Nova Biologica Reperta 7(2): 133-144 (2020)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.7.2.133

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۷، شماره ۲، صفحات ۱۳۳ الی ۱۴۴ (۱۳۹۹)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

بهینه‌سازی بیان مسیر بیوسنتز فلاونوئید نارینجنین با استفاده از کشت سلولی یارُویا لیپولیتیکا

منیره مارصفری[۱]، حبیب‌اله سمیع‌زاده لاهیجی[۱]، بابک ربیعی[۱]، علی‌اشرف مهرابی[۲]، یونگکون لوی[۳] و پنگ شو[۴]

[۱]دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران؛ [۲]دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران؛ [۳]دانشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه جیانگ‌نان، جیانگ‌سو، چین؛ [۴]دانشکده مهندسی شیمی، بیوشیمی و محیط‌زیست، دانشگاه مریلند، 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. نارینجنین نه‌تنها به‌عنوان هسته مرکزی تولید فلاونوئیدهای مختلف از اهمیت زیادی برخوردار است، بلکه در گیاهان و نیز درمان بیماری-های مختلف انسان نقش ویژه‌ای برعهده دارد. به‌همین منظور و برای تولید بهینه این ترکیب فلاونوئیدی ارزشمند، ژن‌های مهم و اصلی مسیر بیوسنتز نارینجنین از منابع مختلف گیاهی شناسایی شدند و پس از مقایسه الگوی بیان و به منظور تولید نارینجنین در میزبان موردنظر معرفی شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که *chs* ژن کلیدی و مهم در تولید نارنجنین به‌شمار می‌رود و به‌همین 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 نارینجنین 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 فراورده 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، کروماتوگرافی‌مایع با کارایی بالا، میزبان مخمر، مهندسی متابولیت

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

Monireh Marsafari[1], Habibollah Samizadeh Lahiji[1], Babak Rabiei[1], AliAshraf Mehrabi[2], Yongkun Lv[3] & Peng Xu[4]

[1]Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran; 2 Faculty of Agriculture, University of Ilam, Ilam, Iran; [3]Faculty of Biotechnology, Jiangnan University, Jiangsu, China; [4]Department 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

Received 08.08.2019/ Revised 11.12.2019/ Accepted 18.12.2019/ Published 01.07.2020
دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۱۷/ اصلاح: ۱۳۹۸/۰۹/۲۰/ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۲۷/ انتشار: ۱۳۹۹/۰۴/۱۱

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.2.11.5]
[DOI: 10.52547/nbr.7.2.133]

مقدمه

فلاونوئیدها یکی از مهم‌ترین زیرگروه‌های ترکیبات پلی‌فنلی با وزن مولکولی پایین هستند (Mahomoodally et al., 2005; Pandy, 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). نارینجنین متعلق به زیرشاخه فلاوانون 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-۴-هیدروکسیلاز (*c4h*) و یا به‌طور مستقیم از طریق آمین‌زدایی تیروزین توسط آنزیم تیروزین آمونیالیاز (*tal*) ایجاد می‌شود و سپس به ۴-کوماریول-کوآ با عملکرد آنزیمی ۴-کوماریت-کوآ لیگاز(*4cl*) تبدیل می‌شود. متعاقباً چالکان سینتاز (*chs*) سه مرحله پی‌درپی متراکم‌سازی واحدهای استات از مالونیل-کوآ (استر کو-آ) را برای دستیابی به چالکان نارینجنین انجام می‌دهد (Stafford et al., 1974; Winkel, 2004). استیل-کوآنزیم‌آ پیش‌ساز مالونیل-کوآنزیم‌آ و به عنوان اولین نقطه کنترل جریان بیوسنتز نارینجنین 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 سوبسترای مورد نیاز برای تولید بهینه فلاونوئیدها ایفا می‌کند (Fowler et al., 2009). سپس چالکان ایزومراز (*chi*) چالکان نارینجنین را به نارینجنین که پیش‌نیاز رایج برای فلاونوئیدهای پایین‌دست به‌شمار می‌رود، تبدیل می‌کند (Winkel-Shirley, 2001). نارینجنین 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).

