ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶
صفحه ۴۸ - ۳۹

بیان دگرساخت ژن لینالول سنتاز در مخمر ساکارومایسس سرویزیه با استفاده از تکنیک ترمیم شکاف

Heterologous expression of linalool synthase in *Saccharomyces cerevisiae* using gap repair technique

پگاه امیری[۱]، آذر شاه پیری[*۱]، محمدعلی اسداللهی[۲]

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲- استادیار، گروه زیست‌فناوری، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان

Amiri P[1], Shahpiri A[*1], Asadollahi MA[2]

1- MSc Student, Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology

2- Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a.shahpiri@cc.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۸)

چکیده

مونوترپنوئیدها یک گروه متنوع از متابولیت‌های ثانویه هستند که بیش‌تر در بافت‌های گیاهی یافت می‌شوند. از این ترکیبات به‌طور گسترده‌ای در صنایع غذایی و آرایشی استفاده می‌شود. ساکارومایسس سرویزیه به‌طور طبیعی حاوی پیش ساز مورد نیاز سنتز ترپنوئیدها است و بنابراین می‌تواند به‌عنوان کارخانه سلولی برای تولید دگرساخت این ترکیبات به کار رود. در سال‌های اخیر تعداد زیادی از ژن‌های رمزگذار مونوترپن سنتازهای گیاهی (MTS) شناسایی شده‌اند. در این مطالعه برای تولید لینالول در مخمر ساکارومایسس سرویزیه، توالی ژن رمزگذار لینالول سنتاز از گیاه اسطوخودوس با استفاده از تکنیک ترمیم شکاف، در پلاسمید pESC-URA تحت کنترل پیش‌بر *GAL1* همسانه‌سازی شد. سویه مخمری حاصل YLIS نامیده شد. تولید لینالول در این سویه با استفاده از کروماتوگرافی گازی (GC) تایید شد. میزان سنتز لینالول در سویه YLIS با استفاده از منحنی لینالول استاندارد ۳۲ میکروگرم در لیتر تخمین زده شد.

واژه‌های کلیدی

اسطوخودوس
تکنیک ترمیم شکاف
لینالول
لینالول سنتاز
مخمر

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.5.5]

مقدمه

ترپنوئیدها یا ایزوپرنوئیدها دسته‌ای از متابولیت‌های ثانویه هستند که تا کنون بیش از ۵۵۰۰۰ ترکیب از آن‌ها شناسایی شده‌است (Wang et al. 2014). ترپنوئیدها از لحاظ عملکردی در بسیاری از بخش‌های متابولیسم سلولی مثل فتوسنتز، تنظیم هورمونی متابولیسم (استرول‌ها)، گلیکوزیله‌کردن پروتئین‌ها و نفوذپذیری غشا نقش دارند (Lee et al. 1997). این ترکیبات زنجیره‌ای از واحدهای تکراری ایزوپرن هستند که از ابتدا تا انتها به هم متصل می‌باشند. پیش ماده سنتز ترپنوئیدها ترکیبی به نام ایزوپنتنیل دی فسفات (IPP) است که توسط دومسیر جداگانه موالونات و MEP[1] تولید می‌شود (Maury et al. 2005; Zhao et al. 2013). به‌طور کلی مسیر موالونات در یوکاریوت‌ها، تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و قارچ‌ها، و مسیر MEP در پروکاریوت‌ها و کلروپلاست سلول‌های گیاهی یافت می‌شود (Katsuki and Bloch 1967; Bochar et al. 1999). در گیاهان هر دو مسیر موالونات و MEP وجود دارد به این ترتیب که ایزوپرنوئیدهایی مثل استرول‌ها و تری‌ترپن‌ها که در سیتوپلاسم ساخته می‌شوند، مسیر موالونات را طی می‌کنند درحالی‌که ایزوپرنوئیدهایی که در کلروپلاست ساخته می‌شوند مانند فیتول، کارتنوئیدها، پلاستوکوئینون و تعداد زیادی از ترپن‌های کوچک‌تر از مسیر MEP حاصل می‌شوند (Lichtenthaler et al. 1997).

این دسته از محصولات طبیعی به دلیل تنوع در ترکیب و ساختار از نظر اقتصادی و تجاری نیز مورد توجه می‌باشند. به‌عنوان مثال برای درمان بیمای‌های عفونی، تهیه داروهای مهمی مثل داروهای ضدمالاریا (آرتیمسینین)، ضدسرطان (تاکسول)، طعم‌دهنده‌ها (منتول، لیمونن)، مواد معطر (لینالول، کامفور)، رنگ دهنده‌های غذایی(کاروتنوئیدها)، سوخت (فارنسین، لیمونن) و هم‌چنین کنترل حشرات از آن‌ها استفاده می‌شود (Behrendorff et al. 2013; Zhang et al. 2011). با وجود پتانسیل بالا برای استفاده از ترپنوئیدها در صنایع مختلف، تاکنون تولید این ترکیبات در مقیاس صنعتی کمتر عملی شده‌است. این امر را می‌توان با ناکارآمدی روش‌های سنتز و استخراج آن‌ها در ارتباط دانست. تولید ترپنوئیدها در مقیاس انبوه عمدتاً بر اساس روش استخراج از میزبان‌های طبیعی و سنتز شیمیایی آن‌ها انجام می‌گیرد (Shiba et al. 2007). استخراج این ترکیبات از بافت‌های گیاهی از دیر باز مرسوم بوده است اما با مشکلاتی مثل تاثیر شرایط اقلیمی روی کمیت و کیفیت این ترکیبات، هزینه بالای استخراج و خالص‌سازی همراه است (Asadollahi et al. 2009; Gounaris 2010). سنتز شیمیایی ایزوپرنوئیدها نیز به‌دلیل پیچیدگی ساختارشان، دشواری و فراوانی فرآیندها، محصولات جانبی و بازده کم روش مناسبی برای تولید این ترکیبات در مقیاس انبوه نیست.

