مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره نهم ، شماره سی و سوم-زمستان ۱۳۹۷

NCMBJ
Review Article
مقاله مروری

بررسی روش های ژنتیکی مورد استفاده جهت بهبود کارایی سویه‌های میکروبی تجزیه‌کننده ترکیب‌های لیگنو سلولزی

فاطمه تابنده*، کژال فرهمندی

پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:25 +0430 on Friday April 26th 2019

چکیده

لیگنوسلولز متشکل از سلولز، همی‌سلولز و لیگنین است. سلولز و همی‌سلولز، ماکرو مولکول‌هایی از قندهای مختلف هستند، در حالی‌که لیگنین یک پلی‌مری آروماتیک تشکیل‌شده از پیش‌سازهای فنیل پروپانوئید است. هرچند ترکیب اصلی مواد لیگنوسلولزی را سلولز تشکیل می‌دهد که نسبت به تجزیه زیستی حساس است، اما این پلی‌ساکارید به‌طورمعمول در طبیعت به‌صورت فیزیکوشیمیایی به لیگنین باند شده است. ازآن‌جایی‌که لیگنین یک ترکیب مقاوم به تخریب زیستی است، تا حدودی سلولز را در مقابل حمله میکروبی محافظت می‌کند. اهمیت تجزیه لیگنوسلولز به‌دلیل کاربردهای فراوان آن‌ها در صنایع تبدیلی و استفاده از آن‌ها به‌عنوان مواد خام در صنایع مختلف بالاخص برای تولید فرآورده‌های زیستی گوناگون است. سویه‌های مؤثر در تخریب زیستی ترکیب‌های لیگنوسلولزی، باید دارای یک سیستم آنزیمی قوی و کارا برای تجزیه این ترکیب‌ها باشند. انواعی از سویه‌های قارچی متعلق به قارچ‌های پوسیدگی سفید به‌عنوان ریزسازواره‌های توانمند در این فرآیند معرفی‌شده‌اند. بااین‌حال پژوهش‌های وسیعی برای بهبود سویه‌های باکتریایی و قارچی تجزیه‌کننده لیگنوسلولز انجام‌شده است. علاوه‌بر روش‌های سنتی و قدیمی مانند جهش‌زایی، روش‌های نوین مبتنی بر دست‌ورزی ژنتیکی جهت بهبود سویه‌ها با هدف افزایش بهره‌دهی فرآیندهای صنعتی پیشنهاد شده‌اند. در این مقاله به‌شرح مختصری راجع به این روش‌ها پرداخته‌شده و مثال‌هایی از هریک برای بهبود سویه‌های تجزیه‌کننده ترکیب‌های لیگنوسلولزی ارائه گردیده است.

واژه‌های کلیدی: ترکیب‌های لیگنوسلولزی، تجزیه زیستی، بهبود سویه، دست‌ورزی ژنتیکی، جهش‌زایی، ادغام پروتوپلاست

مقدمه

عمده‌ترین ترکیب زیست توده، لینگوسلولز است که حدود نیمی از مواد تولیدشده توسط فتوسنتز را تشکیل می‌دهد. لینگوسلولز از سه نوع پلی‌مر سلولز، همی‌سلولز و لیگنین تشکیل شده که به‌لحاظ شیمیایی توسط پیوندهای غیرکووالانسی و اتصالات عرضی کووالانسی به یکدیگر متصل شده‌اند، ترکیب و درصد این پلیمرها در گونه‌های مختلف گیاهی متفاوت است (۴،۸). تجزیه زیستی سلولز، همی‌سلولز و لیگنین از سال‌های قبلی مورد توجه بیوتکنولوژیست‌ها بوده است. تعداد زیادی از باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌توانند با استفاده از آنزیم‌های هیدرولیتیک یا اکسیداتیو این ماکرومولکول‌ها را تجزیه نمایند. در طبیعت، اتصال‌های این پلی‌مرها باعث کاهش تجزیه زیستی آن‌ها شده و تنوع سوبستراهای سلولزی و لیگنوسلولزی باعث بروز مشکل‌هایی در مطالعه‌های آنزیمی آن‌ها شده است (۸،۱۸). قارچ‌ها شناخته شده‌ترین ریزسازواره-هایی هستند که توانایی تجزیه این سه پلی‌مر را دارند. به‌علت نامحلول بودن سوبستراها تجزیه باکتریایی و قارچی به‌صورت خارج سلولی صورت می‌گیرد. دو نوع سیستم آنزیمی خارج سلولی در میکروارگانیسم‌ها وجود دارد: سیستم هیدرولیتیک که تولید هیدرولازها را به‌عهده دارد و مسئول تجزیه سلولز و همی‌سلولز است و سیستم لیگنولیتیک اکسیداتیو که به-اختصاص باعث تجزیه لیگنین می‌شود (۱۰). طی دهه۱۹۹۰ ژنتیک مولکولی سامانه‌های تجزیه‌کننده سلولز ، همی‌سلولز و لیگنین پیشرفت قابل‌توجهی داشت. اکثر آنزیم‌ها هم در میزبان‌های همولوگ و هم در میزبان‌های هترولوگ کلون، تعیین توالی و بیان شده و درباره ساختمان، ساختار ژنومی و

نویسنده مسئول:
پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
پست الکترونیکی: taban_f@nigeb.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۳۰

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:25 +0430 on Friday April 26th 2019

تنظیم ژن‌های کد کننده این پروتئین‌ها اطلاعات زیادی به‌دست‌آمده است (۱۴،۱۷).

لیگنوسلولز در طبیعت از چوب ،علف‌ها ،ضایعات کشاورزی ،پساب‌های جنگلی و پساب‌های جامد شهری به‌دست می‌آید. برای بازیافت لیگنوسلولز چندین روش بیولوژیکی بر اساس آنزیم‌شناسی تجزیه سلولز، همی‌سلولز و لیگنین پیشنهاد شده است. در میان این روش‌ها، کمپوست‌سازی و استفاده از لیگنوسلولز به‌عنوان ماده خام در تولید الکل که به‌صورت یک ماده جانشین سوخت محسوب می‌شود از لحاظ اقتصادی مقرون به‌صرفه است. به‌علاوه، استفاده از آنزیم‌های لینگنو سلولاز در مراحل مختلف تولید خمیرکاغذ جهت پیش تیمار در مراحل خمیر سازی زیستی، رنگ‌بری زیستی و یا تیمار فاضلاب به‌عنوان فن‌های جانشین، باعث صرفه‌جویی در نیروی الکتریکی و نیز کاهش آلودگی در پساب‌های این صنایع شده است. کما این‌که پیش تیمار ضایعات کشاورزی با قارچ‌های لیگنوسلولولیتیک، استفاده از آن‌ها به‌عنوان ماده خام در تولید کاغذ را ممکن می‌سازد (۱۸).

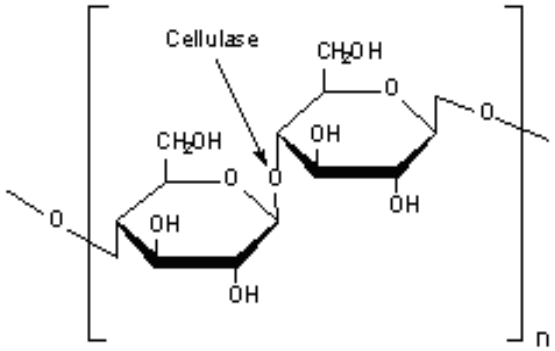
به‌ندرت ممکن است که از طبیعت ریزسازواره‌های صنعتی به دست آورده شود که خصوصیت‌های ایده‌آل داشته و نیاز به ایجاد تغییر در گنجینهٔ ژنتیکی آن‌ها نباشد. به‌طور کلی این ریزسازواره‌ها محصول‌های دلخواه و تجاری را در مقادیر بسیار کم تولید می‌کنند. بنابراین لازم است که قدرت تولید سویه انتخابی، بهبود و افزایش پیدا کند. توانایی بیوشیمیایی ریزسازواره‌ها زیاد است بنابراین امکان تولید اقسام گوناگونی از ترکیب‌های جدید و نامتعارف توسط انواع مختلف میکروب‌ها و قارچ‌ها وجود دارد (۶). .منظور از بهبود سویه‌ها[1] ، تغییر صفت سویه‌های موردنظر در جهت دلخواه با هدف بهبود ارزش‌های کمی و کیفی فرآورده‌هاست. به‌طورکلی، مسائل اقتصادی انگیزه اصلی برای ایجاد سویه‌های جدید به شمار می‌روند، زیرا به‌طورکلی غلظت متابولیت‌های تولیدشده توسط سویه‌های وحشی، برای فرآیندهای اقتصادی بسیار ناچیز است. بنابراین از طریق یک برنامه جامع ایجاد سویه‌های کارا، می‌توان به افزایش تولیدی تا صد برابر یا بیش‌تر نائل شد. برای یک فرآیند مقرون به‌صرفه، ممکن است به سویه‌هایی با خصوصیت تخمیری بهبود یافته‌تر نیاز باشد (۱۸، ۶). بسته به نوع کاربرد ریزسازواره در سیستم موردنظر ممکن است جداسازی و بهبود سویه‌هایی مطلوب باشد که به زمان رشد کوتاه‌تری نیازمند باشند، احتیاج به اکسیژن داشته‌باشند، بهره‌وری بالاتری داشته‌باشند و یا قادر به متابولیزه کردن سوبستراهای ارزان‌قیمت باشند. تغییرات و بهینه‌سازی ژنوتیپ ریزسازواره‌ها، می‌تواند به بیوسنتز متابولیت‌های جدید، منجر گردد. روش‌های متفاوتی مانند موتان‌زایی، نوترکیبی DNA، ادغام پروتوپلاست برای بهبود سویه‌ها وجود دارد. به‌تازگی روش‌های نوین دیگری مانند سیستم بیوتکنولوژی[2]، مهندسی ریبوزوم[3]، درهم‌آمیختگی ژنوم[4] و روش‌های کلی تحت عنوان امیکس[5] نیز شناخته‌شده‌اند که نسبت به روش‌های قبلی بسیار مؤثرترند (۱۸،۲۵).

