

بررسی روش های ژنتیکی مورد استفاده جهت بهبود کارایی سویه های میکروبی تجزیه کننده ترکیب های لیگنوسلولزی

فاطمه تابنده*، کژال فرهمندی

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

چکیده

لیگنوسلولز متشکل از سلولز، همی سلولز و لیگنین است. سلولز و همی سلولز، ماکرو مولکول هایی از قندهای مختلف هستند، در حالی که لیگنین یک پلی مری آروماتیک تشکیل شده از پیش سازهای فنیل پروپانئید است. هرچند ترکیب اصلی مواد لیگنوسلولزی را سلولز تشکیل می دهد که نسبت به تجزیه زیستی حساس است، اما این پلی ساکارید به طور معمول در طبیعت به صورت فیزیکوشیمیایی به لیگنین باند شده است. از آنجایی که لیگنین یک ترکیب مقاوم به تخریب زیستی است، تا حدودی سلولز را در مقابل حمله میکروبی محافظت می کند. اهمیت تجزیه لیگنوسلولز به دلیل کاربردهای فراوان آن ها در صنایع تبدیلی و استفاده از آن ها به عنوان مواد خام در صنایع مختلف بالاخص برای تولید فرآورده های زیستی گوناگون است. سویه های مؤثر در تخریب زیستی ترکیب های لیگنوسلولزی، باید دارای یک سیستم آنزیمی قوی و کارا برای تجزیه این ترکیب ها باشند. انواعی از سویه های قارچی متعلق به قارچ های پوسیدگی سفید به عنوان ریزسازواره های توانمند در این فرآیند معرفی شده اند. با این حال پژوهش های وسیعی برای بهبود سویه های باکتریایی و قارچی تجزیه کننده لیگنوسلولز انجام شده است. علاوه بر روش های سنتی و قدیمی مانند جهش زایی، روش های نوین مبتنی بر دست ورزی ژنتیکی جهت بهبود سویه ها با هدف افزایش بهره دهی فرآیندهای صنعتی پیشنهاد شده اند. در این مقاله به شرح مختصری راجع به این روش ها پرداخته شده و مثال هایی از هریک برای بهبود سویه های تجزیه کننده ترکیب های لیگنوسلولزی ارائه گردیده است.

واژه های کلیدی: ترکیب های لیگنوسلولزی، تجزیه زیستی، بهبود سویه، دست ورزی ژنتیکی، جهش زایی، ادغام پروتوپلاست

مقدمه

عمده ترین ترکیب زیست توده، لینگوسلولز است که حدود نیمی از مواد تولید شده توسط فتوسنتز را تشکیل می دهد. لینگوسلولز از سه نوع پلی مر سلولز، همی سلولز و لیگنین تشکیل شده که به لحاظ شیمیایی توسط پیوندهای غیر کووالانسی و اتصالات عرضی کووالانسی به یکدیگر متصل شده اند، ترکیب و درصد این پلیمرها در گونه های مختلف گیاهی متفاوت است (۴،۸). تجزیه زیستی سلولز، همی سلولز و لیگنین از سال های قبل مورد توجه بیوتکنولوژیست ها بوده است. تعداد زیادی از باکتری ها و قارچ ها می توانند با استفاده از

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: ۱۳۹۶/۰۷/۳۰

آنزیم های هیدرولیتیک یا اکسیداتیو این ماکرومولکول ها را تجزیه نمایند. در طبیعت، اتصال های این پلی مرها باعث کاهش تجزیه زیستی آن ها شده و تنوع سوبستراهای سلولزی و لیگنوسلولزی باعث بروز مشکل هایی در مطالعه های آنزیمی آن ها شده است (۸،۱۸). قارچ ها شناخته شده ترین ریزسازواره های هستند که توانایی تجزیه این سه پلی مر را دارند. به علت نامحلول بودن سوبستراها تجزیه باکتریایی و قارچی به صورت خارج سلولی صورت می گیرد. دو نوع سیستم آنزیمی خارج سلولی در میکروارگانیسم ها وجود دارد: سیستم هیدرولیتیک که تولید هیدرولازها را به عهده دارد و مسئول تجزیه سلولز و همی سلولز است و سیستم لیگنولیتیک اکسیداتیو که به- اختصاص باعث تجزیه لیگنین می شود (۱۰). طی دهه ۱۹۹۰ ژنتیک مولکولی سامانه های تجزیه کننده سلولز، همی سلولز و لیگنین پیشرفت قابل توجهی داشت. اکثر آنزیم ها هم در میزبان های همولوگ و هم در میزبان های هترولوگ کلون، تعیین توالی و بیان شده و درباره ساختمان، ساختار ژنومی و

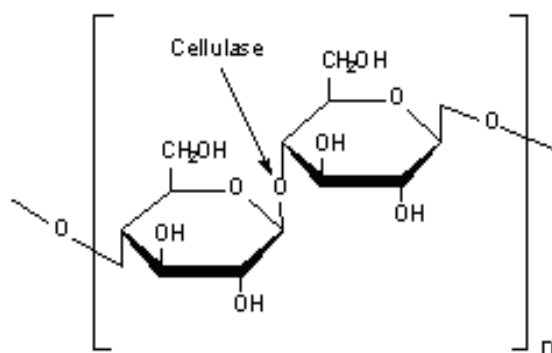
به اکسیژن داشته باشند، بهره‌وری بالاتری داشته باشند و یا قادر به متابولیسم کردن سوبستراهای ارزان قیمت باشند. تغییرات و بهینه‌سازی ژنوتیپ ریزسازواره‌ها، می‌تواند به بیوسنتز متابولیت‌های جدید، منجر گردد. روش‌های متفاوتی مانند موتان‌زایی، نوترکیبی DNA، ادغام پروتوپلاست برای بهبود سویه‌ها وجود دارد. به‌تازگی روش‌های نوین دیگری مانند سیستم بیوتکنولوژی^۲، مهندسی ریبوزوم^۳، درهم‌آمیختگی ژنوم^۴ و روش‌های کلی تحت عنوان امیکس^۵ نیز شناخته شده‌اند که نسبت به روش‌های قبلی بسیار مؤثرترند (۱۸،۲۵).

