

بهینه‌سازی بیان مسیر بیوسنتز فلاونوئید نارینجین با استفاده از کشت سلولی یارویا لیپولیتیکا

منیره مارصفری^۱، حبیب‌اله سمیع‌زاده لاهیجی^۱، بابک ربیعی^۱، علی‌اشرف مهربانی^۲، یونگکون لوی^۳ و پنگ شو^۴

^۱دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران؛ ^۲دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران؛ ^۳دانشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه جیانگ‌نان، جیانگ‌سو،

چین؛ ^۴دانشکده مهندسی شیمی، بیوشیمی و محیط‌زیست، دانشگاه مرلند، بالتیمور، آمریکا

مسئول مکاتبات: منیره مارصفری، mamonir@umbc.edu

چکیده. امروزه استفاده از مخمر *Yarrowia lipolytica* به دلیل برخورداری از ظرفیت تولید بالا، گلیکوزیله شدن در مقادیر کم، برخورداری از نشانگرهای مولکولی و ابزارهای ژنتیکی انحصاری به طور گسترده و برای سرعت بخشیدن به روند تولید ترکیبات گیاهی-دارویی و به عنوان یک میزبان سلولی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. نارینجین نه تنها به عنوان هسته مرکزی تولید فلاونوئیدهای مختلف از اهمیت زیادی برخوردار است، بلکه در گیاهان و نیز درمان بیماری‌های مختلف انسان نقش ویژه‌ای برعهده دارد. به همین منظور و برای تولید بهینه این ترکیب فلاونوئیدی ارزشمند، ژن‌های مهم و اصلی مسیر بیوسنتز نارینجین از منابع مختلف گیاهی شناسایی شدند و پس از مقایسه الگوی بیان و به منظور تولید نارینجین در میزبان موردنظر معرفی شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که *chs* ژن کلیدی و مهم در تولید نارینجین به‌شمار می‌رود و به همین منظور افزایش تعداد نسخه‌های این ژن در هر سازه ژنی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه داده‌های HPLC نشان داد که بهینه‌سازی شرایط رشد و رفع موانع محدودکننده و نیز افزایش تعداد ۵ نسخه ژن *chs* در هر سازه می‌تواند ۷/۱۴ برابر میزان نارینجین را افزایش دهد و تولید آن را به ۹۰/۱۶ میلی‌گرم در لیتر برساند. این بررسی نشان داد که دانش کافی از ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی فرآورده موردنظر، طراحی مصنوعی این مسیر و نیز بهره‌گیری از مخمر *Y. lipolytica* به عنوان یک میزبان کارآمد و ارزان می‌تواند در تولید انبوه ترکیبات گیاهی-دارویی نقش به‌سزایی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی. تعداد نسخه ژن، جریان متابولیسم، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، میزبان مخمر، مهندسی متابولیت

The optimization of Naringenin biosynthesis pathway using *Yarrowia lipolytica* cell culture

Monireh Marsafari¹, Habibollah Samizadeh Lahiji¹, Babak Rabiei¹, AliAshraf Mehrabi², Yongkun Lv³ & Peng Xu⁴

¹Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran; ² Faculty of Agriculture, University of Ilam, Ilam, Iran; ³Faculty of Biotechnology, Jiangnan University, Jiangsu, China; ⁴Department of Chemical, Biochemical and Environmental Engineering, University of Maryland Baltimore County, Baltimore, USA

Correspondent author: Monireh Marsafari, mamonir@umbc.edu

Abstract. *Yarrowia lipolytica*, as a good cell factory to speed up the production of plant pharmaceutical components, has been considered to be one of the most important and attractive micro-organisms in recent years, due to its high secretion capacity, limited glycosylation, large range of genetic markers and molecular tools. Naringenin, as a central core of flavonoids production, plays important roles both in plants and in the treatment of different types of human diseases. For this purpose, specific naringenin biosynthesis genes from different origins were selected and introduced after comparative expression profiling in *Y. lipolytica*. This research indicated that *chs* plays the main role in the production of naringenin, so the increase copy number of this gene in each construct was investigated. The HPLC results confirmed that the construct with 5 copy numbers of *chs* resulted in 7.14 fold increase of naringenin extracellular titer to 90.16 mg/L in shake flask cultures. The results reported in this study demonstrated that sufficient knowledge of genes involved in the specific biosynthesis pathway, synthetic gene pathway and using *Y. lipolytica* as a capable and cheap host could help bioengineers to produce significant amounts of pharmaceutical components.

Keywords. gene copy number, HPLC, metabolic engineering, metabolic flux, yeast host

مقدمه

فلاونوئیدها یکی از مهم‌ترین زیرگروه‌های ترکیبات پلی فنلی با وزن مولکولی پایین هستند (Mahomoodally et al., 2005; Pandey, 2007) که علاوه بر سازوکارهای گوناگون در گیاهان مانند محافظت در برابر اشعه UV، تنظیم فیزیولوژی و پیام‌رسانی سلولی و تنظیم گرده‌افشانی (Falcone Ferreyra et al., 2012)، برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها مانند انواع سرطان‌ها، چاقی، دیابت، بیماری‌های قلبی عروقی و بیماری‌های عصبی مورد هدف قرار گرفته‌اند (Panche et al., 2016). نارینجین متعلق به زیرشاخه فلاونون و به عنوان یکی از مهم‌ترین ترکیبات فلاونوئیدی طبیعی و هسته مرکزی مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها مطرح شده است (Winkel-Shirley, 2001).

اسید پی-کوماریک توسط اسید سینامیک و از طریق عمل هیدروکسیله شدن آنزیم سینامیت-4-هیدروکسیلاز (*c4h*) و یا به‌طور مستقیم از طریق آمین‌زدایی تیروزین توسط آنزیم تیروزین آمونیلایز (*tal*) ایجاد می‌شود و سپس به 4-کوماریول-کوآ با عملکرد آنزیمی 4-کوماریت-کوآ لیگاز (*4cl*) تبدیل می‌شود. متعاقباً چالکان سینتاز (*chs*) سه مرحله پی‌درپی متراکم-سازی واحدهای استات از مالونیل-کوآ (استر-کوآ) را برای دستیابی به چالکان نارینجین انجام می‌دهد (Stafford et al., 2004; Winkel, 1974). استیل-کوآنزیم‌آ پیش‌ساز مالونیل-کوآنزیم‌آ و به عنوان اولین نقطه کنترل جریان بیوسنتز نارینجین و سایر فلاونوئید محسوب می‌شود درحالی‌که مالونیل-کوآنزیم‌آ به عنوان نقطه آغاز سنتز فلاونوئیدها به شمار می‌رود (Zha et al., 2009). آنزیم استیل-کوآنزیم‌آ کربوکسیلاز (*acc1*) استیل-کوآنزیم‌آ را به مالونیل‌کوآنزیم‌آ تبدیل می‌کند و نقش حیاتی در تامین میزان سوسترای مورد نیاز برای تولید بهینه فلاونوئیدها ایفا می‌کند (Fowler et al., 2009). سپس چالکان ایزومراز (*chi*) چالکان نارینجین را به نارینجین که پیش‌نیاز رایج برای فلاونوئیدهای پایین‌دست به‌شمار می‌رود، تبدیل می‌کند (Winkel-Shirley, 2001). نارینجین می‌تواند به‌طور مستقیم و یا غیرمستقیم با آنزیم‌های دیگر واکنش دهد و سایر ترکیبات فلاونوئیدی و آنتوسیانین‌ها را تولید کند (Winkel-Shirley, 2002) (شکل ۱).