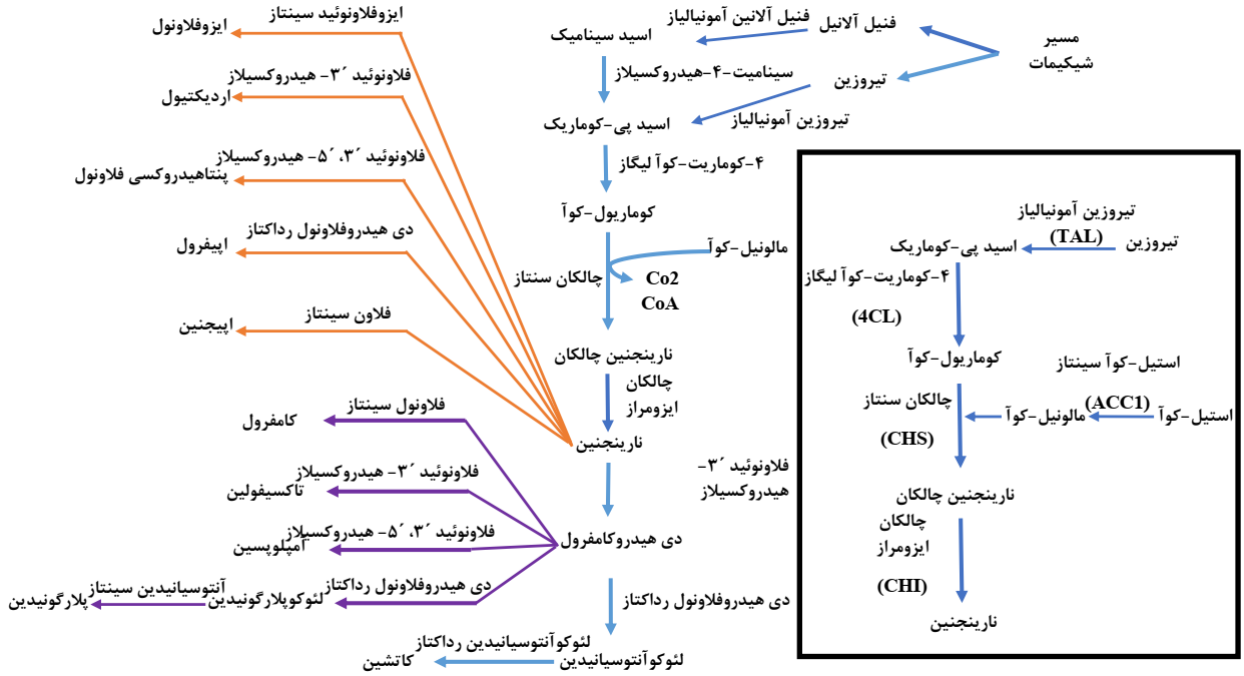
تولید نارینجنین و به طورکلی فلاونوئیدها با استفاده از مواد گیاهی از نظر اقتصادی به صرفه نیست زیرا علاوه بر اینکه استخراج آن‌ها از بافت‌های گیاهی مستلزم استفاده از ترکیبات شیمیایی مضر است، تنها از بافت‌ها و گیاهان منحصر به فرد با قابلیت کشت در اقلیم خاص و گاهاً با دوره کشت طولانی قابل استخراج هستند. تولید شیمیایی فلاونوئیدها نیز به دلیل استفاده از حلال‌های شیمیایی سمی و وجود چالش تغییرات شیمیایی ضروری مانند گلیکولیزه‌شدن 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 سوبسترا 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 آمفی‌فیلیک مناسب برای عملکرد کاتالیکی بسیاری از آنزیم‌های گیاهی، برخورداری از غشاهای ساختاری و محفظه‌های سلولی جهت فراهم کردن محیط هیدروفوبیک مناسب و نیز انتخاب استروئیدهای موردنیاز برای هیدروکسیل‌کردن،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 سختار 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).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.2.11.5]
[DOI: 10.52547/nbr.7.2.133]



شکل ۱- مسیر عمومی بیوسنتز فلاونوئیدها. این مسیر با متابولیسم فنیل‌پروپانوئید در پلاستید آغاز می‌شود و با بکارگیری یک‌سری از آنزیم‌های متفاوت از شبکه اندوپلاسمی و سیتوسول بیوسنتز فرآورده‌های نهایی مانند نارینجنین، تاکسیفولین، کامفرول، اردیکتیول و اپیجنین را انجام می‌دهد. کادر مشکی ژن‌ها 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.

در این پژوهش به منظور شناسایی کارامدترین ژن‌های درگیر در بهینه‌سازی بیوسنتز هترولوگ فلاونوئید نارینجنین و ایجاد یک جریان متعادل متابولیسمی ژن‌های *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 کارامد، با بهره‌گیری از قند گلوکز به عنوان منبع قند، عدم تولید فراورده‌های 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 نارینجنین تولید نماید.

مواد و روش‌ها

ژن، پلاسمید و سویه‌های مورد استفاده

به دلیل تفاوت میزان بیان ژن‌های مختلف در میزبان‌های متفاوت و به منظور شناسایی قدرتمندترین منابع ژنی، ژن‌های مهم و اصلی تولید نارینجنین یعنی *tal*، *4cl*، *chs*، *chi* و *acc1* به صورت ساختار مونوسیسترونیک و با استفاده از روش Yali Bricks در میزبان *Y. lipolytica* همسانه‌سازی شدند (Wong et al., 2017). ژن‌های 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 (*Medicago sativa*; *Mschi*)، و پتونیا (*Petunia x hybrid*; *Phchi*) انتخاب شدند و برای شناسایی بهترین سازه حاوی قدرتمندترین ژن‌های 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 نارینجنین موجب شد تا فرض شود ژن *tal* نیز با فراهم‌کردن مقدار مناسب تیروزین در دسترس برای سویه مخمر مورد بررسی نقش قابل توجهی در تولید نارینجنین خواهد داشت. برای این‌منظور و بر اساس نتایج حاصل از پژوهش‌های قبلی تاثیر ژن *tal* با منبع ژنی *Rhodotorula*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.2.11.5]
[DOI: 10.52547/nbr.7.2.133]

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 نارینجنین خارج سلولی مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور تأمین میزان کافی مالونیل‌کوآنزیم‌آ و شناسایی بهترین منابع ژنی برای افزایش تولید نارینجنین، 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 گرم‌منفی *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 موردنظر بیان شد و کارایی آن مورد بررسی قرار گرفت. تمام ژن‌های 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. ژن‌های مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۱ ارایه شده‌اند. پلاسمید مورد استفاده در این تحقیق، pYLXP' بود که قبلاً مطابق با استانداردهای YaliBrick طراحی و نگهداری‌شده 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 نارینجنین استفاده شد.

