکتور pPICZ
۳۲	شکل ۱-۹ مکانیسم شیمیایی کاتالیز IMPDH
۳۷	شکل ۱-۲ ساختار شماتیک وکتور pTZ ⁵⁷ R/T
۳۷	شکل ۲-۲ نقشه ژنتیکی وکتور pPICZ A ₃ B ₃ C
۴۵	شکل ۲-۳ فلوجارت مراحل انجام آزمایش
۶۵	شکل ۱-۳ هم‌ردیفی توالیهای اینوزین منوفسفات دهیدروژناز پ. پاستوریس و پ. بروی کامپکتوم
۶۶	شکل ۲-۳ رسم درخت فیلوژنتیک اینوزین منوفسفات دهیدروژناز پ. پاستوریس و پ. بروی کامپکتوم
۶۷	شکل ۳-۳ الکتروفورز DNA ی ژنومی قارچ پنی‌سیلیوم بروی کامپکتوم روی ژل آگارز ۱ درصد
۶۸	شکل ۳-۴ محصول PCR از DNA ژنومی پنی‌سیلیوم بروی کامپکتوم با آغازگرهای اختصاصی mpa.Fd و mpa.Re
۶۹	شکل ۳-۵ الکتروفورز پلاسمیدهای pTZ ⁵⁷ R/T
۷۰	شکل ۳-۶ تائید ورود قطعه ژنی به T/A وکتور
۷۱	شکل ۳-۷ توالی بدست آمده برای ژن <i>impdh</i>
۷۲	شکل ۳-۸ بخشی از نتایج حاصل از BLASTX برای ژن <i>impdh</i>
۷۳	شکل ۳-۹ تائید ورود قطعه ژنی به وکتور pPICZB
۷۴	شکل ۳-۱۰ خطی شدن پلاسمید نوترکیب با <i>SacI</i>
۷۵	شکل ۳-۱۱ محصول PCR با پرایمرهای AOX ¹

- شکل ۳-۱۲ الکتروفورز محتوای سیتوپلاسمی مخمر نو ترکیب قبل و بعد از القاء ۷۶
- شکل ۳-۱۳ منحنی استاندارد BSA ۷۶
- شکل ۳-۱۴ نمودار استاندارد NADH ۷۸
- شکل ۳-۱۵ نمودار وزن سلول در برابر چگالی نوری ۷۹
- شکل ۳-۱۶ مقایسه رشد سویه وحشی و نو ترکیب در برابر غلظت‌های مختلف MPA ۸۲

فصل اول

مقدمه و مروری بر منابع

تاریخچه مایکوفنولیک اسید

مایکوفنولیک اسید^۱ اولین بار در سال ۱۸۹۶ توسط گوسیو^۲ از کشت پنی سیلیوم گلاوکوم^۳ جداسازی شد. پس از آن در سال ۱۹۱۳ توسط آلبرگ و بلک^۴ از کشت پنی سیلیوم استولونیفرم (پنی سیلیوم بروی کامپکتوم)^۵ جداسازی و نامگذاری شد. در سال‌های ۱۹۳۱ تا ۱۹۳۳ مطالعات زیادی در خصوص ساختار و خصوصیات بیوشیمیایی مایکوفنولیک اسید انجام شد و نهایتاً در سال ۱۹۵۲ ساختار آن شناسایی گردید. مطالعات اولیه بر روی این ماده حاکی از فعالیت ضد باکتریایی (Abraham, ۱۹۴۵)، ضد قارچ (۱۹۴۶, Gilliver)، ضد ویروسی (۱۹۶۸, Ando et al) و ضد توموری (۱۹۷۱, Jones and Mills) مایکوفنولیک اسید است. در سال ۱۹۶۹ پلانتروس و همکاران^۶ احتمال اثر مهارکنندگی سیستم ایمنی را برای

^۱ - Mycophenolic acid (MPA)

^۲ - Gosio

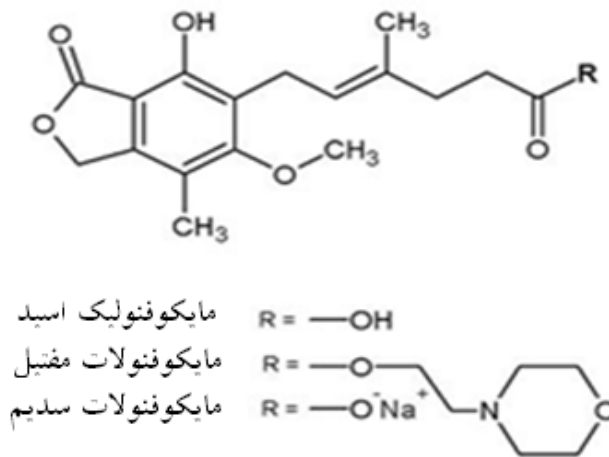
^۳ - *Penicillium glaucum*

^۴ - Alsberg and Black

^۵ - *Penicillium stoloniferum* (*P. brevicompactum*)

^۶ - Planterose et al.