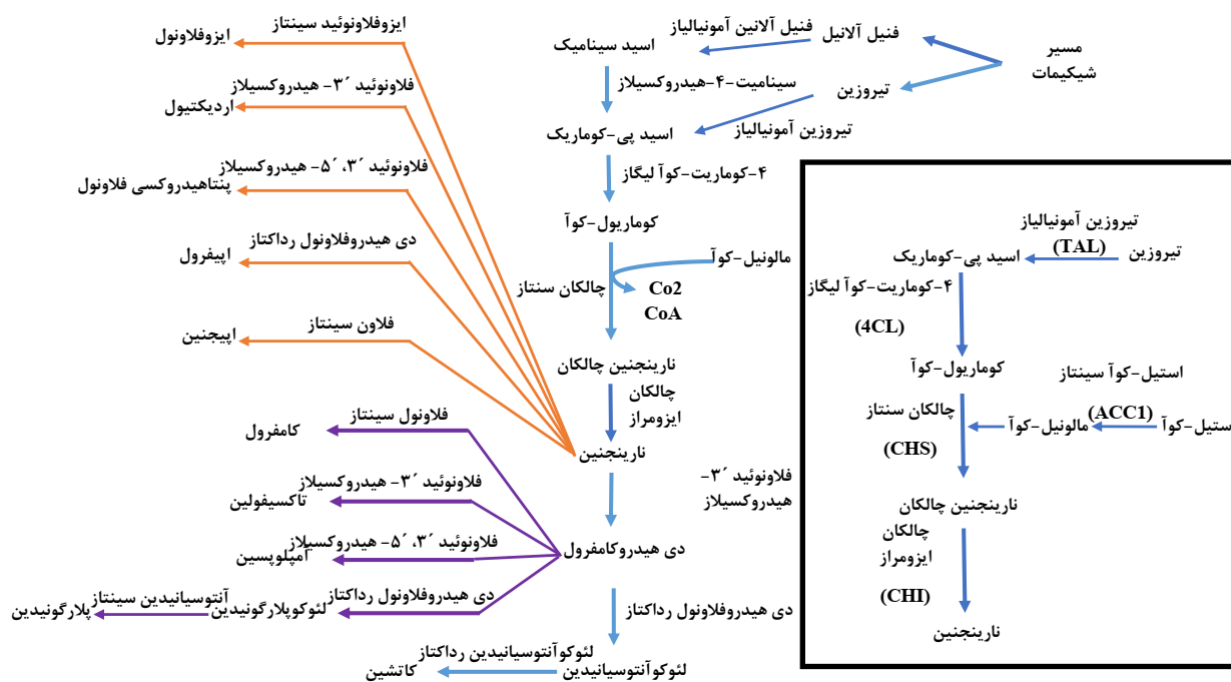
تولید نارینجین و به‌طور کلی فلاونوئیدها با استفاده از مواد گیاهی از نظر اقتصادی به صرفه نیست زیرا علاوه بر اینکه استخراج آن‌ها از بافت‌های گیاهی مستلزم استفاده از ترکیبات شیمیایی مضر است، تنها از بافت‌ها و گیاهان منحصر به فرد با قابلیت کشت در اقلیم خاص و گاهاً با دوره کشت طولانی قابل

استخراج هستند. تولید شیمیایی فلاونوئیدها نیز به دلیل استفاده از حلال‌های شیمیایی سمی و وجود چالش تغییرات شیمیایی ضروری مانند گلیکوزیله‌شدن برای تولید ترکیبات فعال توصیه نمی‌شود. بنابراین مهندسی زیستی مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها به عنوان راهکاری ویژه در جامعه علمی و صنعتی بسیار مورد توجه قرار گرفت (Atanasov et al., 2015; Chemler & Koffas, 2008; Fowler & Koffas, 2009; Wang et al., 2011).

کشت سوسپانسون سلول گیاهی نیز به دلیل نیاز به کشت در مقیاس وسیع، تولید مقدار انبوه ترکیبات جانبی، تمایل سلول‌ها به تشکیل توده و عدم دستیابی سلول‌های میانی توده به نور و سرکوب تولید فلاونوئیدها، از نظر اقتصادی توجیه‌پذیر نیست (Fowler & Koffas, 2009). پیشرفت‌های اخیر در جهت بهبود تولید فلاونوئیدها با استفاده از کارخانه‌های سلولی میکروبی، سیستم‌های مبتنی بر بیوراکتور و بیولوژی مصنوعی بیان مسیر بیوسنتزی متابولیت‌ها را امکان‌پذیر نموده و بیوسنتز فراورده موردنظر را در زمان کوتاه و حجم انبوه امکان‌پذیر می‌کند. استفاده از کارخانه‌های سلولی میکروبی به دلیل عدم استفاده از ترکیبات شیمیایی مضر، سرعت رشد بالا، سهولت رشد و تکثیر و دسترسی به ابزارهای ژنتیکی متعدد؛ نسبت به استخراج از بافت‌های گیاهی و یا کشت سوسپانسیون سلولی از اهمیت بالاتری برخوردار است (Trantas et al., 2015).

تحمل در برابر pH پایین، ماهیت شدید هوازی، قابلیت تطبیق‌پذیری تجزیه سوسترها با شرایط موجود، حضور مقدار زیاد استیل-کوآ و مالونیل-کوآ به همراه مواد چرب هیدروفوبیک، قابلیت مصرف بخش زیادی از مواد کربنی خام به عنوان اسیدهای چرب و چربی، فراهم کردن محیط آمفی‌فیلک مناسب برای عملکرد کاتالیک بسیاری از آنزیم‌های گیاهی، برخورداری از غشاهای ساختاری و محافظه‌های سلولی جهت فراهم کردن محیط هیدروفوبیک مناسب و نیز انتخاب استروئیدهای موردنیاز برای هیدروکسیله‌کردن، گلیکوزیله‌کردن و پرنیله‌کردن موردنیاز فلاونوئیدها و تولید مقدار بیشتر بیوماس نسبت به میزبان ترجیحی *S. cerevisiae*، مخمر *Yarrowia lipolytica* را به عنوان یک میزبان قدرتمند برای تولید ترکیبات طبیعی متنوع با ساختار پیچیده تبدیل کرده است (Lv et al., 2019b).

تعادل جریان متابولیسمی و کاهش بار متابولیکی به واسطه بهبود جریان متابولیکی میان مسیر بالادست و پایین‌دست ژنی (Xu et al., 2013b)، رعایت حداقل ترکیبات حدواسط برای حفظ زنده‌مانی سلول (Leonard et al., 2010) و عدم ایجاد تنش در سلول‌ها از طریق بارگزاری بیش‌ازحد از عوامل حیاتی برای بهینه‌سازی تولید متابولیت در ریزسازواره‌ها هستند (Zelcbuch et al., 2013).



شکل ۱- مسیر عمومی بیوسنتز فلاونوئیدها. این مسیر با متابولیسم فنیل پروپانویید در پلاستید آغاز می‌شود و با بکارگیری یک سری از آنزیم‌های متفاوت از شبکه اندوپلاسمی و سیتوسول بیوسنتز فرآورده‌های نهایی مانند نارینجین، تاکسیفولین، کامفرول، اردیکتیول و اپیجین را انجام می‌دهد. کادر مشکی زن‌ها و مسیر بیوسنتز استفاده شده در این تحقیق را نشان می‌دهد.

Fig. 1. The general biosynthesis pathway of flavonoids. This pathway begins with the metabolism of phenylpropanoid in the plastid and performs biosynthesis of end products such as naringenin, taxifoline, kaempferol, edicticol and epigenin using a series of different enzymes from the endoplasmic reticulum and cytosol. Genes and the biosynthetic pathway used in this study were shown in the black frame.

به صورت ساختار مونوسیسترونیک و با استفاده از روش Yali Bricks در میزبان *Y. lipolytica* همسانه‌سازی شدند (Wong et al., 2017). زن‌های کدکننده ۴-کوماریت-کوآ لیگاز از گیاه جعفری (*Petroselinum crispum*; *Pc4cl*) و گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*; *Sl4cl*)؛ چالکان سنتاز از گیاه پتونیا (*Petunia x hybrid*; *Phchs*) و جو (*Hordeum vulgare*; *Hvchs2*)؛ چالکان ایزومراز از دو گیاه یونجه (*Petunia x hybrid*; *Mschi*)، و پتونیا (*Medicago sativa*; *Mschi*) انتخاب شدند و برای شناسایی بهترین سازه حاوی قدرتمندترین زن‌های پایه در ترکیب‌های مختلف استفاده شدند. بررسی نتایج مثبت حاصل از افزودن ۵ میلی‌مولار تیروزین خارج سلولی به هر فلاسک حاوی مخمر تراریخت شده با سازه موردنظر بر میزان تولید نارینجین موجب شد تا فرض شود زن *tal* نیز با فراهم کردن مقدار مناسب تیروزین در دسترس برای سویه مخمر مورد بررسی نقش قابل توجهی در تولید نارینجین خواهد داشت. برای این منظور و بر اساس نتایج حاصل از پژوهش‌های قبلی تاثیر زن *tal* با منبع ژنی *Rhodotorula*

در این پژوهش به منظور شناسایی کارآمدترین زن‌های درگیر در بهینه‌سازی بیوسنتز هترولوگ فلاونوئید نارینجین و ایجاد یک جریان متعادل متابولیسمی زن‌های *tal*، *4cl*، *chs*، *chi* و *acc1* از منابع ژنی مختلف گرفته شد و قدرت بیان آن‌ها در میزبان *Y. lipolytica* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین نشان داده شد که میزبان مورد استفاده به عنوان یک کارخانه میکروبی کارآمد، با بهره‌گیری از قند گلوکز به عنوان منبع قند، عدم تولید فرآورده‌های اتانولی جانبی، روش‌های ساده مهندسی ژنتیک و عدم استفاده از ابزارهای پیچیده‌تر مانند استفاده از بایوسنسورها و یا کشت میکروبی مخلوط می‌تواند مقدار قابل توجهی فلاونوئید نارینجین تولید نماید.