در این تحقیق ابتدا به معرفی ترکیب لیگنوسلولز و میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده آن‌ها و در انتها به معرفی برخی روش‌های جدید بهبود سویه‌های تجزیه‌کننده لیگنوسلولز پرداخته شده 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 علاوه بر 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 ۱ و ۴ به‌عنوان واحد ساختمانی سلولز

تنظیم ژن‌های کد کننده این پروتئین‌ها اطلاعات زیادی به‌دست آمده 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 لینگنوسلولاز در مراحل مختلف تولید خمیر کاغذ جهت پیش‌تیمار 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 پیش‌تیمار 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 گنجینه 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 میکروکروم‌ها و قارچ‌ها وجود دارد (۶). منظور از بهبود سویه‌ها^۱، تغییر صفت سویه‌های موردنظر در جهت دلخواه با هدف بهبود ارزش‌های کمی و کیفی فرآورده‌هاست. به‌طور کلی، مسائل اقتصادی انگیزه اصلی برای ایجاد سویه‌های جدید به شمار می‌روند، زیرا به‌طور کلی 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 (۶، ۱۸). بسته به نوع کاربرد ریزسازواره در سیستم موردنظر ممکن است جداسازی و بهبود سویه‌هایی مطلوب باشد که به زمان رشد کوتاه‌تری نیازمند باشند، احتیاج

² Systems biotechnology

³ Ribosome Engineering

⁴ Genome shuffling

⁵ X-omics

¹ Strain improvement

اهمیت سلولز

مقدار کربن موجود در مواد سلولزی گیاهان بسیار زیاد است، به طوری که می تواند بخش مهمی از مواد آلی خاک و منبع سرشاری از مواد کربن دار برای تغذیه ریزسازوارهها محسوب شود. به طور کلی میکروارگانیسم های گوناگونی توانایی تجزیه سلولز را داشته و از آن به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می کنند. می توان گفت بدون هیدرولیز سلولز توسط میکروارگانیسم ها قسمت بزرگی از موجودات که نشخوارکنندگان هستند، از نظر غذایی در فقر بوده و قادر به تغذیه از علوفه نخواهند بود. میکروب های هوازی بخش عمده سلولز محیط را به دی اکسید کربن، اکسید کرده و به جو بازمی گردانند که طی این فرآیند امکان چرخه کربن و گردش انرژی فراهم می شود. از سوی دیگر، مقدار کمی از سلولز در فرآیند بی هوازی به صورت متان تشکیل شده و وارد جو می گردد که در نهایت متان با ازن وارد واکنش شده و به دی اکسید کربن و آب تبدیل می شود. سلولز علاوه بر اهمیتی که در طبیعت دارد در صنعت نیز حائز اهمیت است به طوری که با هیدرولیز آن اسیدهای آلی، استون، الکل ها و پروتئین حاصل می شود، لذا امروزه این ماده بسیار مورد توجه است (۱۵، ۱۲).

ریزسازواره های تجزیه کننده سلولز

به علت اهمیت خاصی که تجزیه زیستی سلولز در چرخه کربن دارد توجه زیادی به ریزسازواره های تجزیه کننده این ماده شده است. اکثر ریزسازواره های تجزیه کننده سلولز به گروه باکتری ها و قارچ ها تعلق دارند اگرچه در میان آنها تعدادی پرتوزواهای آبی نیز دیده می شود. ریزسازواره های سلولولیتیک می توانند با سایر جدایه های غیرسلولولیتیک در تجزیه سلولز روابط سینرژیستی داشته باشند. میان کنش های بین دو جمعیت منجر به تجزیه کامل سلولز و آزادسازی دی اکسید کربن و آب تحت شرایط هوازی و دی اکسید کربن، متان و آب تحت شرایط بی هوازی شود. این موجودات به طور معمول در کلیه خاک های زراعی و جنگلی به تعداد فراوان وجود دارند. همچنین در کودهای دامی و روی بافت های در حال فساد نیز دیده شده اند. به طور کلی ریزسازواره های مهم و مؤثر در تجزیه سلولز را می توان به گروه های باکتری های هوازی مزوفیل، باکتری های بی هوازی مزوفیل و قارچ ها دسته بندی کرد (۳۶، ۲۹). در بین قارچ ها تعداد گونه های تجزیه کننده سلولز بسیار زیاد است به علاوه چون قدرت نفوذ این موجودات میکروارگانیسم به داخل بافت های گیاهی خیلی بیش تر از سایر ریزسازواره ها است عامل اصلی تجزیه بیولوژیکی مواد سلولزی خاک هستند. انواع

متعددی از قارچ ها شامل جنس های آسپرژیلوس، پنی سیلیوم، فوزاریوم، تریکودرما، نوروسپورا، ترمونوسپورا دارای فعالیت تجزیه کننده سلولز هستند. نوروسپورا کراسا و آسپرژیلوس ترئوس نیز دارای فعالیت سلولازی هستند که مورد اخیر از لحاظ تولید سلولاز از تریکودرما صنعتی هم بهتر بوده است. برخی قارچ ها مثل ترمونوسپورا وقتی سلولز را تجزیه می کنند قادر به تجزیه نشاسته نیز هستند و در حقیقت سلولاز را همراه با آمیلاز دارند. در کل، مقدار تولید آنزیم سلولاز در قارچ ها بالاست که در برخی از آنها تا ۱۰ برابر باکتری ها نیز می رسد. تعدادی از قارچ ها دارای ترشحات سمی هستند که به این علت نمی توان از آنها برای بهینه سازی خوراک دام و طیور استفاده کرد و از طرف دیگر هوازی بودن آنها باعث عدم استفاده از آنها در شرایط بی هوازی برای هضم سلولز می شود. ولی با وجود این نقایص، قارچ ها در میان سایر ریزسازواره ها نقش بسیار مفیدی در خاک و سهم بسزایی در تجزیه بیولوژیکی سلولز دارند (۱۱، ۳). جدول ۱ اسامی مهم ترین سویه های میکروبی تجزیه کننده سلولز را نشان می دهد.