در این تحقیق ابتدا به معرفی ترکیبت لیگنوسلولز و میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده آن‌ها و در انتها به معرفی برخی روش‌های جدید بهبود سویه‌های تجزیه‌کننده لیگنوسلولز پرداخته‌شده است.

ترکیب‌های لیگنوسلولز

سلولز

سلولز فراوان‌ترین بیوپلیمر در جهان است چراکه کمابیش نیمی از مواد فتوسنتزی را تشکیل می‌دهد که از طریق تثبیت دی‌اکسید کربن حاصل می‌شود. از ویژگی‌های سلولز خاصیت سختی و غیرمحلول بودن آن است، این کربوهیدرات ۴۵ درصد وزن خشک چوب را تشکیل می‌دهد و علاوه‌بر گیاهان در دیواره سلولی تعدادی از قارچ‌ها ،جلبک‌ها و معدودی از باکتری‌ها نظیر استوباکترها (در ترکیب‌های کپسولی) وجود دارد (۱۷، ۱۵). واحد ساختمانی این پلی‌ساکارید در شکل ۱ مشاهده می‌شود.



شکل ۱- دو قند ۶ کربنه د-گلوکز با پیوندهای گلیکوزیدی بتا ۱و ۴ به‌عنوان واحد ساختمانی سلولز

[1] Strain improvement

[2] Systems biotechnology
[3] Ribosome Engineering
[4] Genome shuffling
[5] X-omics

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:25 +0430 on Friday April 26th 2019

اهمیت سلولز

مقدار کربن موجود در مواد سلولزی گیاهان بسیار زیاد است، به‌طوری‌که می‌تواند بخش مهمی از مواد آلی خاک و منبع سرشاری از مواد کربن دار برای تغذیه ریزسازواره‌ها محسوب شود. به‌طورکلی میکروارگانیسم‌های گوناگونی توانایی تجزیه سلولز را داشته و از آن به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند. می‌توان گفت بدون هیدرولیز سلولز توسط میکروارگانیسم‌ها قسمت بزرگی از موجودات که نشخوارکنندگان هستند، از نظر غذایی در فقر بوده و قادر به تغذیه از علوفه نخواهند بود. میکروب‌های هوازی بخش عمده سلولز محیط را به دی‌اکسیدکربن، اکسید کرده و به جو بازمی‌گردانند که طی این فرآیند امکان چرخه کربن و گردش انرژی فراهم می‌شود. از سوی دیگر، مقدار کمی از سلولز در فرایند بی‌هوازی به‌صورت متان تشکیل شده و وارد جو می‌گردد که در نهایت متان با ازن وارد واکنش شده و به دی‌اکسیدکربن و آب تبدیل می‌شود. سلولز علاوه بر اهمیتی که در طبیعت دارد در صنعت نیز حائز اهمیت است به‌طوری‌که با هیدرولیز آن اسیدهای آلی، استون، الکل‌ها و پروتئین حاصل می‌شود، لذا امروزه این ماده بسیار موردتوجه است (۱۵، ۱۲).

ریزسازواره‌های تجزیه‌کننده سلولز

به‌علت اهمیت خاصی که تجزیه زیستی سلولز در چرخه کربن دارد توجه زیادی به ریزسازواره‌های تجزیه‌کننده این ماده شده است. اکثر ریزسازواره‌های تجزیه‌کننده سلولز به گروه باکتری‌ها و قارچ‌ها تعلق دارند اگرچه در میان آن‌ها تعدادی پرتوزواهای آبی نیز دیده می‌شود. ریزسازواره‌های سلولولیتیک می‌توانند با سایر جدایه‌های غیرسلولولیتیک در تجزیه سلولز روابط سینرژیستی داشته باشند. میان کنش‌های بین دو جمعیت منجر به تجزیه کامل سلولز و آزادسازی دی‌اکسیدکربن و آب تحت شرایط هوازی و دی‌اکسیدکربن، متان و آب تحت شرایط بی‌هوازی شود. این موجودات به‌طورمعمول در کلیه خاک‌های زراعی و جنگلی به تعداد فراوان وجود دارند. هم‌چنین در کودهای دامی و روی بافت‌های در حال فساد نیز دیده‌شده‌اند. به‌طورکلی ریزسازواره‌های مهم و مؤثر در تجزیه سلولز را می‌توان به گروه‌های باکتری‌های هوازی مزوفیل، باکتری‌های بی‌هوازی مزوفیل و قارچ‌ها دسته‌بندی کرد (۲۹،۳۶). در بین قارچ‌ها تعداد گونه‌های تجزیه‌کننده سلولز بسیار زیاد است به‌علاوه چون قدرت نفوذ این موجودات میکروارگانیسم به داخل بافت‌های گیاهی خیلی بیش‌تر از سایر ریزسازواره‌هاست عامل اصلی تجزیه بیولوژیکی مواد سلولزی خاک هستند. انواع متعددی از قارچ‌ها شامل جنس‌های آسپرژیلوس، پنی‌سیلیوم، فوزاریوم، تریکودرما، نوروسپورا، ترمونوسپورا دارای فعالیت تجزیه‌کنندگی سلولز هستند. *نوروسپورا کراسا* و *آسپرژیلوس ترئوس* نیز دارای فعالیت سلولازی هستند که مورد اخیر از لحاظ تولید سلولاز از تریکودرمای صنعتی هم بهتر بوده است. برخی قارچ‌ها مثل ترمونوسپورا وقتی سلولز را تجزیه می‌کنند قادر به تجزیه نشاسته نیز هستند و در حقیقت سلولاز را همراه با آمیلاز دارند. در کل، مقدار تولید آنزیم سولاز در قارچ‌ها بالاست که در برخی از آن‌ها تا ۱۰ برابر باکتری‌ها نیز می‌رسد. تعدادی از قارچ‌ها دارای ترشحات سمی هستند که به این علت نمی‌توان از آن‌ها برای بهینه‌سازی خوراک دام و طیور استفاده کرد و از طرف دیگر هوازی بودن آن‌ها باعث عدم استفاده از آن‌ها در شرایط بی‌هوازی برای هضم سلولز می‌شود. ولی با وجود این نقایص، قارچ‌ها در میان سایر ریزسازواره‌ها نقش بسیار مفیدی در خاک و سهم بسزایی در تجزیه بیولوژیکی سلولز دارند (۳،۱۱). جدول ۱ اسامی مهم‌ترین سویه‌های میکروبی تجزیه‌کننده سلولز را نشان می‌دهد.

جدول ۱: انواعی از گونه‌های قارچی، باکتریایی و اکتینومیستی تولیدکننده آنزیم سلولاز(۲۲)

Fungi	
Acremonium cellulolyticus	*Schizophyllum commune*
Aspergillus acculeatus	*Sclerotium rolfsii*
Aspergillus fumigatus	*Sporotrichum cellulophilum*
Aspergillus niger	*Talaromyces emersonii*
Fusarium solani	*Thielavia terrestris*
Irpex lacteus	*Trichoderma koningii*
Penicillium funmiculosum	*Trichoderma reesei*
Phanerochaete	*Trichoderma viride*
Chrysosporium	*Actinomycetes*
Bacteria	
Clostridium thermocellum	*Thermoactinomyces sp.*
Ruminococcus albus	*Thermomonospora curvata*
Streptomyces sp.	

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:25 +0430 on Friday April 26th 2019

همی‌سلولز

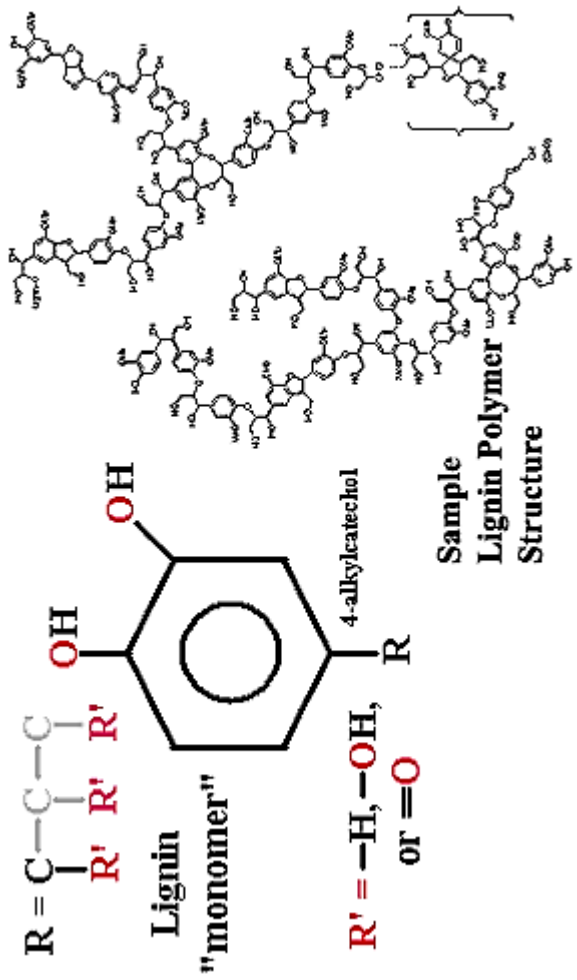
همی‌سلولزها هیچ شباهت ساختمانی با سلولز ندارند و بیش‌تر پلی‌ساکاریدهایی هستند که از پنتوزهای گوناگون نظیر زایلوز، آرابینوز و هم‌چنین هگزوزهای متنوع مانند مانوز، گلوکز و گالاکتوز یا اسیدهای اورونیک نظیر اسید مانورونیک و اسید گالاکتورونیک تشکیل شده‌اند. از ترکیب‌های همی‌سلولز می‌توان به زایلان‌ها، مانال‌ها و گالاکتان‌ها اشاره کرد. همی-سلولز علاوه بر گیاهان در کپسول برخی باکتری‌ها نیز وجود دارد (۱۴).