مواد و روش‌ها

ژن، پلاسمید و سویه‌های مورد استفاده

به دلیل تفاوت میزان بیان زن‌های مختلف در میزبان‌های متفاوت و به منظور شناسایی قدرتمندترین منابع ژنی، زن‌های مهم و اصلی تولید نارینجین یعنی *tal*، *4cl*، *chs*، *chi* و *acc1*

باکتری *E. coli* NEB 5α با ۴ میکرولیتر از مخلوط واکنش گیبسون و با استفاده از روش شوک حرارتی انجام شد و بر روی پلیت لوریبارتانی حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر آمپی سیلین به عنوان مارکر انتخابی کشت شدند. از هر واکنش تراریختی دست-کم ۳ کلنی در محیط مایع لوریبارتانی حاوی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر آمپی سیلین رشد داده شد و پس از ۲۴ ساعت پلاسمید مورد نظر خالص سازی شده و برای توالی یابی به شرکت Genwiz (نیوجرسی، آمریکا) منتقل شدند. پس از تایید توالی ژن های مورد بررسی، با استفاده از روش ساب کلونینگ و YaliBrick که در ادامه به آن پرداخته شد، ژن *tal* و ژن های *chs*، *chi* و *4cl* از منابع ژنی مختلف و هر یک با حفظ پروموتور، اینترون و ترمیناتور مستقل (ساختار مونوسیسترونیک) در پلاسمید گیرنده وارد شدند.

در پلاسمیدهای pYaliBrick که pYLXP نیز عضوی از آنها به شمار می رود، چهار جایگاه آنزیم های برشی ایزوکدومر با انتهای سازگار (*SpeI* و *XbaI*، *NheI*، *AvrII*) به طور استراتژیک بین عناصر تنظیمی ژن به نحوی قرار گرفته اند که به طور بی نهایت می توانند مورد استفاده قرار گیرند و عملکرد ژنتیکی آسان را هنگام سرهم کردن قطعات DNA به صورت ساختارهای مونوسیسترونیک، خوشه ژنی و یا خوشه های ژنی کاذب فراهم کنند باشد (Wong et al., 2017). در این پژوهش عموماً پلاسمیدهای دهنده ژن مورد نظر با آنزیم های برشی *AvrII/SalI* برش داده شدند در حالی که پلاسمید دریافت کننده قطعات مورد نظر با آنزیم های *NheI/SalI* هضم شدند. سپس قطعات مورد نظر با استفاده از روش T4 لیگاز و با آرایش ژنی مونوسیسترونیک در پلاسمید دریافت کننده جمع آوری شدند. به عنوان مثال برای تهیه قدرتمندترین سازه ژنی و جمع آوری سه ژن *Pc4cl2* و *Mschi*، *Phchs* در یک پلاسمید و به عنوان الگوی ساب-کلونینگ برای سایر سازه ها، ابتدا قطعه ژن *Mschi* که از برش پلاسمید *pYLXP⁺-Mschi* با آنزیم های برشی ایزوکدومر *AvrII/SalI* به دست آمده بود در جایگاه آنزیم های برشی *NheI/SalI* پلاسمید دریافت کننده *pYLXP⁺-Phchs* وارد شد. پس از تایید نتایج ساب کلونینگ و یافتن پلاسمید مثبت *pYLXP⁺-Phchs-Mschi* این پلاسمید نیز در محل آنزیم های برشی *NheI/SalI* به عنوان دریافت کننده برای قطعه ژنی *Pc4cl2* حاصل از هضم پلاسمید تولید *pYLXP⁺-Phchs-Mschi-Pc4cl* با نام اختصاری pPc4PhSMsI برش داده شد. برای بررسی نقش تیروزین بر میزان تولید نارینجین نیز ژن *Rttal* به دست آمده از هضم پلاسمید *pYLXP⁺-Rttal* با آنزیم های برشی *AvrII/SalI* به روش ذکر شده در مکان برشی آنزیم های *NheI/SalI* پلاسمید pPc4PhSMsI و برای تولید پلاسمید pYT4SI وارد شد. پلاسمیدهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۲ ذکر شده اند.

toruloides (به اختصار *Rttal*) (Jiang et al., 2005; Lv et al., 2019b; Santos et al., 2011; Zhang & Stephanopoulos, 2013; Zhang et al., 2017) بر میزان تولید نارینجین خارج سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور تأمین میزان کافی مالونیل کوآنزیم A و شناسایی بهترین منابع ژنی برای افزایش تولید نارینجین، افزایش بیان ژن *acc1* از سه میزبان مختلف *Y. lipolytica* با نام ژن *Ylacc1*، باکتری گرم مثبت *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 با نام ژن *Cgacc1* و باکتری گرم منفی *Escherichia coli* MG1655 با نام ژن *Ecacc1* انجام شد. ژن *Ecacc1* از چهار ژن *EcaccA*، *EcaccB*، *EcaccC* و *EcaccD* تشکیل شده که در این تحقیق به صورت خوشه ژنی *Ec_accABCD* در میزبان مورد نظر بیان شد و کارایی آن مورد بررسی قرار گرفت. تمام ژن های مورد بررسی در این پژوهش برای بیان در میزبان *Y. lipoytica* کدون اپتیمایز شده و آغازگرهای سنتز-کننده آنها توسط شرکت Integrate DNA Technology (IDT), Iowa, USA سنتز شدند. ژن های مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۱ ارائه شده اند. پلاسمید مورد استفاده در این تحقیق، pYLXP⁺ بود که قبلاً مطابق با استانداردهای YaliBrick طراحی و نگهداری شده بود (Xu et al., 2016). باکتری *Escherichia coli* NEB 5α برای طراحی، تکثیر و نگهداری پلاسمیدهای هدف و مخمر *Y. lipolytica* Po1g به عنوان میزبان برای تولید نارینجین استفاده شد.

طراحی مسیر بیوسنتزی

برای ساخت پلاسمیدهای حاوی هر یک از ژن های مورد بررسی، واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) برای هر ژن و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت طراحی شده، انجام شد و فرآورده هر واکنش با استفاده از کیت جداسازی DNA (DNA clean& concentrator-5 kit, Zymoresearch, USA) جداسازی و تخلیص شد. پلاسمید pYLXP⁺ با استفاده از آنزیم های برشی *KpnI* و *SnaBI* برش داده شد. تمام آنزیم های برشی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA تهیه شدند. قطعات برش داده شده توسط الکتروفورز ژل آگارز از یکدیگر جدا شده و سپس قطعه مورد نظر از روی ژل جداسازی شد و توسط کیت بازیافت قطعات DNA (DNA gel recovery kit, Zymoresearch, USA) بازیابی شد. پس از آن برای تولید پلاسمیدهای حاوی ژن های مورد نظر، فرآورده واکنش زنجیره ای پلیمرز و قطعه خالص شده پلاسمید با استفاده از واکنش گیبسون به یکدیگر متصل شدند. سپس تراریختی

جدول ۱- نام، منبع و شماره هر ژن در پایگاه داده.

Table 1. Name, source and number of each gene in data source.

ژن	منبع	شماره و پایگاه ژنی مرجع	رفرنس
<i>RtTAL</i>	<i>Rhodotorula toruloides</i>	NCBI ¹ : AAA33883	(Anson et al., 1987)
<i>Pc4cl</i>	<i>Petroselinum crispum</i> (parsley)	UniProtKB ² P14912	(Wu et al., 2013)
<i>Sl4cl</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	NCBI: NP_001333770	(Alberstein et al., 2012)
<i>PhCHS</i>	<i>Petunia x hybrid</i>	NCBI: AAF60297	(Wu et al., 2013)
<i>HvCHS2</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	NCBI: Q96562	(Christensen et al., 1998)
<i>MsCHI</i>	<i>Medicago sativa</i>	NCBI: P28012	(Wu et al., 2013)
<i>PhCHI</i>	<i>Petunia x hybrid</i>	NCBI: P11650	(van Tunen et al., 1988)
<i>YIACCI</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i> Po1f	GRYC: YALI0C11407g1_1	
<i>CgACCI</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032	NCBI: NP_599932 and AUI00288	(Zhu et al., 2014)
<i>EcACCI</i>	<i>Escherichia coli</i> DH 5α	NCBI: NC_000913.3 ³	(Wong et al., 2017)

۱ و ۲ به ترتیب پایگاه داده‌های ژنی NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) و UniPortKB (<https://www.uniprot.org/help/uniprotkb>) است. شماره‌های اختصاصی هر جز در پایگاه داده‌های NCBI به ترتیب بدین صورت است: NC_000913.3:2433926-2433012, NC_000913.3:3405917-3407266, NC_000913.3:3405436-3405906, NC_000913.3:208621-209580. 1 and 2 are NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and UniPortKB (<https://www.uniprot.org/help/uniprotkb>) gene data bases, respectively. 3- This gene encoded by the accABCD operon and included accA, accB, accC and accD genes. The specific accession number of each gene is: NC_000913.3:208621-209580, NC_000913.3:3405436-3405906, NC_000913.3:3405917-3407266 and NC_000913.3:c2433926-2433012, respectively.