جدول ۱: انواعی از گونه های قارچی، باکتریایی و اکتینومیستی تولید کننده آنزیم سلولاز (۲۲)

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

همی سلولز

همی سلولزها هیچ شباهت ساختمانی با سلولز ندارند و بیش تر پلی ساکاریدهایی هستند که از پنتوزهای گوناگون نظیر زایلوز، آرابینوز و هم چنین هگزوزهای متنوع مانند مانوز، گلوکز و گالاکتوز یا اسیدهای اورونیک نظیر اسید مانورونیک و اسید گالاکتورونیک تشکیل شده اند. از ترکیب های همی سلولز می توان به زایلان ها، مانال ها و گالاکتان ها اشاره کرد. همی سلولز علاوه بر گیاهان در کپسول برخی باکتری ها نیز وجود دارد (۱۴).

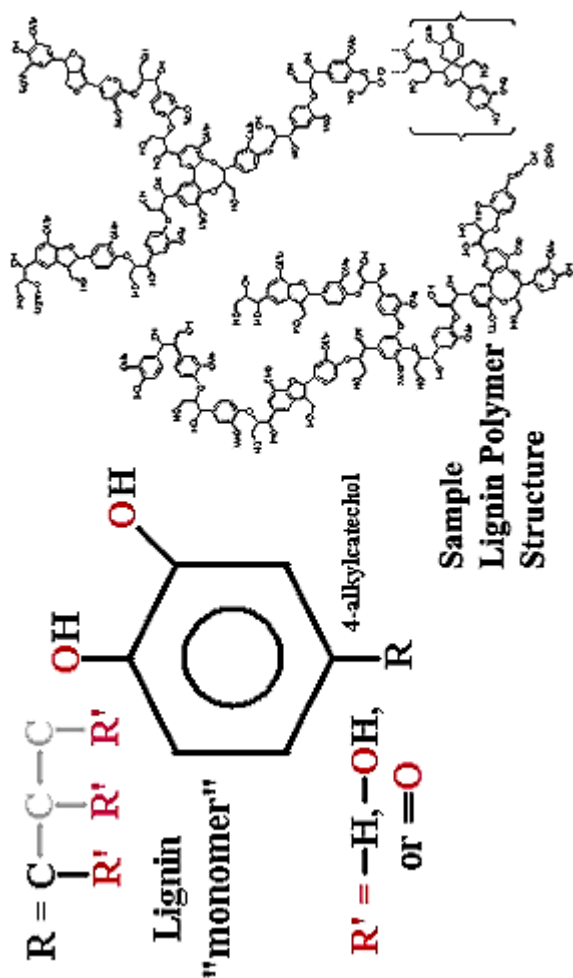
ریزسازواره های تجزیه کننده همی سلولز

قارچ ها و باکتری های زیادی قادر به تجزیه همی سلولز هستند. از میان قارچ ها، آترناریا، فوزاریوم، پنی سیلیوم، اسپریژیلوس، موکور و ریزوپرس از عمده ترین تجزیه کنندگان همی سلولز محسوب می شوند و از میان باکتری ها اکتیومیست ها، باسیلوس، آگروموباکتریوم و سودوموناس در شرایط هوازی و کلاستریدیوم ها و ویبریون ها در شرایط بی هوازی قادر به تجزیه همی سلولز هستند. درصد تجزیه همی سلولز به مخصوص در خاک های اسیدی توسط قارچ ها بیش تر است (۱۴، ۳۲).

لیگنین

لیگنین پلی مری است که به طور فراوان در طبیعت یافت می شود. حضور لیگنین در دیواره سلولی باعث ایجاد دوام ساختاری، عدم نفوذ پذیری و مقاومت در برابر حملات میکروبی و فشارهای اکسیداتیو می شود. از لحاظ ساختاری لیگنین یک هتروپلیمر مربعی شکل بوده، غیر محلول در آب و از لحاظ نوری غیر فعال است. لیگنین از واحدهای فنیل پروپان تشکیل شده است که از طریق انواع مختلفی از اتصالات به یکدیگر پیوند یافته اند. بیوسنتز لیگنین از فنیل آلانین آغاز می شود (شکل ۲). دامیناسیون، هیدروکسیلاسیون حلقه، متیلاسیون و احیای گروه های کربوکسیل منجر به تولید پیش ماده سینامیل الکل می شود که به صورت اکسیداتیو پلی مریزه می شوند. سنتز لیگنین به این خاطر که این پلی مریزاسیون آن در سطح آنزیمی صورت نمی گیرد یک پدیده غیر معمول و منحصر به فرد محسوب می شود. تشکیل این پلی مر در واقع از طریق تولید رادیکال های آزاد است که از طریق دهیدروژناسیون سه الکل فنیل پروپیونیک به واسطه پراکسیداز انجام می شود. الکل های فنیل پروپیونیک شامل کوماریل الکل (پ- هیدروکسی فنیل پروپانل)، کنیفریل الکل (گوآیاسیل پروپانل) و سیناپیل الکل (سیری نگیل پروپانل) هستند. کنیفریل الکل عمده ترین ترکیب لینگنین چوب های سخت است و دو الکل دیگر در ساختار

چوب های نرم بیشتر یافت می شود. 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

ریزسازواره های تجزیه کننده لیگنین

قارچ های پوسیدگی قهوه ای به وسیله مکانیسمی که هنوز معلوم نیست از سد حفاظتی لیگنین در چوب سالم عبور کرده و به طور مستقیم به ترکیب های سلولزی و همی سلولزی چوب حمله می کنند. بخش هایی از درخت که بدین طریق تخریب می شوند به صورت یک پودر قهوه ای درمی آیند که به طور عمده از لینگنین تجزیه شده به وسیله آنزیم ها تشکیل شده اند.