طراحی مسیر بیوسنتزی

برای ساخت پلاسمیدهای حاوی هر یک از ژن‌های مورد بررسی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای هر ژن و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت طراحی شده، انجام شد و فراورده هر واکنش با استفاده از کیت جداسازی DNA clean& concentrator-5 kit,) DNA (Zymoresearch, USA جداسازی و تخلیص شد. پلاسمید pYLXP` با استفاده از آنزیم‌های برشی *SnaBI* و *KpnI* برش-داده شد. تمام آنزیم‌های برشی مورد استفاده در این تحقیق از شرکتThermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA تهیه شدند. قطعات برش‌داده شده توسط الکتروفورز ژل آگارز از یکدیگر جدا شده و سپس قطعه موردنظر 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 ژن‌های موردنظر، فراورده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و قطعه خالص شده پلاسمید با استفاده از واکنش گیبسون به یکدیگر متصل شدند. سپس تراریختی 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 لوریابرتانی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمپی‌سیلین به عنوان مارکر انتخابی کشت شدند. از هر واکنش تراریختی دست-کم ۳ کلنی در محیط مایع لوریابرتانی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم برلیتر آمپی‌سیلین رشد داده شد و پس از ۲۴ ساعت پلاسمید موردنظر خالص‌سازی شده و برای توالی‌یابی به شرکت Genwiz (نیوجرسی، آمریکا) منتقل شدند. پس از تایید توالی ژن‌های مورد بررسی، با استفاده از روش ساب‌کلونینگ و YaliBrick که در ادامه به آن پرداخته شد، ژن *tal* و ژن‌های *chs*، *chi* و *4cl* از منابع ژنی مختلف و هر یک با حفظ پروموتر، اینترون و ترمیناتور مستقل (ساختار مونوسیسترونیک) در پلاسمید گیرنده وارد شدند.

در پلاسمیدهای pYaliBrick که pYLXP' نیز عضوی از آن‌ها به‌شمار می‌رود، چهار جایگاه آنزیم‌های برشی ایزوکدومر با انتهای سازگار (*AvrII*، *NheI*، *XbaI* و *SpeI*) به‌طور استراتژیک بین عناصر تنظیمی ژن به نحوی قرار گرفته‌اند که به طور بی‌نهایت می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند و عملکرد ژنتیکی آسان را هنگام سرهم‌کردن قطعات DNA به صورت ساختارهای مونوسیسترونیک، خوشه‌ژنی و یا خوشه‌های ژنی کاذب فراهم کنند باشد (Wong et al., 2017). در این پژوهش عموما پلاسمیدهای دهنده ژن موردنظر با آنزیم‌های برشی *AvrII*/*SalI* برش داده شدند درحالی‌که پلاسمید دریافت‌کننده قطعات موردنظر با آنزیم‌های *NheI*/*SalI* هضم شدند. سپس قطعات مورد نظر با استفاده از روش T4 لیگاز و با آرایش ژنی مونوسیسترونیک در پلاسمید دریافت‌کننده جمع‌آوری شدند. به عنوان مثال برای تهیه قدرتمندترین سازه ژنی و جمع‌آوری سه ژن *Phchs*، *Mschi* و*Pc4cl2* در یک پلاسمید و به عنوان الگوی ساب-کلونینگ برای سایر سازه‌ها، ابتدا قطعه ژن *Mschi* که از برش پلاسمید pYLXP'-*Mschi* با آنزیم‌های برشی ایزوکدومر *AvrII*/*SalI* به دست آمده بود در جایگاه آنزیم‌های برشی *NheI*/*SalI* پلاسمید دریافت‌کننده pYLXP'-*Phchs* وارد شد. پس از تایید نتایج ساب‌کلونینگ و یافتن پلاسمید مثبت pYLXP'-*Phchs-Mschi*، این پلاسمید نیز در محل آنزیم‌های برشی *NheI*/*SalI* به عنوان دریافت‌کننده برای قطعه ژنی *Pc4cl2* حاصل از هضم پلاسمید تولید پلاسمید pYLXP'-*Phchs-Mschi-Pc4cl* با نام اختصاری pPc4PhSMsI برش داده شد. برای بررسی نقش تیروزین بر میزان تولید نارینجنین نیزژن *Rttal* به دست‌آمده از هضم پلاسمید pYLXP'-*Rttal* با آنزیم‌های برشی *AvrII*/*SalI* به روش ذکر شده در مکان برشی آنزیم‌های *NheI*/*SalI* پلاسمید pPc4PhSMsI و برای تولید پلاسمید pYT4SI وارد شد. پلاسمیدهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۲ ذکر شده‌اند.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.2.11.5]
[DOI: 10.52547/nbr.7.2.133]