در سال‌های اخیر پیشرفت تکنیک‌های ژنومی و هم‌چنین شناسایی ژن‌های درگیر در مسیر سنتز ترپنوئیدها، تولید میکروبی ترپنوئیدها را به یک گزینه مناسب برای تولید صنعتی این ترکیبات تبدیل کرده است (Fischer et al. 2011; Herrero et al. 2008; Jongedijk et al. 2015; Liu et al. 2013; Amiri et al. 2016; Oswald et al. 2007; Rico et al. 2010; Yang et al. 2013; Zhou et al. 2014). با وجود شناسایی تعدادی از میکروارگانیسم-ها که به طور طبیعی قادر به تولید ترپنوئیدها هستند، به دلیل مشکل بودن دست‌ورزی‌های ژنتیکی این میکروارگانیسم‌ها، اغلب تولید دگرساخت[2] این ترکیبات در میکروارگانیسم‌های مدل ترجیح داده می‌شود. تا کنون در بیشتر مطالعاتی که به منظور تولید میکروبی ترپنوئیدها صورت گرفته است از باکتری اشریشیا کلی و مخمر ساکارومایسس سرویزیه استفاده شده‌است (Herrero et al. 2008; Fischer et al. 2011; Liu et al. 2013; Jongedijk et al. 2015; Amiri et al. 2016; Oswald). نخستین گام به‌منظور ساخت یک سویه میکروبی که توانایی تولید ترپنوئیدها را داشته باشد، مهندسی میکروارگانیسمی است که قابلیت تولید پیش‌ساز عمومی سنتز ترپنوئیدها (IPP) را دارا باشد. مخمر ساکارومایسس سرویزیه به صورت طبیعی حاوی پیش ماده ضروری برای تولید ترپنوئیدها (IPP) می‌باشد و از این رو مخمر پتانسیل سنتز بسیاری از ترپنوئیدها را دارد. در مخمر ساکارومایسس سرویزیه IPP طی مسیر موالونات تولید می‌شود. محصول انتهایی مسیر موالونات در مخمر ارگوسترول می‌باشد که در نفوذپذیری و تنظیم سیالیت غشا نقش دارد (Maury et al. 2005).

[1] 2-Methylerythritol 4-phosphate pathway

[2] Heterologous

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.5.5]

مونوترپن‌ها دسته‌ای از ایزوپرنوئیدها هستند که در اسکلت کربنی خود دارای دو واحد ایزوپرن می‌باشند و بسیاری از آن‌ها به‌عنوان جزء اصلی اسانس‌های گیاهی یافت می‌شوند. مونوترپنوئیدها در گیاهان در رابطه متقابل حشره و گیاه (Bochar et al. 1999) و هم‌چنین در فرآیند دفاع شیمیایی به‌عنوان هورمون نقش دارند (Lee et al. 1997). این ترکیبات در بافت‌های گیاهی توسط فعالیت کاتالیتیکی گروهی متنوع از آنزیم‌ها به نام مونوترپن سنتاز[1] از IPP حاصل می‌شوند (Barkovich et al. 2000). مخمر ساکارومایسس سرویزیه به دلیل دارا بودن مسیر موالونات به‌طور طبیعی حاوی پیش ماده مورد نیاز (IPP) برای سنتز مونوترپنوئید-ها است. با این حال به دلیل عدم حضور ژن‌های رمزگذار مونوترپن سنتازها قادر به تولید آن‌ها نبوده و برای تولید این ترکیبات در سلول‌های مخمر بایستی بیان دگرساخت مونوترپن سنتازها صورت بگیرد.

لینالول نیز یک مونوترپنوئید غیرحلقوی معطر است که در بسیاری از گیاهان گل‌دار و گونه‌های گیاهی توسط فعالیت یک کلاس از آنزیم‌های مونوترپن سنتتاز به نام لینالول سنتاز (LIS) از IPP حاصل می‌شود. لینالول به دلیل بوی معطر در ساخت ۸۰-۶۰ درصد از مواد بهداشتی و تمیز کننده مانند صابون‌ها و لوسیون‌ها استفاده می‌شود و علاوه بر کاربرد در صنایع آرایشی و بهداشتی در درمان بیماری‌هایی مثل لوسمی و سرطان سینه نیز به کار می-رود (Nakamura et al. 2009). با توجه به وجود پیش ساز سنتز لینالول (IPP) در مخمر ساکارومایسس سرویزیه، بیان دگرساخت آنزیم لینالول سنتاز تولید این ترکیب را در سلول‌های مخمر امکان‌پذیر می‌سازد. تحقیقات نشان داده است که لینالول یکی از ترکیبات اصلی در عصاره گیاه اسطوخودوس می‌باشد و این گیاه می‌تواند منبع مناسبی برای جداسازی ژن رمزگذار آنزیم لینالول سنتاز باشد. لذا در این تحقیق تولید دگرساخت لینالول با استفاده از انتقال ژن لینالول سنتاز گیاه اسطوخودوس به مخمر ساکارومایسس سرویزیه انجام شد.

[1] Monoterpene synthase

مواد و روش‌ها

ژن رمزگذار *LIS* از گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) (DQ263741.1) که قبلا در پلاسمید pGEX-4T-1 همسانه‌سازی شده بود (Landmann et al. 2007) با استفاده از تکنیک ترمیم شکاف در پلاسمید pESC-URA تحت کنترل پیش‌بر *GAL1* همسانه‌سازی شد. بدین منظور ابتدا ژن رمزگذار *LIS*، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و آغازگر اختصاصی رفت با توالی 5′- tacctctatactttaacgtcaaggagaaaaaacccATGTCGATCAATAT-3′ و آغازگر اختصاصی برگشت با توالی 5′- tccttccttttcggttagagcggatcttagctagTCATGCGTACGGCTCGAA-3′ (بازوهای دارای توالی مشابه با پلاسمید pESC-URA با حروف کوچک مشخص شده‌است) و هم‌چنین آنزیم *pfu* DNA polymerase در یک مخلوط واکنش شامل پلاسمید الگو (pGEX-4T-1-LIS)، داکسی نوکلئوتیدها، بافر واکنش و بر اساس برنامه واسرشت‌کردن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، واسرشت‌کردن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه و در نهایت گسترش نهایی برای ۱۰ دقیقه تکثیر شد. مراحل سه گانه واکنش پلیمراز در ۳۰ چرخه انجام شد. با هدف ایجاد جایگاه‌های مناسب برای قرارگیری قطعه ژنی در ناقل، پلاسمید pESC-URA با آنزیم‌های *Xho*I و *Bam*HI برش داده شد و خالص‌سازی محصول واکنش از روی ژل آگارز یک درصد انجام شد. در مرحله بعد سلول‌های مستعد از مخمر سویه CEN.PK 113-5D به روش لیتیم استات تولید شد (Gietz et al. 1995). در نهایت پلاسمید pESC-URA خطی شده و قطعه DNA به دست آمده از واکنش پلیمراز با نسبت مولی سه به یک قطعه به پلاسمید به روش شیمیایی، هم‌زمان به سلول‌های مستعد مخمر سویه CEN.PK 113-5D ترانسفورم شدند. این سویه مخمر فاقد ژن لازم برای سنتز یوراسیل می باشد و بنابراین بر روی محیط فاقد یوراسیل نمی تواند رشد کند. با توجه به اینکه پلاسمید pESC-URA دارای ژن سنتز اسید آمینه یوراسیل به‌عنوان نشانگر انتخابی می‌باشد، در صورتی که کلنی مخمر قادر به رشد بر روی محیط