در مواردی می توان از هرچند روش برای به حداکثر رساندن میزان محصول استفاده کرد. یکی از مشکل های کاربرد تکنیک های ژنتیکی جدیدتر برای اصلاح فرآیندهای موجود این است که اطلاعات ژنتیکی اولیه ارگانسیم هایی که بیشترین کاربرد را در صنعت دارند، متأسفانه به طور کامل در بانک های اطلاعاتی موجود نیست (۱۲). بین تحقیقات بنیادی و کاربردهای صنعتی، شکاف مشخصی وجود دارد. قبل از اینکه روش های جدید و مناسب بتوانند جایگزین مجموعه روش های تجربی فعلی گردند، می بایست بیوسنتز و تنظیم و هم چنین مبانی ژنتیک ریزسازواره های مهم صنعتی، شناخته شود. در ده سال اخیر، در چندین مؤسسه صنعتی گام هایی برای پر کردن شکاف بین دانش پایه و کاربرد صنعتی برداشته شده است. جهش زایی، روش نو ترکیبی DNA و ادغام پروتوپلاست، روش هایی متداول برای بهبود سویه ها است. روش های دیگری مانند سیستم بیوتکنولوژی، مهندسی ریبوزوم، درهم آمیختگی ژنوم و روش های کلی تحت عنوان امیکس مثال هایی از استفاده از فن آوری هایی جدید است که در زمینه های مختلف صنعتی کاربرد دارند (۶، ۱۸، ۲۵). واژه امیکس اشاره به آنالیز جامع سامانه های زیستی دارد. امیکس یک عبارت کلی برای یک رشته گسترده از علم و فناوری برای تجزیه و تحلیل میان کنش اطلاعات زیستی در انواع omes، شامل ژنوم، متابولم، پروتئوم، ترنسکریپتوم و غیره است.

جهش زایی

یکی از مهم ترین روش های بهبود راندمان تخمیر، تولید سویه های بهینه از طریق جهش زایی است که باعث تغییرهای پایدار در ژنوتیپ می شود. به طور کلی جهش زایی می تواند به صورت خودبه خودی^۱ و یا القا^۲ انجام شود. جهش زایی خود به خودی کمابیش در طی همانندسازی DNA با تغییر در باندهای هیدروژنی، حذف یا اضافه شدن یک باز آلی، دامینه شدن باز آلی و موارد مشابه دیگر ایجاد می شود. اما جهش زایی القایی در اثر عوامل جهش زای^۳ شیمیایی، فیزیکی و زیستی رخ می دهد. اشعه ماورا بنفش با طول موج کوتاه از عوامل جهش زای فیزیکی است که در طول موج های بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ نانومتر موجب جهش پایدار می شود (۱۳، ۱۶). در جهش زایی با مواد شیمیایی جهش به طور یکنواخت در مجموعه ژنی توزیع نمی شود بلکه در نواحی خاصی مانند سامانه های ترمیمی سلول

برعکس قارچ های عامل پوسیدگی سفید ترجیحاً لیگنین را تجزیه کرده و آن را به صورت یک ماده سلولزی و فیبری نرم درمی آورند. قارچ های پوسیدگی سفید و قهوه ای از لحاظ تاکسونومی به هم نزدیک هستند و به طور کلی پس از یکدیگر و یا به طور هم زمان عمل خود را انجام می دهند و باعث تجزیه بیولوژیکی کامل چوب می شوند. تجزیه زیستی لیگنین یک روند اکسیداسیون پیچیده است و مانند مرحله تشکیل لیگنین به صورت غیرمستقیم و تصادفی است. ریزسازواره های تجزیه کننده لیگنین به اکتینومیست ها، بازیدیومیست ها و تعدادی از باکتری ها تقسیم بندی می شوند. برخلاف قارچ ها که بیش تر انواع چوب ها را مورد حمله قرار می دهند، فقط بعضی از چوب های علفی توسط باکتری ها تجزیه می شوند. برخی از چوب ها نیز به خاطر طبیعت خاصی که دارند فقط توسط باکتری ها تجزیه می شوند. برای مثال می توان از چوب آئوزی دروکسیلون نام برد که به هیچ وجه توسط قارچ ها تجزیه نمی شود (۱۸، ۴). قارچ فانروکیت کریزوسپوریوم یکی از قارچ هایی است که به خاطر تجزیه کنندگی لیگنین بیشترین مطالعه هایی بر روی آن انجام گرفته است. قارچ های پوسیدگی سفید (از گروه بازیدیومیست ها) ریزسازواره های منحصر به فردی هستند که می توانند ترکیب های لیگنوسلولزی را به طور کامل تجزیه نمایند. همان گونه که شرح داده شد، قارچ های پوسیدگی سفید برای شکستن ترکیب های پیچیده ای نظیر لیگنین از سیستم آنزیمی خود بهره می گیرند که برای فعالیت به پراکسید هیدروژن نیازمندند. این آنزیم ها به گروهی پراکسیدازها تعلق دارند که شامل لیگنین پراکسیداز، منگنز پراکسیداز و فنل پراکسیداز یا لاکاز هستند. بیش تر این قارچ ها دو آنزیم اول را تولید می نمایند اما برخی دیگر مانند سویه هایی از فانروکیت کریزوسپوریوم در شرایط مختلف محیطی می توانند سه آنزیم مذکور را در مقادیر مختلف تولید نمایند (۳۶، ۳۲، ۴). تاکنون مطالعه های زیادی در زمینه تولید آنزیم های لیگنولیتیک توسط قارچ فانروکیت کریزوسپوریوم به منظور استفاده در فرآیندهای مختلف انجام شده است. در این مطالعه ها به بررسی مدل های مختلف فرمانتور جهت افزایش مقیاس و نیز تولید مداوم محصول مورد نظر و استفاده از روش های آماری جهت استفاده بهینه از این قارچ در فرآیندهای مختلف پرداخته شده است (۵، ۳۱).