ریزسازواره‌های تجزیه‌کننده همی‌سلولز

قارچ‌ها و باکتری‌های زیادی قادر به تجزیه همی‌سلولز هستند. از میان قارچ‌ها، آلترناریا، فوزاریوم، پنی‌سیلیوم، آسپرژیلوس، موکور و ریزوپرس از عمده‌ترین تجزیه‌کنندگان همی‌سلولز محسوب می‌شوند و از میان باکتری‌ها اکتیومیست‌ها، باسیلوس، آگروموباکتریوم و سودوموناس در شرایط هوازی و کلستریدیوم-ها و ویبریون‌ها در شرایط بی‌هوازی قادر به تجزیه همی‌سلولز هستند. درصد تجزیه همی‌سلولز به‌مخصوص در خاک‌های اسیدی توسط قارچ‌ها بیش‌تر است (۱۴،۳۲).

لیگنین

لیگنین پلی‌مری است که به‌طور فراوان در طبیعت یافت می‌شود. حضور لیگنین در دیواره سلولی باعث ایجاد دوام ساختاری، عدم نفوذپذیری و مقاومت در برابر حملات میکروبی و فشارهای اکسیداتیو می‌شود. از لحاظ ساختاری لیگنین یک هتروپلیمر مربعی شکل بوده، غیرمحلول در آب و از لحاظ نوری غیرفعال است. لیگنین از واحدهای فنیل پروپان تشکیل شده است که از طریق انواع مختلفی از اتصالات به یکدیگر پیوند یافته‌اند. بیوسنتز لیگنین از فنیل‌آلانین آغاز می‌شود (شکل ۲). دآمیناسیون، هیدروکسیلاسیون حلقه، متیلاسیون و احیای گروه‌های کربوکسیل منجر به تولید پیش‌ماده سینامیل الکل می‌شود که به‌صورت اکسیداتیو پلی‌مریزه می‌شوند. سنتز لیگتین به این خاطر که این پلی‌مریزاسیون آن در سطح آنزیمی صورت نمی‌گیرد یک پدیده غیرمعمول و منحصربه‌فرد محسوب می‌شود. تشکیل این پلی‌مر در واقع از طریق تولید رادیکال‌های آزاد است که از طریق دهیدروژناسیون سه الکل فنیل پروپیونیک به واسطه پراکسیداز انجام می‌شود. الکل‌های فنیل پروپیونیک شامل کوماریل الکل (پ- هیدروکسی فنیل پروپانل)،کنیفریل الکل (گوآیاسیل پروپانل) و سیناپیل الکل (سیری نگیل پروپانل) هستند. کنیفریل الکل عمده‌ترین ترکیب لینگنین چوب‌های سخت است و دو الکل دیگر در ساختار چوب‌های نرم بیش‌تر یافت می‌شود. نتیجه نهایی این پلی-مریزاسیون ایجاد یک ساختار هتروژن است که ساختار اول آن از اتصالات کربن-کربن و آریل- اتر تشکیل یافته و آریل-گلیسرول و بتا-آریل اتر ساختار غالب آن است (۱۵،۱۴،۳۰).



شکل ۲: ساختمان شیمیایی لیگنین

ریزسازواره‌های تجزیه‌کننده لیگنین

قارچ‌های پوسیدگی قهوه‌ای به‌وسیله مکانیسمی که هنوز معلوم نیست از سد حفاظتی لیگنین در چوب سالم عبور کرده و به-طور مستقیم به ترکیب‌های سلولزی و همی‌سلولزی چوب حمله می‌کنند. بخش‌هایی از درخت که بدین طریق تخریب می‌شوند به‌صورت یک پودر قهوه‌ای درمی‌آیند که به‌طور عمده از لینگنین تجزیه شده به‌وسیله آنزیم‌ها تشکیل شده‌اند.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:25 +0430 on Friday April 26th 2019

برعکس قارچ‌های عامل پوسیدگی سفید ترجیحاً لیگنین را تجزیه کرده و آن را به‌صورت یک ماده سلولزی و فیبری نرم درمی‌آورند. قارچ‌های پوسیدگی سفید و قهوه‌ای از لحاظ تاکسونومی به هم نزدیک هستند و به‌طور کلی پس از یکدیگر و یا به‌طور هم‌زمان عمل خود را انجام می‌دهند و باعث تجزیه بیولوژیکی کامل چوب می‌شوند. تجزیه زیستی لیگنین یک روند اکسیداسیون پیچیده است و مانند مرحله تشکیل لیگنین به‌صورت غیرمستقیم و تصادفی است. ریزسازواره‌های تجزیه‌کننده لیگنین به اکتینومیست‌ها، بازیدیومیست‌ها و تعدادی از باکتری‌ها تقسیم‌بندی می‌شوند. برخلاف قارچ‌ها که بیش‌تر انواع چوب‌ها را مورد حمله قرار می‌دهند، فقط بعضی از چوب‌های علفی توسط باکتری‌ها تجزیه می‌شوند. برخی از چوب‌ها نیز به خاطر طبیعت خاصی که دارند فقط توسط باکتری‌ها تجزیه می‌شوند. برای مثال می‌توان از چوب ائوزی دروکسیلون نام برد که به‌هیچ‌وجه توسط قارچ‌ها تجزیه نمی‌شود (۱۸، ۴). قارچ *فانروکیت کریزوسپوریوم* یکی از قارچ‌هایی است که به‌خاطر تجزیه‌کنندگی لیگنین بیش‌ترین مطالعه‌هایی بر روی آن انجام‌گرفته است. قارچ‌های پوسیدگی سفید (از گروه بازیدیومیست‌ها) ریزسازواره‌های منحصربه‌فردی هستند که می‌توانند ترکیب‌های لیگنوسلولزی را به‌طور کامل تجزیه نمایند. همان‌گونه که شرح داده شد، قارچ‌های پوسیدگی سفید برای شکستن ترکیب‌های پیچیده‌ای نظیر لیگنین از سیستم آنزیمی خود بهره می‌گیرند که برای فعالیت به پراکسید هیدروژن نیازمندند. این آنزیم‌ها به گروهی پراکسیدازها تعلق دارند که شامل لیگنین پراکسیداز، منگنزپراکسیداز و فنل پراکسیداز یا لاکاز هستند. بیش‌تر این قارچ‌ها دو آنزیم اول را تولید می‌نمایند اما برخی دیگر مانند سویه‌هایی از *فانروکیت کریزوسپوریوم* در شرایط مختلف محیطی می‌توانند سه آنزیم مذکور را در مقادیر مختلف تولید نمایند (۳۶، ۳۲، ۴). تاکنون مطالعه‌های زیادی در زمینه تولید آنزیم‌های لیگنولیتیک توسط قارچ *فانروکیت کریزوسپوریوم* به‌منظور استفاده در فرآیندهای مختلف انجام‌شده است. در این مطالعه‌ها به بررسی مدل‌های مختلف فرمانتور جهت افزایش مقیاس و نیز تولید مداوم محصول موردنظر و استفاده از روش‌های آماری جهت استفاده بهینه از این قارچ در فرایندهای مختلف پرداخته شده است (۵،۳۱).

