چالش‌ها و راه‌های پیش رو برای استفاده از سوخت‌های زیستی و اثرات زیست محیطی آن‌ها

فاطمه بیضاوی [۱]، عبدالکریم زارعی [۲] و کیارش جمشیدی گوهرریزی [۳]*

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، کرمان، ایران

۲- استادیار گروه تولید و ژنتیک گیاهی (بیوتکنولوژی)، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم، ایران *zarei14@gmail.com*

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یزد، گروه اصلاح نباتات، یزد، ایران

**نویسنده مسئول: عبدالکریم زارعی*

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۷ *تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۷*

Challenges ahead of the use of biofuels and their environmental impacts

Fatemeh Beyzavi[1], Abdolkarim Zarei[2*] and Kiarash Jamshidi Goharrizi[3]

1- Master candidate of biotechnology, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman-Iran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Plant Production and Genetic (Biotechnology), College of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran. zarei14@gmail.com

3- Department of Plant Breeding, Yazd Branch, Islamic Azad University, Yazd, Iran.

*Corresponding author: Abdolkarim Zarei

Received: June 2018 Accepted: October 2018

Abstract

The limited availability, high cost and the adverse environmental impacts of fossil fuels, persuaded the researchers toward the use of renewable energies. Biofuels are considered as one of the main sources of renewable energies. Woody debris, agricultural waste, sugar cane, vegetables as well as oils of cereals and vegetables are among the primary sources for biofuels production. Biofuels are produced from living organisms or their metabolic byproducts (organic waste products or food). Lignocelluloses of plant cell wall are interesting sources for production of sustainable biofuels. The conversion of lignocellulose to biofuels using existing technologies is too expensive mainly because of the need for chemical pretreatments and enzymatic hydrolysis required for cell wall deconstruction. Modification of cell wall composition by using biotechnological approaches resulted in the reduction of cell wall hardness in various plant species. These results are obtained by reducing the amount of lignin as well as changing the composition and structure of final polymer. In addition, in some cases the reduction of cell wall hardness has been achieved by altering the hemicellulose biosynthesis genes as well as the ectopic expression of microbial genes in the plants with the aim of breaking the connections between lignin and carbohydrates residues. So far, genetic engineering has been used to improve the enzymes involved in digestion of cellulose and lignocellulose sources and engineering metabolic pathways involved in the production of biofuels. Also, these transgenic plants often produced higher sugar yield and ethanol. Modification of the cell wall in transgenic plants can reduce the stiffness of the cell wall without negative impact on performance. This shows that cell wall modification can be resulted without affecting the cell wall integrity or plant performance. To better understanding of the cell walls structure, we need to modify the lignocellulosic components as well as to reduce the price of biofuels production. In this review we tried to give a comprehensive introduction of biofuels and to introduce different potent methods of genetic engineering for the efficient production of biofuels. We also tried to point out all the important points on the pathway that can be modify and improved by biotechnology engineering. Finally, by evaluation the ahead challenges, the appropriate methods are suggested.

Keywords: Biofuel, Biotechnology, Cell wall, Lignin, Lignocellulose.