روش های اصلاح ژنوم میکروارگانسیم ها

به طور کلی چندین روش برای اصلاح ژنوم میکروارگانسیم ها وجود دارد که هر یک مزایا و معایب خاص خود را دارد و حتی

¹ Spontaneous mutation

² Induced mutation

³ Mutagen

۲- بر اساس تأثیر بر روی عملکرد ژن: جهش می تواند عملکرد ژن را کاهش و یا به طور کلی مختل نماید^۵، موجب عملکرد غیرعادی و جدید آن شود^۶ و یا به صورت جهش های کشنده باشد^۷ که موجب مرگ ارگانیزم شود.

۳- بر اساس تأثیر بر روی کارایی ارگانیزم: در ژنتیک کاربردی، جهش می تواند برای ارگانیزم مضر^۸ یا مفید^۹ باشد و یا تأثیر خاصی بر آن نداشته باشند^{۱۰}.

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

از جهش زاهای فیزیکی امواج میکروویو و اشعه ماوراءبنفش برای بهبود سویه تریکودرما ویریده به منظور تولید بالاتر آنزیم کربوکسی متیل سلولاز استفاده شده است. سویه های جهش یافته توان بالایی در تولید آنزیم داشتند و مطالعه های مولکولی در سویه های 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 جهش زای NTG^{۱۱} از ۳/۱۲ به ۸/۱۷ واحد آنزیمی بر میلی لیتر افزایش داده شد و با روش کشت غیر مداوم خوراک دهی شده^{۱۲} 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 ژن ها دوباره مرتب و نوآرایی می شوند. نوترکیبی در قارچها به طور معمول طی چرخه های جنسی و غیرجنسی انجام می شود. بعضی از قارچها (مثل *آسپرژیلوس*) چرخه جنسی کامل دارند و آمیزش هسته ای^{۱۳} بعد از آمیزش هیفاها و مخلوط شدن هسته ها در داخل میسلیوم هتروکاریوت انجام می شود. پس از تشکیل دیپلوئید، در حین تقسیم میوزی بعدی عمل الحاق روی

امکان ظهور جهش بیش تر است. علاوه بر این شرایط تیمار کردن یک اثر عمده روی جهش زایی 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 جهش زا و نحوه تأثیر آنها بر ماده ژنتیکی سلول اشاره شده است (۲۵).

جدول ۲: برخی عوامل جهش زا که برای بهبود سویه های میکروبی به کار گرفته شده اند. (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 dimerization 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 ₂ OH) 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 به لحاظ نحوه عملکرد به انواع زیر قابل دسته بندی هستند:

۱- بر اساس تأثیر بر روی ساختمان و توالی ژن: به طور مثال جهشها می توانند موجب حذف^۱ و یا اضافه شدن^۲ در حد یک یا چند باز آلی^۳ و یا حتی بخش بزرگی از کروموزوم^۴ شوند.

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

¹ Deletion

² Insertion

³ Small-scale mutations

⁴ Large-scale mutations

اولین بار ادغام پروتوپلاست در قارچ *Fusarium culmorum*^۲ انجام شد. سعی بر این بود که ادغام پروتوپلاست در قارچهای اگزوتروف^۳ سویه ژئوتریکوم کاندیدوم^۴ انجام شود. این تکنیک در تعدادی از قارچها مانند دوترومیسیستها که تولیدمثل جنسی ندارند به کار می رود. در آسکومیستها چرخه تولیدمثل جنسی متنوع است و روش ادغام پروتوپلاست باعث ایجاد تنوع ژنتیکی می شود و به راحتی می توان سویهها را خالص سازی نمود. القای ادغام پروتوپلاست به کمک پلی اتیلن گلیکول^۵ اولین بار در پروتوپلاستهای گیاهی شرح داده شد و سپس به طور موفقیت آمیزی به منظور ادغام پروتوپلاستهای حیوانی، قارچهای رشته ای، مخمرها، گونه های باسیلوس و استریتومیست و استافیلوکوکوس به کار گرفته شد (۲۲). ادغام پروتوپلاست می تواند به صورت درون گونه ای^۶، بین گونه ای^۷ یا حتی بین جنسی^۸ صورت گیرد (۲۸، ۲۷، ۲۰). از این روش برای تولید محصول های زیستی مهم به منظور بهبود بازده محصول و جهت درک بهتر چگونگی راه های سنتز متابولیت های ثانویه نظیر آنتی بیوتیک ها و یا آنزیم ها استفاده شده است. به منظور شناسایی رمز ژنتیکی ریزسازواره ها نظیر تعیین جایگاه ژن ها و چگونگی عملکرد آنها نیز از این روش بهره گرفته شده است. ادغام پروتوپلاست هم چنین موجب پیشرفت های بسیاری در کاربرد وسیع نو ترکیبی به منظور تشکیل هیبرید درون گونه ای و تشکیل محصول های جدید شده و به خصوص برای بهبود ریزسازواره های صنعتی که بررسی ژنتیکی وسیعی در مورد آنها صورت نگرفته است بسیار مفید و کارا است (۲۷، ۲۵، ۲۲). شمای کلی این روش در شکل ۳ مشاهده می شود. ادغام پروتوپلاست می تواند به طور خود به خودی یا القایی باشد. در حالت اول هنگام جداسازی پروتوپلاستها، تعدادی از آنها