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.5.5]

کشت فاقد یوراسیل رشد باشد، آن کلنی نوترکیب و دارای پلاسمید است. بر این اساس، کلنی‌های ترانسفورم شده پس از دو روز گرماگذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انتخاب شدند. سویه حاصل که دارای پلاسمید نوترکیب pESC-URA-LIS می‌باشد، YLIS نامیده شد. شایان ذکر است با هدف مقایسه و بررسی سنتز لینالول در سویه YLIS، سویه کنترل با انتقال پلاسمید pESC-URA به سلول‌های مستعد مخمر سویه CEN.PK 113-5D نیز تولید شد. به منظور تایید صحت توالی pESC-URA-LIS نیاز به استخراج پلاسمید از مخمر بود. با توجه به این‌که امکان استخراج پلاسمید به‌طور مستقیم از مخمر وجود ندارد، کل DNAی ژنومی از سویه YLIS استخراج و با استفاده از ترانسفورماسیون به سلول‌های مستعد باکتری DH5α انتقال داده شد. با توجه به وجود ژن مقاومت به آمپی‌سیلین در این پلاسمید، کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط حاوی آمپی‌سیلین حامل این پلاسمید بودند. استخراج پلاسمید از این کلنی‌ها صورت گرفت و برای توالی‌یابی به شرکت Bioneer ارسال شد.

لینالول یک ترکیب برون سلولی است که پس از تولید در محیط کشت سلول‌های مخمر تجمع می‌یابد. لذا برای اندازه‌گیری میزان سنتز لینالول، سویه‌های YLIS و کنترل در ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت حداقلی[1] (Verduyn et al. 1992) حاوی ۲۰ گرم در لیتر از گالاکتوز به‌عنوان منبع کربن کشت داده شدند. سپس سلول‌های دو سویه مذکور در مرحله رشد تصاعدی (۱۲ تا ۱٤ ساعت پس از شروع کشت) با استفاده از سانتریفیوژ رسوب داده شدند و محیط کشت آن‌ها از ستون SPE (ساخت شرکت Macherey-Nagel) عبور داده شد. در نهایت برای شناسایی و اندازه‌گیری غلظت لینالول تولیدی از روش کروماتوگرافی گازی (GC) و نیز کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) استفاده شد. دستگاه GC استفاده شده در این تحقیق، یک دستگاه مدل HP6890 ساخت شرکت اجیلنت[2] و مجهز به آشکارساز FID بود. از ستون DB5 ساخت شرکت اجیلنت استفاده شد. از گاز هلیوم با شدت جریان ۱/۵ میلی‌لیتر در دقیقه به عنوان گاز حامل و از یک تزریق کننده انشعابی/بدون انشعاب[3] در حالت بدون انشعاب آن استفاده شد. دمای تزریق کننده و آشکارساز به ترتیب بر روی ۲۵۰°C و ۲۸۰°C تنظیم شد. دمای اولیه آون بر روی ۵۰°C تنظیم شد. پس از یک دقیقه دمای آون با شیب ۱۰°C بر دقیقه به ۷۵°C رسید و در پی آن با شیب ۳°C بر دقیقه به ۹۰°C افزایش پیدا کرد. دمای آون در نهایت با شدت ۳°C در دقیقه به ۲۵۰°C رسید و در این دما به مدت پنج دقیقه نگه داشته شد. محاسبه غلظت لینالول تولیدی در هر سویه بعد از هر تزریق و با استفاده از منحنی استاندارد لینالول انجام پذیرفت. دستگاه GC-MS مورد استفاده نیز یک دستگاه اجیلنت مدل HP6890 مجهز به آشکارساز طیف‌سنج جرمی مدل (Asadollahi et al. 2009) 5973 بود.

[1] Minimal medium
[2] Agilent
[3] Split/splitless

نتایج

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و پلاسمید الگو (pGEX-4T-1-LIS)، منجر به تکثیر ژن رمزگذار *LIS* به طول ۱٦۹۵ جفت‌باز شد. برش پلاسمید pESC-URA با آنزیم‌های *Xho*I و *Bam*HI نیز موجب خطی شدن آن شد (شکل ۱). پس از خالص‌سازی ژن رمزگذار *LIS* و پلاسمید خطی شده pESC-URA، این دو به صورت هم‌زمان به سلول‌های مستعد مخمر سویه CEN.PK 113-5D انتقال داده شدند. با توجه به اینکه در آغازگرها بازوهایی دارای توالی مشابه با توالی دو منطقه از پلاسمید قرار داده شده بود، توالی دو سر محصول دارای مشابهت با توالی دو منطقه از پلاسمید خطی برش داده شده بود (شکل ۲). در نتیجه پس از انتقال هم‌زمان محصول PCR با پلاسمید خطی شده به مخمر، در سلول‌های مخمر پدیده نوترکیبی همساخت[4]، باعث قرار گیری و همسانه‌سازی ژن *LIS* در پلاسمید pESC-URA می‌شود (شکل۳).