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
RtTAL	*Rhodotorula toruloides*	NCBI[1]: AAA33883	(Anson et al., 1987)
Pc4cl	*Petroselinum crispum* (parsley)	UniProtKB[2] P14912	(Wu et al., 2013)
Sl4cl	*Solanum lycopersicum*	NCBI: NP_001333770	(Alberstein et al., 2012)
PhCHS	*Petunia x hybrid*	NCBI: AAF60297	(Wu et al., 2013)
HvCHS2	*Hordeum vulgare*	NCBI: Q96562	(Christensen et al., 1998)
MsCHI	*Medicago sativa*	NCBI: P28012	(Wu et al., 2013)
PhCHI	*Petunia x hybrid*	NCBI: P11650	(van Tunen et al., 1988)
YlACC1	*Yarrowia lipolytica* Po1f	GRYC: YALI0C11407g1_1	
CgACC1	*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032	NCBI: NP_599932 and AUI00288	(Zhu et al., 2014)
EcACC1	*Escherichia coli* DH 5α	NCBI: NC_000913.3 [۳]	(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) هستند. ۳- این ژن به صورت خوشه‌ژنی accABCDکد می‌شود و از ژن‌های accA، accB، accC و accD تشکیل شده است. شماره‌های اختصاصی هر جز در پایگاه داده‌های NCBI به ترتیب بدین صورت است: NC_000913.3:208621-209580، NC_000913.3:3405436-3405906، NC_000913.3:3405917-3407266، NC_000913.3:c2433926-2433012

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.

در مرحله بعد به منظور تعادل جریان متابولیسم، یافتن بهترین ترکیب ژنی و شناسایی ژن بهبوددهنده میزان تولید نارینجنین تعداد نسخه‌های ژن‌های *Rttal*، *Phchs*، *Mschi* و *Pc4cl* به دو نسخه در هر پلاسمید و به‌صورت جداگانه برای هر ژن در مکان برشی *NheI*/*SalI* پلاسمید pYT4SI و به‌ترتیب برای تولید پلاسمیدهای pYT4SIT، pYT4SI4، pYT4SIS وpYT4SII افزایش یافت (جدول ۲). سپس برای بررسی اثرمتقابل 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 لیتیوم استات با اندکی تغییر استفاده شد (Gietz & Schiestl, 2007). در این روش ابتدا مخمر *Y. lipolytica* Po1g بر روی پلیت YPD (**Y**east Extract-**P**eptone-**D**extrose) 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 لیتیوم استات ۲ مولار و ۹۰ میکرولیتر از محلول استریل ۵۰ درصد پلی‌اتیلن گلایکول ۴۰۰۰ بود. پس از فراهم کردن مخلوط واکنش حدود ۲۰۰ میکرولیتر از *Y. lipolytica* Po1g که از قبل رشد داده شد با مخلوط واکنش مخلوط شده و دست کم به مدت ۱۵ ثانیه و توسط ورتکس کاملا 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 آب‌گرم 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 (**C**omplete **S**ynthetic **M**edia minus **L**eucine; 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 نارینجنین با استفاده از دستگاه HPLC

نمونه‌برداری هر ۲۴ ساعت از فلاسک‌ها انجام شد. ۵۰۰ میلی-لیتر 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

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.2.11.5]
[DOI: 10.52547/nbr.7.2.133]

ورتکس با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و چرخش ۲۵۰ RPM نگهداری شدند. مقدار نارینجنین تولید شده با استفاده از دستگاه HPLC 1220 و به روش (Lv et al., 2019a) اندازه‌گیری شد. به منظور جداسازی نارینجنین 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، ۰/۱۲ و ۰/۱۵. از نارینجنین خالص با درصد خلوص بیش از ۹۵ درصد و زمان خروج ۹/۹۰۱ دقیقه به عنوان استاندارد و برای تعیین کمیت و کیفیت نارینجنین 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 نارینجنین از سایر ترکیبات ممکن موجود در مخلوط واکنش استفاده شد. هر دو استاندارد نارینجنین 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 نارینجنین

شکل ۲ کروموگراف HPLC نمایش منحنی نارینجنین 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 نارینجنین 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 نارینجنین اختلاف معنی‌دار با سایر ترکیبات ژنی داشته و به‌عنوان بهترین ترکیب ژنی به شمار می‌رود.

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

با توجه به نتایج حاصل از تعیین بهترین سازه ژنی در بخش قبل و نیز نقش تیروزین بر میزان تولید نارینجنین، به منظور بررسی نقش تعداد نسخه‌های ژن‌های مورد بررسی بر بهینه‌سازی تولید نارینجنین، تعداد نسخه‌های هر یک از ژن‌های مورد بررسی به صورت گام به‌گام و به تعداد دو نسخه در هر پلاسمید افزایش یافت. شکل ۴ میزان تغییر تولید نارینجنین 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 نارینجنین، 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 نارینجنین 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 نارینجنین حاصل از این تیمار کمتر بود که ممکن است نشان‌دهنده تاثیر منفی افزایش بیش‌ازحد تیروزین بر تولید نارینجنین باشد. نتایج این بررسی نشان داد که افزایش بیان ژن *Phchs* می‌تواند به عنوان یک عامل کلیدی در افزایش تولید نارینجنین به‌شمار رود.