مخلوط شده و دست کم به مدت ۱۵ ثانیه و توسط ورتکس کاملاً ترکیب شدند. در این مرحله ۸-۵ میکرولیتر از پلاسمید موردنظر با مخلوط واکنش نهایی ترکیب شده و مجدداً ورتکس انجام شد. به منظور افزایش کارایی تراریختی مخلوط واکنش در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در حمام آب گرم به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه نگهداری شده و هر ده دقیقه یکبار به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شدند. در نهایت نمونه‌ها به حمام آب گرم با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه منتقل شدند. پس از این مرحله سلول‌های تراریخت شده بر روی پلیت محیط کشت کامل فاقد نشانگر لوسین (Complete Synthetic Media minus Leucine; CSM-Leu) کشت داده شدند و به مدت ۲ تا ۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در گرم‌خانه نگهداری شدند.

برای تهیه مایه تلقیح، از هر پلیت ۱۰ کلونی در محیط کشت حقیقی مایع (CSM-Leu C/N=10) رشد داده شد و پس از ۴۸ ساعت ۶۵۰ میکرولیتر از مایه تلقیح به فلاسک‌های حاوی ۴۰ میلی‌لیتر از محیط کشت کامل مایع (CSM-Leu C/N=80) منتقل شده و در شیکر با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و چرخش ۲۵۰ rpm به مدت یک هفته نگهداری شدند.

شناسایی و تعیین مقدار نارینجین با استفاده از دستگاه HPLC
نمونه‌برداری هر ۲۴ ساعت از فلاسک‌ها انجام شد. ۵۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت کامل برداشت شد و به همان مقدار متانول با درجه خلوص HPLC به نمونه‌ها اضافه شد. به منظور رهاسازی محتویات سلولی، به اندازه حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر مهره شیشه‌ای با قطر ۱ میلی‌متر به هر نمونه اضافه شد و به مدت یک ساعت در

در مرحله بعد به منظور تعادل جریان متابولیسم، یافتن بهترین ترکیب ژنی و شناسایی ژن بهبوددهنده میزان تولید نارینجین تعداد نسخه‌های ژن‌های *Rttal*, *Phchs*, *Mschi* و *Pc4cl* به دو نسخه در هر پلاسمید و به صورت جداگانه برای هر ژن در مکان برشی *NheI/SalI* پلاسمید pYT4SI و به ترتیب برای تولید پلاسمیدهای pYT4SII، pYT4SIS، pYT4SII، pYT4SIT (جدول ۲). سپس برای بررسی اثر متقابل دو نسخه از هر ژن *Rttal* و *Phchs* و تولید پلاسمید pYT4SITS یک نسخه دیگر از ژن *Phchs* در مکان آنزیم‌های برشی *NheI/SalI* پلاسمید دریافت‌کننده pYT4SIT وارد شد. لیست و نام کامل تمام پلاسمیدهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۲ ذکر شده است.

تراریختی و غربال‌گری *Y. lipolytica*

برای تراریختی *Y. lipolytica* از روش پایه لیتیم استات با اندکی تغییر استفاده شد (Gietz & Schiestl, 2007). در این روش ابتدا مخمر *Y. lipolytica* Po1g بر روی پلیت YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) به مدت ۲۴-۱۶ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد. به ازای هر واکنش ۵ میکرولیتر از DNA تک‌رشته‌ای اسپرم سالمون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد و پس از سرد شدن با مخلوط واکنش تراریختی مخمر ترکیب شد؛ این مخلوط حاوی ۵ میکرولیتر لیتیم استات ۲ مولار و ۹۰ میکرولیتر از محلول استریل ۵۰ درصد پلی‌اتیلن گلیکول ۴۰۰۰ بود. پس از فراهم کردن مخلوط واکنش حدود ۲۰۰ میکرولیتر از *Y. lipolytica* Po1g که از قبل رشد داده شد با مخلوط واکنش

همپوشانی خطاهای استاندارد میانگین تیمارهای مورد بررسی در شکل ۳ B نمایانگر این حقیقت است که تیروزین با فراهم کردن میزان سوبسترای موردنیاز برای سویه مخمر تراریخت با بهترین سازه ژنی (pPc4PhSMsI) نقش قابل توجه در بهبود تولید نارینجین دارد. بنابراین ژن *tal* با منبع ژنی *Rhodotorula toruloides* به پلاسمید گیرنده pPc4PhSMsI وارد شد. به منظور سهولت نامگذاری، پلاسمید حاصل از این به بعد pYT4SI نامیده می‌شود (جدول ۲).

تاثیر تعداد نسخه هر ژن بر تولید نارینجین

با توجه به نتایج حاصل از تعیین بهترین سازه ژنی در بخش قبل و نیز نقش تیروزین بر میزان تولید نارینجین، به منظور بررسی نقش تعداد نسخه‌های ژن‌های مورد بررسی بر بهینه‌سازی تولید نارینجین، تعداد نسخه‌های هر یک از ژن‌های مورد بررسی به صورت گام به گام و به تعداد دو نسخه در هر پلاسمید افزایش یافت. شکل ۴ میزان تغییر تولید نارینجین در مقیاس درصد و در مقایسه با تیمار pYT4SI (نمونه شاهد) را نشان می‌دهد. در ابتدا و براساس نتایج حاصل از تاثیر تیروزین بر تولید نارینجین، تعداد نسخه‌های ژن *Rttal* به دو نسخه در هر پلاسمید افزایش یافت (سویه تراریخت با پلاسمید pYT4SIT)، نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های HPLC نمونه‌های تراریخت با پلاسمید حاوی دو نسخه ژن *Rttal* افزایش ۳/۳۸ درصد میزان تولید نارینجین را نسبت به نمونه شاهد نشان داد. در مرحله بعد تعداد دو نسخه از ژن *Pc4cl* مورد بررسی قرار گرفت (سویه تراریخت با پلاسمید pYT4SITS) درحالی‌که نسبت به نمونه‌های تراریخت حاوی دو نسخه از ژن *Phchs* میزان تولید نارینجین حاصل از این تیمار کمتر بود که ممکن است نشان‌دهنده تاثیر منفی افزایش بیش از حد تیروزین بر تولید نارینجین باشد. نتایج این بررسی نشان داد که افزایش بیان ژن *Phchs* می‌تواند به عنوان یک عامل کلیدی در افزایش تولید نارینجین به شمار رود.

در مرحله بعد به منظور بهبود تولید نارینجین تعداد نسخه‌های ژن *Phchs* تا پنج نسخه به صورت تدریجی در هر پلاسمید افزایش یافت. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های HPLC و مقایسه میانگین تیمارهای مختلف به واسطه مقایسه همپوشانی خطاهای استاندارد نشان داد زمانی که تعداد ژن *Phchs* به پنج نسخه در پلاسمید افزایش یافت، میزان تولید نارینجین به بیش از ۵۵ میلی‌گرم در لیتر افزایش داشت که ۳/۷۰۶ برابر نسبت به حالت تک نسخه‌ای (pYT4SI) بیشتر بوده است در صورتی‌که نسبت به زمانی که چهارنسخه از این ژن در هر پلاسمید بیان شده بود، تفاوت معنی‌دار نشان نداد (شکل ۵). با این وجود به دلیل تولید مقدار بیشتر نارینجین توسط سویه حاوی پنج نسخه از ژن *Phchs*، در تحقیقات بعدی از این سویه به عنوان میزبان استفاده شد.

ورتنس با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و چرخش RPM ۲۵۰ نگهداری شدند. مقدار نارینجین تولید شده با استفاده از دستگاه HPLC 1220 و به روش (Lv et al., 2019a) اندازه‌گیری شد. به منظور جداسازی نارینجین از ستون ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 × 100 mm, 3.5 μm, Agilent) و برای تعیین آن نیز از مانیتور VWD (λ = 280 nm) استفاده شد. برای فاز سیال A و B به ترتیب از اسید استیک ۰/۱ درصد حل شده در آب استریل و از اسید استیک ۰/۱ درصد حل شده در متانول استفاده شد. شیب شستشو فاز سیال B به ترتیب و بر حسب زمان/درصد به این صورت بود: ۰/۰، ۸۰/۵، ۸۰/۸، ۸۰/۱۲ و ۰/۱۵. از نارینجین خالص با درصد خلوص بیش از ۹۵ درصد و زمان خروج ۹/۹۰۱ دقیقه به عنوان استاندارد و برای تعیین کمیت و کیفیت نارینجین خارج سلولی و استاندارد ثانویه رزوراتول با درجه خلوص بیش از ۹۵ درصد و زمان خروج ۸/۸۳۶ دقیقه نیز به عنوان کنترل و جهت تشخیص دقیق نارینجین از سایر ترکیبات ممکن موجود در مخلوط واکنش استفاده شد. هر دو استاندارد نارینجین و رزوراتول از شرکت Sigma Aldrich, Missouri, USA تهیه شدند. شکل‌ها و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Adobe Illustrator CC, 2018 طراحی و ترسیم شدند.