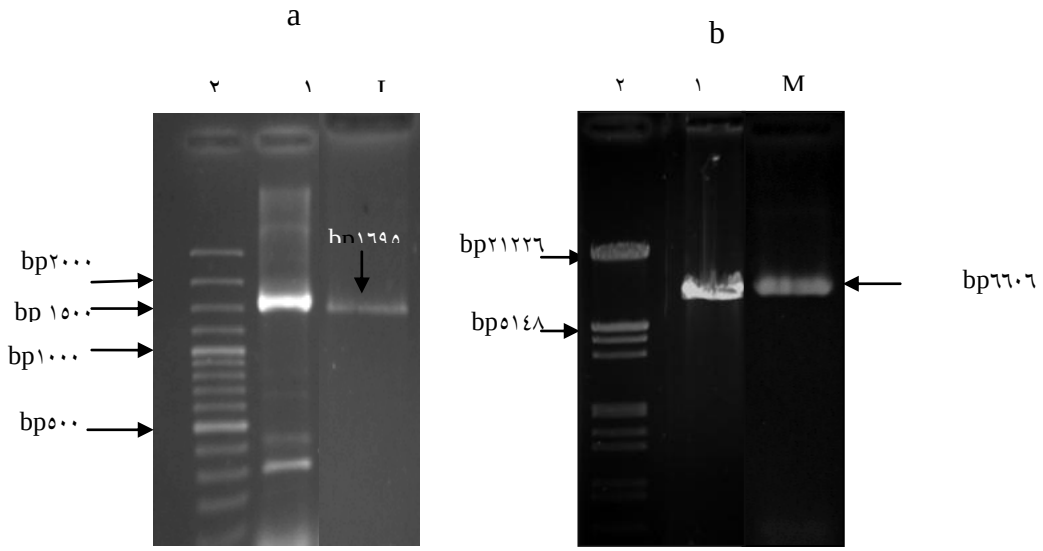
با توجه به اینکه پلاسمید pESC-URA دارای ژن سنتز اسید آمینه یوراسیل به‌عنوان نشانگر انتخابی می‌باشد، رشد کلنی‌های مخمر رشد کرده بر روی محیط کشت فاقد یوراسیل نشان دهنده کلنی‌های حاوی این پلاسمید بود. برای تایید همسانه‌سازی ژن لینالول سنتاز در پلاسمید بیانی pESC-URA، DNA ژنومی تعدادی از کلنی‌های مخمر نوترکیب استخراج و به سلول‌های باکتری DH5α انتقال داده شد. پس از استخراج پلاسمید pESC-

[4] Homologous Recombination

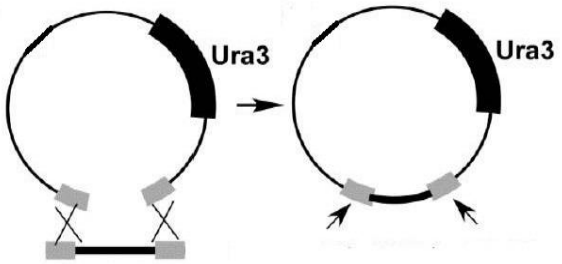
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.5.5]

URA از کلنی‌های باکتری DH5α، واکنش هضم آنزیمی پلاسمید pESC-URA با آنزیم *Xho*I انجام گرفت. با توجه به حضور جایگاه برشی *Xho*I در توالی ژن رمزگذار *LIS*، ظاهر شدن قطعه‌ای به طول ٤٢٠ جفت‌باز موفقیت همسانه‌سازی ژن رمزگذار *LIS* در ناقل pESC-URA را تایید نمود (شکل٤). هم‌چنین از طریق توالی‌یابی، صحت توالی نوکلئوتیدی قطعه ژنی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی که بر اساس ابتدا و انتهای ژن *LIS* طراحی شده بودند، تایید شد.

تایید فعالیت ژن *LIS* و اندازه‌گیری غلظت لینالول تولید شده با استفاده از دستگاه GC و GC -MC انجام گرفت. محیط کشت دو سویه YLIS و کنترل ١٢-١٤ ساعت پس از شروع کشت، زمانی- که سلول‌ها دارای جذب نوری ٢/٥-٢/٢ در طول موج ٦٠٠ نانومتر بودند و پس از تغلیظ توسط ستون‌های SPE در دستگاه GC تزریق شد. مقایسه پیک‌های موجود در نمودار GC سویه YLIS با پیک‌های موجود در نمودار GC سویه کنترل و لینالول استاندارد، تولید لینالول را در سویه YLIS به خوبی نشان می‌داد. در حالی که در منحنی GC سویه کنترل (سویه فاقد ژن *LIS*) پیکی در زمان اقامت مشابه با منحنی GC لینالول استاندارد مشاهده نشد، در سویه YLIS یک پیک در زمان اقامت مشابه با منحنی GC لینالول استاندارد خارج شد و سنتز لینالول را در این سویه تایید نمود (شکل ٥). هم‌چنین با تزریق غلظت‌های متفاوت از لینالول استاندارد در دستگاه GC و بررسی منحنی GC آن‌ها، میزان تولید لینالول در سویه YLIS معادل ٣٢ میکروگرم در لیتر تخمین زده شد.

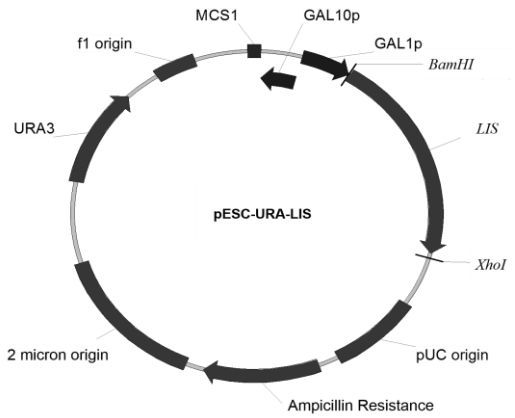


شکل١- روند آماده‌سازی ژن LIS و پلاسمید pESC-URA بر روی ژل آگارز. a) ستون١: الکتروفورز محصول PCR ژن *LIS*، ستون٢: خالص‌سازی محصول PCR ژن *LIS*؛ b) ستون١: پلاسمید pESC-URA خطی شده با دو آنزیم *Bam*HI و *Xho*I، ستون٢: محصول خالص‌سازی پلاسمید pESC-URA خطی شده از روی ژل، M – نشانگر مولکولیIII (فرمنتاس)، DNA Ladder: L (١٠٠-٣٠٠٠ bp)

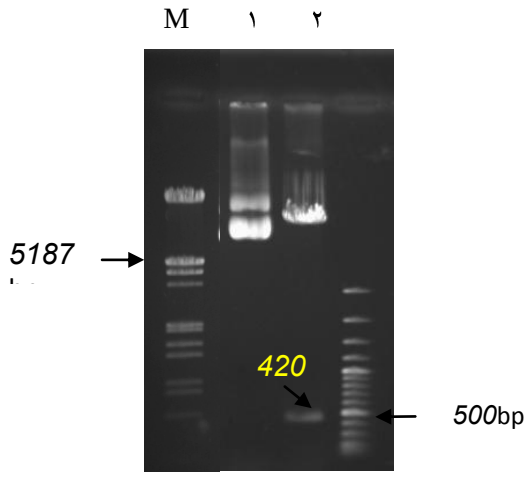


شکل٢- تکنیک ترمیم شکاف در مخمر ساکارومایسس سرویزیه

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.5.5]