می دهد. در بعضی از قارچها که اهمیت اقتصادی زیادی دارند الحاق غیرجنسی را به کار می برند که ترکیب دو میسلیم با قطبیت یکسان یا متفاوت میسلیمی را به وجود می آورد که دارای صفت هر دو والدین است. کشف فرآیندهای غیرجنسی در قارچهای ناقص باعث توسعه روش های اصلاح مناسب گردیده است. فناوری نو ترکیبی DNA می تواند منجر به ساخت ریزسازواره های نو ترکیب با توانایی تولید یک فرآورده جدید شود. انتخاب سویه های مناسب با توانایی بالا برای تولید انواعی از متابولیت های ثانویه با حذف هدفمند یک ژن خاص و تولید ساختارهای جدید با استفاده از دست ورزی ژنی امکان پذیر است (۲۵). بیان بالای ژن سلولاز تریکودرما ریزی تحت پروموتور آمیلاز در *Aspergillus oryzae* تحت القای قند مالتوز به عنوان تنها منبع کربن انجام شد و تولید آنزیم پس از ۳-۴ روز به حداکثر خود رسید (۳۱). برای بهبود سویه مخمر کریپتوکوکوس، ژن کریوکسی متیل سلولاز آن در مخمر پیکیا پاستوریس تحت پروموتور الکل اکسیداز با القای متانول کلون و کشت با تراکم سلولی بالای^۱ سویه نو ترکیب در بیوراکتور ۲ لیتری انجام شد. تولید آنزیم کریوکسی متیل سلولاز نو ترکیب نسبت به سویه اولیه ۶۵۷ برابر افزایش داشت و به ۷۵/۲ میلی گرم 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 نو ترکیب که حاوی کپی های 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 نو ترکیبی ژنی در ریزسازواره های پروکاریوتیک و یوکاریوتیک محسوب شده و به ویژه در ارگانیزم های صنعتی نظیر قارچها کاربرد فراوان داشته است. وقتی اطلاعات کافی از بیولوژی و ژنتیک ریزسازواره ای وجود نداشته باشد و انجام روش های انتقال ژن و جهش زایی مشکل باشد از این تکنیک استفاده می شود. این روش کاربردی ترین روش نو ترکیبی ژنتیکی است که هم در گیاهان و هم در قارچها استفاده می شود (۲۵).

^۱ High cell density culture (HCDC)

^۲ *Fusarium culmorum*

^۳ Auxotroph

^۴ *Geotrichum candidum*

^۵ Poly ethylene glycol (PEG)

^۶ Intraspecific

^۷ Interspecific

^۸ Intergeneric

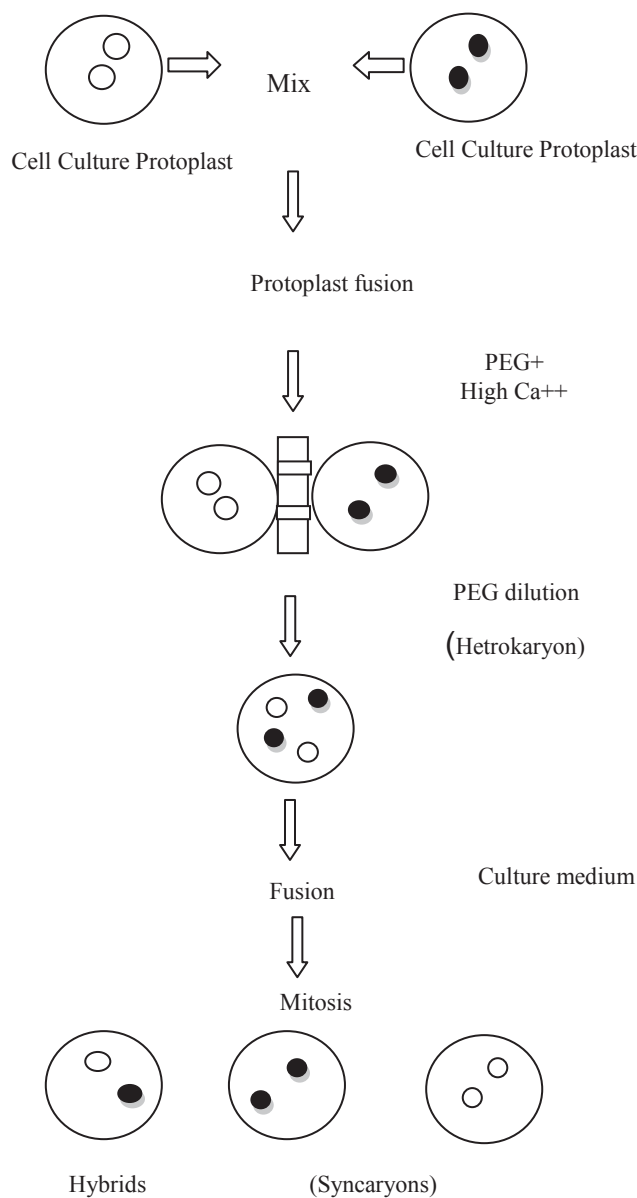
شود پروتوپلاست‌ها به یکدیگر نزدیک شوند و سپس عمل ادغام صورت گیرد (۲۲، ۱۶). عمل القا جهت ادغام به سه طریق صورت می‌گیرد (۱۶).