روش‌های اصلاح ژنوم میکروارگانیسم‌ها

به‌طور کلی چندین روش برای اصلاح ژنوم میکروارگانیسم‌ها وجود دارد که هر یک مزایا و معایب خاص خود را دارد و حتی در مواردی می‌توان از هرچند روش برای به حداکثر رساندن میزان محصول استفاده کرد. یکی از مشکل‌های کاربرد تکنیک‌های ژنتیکی جدیدتر برای اصلاح فرآیندهای موجود این است که اطلاعات ژنتیکی اولیه ارگانیسم‌هایی که بیش‌ترین کاربرد را در صنعت دارند، متأسفانه به‌طور کامل در بانک‌های اطلاعاتی موجود نیست (۱۲). بین تحقیقات بنیادی و کاربردهای صنعتی، شکاف مشخصی وجود دارد. قبل از اینکه روش‌های جدید و مناسب بتوانند جایگزین مجموعه روش‌های تجربی فعلی گردند، می‌بایست بیوسنتز و تنظیم و هم‌چنین مبانی ژنتیک ریزسازواره‌های مهم صنعتی، شناخته شود. در ده سال اخیر، در چندین مؤسسه صنعتی گام‌هایی برای پر کردن شکاف بین دانش پایه و کاربرد صنعتی برداشته شده است. جهش‌زایی، روش نوترکیبی DNA و ادغام پروتوپلاست، روش‌هایی متداول برای بهبود سویه‌ها است. روش‌های دیگری مانند سیستم بیوتکنولوژی، مهندسی ریبوزوم، درهم‌آمیختگی ژنوم و روش‌های کلی تحت عنوان امیکس مثال‌هایی از استفاده از فن‌آوری‌هایی جدید است که در زمینه‌های مختلف صنعتی کاربرد دارند (۶،۱۸،۲۵). واژه امیکس اشاره به آنالیز جامع سامانه‌های زیستی دارد. امیکس یک عبارت کلی برای یک رشته گسترده از علم و فناوری برای تجزیه و تحلیل میان‌کنش اطلاعات زیستی درانواع omes، شامل ژنوم، متابولم، پروتئوم، ترنسکریپتوم و غیره است.

جهش‌زایی

یکی از مهم‌ترین روش‌های بهبود راندمان تخمیر، تولید سویه‌های بهینه از طریق جهش‌زایی است که باعث تغییرهای پایدار در ژنوتیپ می‌شود. به‌طورکلی جهش‌زایی می‌تواند به‌صورت خودبه‌خودی[1] و یا القایی[2] انجام شود. جهش‌زایی خود به خودی کمابیش در طی همانندسازی DNA با تغییر در باندهای هیدروژنی، حذف یا اضافه شدن یک باز آلی، دآمینه شدن باز آلی و موارد مشابه دیگر ایجاد می‌شود. اما جهش‌زایی القایی در اثر عوامل جهش زای[3] شیمیایی، فیزیکی و زیستی رخ می‌دهد. اشعه ماورا بنفش با طول موج کوتاه از عوامل جهش‌زای فیزیکی است که در طول موج‌های بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر موجب جهش پایدار می‌شود (۱۳،۱۶). در جهش‌زایی با مواد شیمیایی جهش به‌طور یکنواخت در مجموعه ژنی توزیع نمی‌شود بلکه در نواحی خاصی مانند سامانه‌های ترمیمی سلول

[1] Spontaneous mutation
[2] Induced mutation
[3] Mutagen

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:25 +0430 on Friday April 26th 2019

امکان ظهور جهش بیش‌تر است. علاوه‌بر این شرایط تیمار کردن یک اثر عمده روی جهش‌زایی دارد. فاکتورهایی از قبیل pH، ترکیب بافر، غلظت عوامل جهش زا، تکرار استفاده از آن‌ها و ... تأثیر زیادی بر راندمان این فرآیند دارند (۱۶). در جدول ۲ انواعی از عوامل جهش‌زا و نحوه تأثیر آن‌ها بر ماده ژنتیکی سلول اشاره شده است (۲۵).

جدول ۲: برخی عوامل جهش‌زا که برای بهبود سویه‌های میکروبی به کار گرفته‌شده‌اند. (۲۵)

Relative effect	Impact on DNA	Mutation induced	Mutagen
High	Deletions, structural changes	Single or double-strand breakage of DNA	Radiation Ionizing radiation X rays, gamma rays
Medium	Transversion, deletion, frameshift, transitions from GC ➡ AT	Pyrimidines diamerization and cross links in DNA	Short wavelengths Ultra violet rays
Low Low Low Low Medium	AT ➡ GC, GC ➡ AT transition AT ➡ GC , GC ➡ AT transition GC ➡ AT transition Bi-directional translation, deletion AT ➡ GC and/or GC ➡ AT	Results in faulty pairing Errors in DNA replication Deamination of cytosine Deamination of A,C and G	Chemicals Base analogs 5-Chlorouracil 5-Bromouracil 2-Aminopurine deaminating agents Hydroxylamine(NH_2OH) Nitrous acid(HNO_2)
High High High	GC ➡ AT transition GC ➡ AT transition GC ➡ AT transition	Methylation.high PH Alkylation of C and A Alkylation of bases C and A	Alkylating agents N-Methyl-N-nitro N-Nitroso guanidine Ethyl methanesulfonate Mustards di-(2-chloroethyl)-sulfide
Low	Frame shift, loss of plasmids and microdeletions	Intercalation between two base pairs	Intercalating agents Ethidium bromide, acridinedyes
High	Deletion, duplication, insertion	Base substitution, breakage	Biological Phage, plasmid,DNA transposing

جهش‌ها به‌لحاظ نحوه عملکرد به انواع زیر قابل دسته‌بندی هستند:

۱- بر اساس تأثیر بر روی ساختمان و توالی ژن: به‌طور مثال جهش‌ها می‌توانند موجب حذف[1] و یا اضافه شدن[2] در حد یک یا چند باز آلی[3] و یا حتی بخش بزرگی از کروموزوم[4] شوند.

۲- بر اساس تأثیر بر روی عملکرد ژن: جهش می‌تواند عملکرد ژن را کاهش و یا به‌طورکلی مختل نماید[5]، موجب عملکرد غیرعادی و جدید آن شود[6] و یا به‌صورت جهش‌های کشنده باشد[7] که موجب مرگ ارگانیزم شود.

۳- بر اساس تأثیر بر روی کارایی ارگانیزم: در ژنتیک کاربردی، جهش می‌تواند برای ارگانیزم مضر[8] یا مفید[9] باشد و یا تأثیر خاصی بر آن نداشته باشند[10].

در کنار یک جهش یافته مطلوب و مناسب، روش گزینش برای انتخاب جهش یافته‌های مؤثر حائز اهمیت است. پیشرفت دانش درباره جهش‌زایی و ترمیم DNA موجب شده که روش‌های جهش‌زایی به‌منظور ایجاد انواع جهش یافته مفید به کار گرفته شود (۶).

از جهش‌زاهای فیزیکی امواج میکروویو و اشعه ماوراءبنفش برای بهبود سویه تریکودرما ویریده به‌منظور تولید بالاتر آنزیم کربوکسی متیل سلولاز استفاده شده است. سویه‌های جهش یافته توان بالایی در تولید آنزیم داشتند و مطالعه‌های مولکولی در سویه‌های جهش یافته برتر نشان داد که جهش در ژن کدکننده برای آنزیم اندوگلوکاناز I رخ داده و کارایی این آنزیم را افزایش داده است (۲۰). تولید آنزیم سلولاز در سویه *اکرمونیوم سلولولیتیکوس* با استفاده هم‌زمان از اشعه ماورا بنفش و ماده جهش‌زای NTG[11] از ۳/۱۲ به ۸/۱۷ واحد آنزیمی بر میلی‌لیتر افزایش داده شد و با روش کشت غیر مداوم خوراک‌دهی شده[12] به ۶/۳۴ U/ml رسید (۹).

نوترکیبی DNA

این تکنیک روش مؤثرتری برای افزایش تغییرهای ژنتیکی یک جمعیت است. در این روش ژنوم یا قسمتی از ژن‌ها دوباره مرتب و نوآرایی می‌شوند. نوترکیبی در قارچ‌ها به‌طورمعمول طی چرخه‌های جنسی و غیرجنسی انجام می‌شود. بعضی از قارچ‌ها (مثل آسپرژیلوس) چرخه جنسی کامل دارند و آمیزش هسته‌ای[13] بعد از آمیزش هیف‌ها و مخلوط شدن هسته‌ها در داخل میسلیوم هتروکاریوت انجام می‌شود. پس از تشکیل دیپلوئید، در حین تقسیم میوزی بعدی عمل الحاق روی

[1] Deletion
[2] Insertion
[3] Small-scale mutations
[4] Large-scale mutations

[5] Loss-of-function mutations
[6] Gain-of-function mutations
[7] Lethal mutations
[8] Harmful mutations
[9] Beneficial mutations
[10] Neutral mutations
[11] N-methyl-N' nitro- N-nitrosoguanidine (NTG)
[12] Fed-batch culture
[13] Karyogamy

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:25 +0430 on Friday April 26th 2019

می‌دهد. در بعضی از قارچ‌ها که اهمیت اقتصادی زیادی دارند الحاق غیرجنسی را به‌کار می‌برند که ترکیب دو میسلیوم با قطبیت یکسان یا متفاوت میسلیومی را به‌وجود می‌آورد که دارای صفت هر دو والدین است. کشف فرآیندهای غیرجنسی در قارچ‌های ناقص باعث توسعه روش‌های اصلاح مناسب گردیده است. فناوری نوترکیبی DNA می‌تواند منجر به ساخت ریزسازواره‌های نوترکیب با توانایی تولید یک فرآورده جدید شود. انتخاب سویه‌های مناسب با توانایی بالا برای تولید انواعی از متابولیت‌های ثانویه با حذف هدفمند یک ژن خاص و تولید ساختارهای جدید با استفاده از دست‌ورزی ژنی امکان‌پذیر است (۲۵). بیان بالای ژن سلولاز *تریکودرما ریسی* تحت پروموتر آمیلاز در *آسپرژیلوس اریزای* تحت القای قند مالتوز به‌عنوان تنها منبع کربن انجام شد و تولید آنزیم پس از ۴-۳ روز به حداکثر خود رسید (۳۱). برای بهبود سویه مخمر کریپتوکوکوس، ژن کربوکسی متیل سلولاز آن در مخمر *پیکیا پاستوریس* تحت پروموتور الکل اکسیداز با القای متانول کلون و کشت با تراکم سلولی بالای[1] سویه نوترکیب در بیوراکتور ۲ لیتری انجام شد. تولید آنزیم کربوکسی متیل سلولاز نوترکیب نسبت به سویه اولیه ۶۵۷ برابر افزایش داشت و به ۷۵/۲ میلی‌گرم پروتئین در لیتر رسید (۳۱). ژن آنزیم لیگنین پراکسیداز قارچ *فانروکیت کریزوسپوریوم* در مخمر *پیکیا پاستوریس* کلون شد. cDNA این ژن از روی کل RNA قارچ با PCR توسط پرایمرهایی ساخته شد که فاقد توالی نشانه برای ترشح آنزیم بودند و سپس در وکتور بیانی pPICZα وارد شد. *پیکیا پاستوریس* نوترکیب که حاوی کپی‌های متعددی از این ژن بود، آنزیم لیگنین پراکسیداز را با فعالیت ۱۵ U/l در طی ۱۲ ساعت تولید کرد (۳۵).