نتایج

تعیین بهترین منابع ژنی جهت تولید بهینه نارینجین

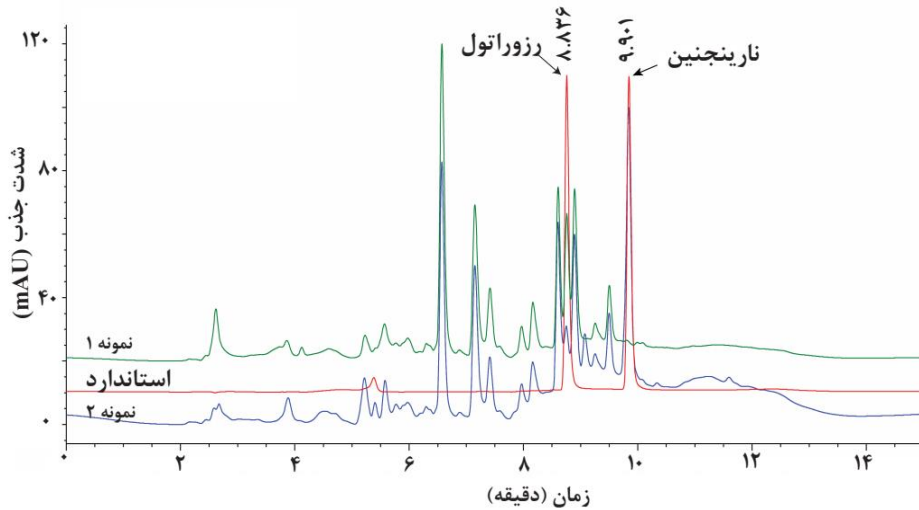
شکل ۲ کروماتوگراف HPLC نمایش منحنی نارینجین در نمونه استاندارد و دو نمونه مورد آزمایش را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های HPLC و به منظور یافتن قدرتمندترین منابع ژنی در شکل ۳ A نشان داد میزان تولید نارینجین در محدوده‌ای بین ۹/۹۴ تا ۲۱/۹۵ میلی‌گرم بر لیتر قرار داشت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین و همپوشانی خطاهای استاندارد تیمارهای مختلف نشان داد که در بین هشت سازه ژنی مختلف، ترکیب ژنی *Pc4cl*، *Phchs* و *Mschi* (با نام اختصاری پلاسمید pPc4PhSMsI) با تولید بیش از ۲۱ میلی‌گرم در لیتر نارینجین اختلاف معنی‌دار با سایر ترکیبات ژنی داشته و به‌عنوان بهترین ترکیب ژنی به شمار می‌رود.

شکل ۳ B نشان می‌دهد که میزان تولید نارینجین در حضور ۵ میلی‌مولار تیروزین خارج سلولی و ۹۶ ساعت پس از آغاز کشت به ۲۶/۲ میلی‌گرم بر لیتر رسید که ۱۶/۲۳ درصد نسبت به نمونه استاندارد (pPc4PhSMsI) و زمانی که گلوکز به عنوان منبع اصلی سوبسترا بود، افزایش معنی‌دار نشان داد. عدم افزایش معنی‌دار تولید نارینجین پس از ۹۶ ساعت احتمالاً به دلیل مصرف تیروزین خارج سلولی بوده است. نتایج حاصل از

جدول ۲- فهرست پلاسمیدهای مورد استفاده در این پژوهش.

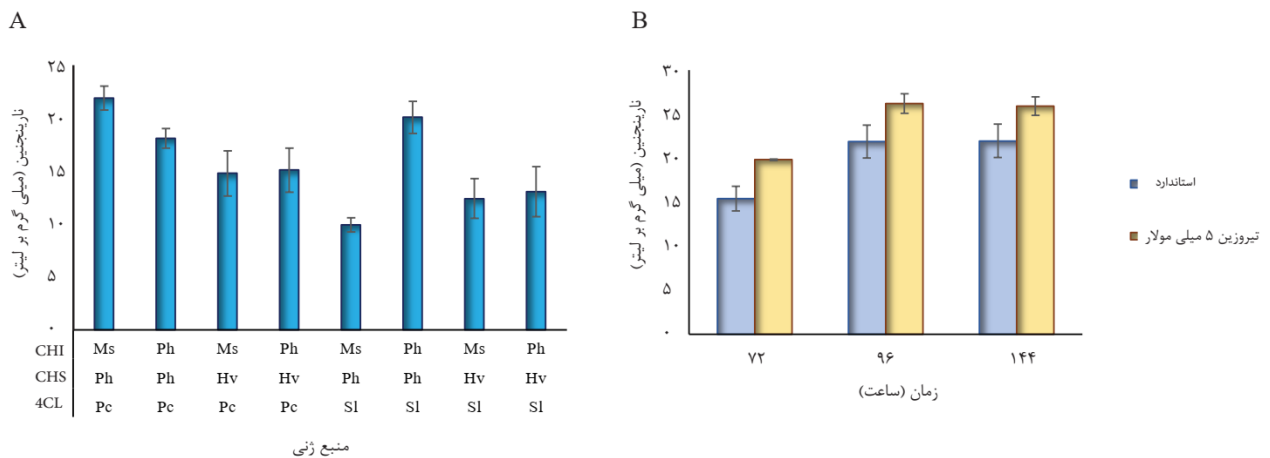
Table 2. List of plasmids used in this study.

علامت اختصاری	نام کامل هر پلاسمید	توضیحات
pYLXP ⁺		پلاسمید مورد استفاده برای تمام مراحل همسانه سازی
pRtT	pYLXP ⁺ - <i>Rttal</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن <i>Rttal</i>
pPc4	pYLXP ⁺ - <i>Pc4cl</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن <i>Pc4cl</i>
pSL4	pYLXP ⁺ - <i>Sl4cl</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن <i>Sl4cl</i>
pPhS	pYLXP ⁺ - <i>Phchs</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن <i>Phchs</i>
pHvS2	pYLXP ⁺ - <i>Hvchs2</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن <i>Hvchs2</i>
pMsI	pYLXP ⁺ - <i>MschI</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن <i>MschI</i>
pPhI	pYLXP ⁺ - <i>PhchI</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن <i>PhchI</i>
pYlA1	pYLXP ⁺ - <i>Ylacc1</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن <i>Ylacc1</i>
pCgA1	pYLXP ⁺ - <i>Cgacc1</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن <i>Cgacc1</i>
pEcA1A	pYLXP ⁺ - <i>Ecacc1A</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن <i>Ecacc1A</i>
pEcA1B	pYLXP ⁺ - <i>Ecacc1B</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن <i>Ecacc1B</i>
pEcA1C	pYLXP ⁺ - <i>Ecacc1C</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن <i>Ecacc1C</i>
pEcA1D	pYLXP ⁺ - <i>Ecacc1D</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن <i>Ecacc1D</i>
pEcA1ABCD	pYLXP ⁺ - <i>Ecacc1ABCD</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن کامل <i>Ecacc1ABCD</i>
pPc4PhSMsI	pYLXP ⁺ - <i>Pc4cl-Phchs-MschI</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن‌های <i>Pc4cl</i> ، <i>Phchs</i> و <i>MschI</i>
pPc4PhSPhI	pYLXP ⁺ - <i>Pc4cl-Phchs-PhchI</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن‌های <i>Pc4cl</i> ، <i>Phchs</i> و <i>PhchI</i>
pPc4HvSMsI	pYLXP ⁺ - <i>Pc4cl-Hvchs-MschI</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن‌های <i>Pc4cl</i> ، <i>Hvchs</i> و <i>MschI</i>
pPc4HvSPhI	pYLXP ⁺ - <i>Pc4cl-Hvchs-PhchI</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن‌های <i>Pc4cl</i> ، <i>Hvchs</i> و <i>PhchI</i>
pSl4PhSMsI	pYLXP ⁺ - <i>Sl4cl-Phchs-MschI</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن‌های <i>Sl4cl</i> ، <i>Phchs</i> و <i>MschI</i>
pSl4PhSPhI	pYLXP ⁺ - <i>Sl4cl-Phchs-PhchI</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن‌های <i>Sl4cl</i> ، <i>Phchs</i> و <i>PhchI</i>
pSl4HvSMsI	pYLXP ⁺ - <i>Sl4cl-Hvchs-MschI</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن‌های <i>Sl4cl</i> ، <i>Hvchs</i> و <i>MschI</i>
pSl4HvSPhI	pYLXP ⁺ - <i>Sl4cl-Hvchs-PhchI</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن‌های <i>Sl4cl</i> ، <i>Hvchs</i> و <i>PhchI</i>
pYT4SI	pYLXP ⁺ - <i>Rttal-Pc4cl-Phchs-MschI</i>	پلاسمید pYLXP ⁺ دربردارنده ژن‌های <i>Rttal</i> ، <i>Pc4cl</i> ، <i>Phchs</i> و <i>MschI</i>
pYT4SIT	pYLXP ⁺ - <i>Rttal-Pc4cl-Phchs-MschI-Rttal</i>	پلاسمید pYT4SI در بردارنده دو نسخه از ژن <i>Rttal</i>
pYT4SI4	pYLXP ⁺ - <i>Rttal-Pc4cl-Phchs-MschI-Pc4cl</i>	پلاسمید pYT4SI در بردارنده دو نسخه از ژن <i>Pc4cl</i>
pYT4SIS	pYLXP ⁺ - <i>Rttal-Pc4cl-Phchs-MschI-Phchs</i>	پلاسمید pYT4SI در بردارنده دو نسخه از ژن <i>Phchs</i>
pYT4SII	pYLXP ⁺ - <i>Rttal-Pc4cl-Phchs-MschI-MschI</i>	پلاسمید pYT4SI در بردارنده دو نسخه از ژن <i>MschI</i>
pYT4SI4S	pYLXP ⁺ - <i>Rttal-Pc4cl-Phchs-MschI-Pc4cl-Phchs</i>	پلاسمید pYT4SI در بردارنده دو نسخه از هر ژن <i>Pc4cl</i> و <i>Phchs</i>
pYT4Sx2I	pYLXP ⁺ - <i>Rttal-Pc4cl-Phchs_{x2}-MschI</i>	پلاسمید pYT4SI در بردارنده دو نسخه از ژن <i>Phchs</i>
pYT4Sx3I	pYLXP ⁺ - <i>Rttal-Pc4cl-Phchs_{x3}-MschI</i>	پلاسمید pYT4SI در بردارنده سه نسخه از ژن <i>Phchs</i>
pYT4Sx4I	pYLXP ⁺ - <i>Rttal-Pc4cl-Phchs_{x4}-MschI</i>	پلاسمید pYT4SI در بردارنده چهار نسخه از ژن <i>Phchs</i>
pYT4Sx5I	pYLXP ⁺ - <i>Rttal-Pc4cl-Phchs_{x5}-MschI</i>	پلاسمید pYT4SI در بردارنده پنج نسخه از ژن <i>Phchs</i>
pYT4Sx5I-Cgacc1	pYLXP ⁺ - <i>Rttal-Pc4cl-Phchs_{x5}-MschI-Cgacc1</i>	پلاسمید pYT4Sx5I در بردارنده ژن <i>Cgacc1</i>
pYT4Sx5I-Ecacc1ABCD	pYLXP ⁺ - <i>Rttal-Pc4cl-Phchs_{x5}-MschI-Ecacc1ABCD</i>	پلاسمید pYT4Sx5I در بردارنده ژن <i>Ecacc1ABCD</i>
pYT4Sx5I-Ylacc1	pYLXP ⁺ - <i>Rttal-Pc4cl-Phchs_{x5}-MschI-Ylacc1</i>	پلاسمید pYT4Sx5I در بردارنده ژن <i>Ylacc1</i>