شکل ۳- نقشه پلاسمید نوترکیب pESC-URA-LIS



شکل٤- واکنش هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pESC-URA-LIS، M - نشانگر مولکولی(فرمنتاز)، چاهک۱) پلاسمید pESC-URA-LIS هضم نشده، ۲) پلاسمید pESC-URA-LIS برش داده شده با آنزیم *Xho*I، L:DNA Ladder(۱۰۰-۳۰۰۰ bp)

بحث

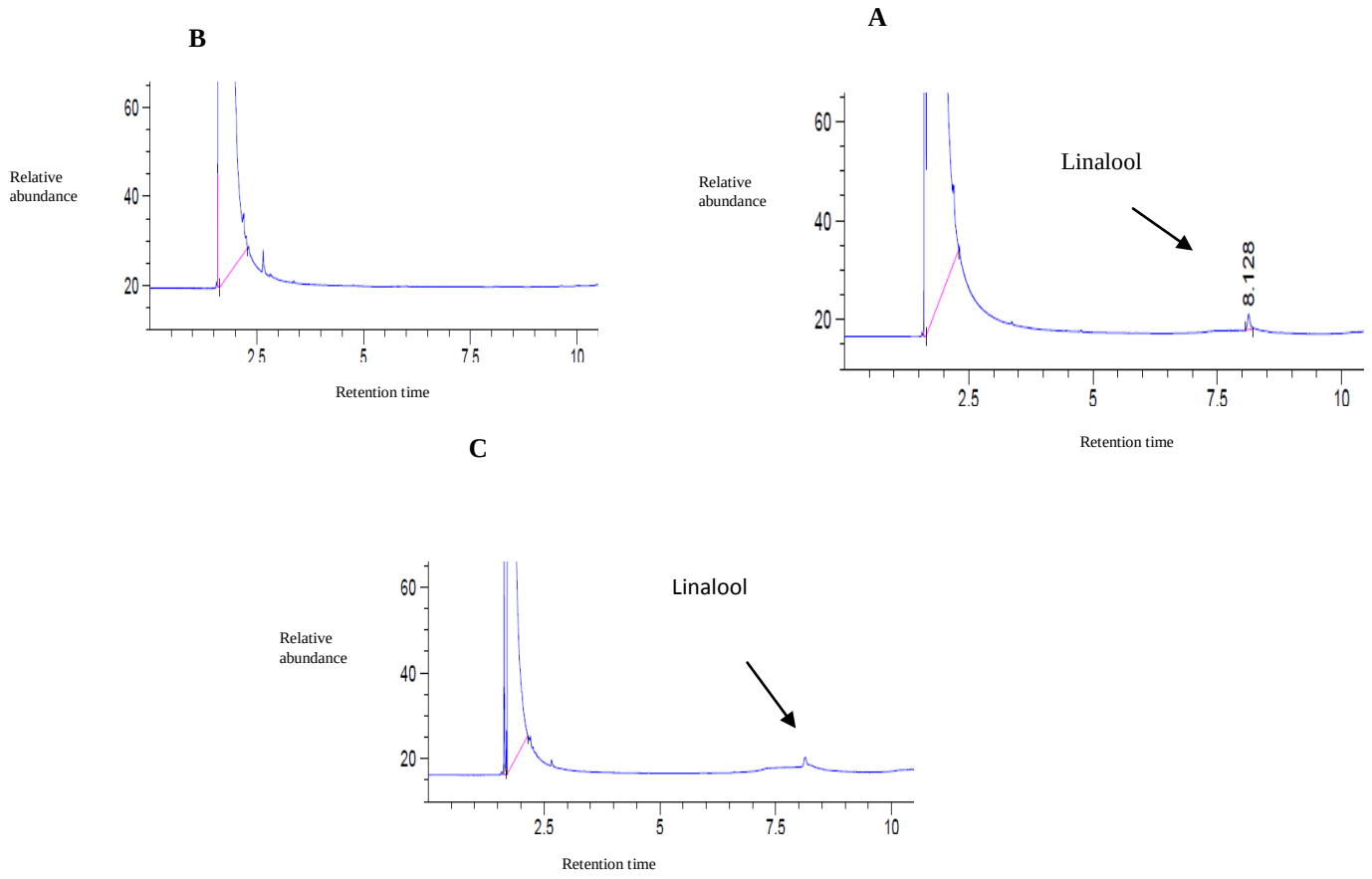
در سال‌های اخیر تولید دگرساخت ترپنوئیدها با استفاده از میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان یک گزینه جدید و اقتصادی سازگار با محیط زیست توجه زیادی را به خود جلب کرده و تحقیقات زیادی در این زمینه صورت گرفته است (Yang et al. 2013; Zhou et al. 2014). در بیش‌تر تحقیقات انجام شده، از باکتری اشریشیا کلی و یا مخمر ساکارومایسس سرویزیه به‌عنوان میزبان برای تولید دگرساخت ترپنوئیدها استفاده شده‌است. وجود مسیر موالونات در مخمر ساکارومایسس سرویزیه باعث شده تا این میکروارگانیسم یوکاریوتی به‌طور طبیعی حاوی پیش‌ماده مورد نیاز برای سنتز ترپنوئیدها باشد اما این میکروارگانیسم فاقد آنزیم‌های لازم برای تبدیل این پیش‌سازها به ترکیبات ترپنوئیدی است. بافت‌های گیاهی منبع مناسبی برای جداسازی ژن‌های رمزگذار ترپن سنتازها می‌باشند. ژن رمزگذار آنزیم لینالول سنتاز نیز در بسیاری از گونه‌های گیاهی از جمله کلارکیا بروری[1] (Dudareva et al. 1996)، آرابیدوپسیس تالیانا (Chen et al. 2003) و برنج (Yuan et al. 2008) شناسایی و جداسازی شده‌است. در این پژوهش همسانه‌سازی ژن *LIS* گیاه اسطوخودوس با استفاده از تکنیک ترمیم شکاف و با استفاده از قابلیت بالای مخمر ساکارومایسس سرویزیه در نوترکیب‌سازی همساخت، تحت کنترل پیش‌بر قوی GAL1 انجام شد. سپس تولید لینالول در سلول‌های مخمر نوترکیب دارای پلاسمید pESC-URA-LIS، با استفاده از کروماتوگرافی گازی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنالیز کروماتوگرافی گازی فعالیت ژن *LIS* و تولید لینالول را در سویه YLIS تایید نمود. با استفاده از چند منحنی GC لینالول استاندارد با غلظت‌های متفاوت، میزان سنتز این ترکیب ۳۲ میکروگرم در لیتر تخمین زده شد.