در مرحله بعد به منظور بهبود تولید نارینجنین 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 نارینجنین 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 زمانی‌که چهارنسخه از این ژن در هر پلاسمید بیان شده بود، تفاوت معنی‌دار نشان نداد (شکل ۵). با این‌وجود به دلیل تولید مقدار بیشتر نارینجنین توسط سویه حاوی پنج نسخه از ژن *Phchs*، در تحقیقات بعدی از این سویه به عنوان میزبان استفاده شد.

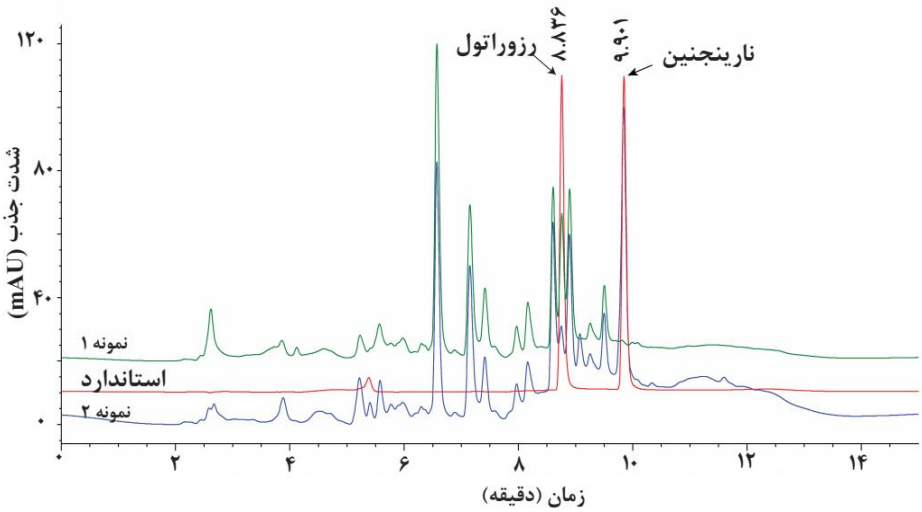
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.2.11.5]
[DOI: 10.52547/nbr.7.2.133]

جدول ۲- فهرست پلاسمیدهای مورد استفاده در این پژوهش.

Table 2. List of plasmids used in this study.