شکل ۲- کروماتوگراف تعیین نارینجین در نمونه استاندارد و دو نمونه مورد آزمایش. نارینجین با درصد خلوص بیش از ۹۵ درصد (PubChem Substance ID: 57654457) به عنوان نمونه استاندارد، رزوراتول با درجه خلوص بیش از ۹۵ درصد (PubChem Substance ID:24278055) به عنوان کنترل و جهت تشخیص دقیق نارینجین و به ترتیب سویه های pYT4S_{x5}I-ylacc1#2 و pYT4S_{x5}I-ylacc1#5 به عنوان نمونه های ۱ و ۲ استفاده شدند.

Fig. 2. Naringin chromatograph in standard and two tested samples. Naringin with a purity of more than 95% (PubChem Substance ID 57654457) as the standard sample, Resveratol with a purity of more than 95% (PubChem Substance ID:24278055) as a control and for accurate diagnosis of Naringenin and pYT4S_{x5}I-ylacc1#2 and pYT4S_{x5}I-ylacc1#5 strains were used as samples 1 and 2, respectively.



شکل ۳. نمایش ترکیب ژنی و نقش تیروزین بر تولید نارینجین در میزبان *Y. lipolytica*. **A.** تاثیر منبع ژنی بر قدرت بیان سه ژن بیوسنتزی پایه به منظور بهینه سازی تولید نارینجین. **B.** تاثیر تیروزین خارج سلولی بر میزان تولید نارینجین.

Fig. 3. Gene composition and the role of tyrosine on the production of naringenin in *Y. lipolytica* host. **A.** The effect of gene source on the expression of three basic biosynthetic genes to optimize naringenin production. **B.** The effect of extracellular tyrosine on naringenin titer.

تاثیر منابع استیل-کوآنزیم آ و مالونیل کوآنزیم آ بر میزان تولید نارینجین

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده های HPLC برای بررسی تاثیر منبع مالونیل کوآنزیم آ و افزودن دو ژن *Cgacc1*, *Ylacc1* و خوشه ژنی *Ec_accABCD* به پلاسמיד حاوی بهترین سازه ژنی حاصل از مراحل قبل یعنی پلاسמיד pYT4S_{x5}I با استفاده از روش

YaliBrick و مقایسه تیمارهای مختلف از طریق مقایسه میانگین هم پوشانی خطاهای استاندارد در شکل ۶ نشان داد که بین تمام تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی دار آماری وجود دارد و ژن های مورد بررسی می توانند سبب افزایش قابل توجه تولید نارینجین شوند. ژن *Ylacc1* از قدرت بسیار بیشتری نسبت به دو منبع ژنی دیگر برخوردار بوده است و سویه مخمر تراریخت با پلاسמיד

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده های HPLC برای بررسی تاثیر منبع مالونیل کوآنزیم آ و افزودن دو ژن *Cgacc1*, *Ylacc1* و خوشه ژنی *Ec_accABCD* به پلاسמיד حاوی بهترین سازه ژنی حاصل از مراحل قبل یعنی پلاسמיד pYT4S_{x5}I با استفاده از روش

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده های HPLC برای بررسی تاثیر منبع مالونیل کوآنزیم آ و افزودن دو ژن *Cgacc1*, *Ylacc1* و خوشه ژنی *Ec_accABCD* به پلاسמיד حاوی بهترین سازه ژنی حاصل از مراحل قبل یعنی پلاسמיד pYT4S_{x5}I با استفاده از روش

حالت تک کشت مخمر ۸ برابر افزایش داشت (Zhang et al., 2017). استفاده از ۲۰ گرم بر لیتر منبع قند گلوکز در محیط کشت، افزایش میزان توزیع اکسیژن در محیط کشت، به نسبت ۵ برابر ماده تلقیح سوپه دارای مسیر بیوسنتزی بالادست به پایین دست و نیز القای IPTG در زمان ۶ ساعت پس از آغاز کشت میزان تولید نارینجین را در کشت مخلوط *E. coli* - *E. coli* به میزان ۴۱/۵ میلی-گرم بر لیتر رساند (Ganesan et al., 2017).

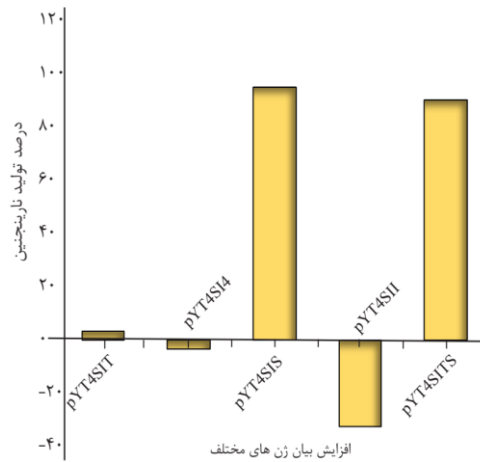
تعداد مسیر بیوسنتزی، یعنی هماهنگی میزان تجمع و مصرف ترکیبات حدواسط نقش بسیار مهمی را در بهینه‌سازی تولید فرآورده مورد نظر ایفا می‌کند. این هماهنگی می‌تواند از طریق افزایش تعداد نسخه‌های هر ژن در هر پلاسمید انجام شود (Jones et al., 2015). زمانی که مسیر بیوسنتزی پایه (حاوی ژن‌های *chi*, *Acl* و *chs* بهینه‌سازی شد، تولید نارینجین به ۲۱/۹۵ میلی‌گرم بر لیتر رسید که نشان‌دهنده تفاوت در قدرت بیان ژن‌ها در میزان بود (شکل ۳ A). همچنین نشان داده شد که ژن *tal* سبب افزایش میزان سوبسترای کافی برای سلول‌های در حال رشد و افزایش میزان تولید نارینجین می‌شود. در مرحله بعد نقش افزایش تعداد نسخه‌های هر ژن در هر سلول بررسی شد و مشخص شد که افزایش بیان ژن *chs* تا پنج نسخه به میزان قابل توجهی تولید نارینجین را افزایش داد (شکل ۵). پژوهشگران بیان کردند تعداد نسبتاً کم نسخه‌های پلاسمید و متعاقباً تعداد ژن منحصر به فرد در یک مسیر بیوسنتز هترولوگ به عنوان یک عامل محدودکننده در مهندسی متابولیت به‌شمار می‌رود و این در صورتی است که در اغلب پروژه‌های مهندسی سطح بالایی از بیان ژن‌ها مورد نیاز است (Lian et al., 2018). برای اولین بار و با تراریختی هر سلول میزان *E. coli* با ۱۰۰ نسخه از پلاسمید حاوی مسیر بالادست تولید نارینجین یعنی از ژن تولیدکننده تیروزین تا نارینجین و بهینه‌سازی شرایط رشد، میزان ۱۰۰/۶۴ میلی‌گرم بر لیتر تولید نارینجین گزارش شد (Wu et al., 2014). در انتها در این پژوهش نقش سوبستراهای کلیدی و مهم استیل-کوآنزیم‌آ و مالونیل‌کوآنزیم‌آ بر افزایش بیان نارینجین تایید شد و سبب بهینه‌سازی تولید این ترکیب ارزشمند به بیش از ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر شد (شکل ۶). در پژوهشی با استفاده از سوپه Polf مخمر *Y. lipolytica* محققان توانستند موانع محدودکننده تولید نارینجین را از طریق ساخت مدولار تمام مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها و مشتقات هیدروکسیله آن‌ها شامل ژن‌های *tal*, *Acl*, *chs*, *chi*, *h3*, *f3h* سیتوکروم *p450* رداکتاز، و *aro1* شناسایی کنند. در این بررسی آن‌ها نشان دادند که افزایش تعداد نسخه‌های *chs* و *CPR* به ترتیب به پنج و دو نسخه در هر پلاسمید و از طریق تلفیق پلاسمید به ژنوم میزان، بهبود سنتز سوبستراهای مالونیل و استیل‌کوآنزیم‌آ، افزایش میزان گلوکز در ابتدای