همانند پژوهش حاضر گزارش‌های دیگری نیز وجود دارد که نشان می‌دهد با بیان دگرساخت آنزیم‌های مونوترپن سنتاز سنتز مونوترپنوئیدها در مخمر ساکارومایسس سرویزیه میسر می‌شود. از آن جمله می‌توان به بیان دگرساخت آنزیم جرانیول سنتاز در مخمر ساکارومایسس اشاره کرد که سنتز جرانیول را در سلول‌های مخمر امکان‌پذیر ساخت (Liu et al. 2013). در پژوهشی دیگر نیز همسانه سازی آنزیم لیمونن سنتاز از گیاه نعناع ارغوانی[2] در مخمر ساکارومایسس سرویزیه موجب تجمع ۲۸ میکروگرم در لیتر لیمونن در محیط کشت سلول‌های مخمر شد (Jongedijk et al. 2015).

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق اگرچه نشان‌دهنده توانایی مخمر در تولید لینالول می‌باشد ولی مقدار لینالول تولید شده همچنان پایین است.

[1] *Clarkia breweri*
[2] *Perilla frutescens*

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.5.5]



شکل۵- کروماتوگرام GC حاصل از آنالیز محیط کشت سویه استاندارد (A)، سویه کنترل (B)، سویه YLIS (C)

در توجیه این مساله می‌توان گفت به طور کلی اگرچه بیان دگرساخت آنزیم‌ها در سلول‌های میزبان باعث رهایی از سیستم-های تنظیمی و بازخوری طبیعی می‌شود اما در مقابل ممکن است با مسیرهای متابولیکی تحت کنترل و تنظیم شدید خود میزبان روبه روشوند. تنظیم شدید مسیرهای متابولیکی موجود در سلول-های میزبان، رقابت مسیرهای خارجی را با آن‌ها دشوار می‌سازد و بدین صورت سنتز این ترکیبات را در سلول‌های میزبان تحت تأثیر قرار می‌دهد. عامل دیگر برای عدم فعالیت کارآمد آنزیم‌های خارجی، فقدان سازوکارهای طبیعی مدیریت این ژن‌ها در میزبان می‌باشد. به بیان دیگر عدم وقوع تغییراتی مثل تغییرات پس از ترجمه و عدم تغییر در مکان قرارگیری آن‌ها در سلول باعث می-شود آنزیم‌ها قادر به انجام حداکثر فعالیت خود نباشند و بنابراین مقدار سنتز محصول کمتر از حد مورد انتظار شود. نتایج تحقیقات انجام شده در زمینه تولید دگرساخت ترپنوئیدها و اندازه‌گیری میزان سنتز این ترکیبات در میزبان‌هایی مثل باکتری اشریشیا کلی و مخمر ساکارومایسس سرویزیه گفته های بالا را تأئید می‌کند. به‌عنوان مثال بیان دگر ساخت آنزیم کادنین سنتاز و اپی آریستولوکن سنتاز در باکتری اشریشیا کلی به‌ترتیب منجر به تولید ۱۰/۳ و ۰/۲٤ میکروگرم در لیتر از این دو ترکیب شد (Martin et al. 2001). هم‌چنین بیان ژن‌های رمزگذار کیوببول سنتاز (Asadollahi et al. 2010) و والنسین سنتاز (Asadollahi et al. 2008) در مخمر ساکارومایسس سرویزیه به‌ترتیب منجر به تولید ۹/۹ و سه میلی‌گرم در لیتر از کیوببول و والنسین شد.

بررسی‌های انجام گرفته روی آنزیم لینالول سنتاز نشان می‌دهد که این آنزیم به‌طور کلی دارای فعالیت ضعیفی در سلول‌های مخمر است و همین امر باعث شده که میزان سنتز آن در سلول‌های مخمر بسیار پایین گزارش شود (Oswald et al. 2007). فعالیت ضعیف آنزیم لینالول سنتاز را می‌توان به ایجاد ساختارهای

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.5.5]

تجمعی[1] از این پروتئین در سیتوپلاسم نسبت داد (Oswald et al. 2007). وجود این ساختارهای تجمعی حلالیت پروتئین را در سلول تحت تأثیر قرار داده، منجر به رسوب این پروتئین در سلول می‌شود و از این طریق باعث از دست دادن و یا کاهش فعالیت این پروتئین در سلول خواهد شد. مقایسه میزان تولید لینالول و جرانیول در یک سویه وحشی مخمر، این امر را به خوبی نشان می‌دهد. بیان دگرساخت ژن جرانیول سنتاز جداسازی شده از گیاه ریحان[2] منجربه سنتز ۵۰۰ µg/L جرانیول در سلول‌های مخمر شد در حالی‌که میزان سنتز لینالول در اثر بیان ژن لینالول سنتاز جداسازی شده از گیاه کلارکیا بروری در همان سویه تنها ۴۳ µg/L برآورد شد (Oswald et al. 2007).

علاوه بر دلایل ژنتیکی و درون سلولی، ماهیت فرار لینالول نیز موجب از دست رفتن بخش زیادی از لینالول از محیط کشت در حین تخمیر می‌شود. بنابراین استفاده از روش‌هایی مانند بیوراکتورهای دوفازی تفکیک‌شده[3] که مانع از تبخیر لینالول در حین تخمیر و جداسازی درجای آن می‌شوند، می‌تواند تا حدودی این مشکل را مرتفع کند.