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

۲- ادغام شیمیایی: مواد شیمیایی مانند نیترات سدیم، پلی اتیلن گلیکول و یون‌های کلسیم جهت ادغام پروتوپلاست‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۴). این مواد موجب می‌شوند که پروتوپلاست‌های جدانشده به یکدیگر بچسبند و محکم آگلوتینه شوند. برای ادغام پروتوپلاست دو سویه *تریکودرما ریزی* و *ساکارومیسس سرویسسه* از روش ادغام شیمیایی استفاده شد و مشخص شد که آنزیم اندوگلوکاناز نقش بسیار کلیدی در ادغام پروتوپلاست‌ها دارد. روش ادغام شیمیایی یک روش 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 میکروالکتروود بسیار باریک در سوسپانسیون پروتوپلاست قرار می‌گیرد و باعث می‌شود که یک میدان الکتریکی ضعیف (10 kV/m) به‌وجود آید و این جریان دی‌الکتروفوریتیک دو قطبی در سوسپانسیون ایجاد نموده و کمک می‌کند تا پروتوپلاست‌ها مانند زنجیر به هم نزدیک شوند. پس از این از میدان الکتریکی قوی‌تر (100 kV/m) به مدت چند میکروثانیه جهت شکستن غشاء و ادغام پروتوپلاست‌ها استفاده می‌شود. برای انجام ادغام به این روش وجود یون کلسیم و همچنین پلی اتیلن گلیکول به‌عنوان شروع کننده اولیه لازم است. در این روش کنترل ادغام راحت‌تر و فراوانی ادغام تا ۱۰٪ 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^۱ جدیدی شد که در کشت غوطه‌ور^۲ توانایی تولید بالای سلولاز را داشتند و در کشت حالت جامد^۳ نسبت به سلول‌های والد رشد سریع‌تر و ترشح بیش‌تر آنزیم را نشان دادند (۷).



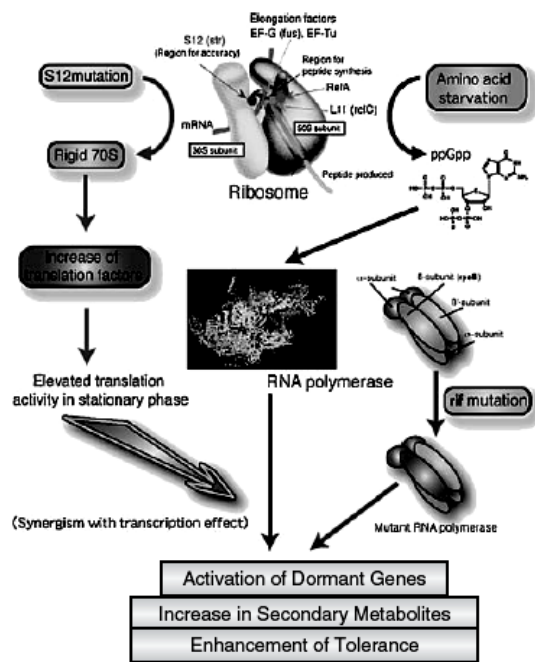
شکل ۳: ادغام پروتوپلاست

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

¹ Fusant

² Submerged culture

³ Solid-state culture



شکل ۴: شمای مهندسی ریبوزوم برای فعال سازی سلول (۲۴)

درهم آمیختگی ژنوم

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

روش درهم آمیزی 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 درهم آمیزی ژنوم بین چندین والد صورت می‌گیرد و در نتیجه سلول نوترکیبی به وجود می‌آید که دارای تنوع ژنتیکی بیشتری است (۲۱).

به طور کلی 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 به صورت 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 درهم آمیزی ژنوم نیاز به اطلاعات زیادی در مورد زمینه ژنتیکی ریزسازواره نیست و زمانی که اطلاعات زیادی درباره توالی ژنتیکی یک ریزسازواره موجود

ادغام درون گونه‌ای تریکودرما ریزی با روش شیمیایی با استفاده از پلی اتیلن گلیکول ۴۰٪ به منظور افزایش تولید آنزیم کربوکسی متیل سلولاز انجام شد. بیش تر پروتوپلاست-های ادغام یافته رشد میسلیومی سریع و اسپورزایی فراوانی داشته و بر روی محیط اختصاصی هاله‌های بزرگ شفاف تشکیل دادند که نشان دهنده ترشح مقادیر بالای آنزیم کربوکسی متیل سلولاز نسبت به والدین آن‌ها بود (۲۶).

روش‌های نوین بهبود سویه‌ها

روش‌هایی که در ادامه ارائه می‌شوند به تازگی معرفی شده‌اند و بیش تر تاکنون برای بهبود سویه‌های تولیدکننده آنزیم‌های مؤثر در تجزیه ترکیبات لیگنوسلولزی به کار 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^۱ 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) 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 به عهده 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). از آنجایی که لیگنینازها در شرایط محدودیت نیتروژن تولید می‌شوند و جزو متابولیت‌های ثانویه هستند امکان بهبود سویه‌های تولیدکننده آن‌ها با روش مهندسی ریبوزوم وجود دارد.

¹ Guanosine tetraphosphate (ppGpp)

مقاومت نسبت به تنش‌های محیطی، موفقیت‌های کم‌تری گزارش شده است (۲۶). از طرفی از آن‌جا که 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 خارج از 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^۱، 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^۲، رونویسی^۳، سوخت‌وساز سلولی^۴، ترجمه و پروتئین^۵ و ... است که تحت عنوان کلی آمیکس (omics-) نیز شناخته می‌شوند (۲۵، ۱۸).

جنبه کلیدی در مهندسی متابولیک^۱، تجزیه و تحلیل در سطح سلولی برای درک دقیق کارکرد سلولی است که مستلزم به-کارگیری 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- توسعه یافته‌اند. این تجزیه و تحلیل را می‌توان به سه بخش تقسیم کرد:

- تعیین ساختار شبکه متابولیک؛

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

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 سفار سومایس/استیپیتیس^۱ GS301 و GS302 با روش درهم‌آمیزی ژنوم، هیبریدهایی تهیه شده‌اند که از قندهای گلوکز و زایلوز تخمیر شده از لیگنوسولز 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^۲

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 آمیکس (omics-) نیز شناخته می‌شوند (۲۵، ۱۸).