فصلنامه زیست شناسی سلولی و مولکولی گیاهی

سال ۱۳۹۷، دوره ۱۳، شماره ۲، صص ۱٤-۵

چکیده

محدود بودن سوخت‌های فسیلی، گران بودن و ضررهای ناشی از استفاده از آن‌ها، باعث شده که انسان به استفاده از انرژی‌های تجدیدپذیر روی آورد. یکی از انواع انرژی‌های تجدیدپذیر سوخت‌های زیستی می‌باشد. از منابع اولیه سوخت‌های زیستی می‌توان به ضایعات چوبی، تفاله‌های محصولات کشاورزی، نیشکر، غلات و روغن گیاهان و سبزیجات اشاره کرد. سوخت‌های زیستی از موجودات زنده یا از سوخت و ساز محصولات فرعی (مواد زاید آلی یا مواد غذایی) تولید می‌شوند. لیگنوسلولزهای دیواره‌ی سلولی گیاهی، منابع جذابی برای تولید سوخت‌های زیستی پایدار می‌باشند. تبدیل لیگنوسلولز به سوخت‌های زیستی با استفاده از تکنولوژی‌های موجود، بدلیل نیاز به مراحل پیش پالایش شیمیایی و هیدرولیز آنزیمی برای ساختارشکنی دیواره‌ی سلولی، بسیار گران است. سرسختی دیواره‌ی سلولی در بسیاری از گیاهان که دیواره‌ی سلولی آن‌ها توسط بیوتکنولوژی اصلاح شده است، کاهش یافته است. این نتایج توسط کاهش مقدار لیگنین و تغییر در ترکیب و ساختار آن بدست آمده است. همچنین کاهش سرسختی توسط تغییر در بیوسنتز همی‌سلولز و بیان آنزیم‌های میکروبی در گیاهان برای شکستن اتصالات لیگنین و کربوهیدرات حاصل شده است. تاکنون از مهندسی ژنتیک جهت اصلاح و بهبود آنزیم‌های دخیل در هضم آنزیمی منابع سلولزی و لیگنوسلولزی و مهندسی مسیرهای متابولیکی دخیل در تولید سوخت‌های زیستی استفاده شده است. همچنین این گیاهان تراریخت اغلب عملکرد تولید قند بهتر و تولید اتانول بیشتری دارند. اصلاح دیواره سلولی در گیاهان تراریخت می‌تواند بدون تأثیر منفی بر عملکرد، سرسختی دیواره را کاهش دهد و این نشان می‌دهد که اصلاح دیواره سلولی به صورت موفق می‌تواند بدون تأثیر در یکپارچگی دیواره سلولی یا رشد گیاه، حاصل شود. برای درک بیشتر ساختار و فرم دیواره سلولی باید مواد اولیه لیگنوسلولزی را به خوبی اصلاح کنیم و قیمت تولید سوخت زیستی را کاهش دهیم. در این نوشته ابتدا به مقدمه‌ای در خصوص معرفی بیوفیول یا سوخت‌های زیستی می‌پردازیم و سپس روش‌های مختلف مهندسی ژنتیکی برای تولید با صرفه‌ی سوخت‌های زیستی را معرفی می‌کنیم. همچنین سعی شده است به تمامی نقاط مهم در مسیر که قابل اصلاح و بهبود با مهندسی بیوتکنولوژی می‌باشند، اشاره شود و با آنالیز چالش‌های پیش رو، روش‌های مؤثر پیشنهاد گردد.

کلمات کلیدی: بیوتکنولوژی، سوخت زیستی، دیواره سلولی، لیگنوسلولز.