ادغام پروتوپلاست

ادغام پروتوپلاست تکنیکی سودمند برای ایجاد نوترکیبی ژنی در ریزسازواره‌های پروکاریوتیک و یوکاریوتیک محسوب شده و به‌ویژه در ارگانیسم‌های صنعتی نظیر قارچ‌ها کاربرد فراوان داشته است. وقتی اطلاعات کافی از بیولوژی و ژنتیک ریزسازواره‌ای وجود نداشته باشد و انجام روش‌های انتقال ژن و جهش‌زایی مشکل باشد از این تکنیک استفاده می‌شود. این روش کاربردی‌ترین روش نوترکیبی ژنتیکی است که هم در گیاهان و هم در قارچ‌ها استفاده می‌شود (۲۵).

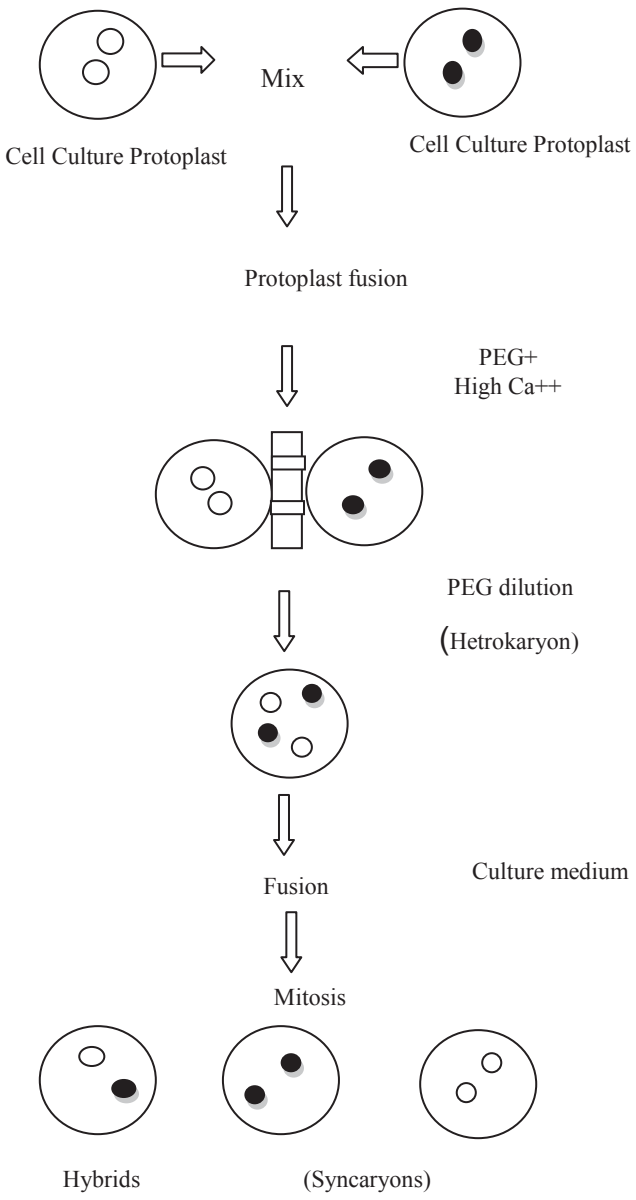
[1] High cell density culture (HCDC)

اولین بار ادغام پروتوپلاست در قارچ *فوزاریوم کالموروم*[2] انجام شد. سعی بر این بود که ادغام پروتوپلاست در قارچ‌های اگزوتروف[3] سویه *ژئوتریکوم کاندیدوم*[4] انجام شود. این تکنیک در تعدادی از قارچ‌ها مانند دوترومیسیت‌ها که تولیدمثل جنسی ندارند به‌کار می‌رود. در آسکومیست‌ها چرخه تولیدمثل جنسی متنوع است و روش ادغام پروتوپلاست باعث ایجاد تنوع ژنتیکی می‌شود و به‌راحتی می‌توان سویه‌ها را خالص‌سازی نمود. القای ادغام پروتوپلاست به کمک پلی‌اتیلن گلیکول[5] اولین بار در پروتوپلاست‌های گیاهی شرح داده شد و سپس به‌طور موفقیت‌آمیزی به‌منظور ادغام پروتوپلاست‌های حیوانی، قارچ‌های رشته‌ای، مخمرها، گونه‌های باسیلوس و استرپتومیست و استافیلوکوکوس به‌کار گرفته شد (۲۲). ادغام پروتوپلاست می‌تواند به‌صورت درون‌گونه‌ای[6]، بین‌گونه‌ای[7] یا حتی بین جنسی[8] صورت گیرد (۲،۲۷،۲۸). از این روش برای تولید محصول‌های زیستی مهم به‌منظور بهبود بازده محصول و جهت درک بهتر چگونگی راه‌های سنتز متابولیت‌های ثانویه نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها و یا آنزیم‌ها استفاده شده است. به‌منظور شناسایی رمز ژنتیکی ریزسازواره‌ها نظیر تعیین جایگاه ژن‌ها و چگونگی عملکرد آن‌ها نیز از این روش بهره گرفته شده است. ادغام پروتوپلاست هم‌چنین موجب پیشرفت‌های بسیاری در کاربرد وسیع نوترکیبی به‌منظور تشکیل هیبرید درون‌گونه‌ای و تشکیل محصول‌های جدید شده و به‌خصوص برای بهبود ریزسازواره‌های صنعتی که بررسی ژنتیکی وسیعی در مورد آن‌ها صورت نگرفته است بسیار مفید و کارا است (۲۲،۲۵،۲۷). شمای کلی این روش در شکل ۳ مشاهده می‌شود.

ادغام پروتوپلاست می‌تواند به‌طور خود به‌خودی یا القایی باشد. در حالت اول هنگام جداسازی پروتوپلاست‌ها، تعدادی از آن‌ها

[2] *Fusarium* culmorum
[3] Auxotroph
[4] Geotrichum candidum
[5] Poly ethylene glycol (PEG)
[6] Intraspecific
[7] Interspecific
[8] Intergeneric

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:25 +0430 on Friday April 26th 2019



شکل ۳:ادغام پروتوپلاست

با یکدیگر ادغام می‌شوند. در این ادغام هیچ عامل القایی بیرونی وجود ندارد و اغلب بین پروتوپلاست‌های یکسان از یک خانواده صورت می‌گیرد. در حالت دوم به‌طور کلی ادغام پروتوپلاست با استفاده از القاکننده‌هایی صورت می‌گیرد تا بالاترین میزان ادغام را بین پروتوپلاست‌ها فراهم کند. به‌طور طبیعی پروتوپلاست‌های جدا شده به‌علت وجود بار منفی در سطح خود با یکدیگر ادغام نمی‌شوند و یکدیگر را دفع می‌کنند. برای انجام ادغام با بالاترین میزان به القاکننده‌های شیمیایی مناسب جهت کاهش بار الکتریکی سطح پروتوپلاست نیاز است تا اجازه داده شود پروتوپلاست‌ها به یکدیگر نزدیک شوند و سپس عمل ادغام صورت گیرد (۱۶،۲۲). عمل القا جهت ادغام به سه طریق صورت می‌گیرد (۱۶).

۱-ادغام مکانیکی: با استفاده از روش‌های مکانیکی مانند میکروپیپت پرفیوژن سعی می‌شود عمل ادغام بین دو پروتوپلاست تحریک شود (۳۲).

۲-ادغام شیمیایی: مواد شیمیایی مانند نیترات سدیم، پلی‌اتیلن گلیکول و یون‌های کلسیم جهت ادغام پروتوپلاست‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۴). این مواد موجب می‌شوند که پروتوپلاست‌های جداشده به‌یکدیگر بچسبند و محکم آگلوتینه شوند. برای ادغام پروتوپلاست دو سویه *تریکودرما ریسی* و *ساکارومیسس سرویسیه* از روش ادغام شیمیایی استفاده شد و مشخص شد که آنزیم اندوگلوکاناز نقش بسیار کلیدی در ادغام پروتوپلاست‌ها دارد. روش ادغام شیمیایی یک روش غیراختصاصی و ارزان است که می‌تواند برای سلول سمی و غیرانتخابی عمل کند و فراوانی ادغام با این روش پایین است.