می‌تواند میزان تولید نارینجین را به ۹۰/۱۶ میلی‌گرم بر لیتر افزایش دهد (شکل ۶). ژن *Cgacc1* نیز از نظر میزان قدرت و کارایی بیان در میزان مورد بررسی با تولید ۷۶/۳۶ میلی‌گرم بر لیتر نارینجین در رتبه دوم قرار داشت.

بحث و نتیجه‌گیری

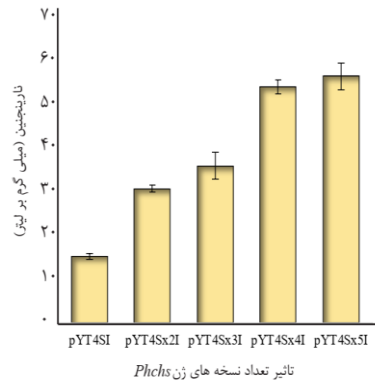
به دلیل نگرانی‌هایی که در مورد ایمنی صنایع غذایی و محیط زیست وجود دارد، بیوسنتز فلاونوئیدها از سوبسترای ایمن، ارزان و تجدیدپذیر به‌طور فزاینده‌ای مورد توجه قرار گرفته است (Koopman et al., 2012; Santos et al., 2011). نارینجین به عنوان هسته مرکزی تولید فلاونوئیدها، یک ترکیب طبیعی بسیار ارزشمند است که از اهمیت ویژه‌ای در درمان بسیاری از بیمارهای انسان برخوردار است (Hermenean et al., 2013; Ribeiro et al., 2008; Xu et al., 2013a). به دلیل اهمیت این ترکیب آلی، بیان ترکیبی از آنزیم‌ها از ارگانوسم‌های مختلف و در سوپه‌های مختلف باکتریایی، این موجودات زیستی را قادر به تولید مقادیر قابل توجهی نارینجین کرده است. مخمر *Y. lipolytica* از اجزای لپیدی و ساختارهای غشادار غنی بوده و محیط بسیار مناسبی را برای تولید بسیاری از ترکیبات طبیعی از جمله فلاونوئیدها فراهم می‌کند (Lv et al., 2019b). مخمر *Y. lipolytica* Polg برای تولید نارینجین و برای اولین بار در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت در حالی که در سایر پژوهش‌های مرتبط و برای تولید فلاونوئید موردنظر سایر محققین از میزان‌های *E. coli* یا *S. cerevisiae* استفاده نمودند.

بهره‌گیری از گیاه آرابیدوپسیس تالینا، بیان مقایسه‌ای ژن‌های درگیر در بیوسنتز نارینجین و معرفی آن‌ها به میزان میکروبی *S. cerevisiae* کاهش مهار بازخورد ۳-دئوکسی-د-آرابینوز-هپتولوزونیت-۷-فسفات سینتاز، افزایش تعداد نسخه‌های ژن *chs* و نیز استفاده از گلوکز به عنوان منبع قند منجر به تولید مقدار ۵۴ میلی‌گرم بر لیتر نارینجین شد (Koopman et al., 2012). در پژوهش دیگری به‌منظور بهینه‌سازی تولید نارینجین از کشت مخلوط باکتری *E. coli* و مخمر *S. cerevisiae*، منبع قند زایلوز استفاده شد. برای این منظور مسیر طولانی بیوسنتز نارینجین به دو بخش تفکیک شد و هر بخش به یکی از میزان‌های مورد استفاده وارد شد. نوع محیط کشت، اندازه ماده تلقیح و نسبت ماده تلقیح هر یک از میزان‌های سلولی از عوامل مهمی بود که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نسبت ماده تلقیح *S. cerevisiae* بیشترین نقش را در میزان تولید نارینجین دارد و زمانی که اندازه ماده تلقیح مخمر ۵ برابر و قند زایلوز ۴۰ گرم بر لیتر در نظر گرفته شد، مقدار تولید نارینجین به ۲۱/۱۶ میلی‌گرم بر لیتر رسید که نسبت به



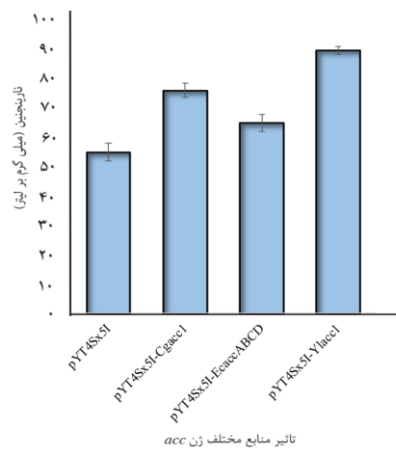
شکل ۴- تاثیر تعداد نسخه های هر ژن بر میزان تولید نارینجین.

Fig. 4. The effect of gene copy number on naringenin titer.



شکل ۵- تاثیر افزایش تعداد نسخه های ژن *Phchs* تا پنج نسخه در هر پلاسمید بر میزان تولید نارینجین.

Fig. 5. The effect of *Phchs* gene copy number (up to five copies) in each plasmid on naringenin titer.



شکل ۶- تاثیر بیان ژن *acc1* از منابع ژنی مختلف بر افزایش تولید نارینجین.

Fig. 6. The effect of *acc1* gene expression on the improvement of naringenin titer.

References

- Alberstein, M., Eisenstein, M. & Abeliovich, H.** 2012. Removing allosteric feedback inhibition of tomato 4-coumarate:CoA ligase by directed evolution. *Plant J.* 69: 57-69.
- Anson, J.G., Gilbert, H.J., Oram, J.D. & Minton, N.P.** 1987. Complete nucleotide sequence of the *Rhodospiridium toruloides* gene coding for phenylalanine ammonia-lyase. *Gene* 58: 189-199.
- Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., Rollinger, J.M., Schuster, D., Breuss, J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V.M. & Stuppner, H.** 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* 33: 1582-1614.
- Chemler, J.A. & Koffas, M.A.** 2008. Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 597-605.
- Christensen, A.B., Gregersen, P.L., Schroder, J. & Collinge, D.B.** 1998. A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. *Plant Mol. Biol.* 37: 849-857.
- Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S.P. & Casati, P.** 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front. Plant Sci.* 3: 1-15.
- Fowler, Z.L., Gikandi, W.W. & Koffas, M.A.** 2009. Increased malonyl coenzyme A biosynthesis by tuning the *Escherichia coli* metabolic network and its application to flavanone production. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 5831-5839.
- Fowler, Z.L. & Koffas, M.A.** 2009. Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83: 799-808.
- Ganesan, V., Li, Z., Wang, X. & Zhang, H.** 2017. Heterologous biosynthesis of natural product naringenin by co-culture engineering. *Synth. Syst. Biotechnol.* 2: 236-242.
- Gietz, R.D. & Schiestl, R.H.** 2007. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* 2: 31-34.
- Hermenean, A., Ardelean, A., Stan, M., Herman, H., Mihali, C.V., Costache, M. & Dinischiotu, A.** 2013. Protective effects of naringenin on carbon tetrachloride-induced acute nephrotoxicity in mouse kidney. *Chem. Biol. Interact.* 205: 138-147.
- Jiang, H., Wood, K.V. & Morgan, J.A.** 2005. Metabolic engineering of the phenylpropanoid pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2962-2969.
- Jones, J.A., Toparlak, Ö.D. & Koffas, M.A.G.** 2015. Metabolic pathway balancing and its role in the production of biofuels and chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 33: 52-59.
- Koopman, F., Beekwilder, J., Crimi, B., van Houwelingen, A., Hall, R.D., Bosch, D., van Maris, A.J., Pronk, J.T. & Daran, J.M.** 2012. De novo production of the flavonoid naringenin in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 11: 155-170.