مهندسی متابولیک^۳، در واقع توسعه هدفمند کارخانه‌های سلولی با استفاده از ابزار و فنون مهندسی ژنتیک است. به‌طور سنتی، راهبردهای مهندسی متابولیک^۱ 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

^۴ Genomics

^۵ Transcriptomics

^۶ Metabolomics

^۷ Proteomics

^۱ *Scheffersomyces stipitis*

^۲ Metabolic engineering

^۳ Metabolic engineering

بیش تر است. زیاد بودن تعداد معادله ها در مقایسه با مجهول ها، تخمین مطمئن تری از شارهای موجود و نیز شارهای برگشت پذیر در شبکه را امکان پذیر می سازد. نرم افزارهای (FBA) Flux Balance Analysis (DFBA)، OptKnock، Dynamic Flux Balance Analysis، OptFlux، و EMilio برای بهبود و طراحی سوبیه به روش مهندسی متابولیک^۱ مورد استفاده قرار می گیرند. به طور مثال از روش مهندسی متابولیک^۱ برای تولید انانتیوپور^۲ ۲ و ۳ بوتان دی ال (به عنوان یک سوخت زیستی) از منابع زیست تخریب پذیر استفاده شده است. هیچ سوبیه باکتریایی توانایی تولید این سوخت زیستی را از ترکیب های لیگنوسلولزی هیدرولیز شده ندارد. باکتری *آنتروباکتر کلوآکه*^۳ به نحوی مهندسی متابولیک^۱ شده که بتواند بیوکاتالیست کارآمد برای تولید این انانتیوپور را بسازد. ژن های مربوط به مسیرهای متابولیکی مانند ژن آنزیم های ۲ و ۳ بوتان دی ال دهیدروژناز و مزو- ۲ و ۳ بوتان دی ال دهیدروژناز و گالاکتوز پرمیاز^۴ در یک کلاستر به نحوی طراحی و ساخته شده اند که این سوبیه مهندسی شده توانایی مصرف هم زمان گلوکز و زایلوز را برای تولید محصول دارد. حتی ژن های تولید محصول های جانبی نیز حذف شده اند تا محصول با راندمان بالا تولید شود (۱۹).

نتیجه گیری و چشم انداز آینده

ساخت سوبیه های توانمند و یا بهبود آن ها به عنوان ابزار اولیه برای تولید گستره وسیعی از فرآورده های زیستی با کیفیت و راندمان بالا و قیمت تمام شده پایین از اهداف اصلی زیست فناوری است. بدین منظور روش های کلاسیک و روش های نوین مبتنی بر فنون مهندسی ژنتیک و فناوری DNA نوترکیب می توانند در دستیابی به این سوبیه ها مفید واقع شوند. روش های گوناگونی که در این مقاله به آن اشاره شد، هر یک مزایایی داشته و در مواردی استفاده از آن ها مشکلاتی را در بر دارند. شناخت سوبیه مورد نظر 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 می کند تا روش مناسب را انتخاب نمایند. بدیهی است روش های نوین با توجه به این که امکان تغییرهای هدفمند را در سوبیه مورد نظر ایجاد

می شود. درون سلول ها 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 آن ها سطح تعامل مسیرهای مختلف را در عملکرد کلی سلولی و مسیرهای متابولیکی اندازه گیری می کنند).

• تعیین ساختارهای کنترلی در یک شبکه متابولیک. برای تعیین ساختار شبکه متابولیک، می توان از اطلاعات موجود در منابع بیوشیمی بهره جست. گزارش های زیادی در مورد فعالیت های ویژه آنزیمی در گونه های مختلف وجود دارد و برای میکروارگانیسم های زنده مهم صنعتی، شبکه های متابولیک اصلی مشخص شده اند. پس از شناسایی ساختار شبکه متابولیک، باید شارهای هر یک از شاخه های مختلف شبکه را کمی نمود که این کار به اصطلاح فلاکسوم نامیده می شود. ساده ترین روش برای تعیین فلاکسوم، استفاده از موازنه متابولیت است. به این ترتیب، موازنه ماده برای هر یک از متابولیت های شبکه برقرار می شود و با فرض حالت پایا برای غلظت متابولیت ها، یک سری معادلات جبری مرتبط کننده شارها به یکدیگر، به دست می آید. این معادلات یک سری محدودیت هایی بر هر یک از شارهای موجود در شبکه اعمال می کنند. با اندازه گیری تعدادی از شارها و یا با استفاده از برنامه ریزی خطی، امکان محاسبه شارها در هر یک از شاخه های شبکه وجود دارد. مفهوم موازنه متابولیت به دلیل سادگی آن بسیار جذاب است، اما محدودیت هایی نیز دارد. تخمین شارها به موازنه کوفاکتور یعنی موازنه NADH و NADPH بستگی دارد، بنابراین توجه به همه واکنش های داخل سلول که به نحوی شامل این کوفاکتورها می شوند، اهمیت دارد. از آن جا که شناسایی همه این گونه واکنش ها در یک میکروارگانیسم بعید به نظر می رسد، 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 برچسب دار شدن متابولیت های داخل سلولی از طریق NMR و یا GC-MS، امکان اعمال موازنه ها برای هر یک از اتم های کربن علاوه بر موازنه متابولیت ها وجود دارد. به این ترتیب سری جدیدی از محدودیت ها ایجاد می شود و دیگر نیازی به توجه به موازنه کوفاکتورها نیست. به علاوه، از آن جا که می توان بسیاری از موازنه ها را برای اتم های کربن منفرد اعمال نمود، یک سری از معادله ها بیش تخمین به دست می آید که در آن تعداد معادله ها از تعداد شارهای نامعلوم

¹ Metabolic engineering

² Enantiopure

³ *Enterobacter cloacae*

⁴ galactose permease

می کنند ابزار منحصربه فردی را برای تهیه سویه های بهبود یافته کارآمد در اختیار می گذارند.

سپاسگزاری

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

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 superficial 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

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., Ikura, 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., Velasquez, 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.