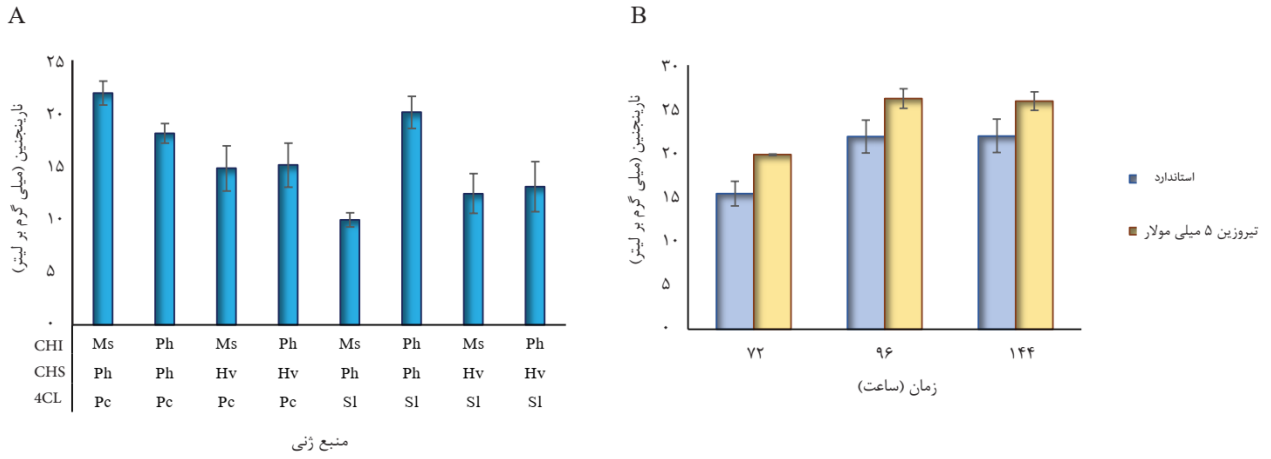
علامت اختصاری	نام کامل هر پلاسمید	توضیحات
pYLXP`		پلاسمید مورد استفاده برای تمام مراحل همسانه سازی
pRtT	pYLXP`-*Rttal*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن *Rttal*
pPc4	pYLXP`-*Pc4cl*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن *Pc4cl*
pSL4	pYLXP`-*Sl4cl*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن *Sl4cl*
pPhS	pYLXP`-*Phchs*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن *Phchs*
pHvS2	pYLXP`-*Hvchs2*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن *Hvchs2*
pMsI	pYLXP`-*Mschi*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن *Mschi*
pPhI	pYLXP`-*Phchi*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن *Phchi*
pYlA1	pYLXP`-*Ylacc1*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن *Ylacc1*
pCgA1	pYLXP`-*Cgacc1*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن *Cgacc1*
pEcA1A	pYLXP`-*Ecacc1A*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن *Ecacc1A*
pEcA1B	pYLXP`-*Ecacc1B*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن *Ecacc1B*
pEcA1C	pYLXP`-*Ecacc1C*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن *Ecacc1C*
pEcA1D	pYLXP`-*Ecacc1D*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن *Ecacc1D*
pEcA1ABCD	pYLXP`-*Ecacc1ABCD*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن کامل *Ecacc1ABCD*
pPc4PhSMsI	pYLXP`-*Pc4cl-Phchs-Mschi*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن‌های *Pc4cl*، *Phchs* و *Mschi*
pPc4PhSPhI	pYLXP`-*Pc4cl-Phchs-Phchi*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن‌های *Pc4cl*، *Phchs* و *Phchi*
pPc4HvSMsI	pYLXP`-*Pc4cl-Hvchs-Mschi*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن‌های *Pc4cl*، *Hvchs* و *Mschi*
pPc4HvSPhI	pYLXP`-*Pc4cl-Hvchs-Phchi*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن‌های *Pc4cl*، *Hvchs* و *Phchi*
pSl4PhSMsI	pYLXP`-*Sl4cl-Phchs-Mschi*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن‌های *Sl4cl*، *Phchs* و *Mschi*
pSl4PhSPhI	pYLXP`-*Sl4cl-Phchs-Phchi*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن‌های *Sl4cl*، *Phchs* و *Phchi*
pSl4HvSMsI	pYLXP`-*Sl4cl-Hvchs-Mschi*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن‌های *Sl4cl*، *Hvchs* و *Mschi*
pSl4HvSPhI	pYLXP`-*Sl4cl-Hvchs-Phchi*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن‌های *Sl4cl*، *Hvchs* و *Phchi*
pYT4SI	pYLXP`-*Rttal-Pc4cl-Phchs-Mschi*	پلاسمید pYLXP دربردارنده ژن‌های *Rttal*، *Pc4cl*، *Phchs* و *Mschi*
pYT4SIT	pYLXP`-*Rttal-Pc4cl-Phchs-Mschi-Rttal*	پلاسمید pYT4SI در بردارنده دونسخه از ژن *Rttal*
pYT4SI4	pYLXP`-*Rttal-Pc4cl-Phchs-Mschi-Pc4cl*	پلاسمید pYT4SI در بردارنده دونسخه از ژن *Pc4cl*
pYT4SIS	pYLXP`-*Rttal-Pc4cl-Phchs-Mschi-Phchs*	پلاسمید pYT4SI در بردارنده دونسخه از ژن *Phchs*
pYT4SII	pYLXP`-*Rttal-Pc4cl-Phchs-Mschi*-Mschi	پلاسمید pYT4SI در بردارنده دونسخه از ژن *Mschi*
pYT4SI4S	pYLXP`-*Rttal-Pc4cl-Phchs-Mschi-Pc4cl-Phchs*	پلاسمید pYT4SI در بردارنده دونسخه از هر ژن *Phchs* و *Pc4cl*
pYT4S$_{x2}$I	pYLXP`-*Rttal-Pc4cl-Phchs$_{x2}$-Mschi*	پلاسمید pYT4SI در بردارنده دو نسخه از ژن *Phchs*
pYT4S$_{x3}$I	pYLXP`-*Rttal-Pc4cl-Phchs$_{x3}$-Mschi*	پلاسمید pYT4SI در بردارنده سه نسخه از ژن *Phchs*
pYT4S$_{x4}$I	pYLXP`-*Rttal-Pc4cl-Phchs$_{x4}$-MschI*	پلاسمید pYT4SI در بردارنده چهار نسخه از ژن *Phchs*
pYT4S$_{x5}$I	pYLXP`-*Rttal-Pc4cl-Phchs$_{x5}$-Mschi*	پلاسمید pYT4SI در بردارنده پنج نسخه از ژن *Phchs*
pYT4S$_{x5}$I-*Cgacc1*	pYLXP`-*Rttal-Pc4cl-Phchs$_{x5}$-Mschi-Cgacc1*	پلاسمید pYT4S$_{x5}$I در بردارنده ژن *Cgacc1*
pYT4S$_{x5}$I-*Ecacc1ABCD*	pYLXP`-*Rttal-Pc4cl-Phchs$_{x5}$-Mschi-Ecacc1ABCD*	پلاسمید pYT4S$_{x5}$I در بردارنده ژن *Ecacc1ABCD*
pYT4S$_{x5}$I-*Ylacc1*	pYLXP`-*Rttal-Pc4cl-Phchs$_{x5}$-Mschi-Ylacc1*	پلاسمید pYT4S$_{x5}$I در بردارنده ژن *Ylacc1*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.2.11.5]
[DOI: 10.52547/nbr.7.2.133]



شکل ۲- کروموگراف تعیین نارینجنین در نمونه استاندارد و دو نمونه مورد آزمایش. نارینجنین 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 نارینجنین و به ترتیب سویه‌های pYT4S$_{x5}$I-*ylacc1*#2 و pYT4S$_{x5}$I-*ylacc1*#5 به عنوان نمونه‌های 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 نارینجنین در میزبان *Y. lipolytica*. **A**. تاثیر منبع ژنی بر قدرت بیان سه ژن بیوسنتزی پایه به منظور بهینه‌سازی تولید نارینجنین. **B**. تاثیر تیروزین خارج سلولی بر میزان تولید نارینجنین.