فرمنتیشن و افزودن بازدارنده سرلانین به محیط کشت می‌تواند سبب بهبود تولید نارینجین، اردیکتیول و تاکسیفولین به ترتیب به ۲۵۲/۴، ۱۳۴/۲ و ۱۱۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر شوند (Lv et al., 2019b). درحالی‌که کاهش هزینه تولید ترکیبات فلاونوئیدی از طریق کاهش مصرف گلوکز در محیط کشت و عدم افزودن ترکیبات گران‌قیمت همچون سرلانین همچنان به عنوان یک چالش عمده به شمار می‌رود که محققان تلاش دارند از طریق تولید مسیرهای بیوسنتز هترولوگ تکرارپذیر و کاهش سرمایه‌گذاری‌های اولیه این موانع را رفع کنند (Zhu & Jackson, 2015).

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که درک کافی از مسیر بیوسنتزی، شناسایی و رفع عوامل محدود کننده تولید هترولوگوس ترکیبات موردنظر و استفاده از میزبان سلولی قدرتمند می‌تواند سبب بهینه‌سازی تولید ترکیبات ارزشمند دارویی به روش بسیار ایمن در مقیاس وسیع و با هزینه کمتر نسبت به استخراج از مواد گیاهی و یا سنتز شیمیایی شوند. همچنین این نتایج تاکید نمود که مخمر *Y. lipolytica* می‌تواند با بهره‌گیری از آنزیم‌ها و سوبستراهای ذاتی خود منجر به بهبود سنتز ترکیبات خارجی شود.

سپاسگزاری

این پژوهش در دانشگاه مریلند آمریکا حومه بالتیمور (University of Maryland, Baltimore County, USA) انجام شد. هزینه‌های انجام این پروژه توسط دانشگاه مریلند، بنیاد ملی علوم (National Science Foundation; NSF) آمریکا و نیز دانشگاه گیلان تامین شد. به‌همین منظور از پرسنل محترم این مؤسسه‌ها جهت همکاری‌های بی‌دریغ و حمایت مالی قدردانی می‌شود.

- Leonard, E., Ajikumar, P., Thayer, K., Xiao, W., Mo, J., Tidor, B., Stephanopoulos, G. & Prather, K.** 2010. Combining metabolic and protein engineering of a terpenoid biosynthetic pathway for overproduction and selectivity control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 13654-13659.
- Lian, J., Mishra, S. & Zhao, H.** 2018. Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: New tools and their applications. *Metab. Eng.* 50: 85-108.
- Lv, Y., Edwards, H., Zhou, J. & Xu, P.** 2019a. Combining 26s rDNA and the Cre-loxP system for iterative gene integration and efficient marker curation in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth. Biol.* 8: 568-576.
- Lv, Y., Marsafari, M., Koffas, M., Zhou, J. and Xu, P.** 2019b. Optimizing oleaginous yeast cell factories for flavonoids and hydroxylated flavonoids biosynthesis. *ACS Synth. Biol.* 8: 2514-2523.
- Mahomoodally, M.F., Gurib-Fakim, A. & Subratty, A.H.** 2005. Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of mauritius. *Pharm. Biol.* 43: 237-242.
- Panche, A.N., Diwan, A.D. & Chandra, S.R.** 2016. Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* 5: 1-15.
- Pandy, A.K.** 2007. Anti-staphylococcal activity of a pan-tropical aggressive and obnoxious weed *Parthenium hysterophorus*: An in vitro study. *Natl Acad Sci Lett.* 30: 383-386.
- Ribeiro, I.A., Rocha, J., Sepodes, B., Mota-Filipe, H. & Ribeiro, M.H.** 2008. Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 52-53: 13-18.
- Santos, C.N.S., Koffas, M. & Stephanopoulos, G.** 2011. Optimization of a heterologous pathway for the production of flavonoids from glucose. *Metab. Eng.* 13: 392-400.
- Stafford, H.A., Runeckles, V.C. & Conn, E.E.** 1974. Possible Multienzyme Complexes Regulating the Formation of C6-C3 Phenolic Compounds and Lignins in Higher Plants. *Recent Adv. Phytochem.* 8: 53-79.
- Trantas, E.A., Koffas, M.A., Xu, P. & Verweridis, F.** 2015. When plants produce not enough or at all: metabolic engineering of flavonoids in microbial hosts. *Front. Plant Sci.* 6: 7-23.
- van Tunen, A.J., Koes, R.E., Spelt, C.E., van der Krol, A.R., Stuitje, A.R. & Mol, J.N.** 1988. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes. *Embo. J.* 7: 1257-1263.
- Wang, Y., Chen, S. & Yu, O.** 2011. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91: 949-956.
- Winkel, B.S.** 2004. Metabolic channeling in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 55: 85-107.
- Winkel-Shirley, B.** 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 126: 485-493.
- Winkel-Shirley, B.** 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 218-223.
- Wong, L., Engel, J., Jin, E., Holdridge, B. & Xu, P.** 2017. YaliBricks, a versatile genetic toolkit for streamlined and rapid pathway engineering in *Yarrowia lipolytica*. *Metab. Eng. Commun.* 5: 68-77.
- Wu, J., Du, G., Zhou, J. & Chen, J.** 2013. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for (2S)-pinocembrin production from glucose by a modular metabolic strategy. *Metab. Eng.* 16: 48-55.
- Wu, J., Zhou, T., Du, G., Zhou, J. & Chen, J.** 2014. Modular optimization of heterologous pathways for de novo synthesis of (2S)-naringenin in *Escherichia coli*. *PLOS ONE* 9: e101492.
- Xu, C., Chen, J., Zhang, J., Hu, X., Zhou, X., Lu, Z. & Jiang, H.** 2013a. Naringenin inhibits angiotensin II-induced vascular smooth muscle cells proliferation and migration and decreases neointimal hyperplasia in balloon injured rat carotid arteries through suppressing oxidative stress. *Biol. Pharm. Bull.* 36: 1549-1555.
- Xu, P., Bhan, N. & Koffas, M.A.G.** 2013b. Engineering plant metabolism into microbes: from systems biology to synthetic biology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24: 291-299.
- Xu, P., Qiao, K.J., Ahn, W.S. & Stephanopoulos, G.** 2016. Engineering *Yarrowia lipolytica* as a platform for synthesis of drop-in transportation fuels and oleochemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: 10848-10853.
- Zelcbuch, L., Antonovsky, N., Bar-Even, A., Levin-Karp, A., Barenholz, U., Dayagi, M., Liebermeister, W., Flamholz, A., Noor, E., Amram, S., Brandis, A., Barea, T., Yofe, I., Jubran, H. & Milo, R.** 2013. Spanning high-dimensional expression space using ribosome-binding site combinatorics. *Nucleic Acids Res.* 41: e98-e106.
- Zha, W., Rubin-Pitel, S.B., Shao, Z. & Zhao, H.** 2009. Improving cellular malonyl-CoA level in *Escherichia coli* via metabolic engineering. *Metab Eng.* 11: 192-198.
- Zhang, H. and Stephanopoulos, G.** 2013. Engineering *E. coli* for caffeic acid biosynthesis from renewable sugars. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 3333-3341.
- Zhang, W., Liu, H., Li, X., Liu, D., Dong, X.-T., Li, F.-F., Wang, E.-X., Li, B.-Z. & Yuan, Y.-J.** 2017. Production of naringenin from D-xylose with co-culture of *E. coli* and *S. cerevisiae*. *Eng. Life. Sci.* 17: 1021-1029.
- Zhu, Q. & Jackson, E.N.** 2015. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for industrial applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 36: 65-72.
- Zhu, S., Wu, J., Du, G., Zhou, J. & Chen, J.** 2014. Efficient synthesis of eriodictyol from L-tyrosine in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 3072-3080.

How to cite this article:

Marsafari, M., Samizadeh, H., Rabiee, B., Ashraf Mehrabi, A., Lv, Y. & Xu, P. 2020. The optimization of Naringenin biosynthesis pathway using *Yarrowia lipolytica* cell culture. *Nova Biologica Reperta* 7: 133-144. (In Persian).

مارصفری، م.، سمیع‌زاده لاهیجی، ح.ا.، ربیعی، ب.، اشرف مهرابی، ع.، لوی، ی. و شو، پ. ۱۳۹۹. بهینه‌سازی بیان مسیر بیوسنتز فلاونوئید نارینجین با استفاده از کشت سلولی یارویا لیپولیتیکا. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۷: ۱۴۴-۱۳۳.