سمیت ترکیبات مونوترپنوئیدی مانند لینالول نیز از دیگر عواملی است که مانع از افزایش تولید لینالول و دیگر ترکیبات مونوترپنوئیدی در سلول‌های میکروبی می‌شود. غلظت پایین تولید دگرساخت ترکیبات مونوترپنوئیدی در مقایسه با سایر ترکیبات ترپنوئیدی مانند سسکوئی‌ترپن‌ها موید این ادعا است. تلاش‌های انجام شده بر روی مهندسی سویه‌های مخمری برای تولید دگرساخت ترکیبات ترپنوئیدی تاکنون منجر به تولید تجاری داروی ضدمالاریای آرتمیسینیک اسید و پیش‌ساز آن آمورفادین (از دسته ترکیبات سسکوئی‌ترپنی) شده‌است (Westfall et al. 2012)، در حالی که تجاری‌شدن تولید دگرساخت ترکیبات مونوترپنوئیدی هنوز دور از دسترس به نظر می‌رسد و تجاری‌سازی این فرایند تا حد زیادی به حل این مشکل وابسته است (Brennan et al. 2012). مونوترپن‌ها ترکیبات لیپوفیلیک بوده و اثر سمیت آن‌ها به تداخل این ترکیبات با ویژگی‌های غشایی ارتباط داده می‌شود (Andrews et al. 1980; Uribe et al. 1985). به‌عنوان مثال، بتا پینن مانع از تنفس و انتقال ضروری یونی (K+ و H+) در سلول‌های مخمری می‌شود، در حالی‌که از دست رفتن کامل کنترل تنفسی، ممانعت از سنتز ATP و افزایش سیالیت غشا در میتوکندری‌های مخمری جداسازی شده مشاهده شده‌است (Uribe et al. 1985). این مشاهدات حاکی از تداخل بتا پینن با یکپارچگی غشای میتوکندریایی و تولید ATP است، در حالی که رهایش ترکیبات سیتوپلاسمی در حضور آلفا پینن نشان دهنده این است که مونوترپنوئیدها می‌توانند باعث آسیب شدید به غشای پلاسما شوند (Andrews et al. 1980). همچنین قابلیت حیات سلول[4] و تولید اتانول توسط مخمر ساکارمایسس سرویزیه با استفاده از ضایعات پوست مرکبات هضم شده در حضور ۰/۰۲-۰/۱٪ از روغن پوست پرتقال[5] که حاوی ۹۵ تا ۹۷ درصد لیمونن است، به طرز چشمگیری کاهش می‌یابد (Pourbafrani et al. 2007; Wilkins et al. 2007). اگرچه اثرات بازدارندگی رشد ترکیبات مونوترپنوئیدی به خوبی شناخته شده‌است، هنوز سازوکارهای این بازدارندگی شناخته شده نیست و لازم است در این خصوص تحقیقات بیشتری انجام شود.

مطالعات انجام گرفته روی آنزیم‌های مونوترپن سنتاز گیاهی نشان می‌دهد که به‌طور کلی این آنزیم‌ها دارای فعالیت ضعیفی در میزبان‌های میکروبی مثل مخمر هستند. بهینه‌سازی رمزه[6] به ویژه در موتیف‌های مهم و حفاظتی رمزگذار نواحی حیاتی برای فعالیت آنزیم نظیر جایگاه فعال می‌تواند باعث بهبود عملکرد ترپن سنتازهای گیاهی در مخمر شود. چنانچه در پژوهشی استفاده از یک ژن با رمزه بهینه شده در مخمر ساکارومایسس سرویزیه سبب افزایش ۲۰۰ درصدی در تولید بتاکاروتن شد (Miura et al. 1998).

هم‌چنین به‌کارگیری راهبردهای مهندسی متابولیک از جمله افزایش تولید آنزیم‌های کلیدی در مسیر موالونات و افزایش تولید عوامل رونویسی به طور موثری قادر است سبب بالا رفتن میزان سنتز این ترکیبات در مخمر شود. از آن جمله در پژوهشی بیش‌بیان ژن رمزگذار آنزیم کلیدی HMG-CoA ردوکتاز با افزایش سنتز پیش‌ساز ترپنوئیدها (IPP) سبب دوبرابر شدن میزان

[1] Aggregated
[2] *Ocimum bacilicum*
[3] Two-phase partitioning bioreactors
[4] Cell viability
[5] Orange peel oil
[6] Codon optimization

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.5.5]

تولید لینالول در مخمر شد (Rico et al. 2010). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر، با بیش‌بیان ژن رمزگذار آنزیم کلیدی HMG-CoA ردوکتاز نتایج مشابهی به دست آمد بدین صورت که میزان سنتز تاکسادین در مخمر به دنبال بیش بیان ژن *HMG1* به میزان قابل توجهی افزایش یافت (Engels et al. 2008). کاهش بیان ژن *ERG9* (Asadollahi et al. 2008; Asadollahi et al. 2010)، حذف ژن *GDH1* و بیش‌بیان ژن *GDH2* (Asadollahi et al. 2009) و مهندسی مسیر کنارگذر[1] پیروات دهیدروژناز (Shiba et al., 2007) از جمله دست‌ورزی‌های ژنتیکی هستند که منجر به افزایش تولید ترپنوئیدهای مختلف در مخمر ساکارومایسس سرویزیه شده‌اند.

[1] Bypass

منابع

Amiri P, Shahpiri A, Asadollahi MA, Momenbeik F, Partow S. 2016. Metabolic engineering of *Saccharomycescerevisiae* for linalool production. Biotechnology Letters. 38:503-508.

Andrews RE, Parks LW, Spence KD, 1980. Some effects of douglas-fir terpenes on certain microorganisms. Applied and Environmental Microbiology. 40:301-304.

Asadollahi MA, Maury J, Møller K, Nielsen KF, Schalk M, Clark A, Nielsen J, 2008. Production of plant sesquiterpenes in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of *ERG9* repression on sesquiterpene biosynthesis. Biotechnology and Bioengineering. 99:666-677.

Asadollahi MA, Maury J, Patil KR, Schalk M, Clark A, Nielsen J, 2009. Enhancing sesquiterpene production in *Saccharomyces cerevisiae* through *in silico* driven metabolic engineering. Metabolic Engineering. 11:328-334.

Asadollahi MA, Maury J, Schalk M, Clark A, Nielsen J, 2010. Enhancement of farnesyl diphosphate pool as direct precursor of sesquiterpenes through metabolic engineering of the mevalonate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering. 106:86-96.

Barkovich R, Liao JC, 2000. Metabolic engineering of isoprenoids. Metabolic Engineering. 3:27-39.

Behrendorff JBYH, Vickers CE, Chrysanthopoulos P, Nielsen LK, 2013. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl as ascreening tool for recombinant monoterpene biosynthesis. Microbial Cell Factories. 12:76.

Bochar DA, Stauffacher CV, Rodwell VW, 1999. Sequence comparisons reveal two classes of 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase. Molecular Genetics and Metabolism. 66:122-127.