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-کوآنزیمآ و مالونیل‌کوآنزیمآ بر میزان تولید نارینجنین

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های HPLC برای بررسی تاثیر منبع مالونیل‌کوآنزیمآ و افزودن دو ژن *Ylacc1*، *Cgacc1* و خوشه ژنی *Ec_accABCD* به پلاسمید حاوی بهترین سازه ژنی حاصل از مراحل قبل یعنی پلاسمید pYT4S$_{x5}$I با استفاده از روش YaliBrick و مقایسه تیمارهای مختلف از طریق مقایسه میانگین و هم‌پوشانی خطاهای استاندارد در شکل ۶ نشان داد که بین تمام تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد و ژن‌های مورد بررسی می‌توانند سبب افزایش قابل توجه تولید نارینجنین شوند. ژن *Ylacc1* از قدرت بسیار بیشتری نسبت به دو منبع ژنی دیگر برخوردار بوده است و سویه مخمر تراریخت با پلاسمید

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.2.11.5]
[DOI: 10.52547/nbr.7.2.133]

pYT4Sx5I-*Ylacc1* می‌تواند میزان تولید نارینجنین را به ۹۰/۱۶ میلی‌گرم بر لیتر افزایش دهد (شکل ۶). ژن *Cgacc1* نیز از نظر میزان قدرت و کارایی بیان در میزبان مورد بررسی با تولید ۷۶/۳۶ میلی‌گرم بر لیتر نارینجنین در رتبه دوم قرار داشت.

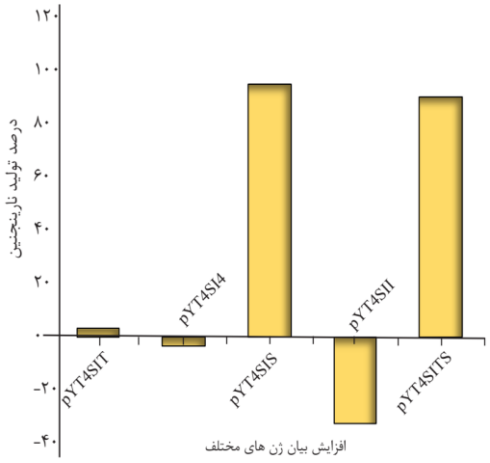
بحث و نتیجه‌گیری

به دلیل نگرانی‌هایی که درمورد 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). نارینجنین 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 ارگانیسم‌های مختلف و در سویه‌های مختلف باکتریایی، این موجودات زیستی را قادر به تولید مقادیر قابل‌توجهی نارینجنین کرده است. مخمر *Y. lipolytica* از اجزای لیپیدی 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 Polg *Y. lipolytica* برای تولید نارینجنین 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 میزبان‌های *E. coli* یا *S. cerevisiae* استفاده نمودند.

بهره‌گیری از گیاه آرابیدوپسیس تالینا، بیان مقایسه‌ای ژن‌های درگیر در بیوسنتز نارینجنین و معرفی آن‌ها به میزبان 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 نارینجنین شد (Koopman et al., 2012). در پژوهش دیگری به‌منظور بهینه‌سازی تولید نارینجنین از کشت مخلوط باکتری *E.coli* و مخمر *S. cerevisiae* و منبع قند زایلوز استفاده شد. برای این منظور مسیر طولانی بیوسنتز نارینجنین به دو بخش تفکیک شد و هر بخش به یکی از میزبان‌های مورد استفاده وارد شد. نوع محیط کشت، اندازه ماده تلقیح و نسبت ماده تلقیح هر یک از میزبان‌های 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 نارینجنین دارد و زمانی‌که اندازه ماده تلقیح مخمر ۵ برابر و قند زایلوز ۴۰ گرم بر لیتر در نظر گرفته شد، مقدار تولید نارینجنین به ۲۱/۱۶ میلی‌گرم بر لیتر رسید که نسبت به 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 سویه دارای مسیر بیوسنتزی بالادست به پایین دست و نیز القای IPTG در زمان ۶ ساعت پس از آغاز کشت میزان تولید نارینجنین را در کشت مخلوط *E.coli*-*E.coli* به میزان ۴۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر رساند (Ganesan et al., 2017).