۳- ادغام الکتریکی: به‌تازگی برای ادغام پروتوپلاست‌ها از یک محرک الکتریکی ملایم استفاده می‌شود. در این روش دو میکروالکترود بسیار باریک در سوسپانسیون پروتوپلاست قرار می‌گیرد و باعث می‌شود که یک میدان الکتریکی ضعیف (۱۰ kV/m) به‌وجود آید و این جریان دی الکتروفورتیک دوقطبی در سوسپانسیون ایجاد نموده و کمک می‌کند تا پروتوپلاست‌ها مانند زنجیر به‌هم نزدیک شوند. پس از این از میدان الکتریکی قوی‌تر (۱۰۰kV/m) به‌مدت چند میکروثانیه جهت شکستن غشاء و ادغام پروتوپلاست‌ها استفاده می‌شود. برای انجام ادغام به این روش وجود یون کلسیم و هم‌چنین پلی‌اتیلن گلیکول به‌عنوان شروع کننده اولیه لازم است. در این روش کنترل ادغام راحت‌تر و فراوانی ادغام تا ۱۰۰٪ است و تکرارپذیر است هرچند تجهیزات موردنیاز برای ادغام الکتریکی گران و استفاده از آن پیچیده بوده و نیاز به آموزش‌های خاص دارد(۳۴).

ادغام پروتوپلاست بین دو جنس تریکودرما و پنی‌سیلیوم به‌منظور افزایش فعالیت سلولازی منجر به سویه‌های ادغام یافته[1] جدیدی شد که در کشت غوطه‌ور[2] توانایی تولید بالای سلولاز را داشتند و در کشت حالت جامد[3] نسبت به سلول‌های والد رشد سریع‌تر و ترشح بیش‌تر آنزیم را نشان دادند (۷).

[1] Fusant
[2] Submerged culture
[3] Solid-state culture

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:25 +0430 on Friday April 26th 2019

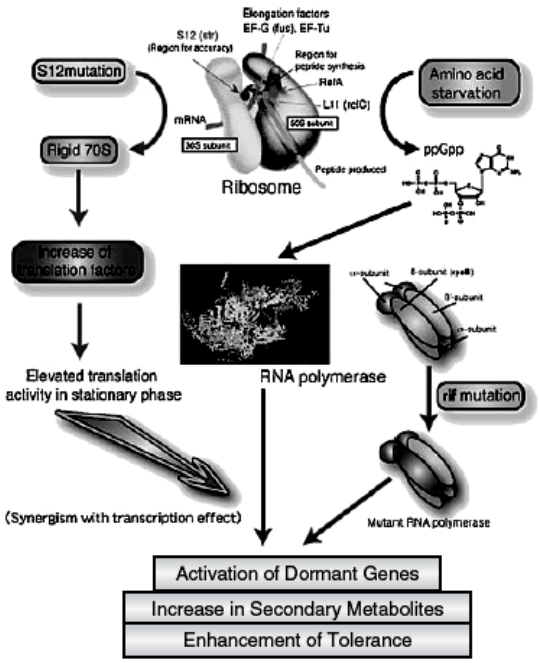
ادغام درون‌گونه‌ای *تریکودرما ریسی* با روش شیمیایی با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول ۴۰٪ به‌منظور افزایش تولید آنزیم کربوکسی متیل سلولاز انجام شد. بیش‌تر پروتوپلاست-های ادغام یافته رشد میسلیومی سریع و اسپورزایی فراوانی داشته و بر روی محیط اختصاصی هاله‌های بزرگ شفاف تشکیل دادند که نشان‌دهنده ترشح مقادیر بالای آنزیم کربوکسی متیل سلولاز نسبت به والدین آن‌ها بود (۲۶).

روش‌های نوین بهبود سویه‌ها

روش‌هایی که در ادامه ارائه می‌شوند به‌تازگی معرفی‌شده‌اند و بیش‌تر تاکنون برای بهبود سویه‌های تولیدکننده آنزیم‌های مؤثر در تجزیه ترکیبات لیگنوسلولزی به‌کار گرفته نشده‌اند لیکن افق جدیدی را در پیش روی محققین این رشته باز می‌نمایند.

مهندسی ریبوزوم

تغییرهای فیزیولوژیکی سلول از جمله تولید متابولیت‌های ثانویه مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و برخی آنزیم‌ها در شرایط سخت می‌تواند منتج از عملکرد گوانوزین تترافسفات[1] باشد. در شرایط سخت مانند محدودیت مواد غذایی از جمله کمبود اسیدهای آمینه، منابع کربن و نیتروژن این ترکیب در سلول انباشته می‌شود. آنزیم اینوزین منوفسفات دهیدروژناز (ppGpp[1]) توسط ppGpp مهار شده و موجب کاهش در مقدار GTP سلول می‌شود. ppGpp به RNA پلی‌مراز متصل شده و به-سرعت سنتز rRNA را مهار می‌کند. این تغییرها می‌تواند منجر به افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه و فعال شدن ژن‌های خفته و تولید ترکیب‌های جدید شود و یا باعث افزایش مقاومت نسبت به ترکیب‌های مضر مانند انواع آلاینده‌ها شود (شکل ۴). بنابراین ppGpp به نوعی تنظیم رونویسی را به‌عهده دارد و هرگونه تغییر و دست‌کاری در ریبوزوم با کمک فنون جهش‌زایی تحت عنوان مهندسی ریبوزوم، با تغییر در دستگاه ترجمه‌ای سلول با القای جهش در ژن‌های مربوطه مانند str و gen و تغییر در دستگاه رونویسی سلول با جهش در ژن‌هایی مانند rif می‌تواند تولید ppGpp را تحت تأثیر قرار دهد (۲۴). ازآنجایی‌که لیگنینازها در شرایط محدودیت نیتروژن تولید می‌شوند و جزو متابولیت های ثانویه هستند امکان بهبود سویه‌های تولیدکننده آن‌ها با روش مهندسی ریبوزوم وجود دارد.



شکل ۴: شمای مهندسی ریبوزوم برای فعال‌سازی سلول (۲۴)

درهم‌آمیختگی ژنوم

یکی از روش بهبود سویه‌ها، درهم‌آمیزی ژنوم است که بر پایه ادغام پروتوپلاست طراحی شده است. هرچند ادغام پروتوپلاست بین گونه‌های مختلف به‌خوبی انجام می‌شود و روشی مفید در بهبود ژنتیکی سویه‌ها است.

روش درهم‌آمیزی ژنوم نسبت به ادغام پروتوپلاست بسیار کارآمدتر است.

ادغام پروتوپلاست بین دو سلول با ویژگی‌های ژنتیکی متفاوت انجام می‌شود و سلول نوترکیب با خصوصیت‌های هر دو والد به وجود می‌آید. اما درهم‌آمیزی ژنوم بین چندین والد صورت می‌گیرد و در نتیجه سلول نوترکیبی به وجود می‌آید که دارای تنوع ژنتیکی بیش‌تری است (۲۱).

به‌طورکلی این روش دارای مزایای زیر است:

۱- در مقایسه با روش‌های کلاسیک مانند موتاسیون و ادغام پروتوپلاست کارایی بالاتری در بهبود فنوتیپ دارد. در این روش از چندین والد به‌صورت همزمان استفاده می‌شود و تعداد هیبرید بیش‌تری تشکیل می‌شود و سرعت به دست آوردن تنوع ژنتیکی نسبت به ادغام پروتوپلاست بیش‌تر است.

۲- برای استفاده از روش درهم‌آمیزی ژنوم نیاز به اطلاعات زیادی در مورد زمینه ژنتیکی ریزسازواره نیست و زمانی‌که اطلاعات زیادی درباره توالی ژنتیکی یک ریزسازواره موجود

[1] Guanosine tetraphosphate (ppGpp)

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:25 +0430 on Friday April 26th 2019

نباشد، نمی‌توان به‌طور مستقیم از طریق دست‌کاری ژنتیکی آن سویه را بهبود بخشید و روش درهم‌آمیزی ژنوم می‌تواند گزینه مناسبی باشد زیرا می‌تواند تغییرهای زیادی را به‌صورت هم‌زمان ایجاد کند بدون آن‌که نیاز به اطلاعات زیاد از ژنوم باشد (۲۱). هم‌چنین در مقایسه با روش‌های مولکولی بهبود سویه‌ها، روش درهم‌آمیزی ژنوم بسیار آسان و کم‌هزینه است و به تجهیزات خاصی نیاز ندارد. این روش، برای بهبود سویه‌های مورد استفاده در صنعت به لحاظ ایجاد برخی شاخص‌های سلولی، افزایش راندمان تولید محصول، افزایش مقاومت سلول و ... کاربرد دارد. روش درهم‌آمیزی ژنوم در کارهای پژوهشی جهت شناسایی چرخه سوخت‌وساز و روش‌های تنظیم سلول نیز به کار می‌رود (۲۱).

به‌تازگی در دو سویه *سفارسومایسس استیپیتیس* [1] GS301 و GS302 با روش درهم‌آمیزی ژنوم، هیبریدهایی تهیه‌شده‌اند که از قندهای گلوکز و زایلوز تخمیر شده از لیگنوسلولز چوب استفاده کرده و آن‌ها را به اتانول تبدیل می‌کنند درحالی‌که نوع وحشی توانایی مصرف مقادیر بسیار کمی از زایلوز یا گلوکز را دارد و الکل کمتری نیز تولید می‌کند (۱).