فصلنامه زیست شناسی سلولی و مولکولی گیاهی

سال ۱۳۹۷، دوره ۱۳، شماره ۲، صص ۱٤-۵

مقدمه و کلیات

زیست توده مواد بیولوژیکی است که از زندگی ارگانیسم‌ها نشات گرفته است. زیست توده‌ها یا به صورت مستقیم در تولید گرما کاربرد دارند یا به صورت غیرمستقیم در تولید بیوفیول‌ها استفاده می‌شوند. با افزایش تقاضا برای انرژی و احتیاج به تولیدات مقرون به صرفه و پایدار، استفاده از سوخت‌های جایگزین برای کاهش وابستگی به سوخت‌های فسیلی اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند. مواد اولیه سوخت‌های زیستی باید مقدار زیادی انرژی داشته باشند، در مقیاس و حجم بالایی تولید شوند و بتوانند بدون رقابت با محصولات کشاورزی در زمین‌های حاشیه‌ای رشد کنند. سوخت‌های زیستی بر اساس منبع زیست توده به دسته‌های مختلفی طبقه‌بندی می‌شوند. نسل اول سوخت‌های زیستی از شکر و نشاسته مشتق شده است که به آسانی استخراج و به اتانول تخمیر می‌شوند. نسل دوم سوخت‌های زیستی از لیگنوسلولزهای مواد غیرتغذیه‌ای گیاهی یا مواد کشاورزی و زباله‌های شهری تولید می‌شوند. در حال حاضر بیشترین سوخت‌های مایع مبتنی بر زیست توده، اتانول می‌باشد که از دانه ذرت و ساقه نیشکر حاصل می‌شوند (Estiken, 2006). با این حال تولیدات نسل اول سوخت‌های زیستی اغلب با تولیدات محصولات غذایی در رقابت‌اند و فقط می‌توانند بخش کمی از نیاز سوخت کره زمین را تأمین کنند (Field *et al.*, 2008). لیگنوسلولزهای گیاهی به عنوان فراوان‌ترین مواد آلی خام و بهترین مواد اولیه برای تولید سوخت زیستی اتانول در نظر گرفته شده است (Carroll, and Somerville, 2009). لیگنوسلولزها عمدتاً شامل لیگنین، کربوهیدرات، پکتین و پروتئین می‌باشند. مراحل تولید سوخت‌های زیستی لیگنوسلولزی دربرگیرنده حذف لیگنین و تبدیل شدن سلولز به اتانول می‌باشد و این شامل پنج مرحله اصلی جمع آوری مواد خام و انتقال به کارخانه فراوری، پیش پالایش برای کاهش لیگنین، هیدرولیز آنزیمی برای تولید قند، تخمیر و تقطیر است. پلیمرهای دیواره سلولی برای تخمیر به اتانول بایستی ابتدا به قند هیدرولیز شوند ولی لیگنوسلولزها برای تخریب آنزیمی و میکروبی بسیار سرسخت هستند. سلولز بسیار متبلور و دارای شبکه مرتبط با لیگنین و همی سلولز است و دسترسی سلولاز به سلولز را محدود می‌کند (Himmel *et al.*, 2007). برای هیدرولیز مؤثر سلول، پیش پالایش برای حذف لیگنین و همی سلولز و یا تخریب اتصالات با سلولز و کاهش تبلور ضروری است. بر اساس نظر Kumar و همکاران (۲۰۰۹) تکنیک‌هایی که برای پیش پالایش سازی به کار می‌رود شامل پیش پالایش فیزیکی (احیا مکانیکی برای اندازه ذرات کوچک و تولید کننده گاز)، پیش پالایش فیزیکی و شیمیایی (بخار، دی اکسید کربن، انفجار فیبر آمونیاک)، پیش پالایش شیمیایی (اسید، آلکالین، مایع یونی، ازونکافت) و پیش پالایش زیستی (با استفاده از میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده زیست توده) است. در حال حاضر پیش پالایش شیمیایی و حرارتی بیشترین تأثیر را روی برنامه‌های صنعتی دارند بعد از پیش پالایش، بیشتر سلولزها می‌توانند توسط هیدرولیز پلی ساکاریدی به گلوکز تبدیل شوند. سپس گلوکز به اتانول تخمیر می‌شود که توسط تقطیر دوباره بدست می‌آید (Alvira *et al.*, 2010).

اصلاح و تغییر دیواره‌ی سلول گیاهی برای تولید سوخت زیستی: شکل‌گیری ساختمان و دیواره‌ی

سلولی، یک فرآیند خاص پیچیده گیاهی است که شامل رسوب انواع پلی‌ساکاریدها و ترکیبات فنولی از جمله انواع مختلف منولیگنول‌ها و پلیمر لیگنین است (Kusgravo, 2005). زمانی که صفحات سلولی جدید بعد از سیتوکینز شکل پیدا می‌کند، دیواره‌های سلولی اولیه در طول رشد سلول به صورت مداوم ساخته می‌شوند و منجر به مونتاژ پلی‌ساکاریدهای سلولی و همی‌سلولز و پکتین می‌شوند. بعد از توقف رشد سلول، دومین دیواره‌ی سلولی درسلول‌های تخصص یافته برای برقراری استحکام مکانیکی و تشکیل سلول‌های اسکلرانشیم شکل می‌گیرد. این تفاوت نهایی در سلول‌ها شامل آوندها و فیبر در نهاندانگان و تراکئید در بازدانگان می‌باشد (Ureat, 2006). دومین دیواره‌ی سلولی غنی از سلولز و همی‌سلولز و لیگنین است و منبع عمده‌ی زیست توده برای سوخت‌های زیستی می‌باشد. تلاش‌های محققین روی بیوسنتز سلولز و همی‌سلولز و لیگنین متمرکز شده است تا چگونگی تشکیل دومین دیواره از این اجزا را درک کنند. به دلیل اینکه لیگنین موجب استحکام دیواره‌ی سلولی می‌شود، شناسایی مسیر بیوسنتز لیگنین بهترین روش است. بنابراین خلاصه‌ای در مورد نحوه‌ی تولید لیگنین در گیاهان ذکر می‌شود.