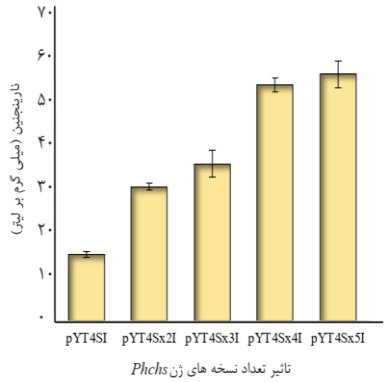
تعادل مسیر بیوسنتزی، یعنی هماهنگی میزان تجمع و مصرف ترکیبات حدواسط نقش بسیار مهمی را در بهینه‌سازی تولید فراورده موردنظر ایفا می‌کند. این هماهنگی می‌تواند از طریق افزایش تعداد نسخه‌های هر ژن در هر پلاسمید انجام شود (Jones et al., 2015). زمانی که مسیر بیوسنتزی پایه (حاوی ژن‌های *4cl*، *chi* و *chs* بهینه‌سازی شد، تولید نارینجنین به ۲۱/۹۵ میلی‌گرم بر لیتر رسید که نشان‌دهنده تفاوت در قدرت بیان ژن‌ها در میزبان بود (شکل ۳ A). همچنین نشان داده شد که ژن *tal* سبب افزایش میزان سوبسترای کافی برای سلول‌های درحال رشد و افزایش میزان تولید نارینجنین می‌شود. در مرحله بعد نقش افزایش تعداد نسخه-های هر ژن در هر سلول بررسی شد و مشخص شد که افزایش بیان ژن *chs* تا پنج نسخه به‌میزان قابل توجهی تولید نارینجنین 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 پروژه-های مهندسی سطح بالایی از بیان ژن‌ها مورد نیاز است (Lian et al., 2018). برای اولین بار و با تاریخی هر سلول میزبان *E. coli* با ۱۰۰ نسخه از پلاسمید حاوی مسیر بالادست تولید نارینجنین یعنی از ژن تولیدکننده تیروزین تا نارینجنین و بهینه‌سازی شرایط رشد، میزان ۱۰۰/۶۴ میلی‌گرم بر لیتر تولید نارینجنین گزارش شد (Wu et al., 2014). در انتها در این پژوهش نقش سوبستراهای کلیدی و مهم استیل-کوآنزیمآ و مالونیل‌کوآنزیمآ بر افزایش بیان نارینجنین تایید شد و سبب بهینه‌سازی تولید این ترکیب ارزشمند به بیش از ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر شد (شکل ۶). در پژوهشی با استفاده از سویه Po1f مخمر *Y. lipolytica* محققان توانستند موانع محدودکننده تولید نارینجنین را از طریق ساخت مدولار تمام مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها و مشتقات هیدروکسیله آن‌ها شامل ژن‌های *tal*، *4cl*، *chs*، *chi*، *f3′h*، *f3h*، سیتوکروم *p450* ردااکتاز، *aro1* و *acc1* شناسایی کنند. در این بررسی آن‌ها نشان دادند که افزایش تعداد نسخه‌های *chs* و *CPR* به‌ترتیب به پنج و دو نسخه در هر پلاسمید و از طریق تلفیق پلاسمید به ژنوم میزبان، بهبود سنتز سوبستراهای مالونیل و استیل‌کوآنزیمآ، افزایش میزان گلوکز در ابتدای

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.2.11.5]
[DOI: 10.52547/nbr.7.2.133]



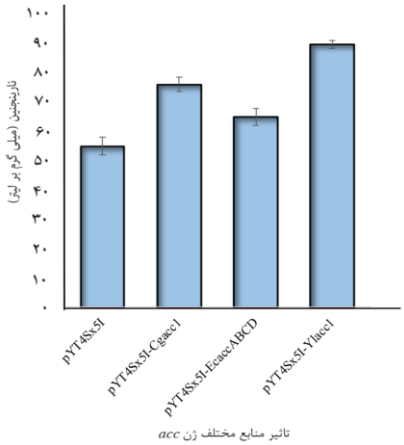
شکل ۴- تاثیر تعداد نسخه‌های هر ژن بر میزان تولید نارینجنین.

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



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

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



شکل ۶- تاثیر بیان ژن *acc*1 از منابع ژنی مختلف بر افزایش تولید نارینجنین.

Fig. 6. The effect of *acc*1 gene expression on the improvement of naringenin titer.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.2.11.5]
[DOI: 10.52547/nbr.7.2.133]

فرمنتیشن و افزودن بازدارنده سرلانین به محیط‌کشت می‌تواند سبب بهبود تولید نارینجنین، 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 سرمایه‌گزاری‌های 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. به‌همین‌منظور از پرسنل محترم این مؤسسه‌ها جهت همکاری‌های بی‌دریغ و حمایت مالی قدردانی می‌شود.

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 *Rhodosporidium 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.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.2.11.5]
[DOI: 10.52547/nbr.7.2.133]

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 histerophorus: 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. & Ververidis, 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 (2*S*)-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., Bareia, 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. cerevisi*ae. 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., Rabiei1, 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 نارینجنین با استفاده از کشت سلولی یارُویا لیپولیتیکا. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۷: ۱۴۴-۱۳۳.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1399.7.2.11.5]
[DOI: 10.52547/nbr.7.2.133]