مهندسی متابولیک[2]

زیست فناوری سامانه‌ای مجموعه بزرگی از فنون جدید برای دست‌یابی به اطلاعات کاملی از فعالیت سلولی در سطح ژنومی (genomics)، رونویسی (transcriptomics)، سوخت‌وساز سلولی (metabolomics)، ترجمه و پروتئین (proteomics) و ... است که تحت عنوان کلی اُمیکس (-omics) نیز شناخته می‌شوند (۱۸،۲۵).

مهندسی متابولیک[3]، در واقع توسعه هدفمند کارخانه‌های سلولی با استفاده از ابزار و فنون مهندسی ژنتیک است. به‌طور سنتی، راهبردهای مهندسی متابولیک[1] اغلب محدود بوده است به وارد نمودن مسیرهای متابولیک جدید به یک ارگانیسم میزبان برای تولید یک محصول جدید، حذف مسیرهای متابولیک برای کاهش و یا حذف محصولات جانبی ناخواسته و یا بیش بیان برخی از ژن‌های کنترل‌کننده سرعت در یک مسیر متابولیک به‌منظور افزایش شار به سمت محصول موردنظر. اگرچه استفاده از این راهبردها در موارد زیادی با موفقیت همراه بوده است، در مورد فنوتیپ‌های پیچیده‌تر، مانند گسترش طیف سوبستراهای قابل‌مصرف و یا افزایش مقاومت نسبت به تنش‌های محیطی، موفقیت‌های کم‌تری گزارش شده است (۲۶). از طرفی ازآن‌جاکه مسیرهای متابولیک در داخل یک سلول، همگی بخشی از یک شبکه بزرگ هستند و با یکدیگر برهم‌کنش دارند، افزایش میزان تولید یک محصول فقط از طریق دست‌کاری در بیان ژن‌های موجود در مسیر بیوشیمیایی مسئول ساخت محصول موردنظر میسر نمی‌شود و در بسیاری از موارد به ایجاد تغییرهایی در ژن‌های خارج‌از مسیر متابولیک اصلی و به‌خصوص ژن‌های تنظیمی نیاز است. این کار، نیازمند دانش کاملی از نقش و نوع برهم‌کنش تمام ژن‌های موجود در یک سلول است و به‌جای تمرکز روی تعداد محدودی ژن و یا مسیر متابولیک، بررسی کل مسیرهای متابولیک و ژن‌های تنظیمی به‌عنوان یک سامانه واحد لازم است. بنابراین در راهبردهای نسل دوم مهندسی متابولیک[1]، زیست‌شناسی سامانه‌ها به‌عنوان ابزاری قوی برای تأمین داده‌های با خروجی زیاد در توالی نوکلئوتیدی و نقش ژن‌ها، میزان بیان ژن‌ها، میزان و نحوه ساخت پروتئین‌ها و اصلاحات بعد از ترجمه‌ای پروتئین‌ها و شار متابولیت‌ها در مسیرهای متابولیکی مختلف و سپس استفاده از این اطلاعات برای تسریع در بهبود هدفمند کارخانجات سلولی توجه می‌شود (۲۳). به‌عبارتی زیست‌فناوری سامانه‌ای مجموعه بزرگی از فنون جدید برای دست‌یابی به اطلاعات کاملی از فعالیت سلولی در سطح ژنومی[4]، رونویسی[5]، سوخت‌وساز سلولی[6]، ترجمه و پروتئین[7] و ... است که تحت عنوان کلی اُمیکس (-omics) نیز شناخته می‌شوند (۲۵، ۱۸).

جنبه کلیدی در مهندسی متابولیک[1]، تجزیه و تحلیل در سطح سلولی برای درک دقیق کارکرد سلولی است که مستلزم به‌کارگیری فنون مختلفی است. در سال‌های اخیر تعدادی از فنون بسیار توانمند برای تجزیه و تحلیل شبکه کامل متابولیک -که اغلب تجزیه و تحلیل مسیرهای متابولیک نامیده می‌شود- توسعه‌یافته‌اند. این تجزیه و تحلیل را می‌توان به سه بخش تقسیم کرد:

- تعیین ساختار شبکه متابولیک؛

کمّی کردن شارها در شاخه‌های مختلف شبکه متابولیک؛ (شار و یا جریان متابولیسم، میزان گردش مولکول ها در مسیر متابولیکی است .شار از طریق آنزیم‌های دخیل در مسیر تنظیم

[1] *Scheffersomyces stipitis*
[2] Metabolic engineering
[3] Metabolic engineering
[4] Genomics
[5] Transcriptomics
[6] Metabolomics
[7] Proteomics

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:25 +0430 on Friday April 26th 2019

می‌شود .درون سلول‌ها تنظیم شار برای تمام مسیرهای متابولیکی برای تنظیم فعالیت مسیر در شرایط مختلف حیاتی است. شارهای متابولیکی عامل اصلی تعیین کننده فیزیولوژی سلول هستند. چراکه آن‌ها سطح تعامل مسیرهای مختلف را در عملکرد کلی سلولی و مسیرهای متابولیکی اندازه‌گیری می-کنند).

- تعیین ساختارهای کنترلی در یک شبکه متابولیک.

برای تعیین ساختار شبکه متابولیک، می‌توان از اطلاعات موجود در منابع بیوشیمی بهره جست. گزارش‌های زیادی در مورد فعالیت‌های ویژه آنزیمی در گونه‌های مختلف وجود دارد و برای میکروارگانیسم‌های زنده مهم صنعتی، شبکه‌های متابولیک اصلی مشخص شده‌اند.

پس از شناسایی ساختار شبکه متابولیک، باید شارهای هریک از شاخه‌های مختلف شبکه را کمّی نمود که این کار به‌اصطلاح فلاکسوم نامیده می‌شود. ساده‌ترین روش برای تعیین فلاکسوم، استفاده از موازنه متابولیت است. به‌این ترتیب، موازنه ماده برای هریک از متابولیت‌های شبکه برقرار می‌شود و با فرض حالت پایا برای غلظت متابولیت‌ها، یک‌سری معادلات جبری مرتبط‌کننده شارها به یکدیگر، به‌دست می‌آید. این معادلات یک‌سری محدودیت‌هایی بر هریک از شارهای موجود در شبکه اعمال می‌کنند. با اندازه‌گیری تعدادی از شارها و یا با استفاده از برنامه‌ریزی خطی، امکان محاسبه شارها در هر یک از شاخه‌های شبکه وجود دارد. مفهوم موازنه متابولیت به‌دلیل سادگی آن بسیار جذاب است، اما محدودیت‌هایی نیز دارد. تخمین شارها به موازنه کوفاکتور یعنی موازنه NADH و NADPH بستگی دارد، بنابراین توجه به همه واکنش‌های داخل سلول که به‌نحوی شامل این کوفاکتورها می‌شوند، اهمیت دارد. ازآن‌جاکه شناسایی همه این‌گونه واکنش‌ها در یک میکروارگانیسم بعید به‌نظر می‌رسد، موازنه متابولیت ممکن است به تخمین غیردقیقی از برخی از شارهای متابولیت منجر شود. با استفاده از گلوکز برچسب گذاری شده با C و بررسی الگوی برچسب‌دار شدن متابولیت‌های داخل سلولی از طریق NMR و یا GC-MS، امکان اعمال موازنه‌ها برای هریک از اتم‌های کربن علاوه‌بر موازنه متابولیت‌ها وجود دارد. به‌این‌ترتیب سری جدیدی از محدودیت‌ها ایجاد می‌شود و دیگر نیازی به توجه به موازنه کوفاکتورها نیست. به‌علاوه، ازآن‌جاکه می‌توان بسیاری از موازنه‌ها را برای اتم‌های کربن منفرد اعمال نمود، یکسری از معادله‌ها بیش تخمین به‌دست می‌آید که در آن تعداد معادله‌ها از تعداد شارهای نامعلوم بیش‌تر است. زیاد بودن تعداد معادله‌ها در مقایسه با مجهول‌ها، تخمین مطمئن‌تری از شارهای موجود ونیز شارهای برگشت‌پذیر در شبکه را امکان‌پذیر می‌سازد.

نرم‌افزارهای(DFBA) Flux Balance Analysis (FBA)، Dynamic Flux Balance Analysis، OptKnock، OptFlux، OptStrain و EMIlio برای بهبود و طراحی سویه به‌روش مهندسی متابولیک[1] مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌طور مثال از روش مهندسی متابولیک[1] برای تولید انانتیوپور[2] ۲ و۳ بوتان‌دی‌ال (به‌عنوان یک سوخت زیستی) از منابع زیست تخریب‌پذیر استفاده شده است. هیچ سویه باکتریایی توانایی تولید این سوخت زیستی را از ترکیب‌های لیگنوسلولزی هیدرولیز شده ندارد. باکتری *آنتروباکتر کلواکه*[3] به‌نحوی مهندسی متابولیک[1] شده که بتواند بیوکاتالیست کارامد برای تولید این انانتیوپور را بسازد. ژن‌های مربوط به مسیرهای متابولیکی مانند ژن آنزیم‌های ۲ و ۳ بوتان‌دی‌ال‌دهیدروژناز و مزو- ۲ و ۳ بوتان‌دی‌ال‌دهیدروژناز و گالاکتوز پرمیاز[4] در یک کلاستر به‌نحوی طراحی و ساخته‌شده‌اند که این سویه مهندسی‌شده توانایی مصرف هم‌زمان گلوکز و زایلوز را برای تولید محصول دارد. حتی ژن‌های تولید محصول‌های جانبی نیز حذف‌شده‌اند تا محصول با راندمان بالا تولید شود (۱۹).