Brennan TCR, Turner CD, Kromer JO, Nielsen LK, 2012. Alleviating monoterpene toxicity using a two-phase extractive fermentation for the bioproduction of jet fuel mixtures in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering. 109:2513-2522.

Chen X, Yauk YK, Nieuwenhuizen NJ, Matich AJ, Wang MY, Perez RL, Atkinson RG, Beuning LL, 2010. Characterisation of an (*S*)-linalool synthase from kiwifruit (*Actinidia arguta*) that catalyses the first committed step in the production of floral lilac compounds. Functional Plant Biology. 37:232-243.

Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P, 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. Gene 110:119-122

Engels B, Dahm P, Jennewein S, 2008. Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production. Metabolic Engineering. 10:201-206.

Fischer MJC, Meyer S, Claudel P, Bergdoll M, Karst F, 2011. Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast. Biotechnology and Bioengineering. 108: 1883-1892.

Gietz RD, Schiesti RH, Willems AR, Woods RA, 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. Yeast 11:355-360.

Gounaris Y, 2010. Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates. A review. Flavour and Fragrance Journal. 25:367-386.

Greay SJ, Hammer KA, 2015. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. Phytochemistry Reviews. 14:1-6.

Herrero Ó, Ramón D, Orejas M, 2008. Engineering the *Saccharomyces cerevisiae* isoprenoid pathway for *de novo* production of aromatic monoterpenes in wine. Metabolic Engineering. 10:78-86.

Jackson BE, Hart-Wells EA, Matsuda SP, 2003. Metabolic engineering to produce sesquiterpenes in yeast. *Organic Letters.* 5:1629-32.

Jongedijk E, Cankar K, Ranzijn J, van der Krol S, Bouwmeester H, Beekwilder J, 2015. Capturing of the monoterpene olefin limonene produced in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 32:159-171.

Katsuki H, Bloch K, 1967. Studies on the biosynthesis of ergosterol in yeast. Formation of methylated intermediates. The Journal of Biological Chemistry. 242:222-227.

Landman C, Fink B, Festner M, Dregus M, Engeland KH, Schwab W, 2007. Cloning and characterization of three terpene synthase from lavender (*Lavendula angostifolia*). Archives of Biochemistry and Biophysics .465:417-429.

Lee S, Tsao R, Peterson C, Coasts JR, 1997. Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm, two spotted spider mite, and house fly. Journal of Economic Entomology. 90:883-892.

Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A, Rohmer M, 1997. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. FEBS Letters. 400:271-274.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.5.5]

Lindahi A, Alsson ME, Mercke P, Tollbum O, Schelin J, Brodelius M, Brodelius PE, 2006. Production of artemisinin precursor amorpha-4-11-diene by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters. 28:571-580.

Liu J, Zhang W, Du G, Chen J, Zhou J, 2013. Overproduction of geraniol by enhanced precursor supply in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biotechnol. 168:446-451.

Martin VJJ, Yoshikuni Y, Keasling JD, 2001. The *in vivo* synthesis of plant sesquiterpenes by *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering. 75:497-503.

Maury J, Asadollahi MA, Møller K, Clark A, Nielsen J. 2005. Microbial isoprenoid production: An example of green chemistry through metabolic engineering. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 100:19-51.

McCaskill D, Croteau R, 1997. Prospects for the bioengineering of isoprenoid biosynthesis. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 55:107-146.

Miura Y, Kondo K, Shimada H, Satio T, Nakamura K, Misawa N, 1998. Production of the carotenoid lycopene ßcaroten and Astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. Applied and Environmental Microbiology. 64;1226-1229.

Nakamura A, Fujiwara S, Matsumoto I, Abe K, 2009. Stress repression in restrained rats by (R)-(-)-linalool inhalation and gene expression profiling of their whole blood cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57:5480-5485.

Oswald M, Fischer M, Dirninger N, Karst F, 2007. Monoterpenoid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research. 7:413-421.

Pourbafrani M, Talebnia F, Niklasson C, Taherzadeh M, 2007. Protective effect of encapsulation in fermentation of limonene-contained media and orange peel hydrolyzate. International Journal of Molecular Sciences. 8:777-787.

Rico J, Pardo E, Orejas M, 2010. Enhanced production of a plant monoterpene by overexpression of the 3hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase catalytic domain in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 76: 6449-6454.

Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, Fisher KJ, Newman KL, Ndungu JM, Ho KA, Eachus RA, Ham TS, Kirby J, Chang MCY, Withers ST, Shiba Y, Sarpong R, Keasling JD, 2006. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. Nature 440: 940-943.

Shiba Y, Paradise EM, Kirby J, Ro DK, Keasling JD, 2007. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae* for high-level production of isoprenoids. Metabolic Engineering. 9:160-168.

Uribe S, Ramirez J, Pena A, 1985. Effects of ß-pinene on yeast membrane functions. J. Bacteriol. 161:1195-1200.

Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, van Dijken JP 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. Yeast 8:501-517.

Wang JF, Meng HL, Xiong ZQ, Zhang SL, Wang Y, 2014. Identification of novel knockout and up-regulated targets for improving isoprenoid production in *E. coli*. Biotechnology Letters. 36: 1021-1027.

Westfall PJ, Pitera DJ, Lenihan JR, Eng D, Woolard FX, Regentin R, Horning T, Tsuruta H, Melis DJ, Owens A, Fickes S, Diola D, Benjamin KR, Keasling JD, Leavell MD, McPhee DJ, Renninger NS, Newman JD, Paddon CJ, 2012. Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinic acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin.Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 109:E111-E118.

Wilkins M, Suryawati L, Maness N, Chrz D, 2007. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* in the presence of orange-peel oil. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23:1161-1168.

Yang J, Nie Q, Ren M, Feng H, Jiang X, Zheng Y, Liu M, Zhang H, Xian M, 2013. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the biosynthesis of alpha-pinene. Biotechnology for Biofuels. 6:60

hang F, Rodriguez S, Keasling JD, 2011. Metabolic engineering of microbial pathways for advanced biofuels production. Current Opinion in Biotechnology. 22:775-783.

Zhao L, Chang WC, Xiao Y, Liu HW, Liu P, 2013. Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. Annual Review of Biochemistry. 82:497-530.

Zhou J, Wang C, Yoon SH, Jang HJ, Choi ES, Kim SW, 2014. Engineering *Escherichia coli* for selective geraniol production with minimized endogenous dehydrogenation. Journal of Biotechnology. 169: 42-50.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-29]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.1.5.5]