MPA مطرح کردند. در همان سال میتسو و همکارانش^۱ برای اولین بار اثر مهارکنندگی این ماده را بر سیستم ایمنی موش گزارش دادند. در سال‌های بعد مطالعات بیشتری در رابطه با اثر مهارکنندگی MPA صورت گرفت که نتیجه‌ی آن تولید مشتق دارویی مایکوفنولیک اسید با نام مایکوفنولات مفتیل^۲ توسط شرکت syntax بود. MMF اولین بار در سال ۱۹۹۵ توسط سولینگر و همکارانش^۳ در بیماران دریافت کننده‌ی کلیه مورد استفاده قرار گرفت و در همان سال توسط سازمان غذا و داروی آمریکا به منظور پیشگیری از رد پیوند در عمل پیوند کلیه تأیید شد. در سال ۲۰۰۴ نیز یکی دیگر از مشتقات دارویی MPA با نام مایکوفنولات سدیم^۴ وارد بازار شد.



شکل ۱-۱ ساختار مولکولی مایکوفنولیک اسید و مشتقات دارویی آن

۱-۱ متابولیت‌های ثانویه

ریزسازواره‌ها^۵ به ویژه قارچ‌ها و باکتری‌ها طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه با فعالیت‌های زیستی متفاوت را تولید می‌کنند. تولید متابولیت‌های ثانویه اغلب همزمان با تمایز و یا اسپورزایی در ریزسازواره‌ها صورت گرفته، بنابراین بیشترین میزان تولید این ترکیبات در فاز سکون مشاهده می‌شود. این مرحله از رشد ریزسازواره‌ها

^۱ - Mitsui et al.

^۲ - Mycophenolate mofetil (MMF)

^۳ - Sollinger et al

^۴ - Mycophenolate sodium

^۵ - Microorganisms

ایدیوفاز^۱ نامیده می‌شود؛ لذا کشت‌های ناپیوسته^۲ و ناپیوسته خوراک‌دهی^۳ شده بهتر از کشت پیوسته^۴ در تولید متابولیت‌های ثانویه عمل می‌کنند (Carlile et al, ۲۰۰۱). در مقابل مرحله‌ی رشد لگاریتمی سلول که در آن متابولیت‌های اولیه به ویژه ماکرومولکول‌های زیستی تولید می‌شوند را تروفوفاز^۵ می‌نامند. متابولیت‌های ثانویه اغلب دارای ساختارهای پیچیده و گوناگون‌اند و این تغییرپذیری در ساختار موجب طبقه‌بندی این ترکیبات در گروه‌های متفاوتی از ترکیبات شیمیایی شده است. به علاوه حضور ترکیبات شیمیایی غیرمعمول مثل حلقه‌های بتالاکتام، پپتیدهای حلقوی و یا حلقه‌های بزرگ ماکرولیدها به عنوان اتصالات جانبی در این ترکیبات بر پیچیدگی ساختار آنها افزوده است. علی‌رغم تنوع ساختاری ذکر شده، تمامی متابولیت‌های ثانویه از ترکیباتی با وزن مولکولی پایین که اغلب به عنوان حدواسط‌هایی در سنتز اجزاء اصلی سلول نیز به کار می‌روند، تولید می‌شوند.

اگرچه متابولیت‌های ثانویه نقش مشخصی در رشد سلول ندارند اما به نظر می‌رسد که برخی از آنها نقش متابولیکی خاصی ایفا می‌کنند. از جمله انتقال مولکول‌های خاص از عرض غشاء پلاسمایی (والینومايسين) و یا نقش رقابتی با سایر میکروب‌های موجود در محیط اطراف (Rose, ۱۹۷۶) که اجازه‌ی بهره‌برداری از مواد مغذی را به ریزسازواره‌ی تولیدکننده‌ی متابولیت ثانویه می‌دهد (فوزیدیک اسید)، (Carlile et al, ۲۰۰۱). اگرچه تا بحال مطالعات مولکولی بوم‌شناسی^۶ بر روی اثر حضور یا عدم حضور این ترکیبات در محیط طبیعی انجام نشده اما به نظر می‌رسد حذف متابولیت‌های ثانویه در طولانی مدت منجر به ناپدید شدن ریزسازواره‌های تولیدکننده‌ی این ترکیبات از محیط طبیعی آنها خواهد شد (Demain and Fang, ۲۰۰۰).

ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه اغلب به صورت خوشه‌های ژنی^۷ همراه با ژن‌های تنظیمی و ژن‌های مقاومت بر روی یک کروموزوم دیده می‌شوند. این آرایش ژنی علاوه بر تنظیم هماهنگ ژن‌ها کمک شایانی به شناسایی و جداسازی این ژن‌ها کرده است. لذا دستیابی به ژن‌های دخیل در سنتز متابولیت‌های ثانویه و مطالعه‌ی گسترده بر روی طیف وسیعی از این ترکیبات قابلیت آنها را به عنوان عوامل دارویی در درمان بسیاری از بیماری‌ها نشان داده است. اگرچه وجود خوشه‌های ژنی در پروکاریوت‌ها یک ویژگی متداول است اما این ویژگی در یوکاریوت‌ها به ندرت دیده می‌شود. حضور خوشه‌های ژنی در

^۱ - Idio Phase

^۲ - Batch Culture

^۳ - Fed Batch

^۴ - Continuous Culture

^۵ - Tropho Phase

^۶ - Ecology

^۷ - Gene Cluster

یوکاریوت‌ها اولین بار در سال ۱۹۸۹ توسط هول و همکاران^۱ در مسیر تجزیه پرولین در *آسپریژیلوس نیدولانس*^۲ شناسایی شد.

خوشه‌های ژنی در قارچ‌ها در واقع حاصل اتصال نزدیک دو یا چند ژن‌اند که در یک مسیر متابولیکی خاص شرکت می‌کنند (Keller and Hohn, ۱۹۹۷). قارچ‌ها دارای مسیرهای متابولیکی بسیار زیادی هستند که اصطلاحاً مسیرهای مازاد^۳ نامیده می‌شوند. به نظر می‌رسد این مسیرها در رشد سلول نقش نداشته و یا در شرایط محدودیت غذایی ایفای نقش می‌کنند. یک توضیح احتمالی برای وجود خوشه‌های ژنی در مسیرهای مازاد موجود در قارچ‌ها کمک به تنظیم بیان این ژن‌هاست چرا که اتصال نزدیک این ژن‌ها می‌تواند منجر به تشکیل ساختارهای کروماتینی گردد که تا حدودی بر بیان ژن مؤثر است. بعلاوه چنین ساختارهایی احتمال انتقال افقی این خوشه‌های ژنی از پروکاریوت‌ها به یوکاریوت‌ها را فراهم می‌کند.

۱-۲ پلی کتیدها

پلی کتیدها^۴ گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه با تنوع ساختاری فراوانند که از تجمع پیش‌سازهای کربنی کوچک (معمولاً ۲ یا ۳ کربنه) مشتق از آسیل تیواسترها در مسیری مشابه با سنتز اسیدهای چرب (Birch, ۱۹۵۳, and Donovan) طی واکنش‌های الحاقی دکربوکسیلاسیون^۵ به وجود می‌آیند. نتیجه این واکنش‌ها تشکیل زنجیرهای کربنی با تعداد زوج و ایجاد گروه بتا-کتو-تیواستر^۶ می‌باشد. بنابراین تنوع ساختاری مشاهده شده در پلی کتیدها حاصل تغییرات بعدی صورت گرفته بر گروه کتونی موجود در این ترکیبات است بطوریکه در صورت احیاء گروه کتونی به متیلن منجر به تولید اسیدهای چرب شده و در غیر این صورت به سمت تولید ترکیبات آروماتیک می‌رود. اما اغلب پلی کتیدها حاصل تغییراتی مابین این دو حالت‌اند. اصلی‌ترین گروه تولید کننده‌ی پلی کتیدها اکتینومیست^۷ هستند بطوریکه دو سوم پلی کتیدهای فعال شناخته شده از این گروه منشاء می‌گیرند. از میان یوکاریوت‌ها نیز برخی قارچ‌ها و گیاهان به عنوان تولیدکننده‌ی پلی کتیدها شناسایی شده‌اند. این گروه از ترکیبات به واسطه فعالیت‌های زیستی گوناگون دارای مصارف زیادی از جمله ضد قارچ، ضد انگل،

^۱ - Hull et al

^۲ - *Aspergillus nidulans*

^۳ - Dispensable pathways

^۴ - Polyketides

^۵ - Decarboxylative condensation

^۶ - β _keto_Thioester

^۷ - Actinomycetes