نتیجه‌گیری و چشم‌انداز آینده

ساخت سویه‌های توانمند و یا بهبود آن‌ها به‌عنوان ابزار اولیه برای تولید گستره وسیعی از فرآورده‌های زیستی با کیفیت و راندمان بالا و قیمت تمام‌شده پایین از اهداف اصلی زیست فناوری است. بدین‌منظور روش‌های کلاسیک و روش‌های نوین مبتنی بر فنون مهندسی ژنتیک و فناوری DNA نوترکیب می‌توانند در دست‌یابی به این سویه‌ها مفید واقع شوند. روش‌های گوناگونی که در این مقاله به آن اشاره شد، هر یک مزایایی داشته و در مواردی استفاده از آن‌ها مشکلاتی را در بر دارند. شناخت سویه موردنظر و اطلاعات موجود برای آن اعم از ساختار ژنتیکی، متابولیکی و سلولی و نیز نوع فرآیند زیستی و محصول این امکان را برای محققین فراهم می‌کند تا روش مناسب را انتخاب نمایند. بدیهی است روش‌های نوین با توجه به این‌که امکان تغییرهای هدفمند را در سویه موردنظر ایجاد

[1] Metabolic engineering
[2] Enantiopure
[3] *Enterobacter cloacae*
[4] galactose permease

می‌کنند ابزار منحصربه‌فردی را برای تهیه سویه‌های بهبود یافته کارآمد در اختیار می‌گذارند.

سپاسگزاری

از حمایت مالی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که در قالب طرح ۲۶۶ و ۳۲۹ به انجام رسیده است، قدردانی می‌شود.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:25 +0430 on Friday April 26th 2019

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:25 +0430 on Friday April 26th 2019

منابع

1.Bajwa, P. K., Phaenark, C., Grant, N., Zhang, X., Paice, M., Martin, V. J., Trevors, J. T. & Lee, H. Ethanol production from selected lignocellulosic hydrolysates by genome shuffled strains of Scheffersomyces stipitis. Bioresour Technol, 2011. 102(9):P. 965-9969.

2.Balasubramanian, N. & Lalithakumari, D. Characteristics of protoplast inter, intra-fusant and regeneration of antagonistic fungi Trichoderma harzianum and Trichoderma viride. Afr. J. Biotechnol, 2008.7.

3.Bayer, E. A., Chanzy, H., Lamed, R. & Shoham, Y. Cellulose, cellulases and cellulosomes. Curr Opin Struct Biol, 1998.8:p, 548-557.

4.Beguin, P.. Molecular biology of cellulose degradation. Annu Rev Microbiol, 1990, 44:P. 219-248.

5.Bosco, F., Ruggeri, B. & Sassi, G. Performances of a trickle-bed reactor (TBR) for exoenzymes production by Phanerochaete chrysosporium: influence of superfacial liquid velocity. Chem. Eng. Sci, 1999. 54:P. 3163-3169.

6.Bowman, B. H., Taylor, J. W. & White, T. J. Molecular evolution of the fungi: human pathogens. Mol Biol Evol, 1992. 9:P. 893-904.

7.Dillon, A. J. P., Camassola, M., Henriques, J. A. P., Fungaro, M. H. P., Azevedo, A. C. S., Velho, T. A. F. & Laguna, S. E. Generation of recombinants strains to cellulases production by protoplast fusion between Penicillium echinulatum and Trichoderma harzianum. Enzyme Microb Technol , 2008. 43:p. 403-409.

8.Faison, B. D., Kirk, T. K. & Farrel, R. L. Role of veratryl alcohol in regulating ligninase activity in Phanerochaete chrysosporium. J Appl Environ Microbiol, 1986. 52:p. 251-254.

9.Fang, X., Yano, S., Inoue, H. and Sawayama, S. Strain improvement of Acremonium cellulolyticus for cellulase production by mutation. J Biosci Bioeng, 2009. 107(3), :p.256-261.

10.Gold, M. H. & Alic, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium. Microbiological reviews, 1993. 57:p. 605-622.

11.Hatakka, A. I. & Uusi-Rauva, A. K. Degradation of 14C-labelled poplar wood lignin by selected white-rot fungi. Eur J Appl Microbiol Biotechnol. 1983. 17:P: 235-242.

12.Hubbe, M. A., Nazhad, M. & Sanchez, C. Composting as a way to convert cellulosic biomass and organic waste into high-value soil amendments: A review. BIORESOURCES, 2010. 5:P. 2808-2854.

13.Ikram-ul, H., Ali, S., Qadeer, M. & Iqbal, J. Citric acid production by selected mutants of Aspergillus niger from cane molasses. Bioresour Technol, 2004. 93:p. 125-130.

14.Jemaneh, Z. Xylanase production by the termite associated fungus, Termitomyces sp. and its role in the termite nest. AAU. 2007.

15.Kapich, A. N., Jensen, K. A. & Hammel, K. E.. Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. FEBS letters, 1999. 461:p. 115-119.

16.Khattab, A. & Bazzara, W. Screening, mutagenesis and protoplast fusion of Aspergillus niger for the enhancement of extracellular glucose oxidase production. J Ind Microbiol Biotechnol. 2005. 32:P. 289-294.

17.Kirk, T. K. & Farrell, R. L. Enzymatic" combustion": the microbial degradation of lignin. Annu Rev Microbiol, 1987. 41:P. 465-501.

18.Kumar, R., Singh, S. & Singh, O. V.. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. J Ind Microbiol Biotechnol, 2008. 35:P. 377-391.

19.Li, L., Li, K., Wang, Y., Chen, C., Xu, Y., Zhang, L., Han, B., Gao, C., Tao, F. & MA, C. Metabolic engineering of Enterobacter cloacae for high-yield production of enantiopure (2R, 3R)-2, 3-butanediol from lignocellulose-derived sugars. METAB ENG, 2015. 28:P. 19-27.

20.Li, X.h., Yang, H.J., Roy, B., Park, E.Y., Jiang, L.J., Wang, D. and Miao, Y.G. Enhanced cellulase production of the Trichoderma viride mutated by microwave and ultraviolet. Microbiol Res J Int, 2010 .165(3), pp.190-198.

21.Mielgo, I., Moreira, M., Feijoo, G. & Lema, J. Biodegradation of a polymeric dye in a pulsed bed bioreactor by immobilised Phanerochaete chrysosporium. Water Res. 2002, 36:P 1896-1901.

22.Miyamoto, K.. Renewable biological systems for alternative sustainable energy production, J Sci Food Agric ISO. 1997

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 5:25 +0430 on Friday April 26th 2019

23.Nissen, T. L., Kielland-Brandt, M. C., Nielsen, J. & Vlladsen, J. Optimization of ethanol production in Saccharomyces cerevisiae by metabolic engineering of the ammonium assimilation. METAB ENG, 2000. 2:P. 69-77.
24.Ochi, K. From microbial differentiation to ribosome engineering. Biosci Biotechnol Biochem, 2007. 71:P. 1373-1386.
25.Parekh, S., Vinci, V. & Strobel, R. Improvement of microbial strains and fermentation processes. Appl Microbiol Biotechnol, 2000. 54:P. 287-301.
26.Petranovic, D., Vemuri, G. Impact of Yeast Systems Biology on Industrial Biology. Biotechnol 2009. 144:P. 204-211.
27.Prabavathy, V., Mathivanan, N., Sagadevan, E., Murugesan, K. & Lalithakumari, D. Intra-strain protoplast fusion enhances carboxymethyl cellulase activity in Trichoderma reesei. Enzyme Microb Technol, 2006. 38:P. 719-723.
28.Solis, S. & Flores, M.. Improvement of pectinase production by interspecific hybrids of Aspergillus strains. Lett Appl Microbiol, 1997. 24:P. 77-81.
29.Suto, M. & Tomita, F.. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. J Biosci Bioeng, 2001. 92:P. 305-311.
30.Tabandeh, F., Roaiaee, M., Bambai, B., Molaie M., Ghasemi, F. Isolation and identification of bagasse degrading fungi; Iranian Journal of Biology, 2009. 22:P. 442-452.
31.Takashima, S., Ilkura, H., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H. & Uozumi, T. Overproduction of recombinant Trichoderma reesei cellulases by Aspergillus oryzae and their enzymatic properties. J Biotech, 1998. 65:P. 163-171.
32.Tate III, R. L. Soil microbiology, John Wiley and Sons. *1995*
33.Thongekkaew, J., Ikeda, H., Masaki, K. & Iefuji, H. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast Cryptococcus sp. S-2: purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of Pichia pastoris. Protein Expr Purif, 2008. 60:P. 140-146.

34.Verma, N., Bansal, M. & Kumar, V. Protoplast fusion technology and its biotechnological applications. Chem Eng Trans 2008. 14:P. 1-13.
35.Wei, W. & Xianghua, W. Expression of lignin peroxidase H2 from Phanerochaete chrysosporium by multi-copy recombinant Pichia strain. J Environ Sci. 2009. 21:P. 218-222.
36.Zaldivar, M., Velasqez, J. C., Contreras, I. & Perez, L. M. Trichoderma aureoviride 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. Electron J Biotechnol, 2001 .4: 13-14.