مهندسی ژن‌های مسیر بیوسنتز منولیگنول: لیگنین یک پلیمر فنولی است که در دومین دیواره‌ی سلولی گیاهان آوندی با پیوند کووالانسی به سلولز و همی سلولز متصل می‌شود (Balakshin *et al*., 2008). لیگنین نقش اساسی در انتقال آوندی و پشتیبانی مکانیکی را بازی می‌کند و همیشه نقش منحصر به فرد در تطبیق گیاهان به محیط اطراف و مقاومت به حیات و زندگی و تنش‌های غیرزنده دارد (Harada and Cote., 1985). لیگنین، سلولز و همی‌سلولز تشکیل شده را احاطه می‌کند تا دسترسی به آنزیم‌های تخریب کننده سلولز را کاهش دهد. لیگنین یک مانع عمده برای دسترسی به آنزیم‌های سلولوتیک برای هیدرولیز سلولز فیبرهای گیاهی است. تعدادی از ویژگی‌های لیگنین از جمله مقدار، محتوا، ترکیب زیر واحدها و اتصالات استری بین لیگنین و کربوهیدرات بر سرسختی دیواره‌ی سلولی موثراند (Chen and Dixon., 2007). کاهش مقدار لیگنین و افزایش نسبت سیرینجیلبه گوآسیل (دو زیر واحد مهم لیگنین که تغییر در آن‌ها موجب تغییر در ساختار چوب می‌شود) ترشح قند را افزایش می‌دهد (DeMartini *et al*., 2013). لیگنین معمولاً از پلیمر شدن سه مونومر فنیل پروپانوئید که عبارت‌اند از کوماریل کوآ، کنیفریل الکل و سیناپیل الکل و به ترتیب با منولیگنول‌های نوع S,G,H شناخته می‌شوند، سنتز می‌شود. ۱۰ آنزیم در مسیر فنیل پروپانوئید، از طریق شبکه‌ی متابولیکی که شامل واکنش‌های پشت سرهم هیدروکسیلی و متیله کردن می‌باشد، فنیل آلانین را به منولیگنول تبدیل می‌کنند (Vanholme *et al*., 2008. Shi *et al*., 2010). این خانواده‌ی ۱۰ آنزیمی شامل فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL)، سینامات ٤ هیدروکسیلاز (C_4H)، کوماریت: کوآنزیم آ لیگاز (٤CL)، کوماریل کو آنزیم آ (شیکمات p-هیدروکسی سینامول ترانسفراز (HCT))، P-کومارول شیمیکات ۳ هیدرولاز/کوماریت ۳ هیدروکسیلاز (C_3H)، کافیول کوآنزیم آ -O- متیل تراسفراز (CCOAOMT)، سینامیل کوآنزیم A ردوکتاز (CCR)، کانیفرآلدهید ۵ هیدروکسیلاز / فرولیت ۵ هیدروکسیلاز (CALD5H/F5H)، کافئیک اسید/۵ هیدروکسی کانیفرآلدهید-۳-O-متیل ترانسفراز (COMT) و سینامیل دهیدروژناز (CAD).

منولیگنول‌ها پس از سنتز به دیواره‌ی سلولی فرستاده می‌شوند (Esmit et al., 2013) و با پراکسیداز (POS) و لاکاز (LACs) به رادیکال‌های فنوکسی از پلی مرهای لیگنین اکسید می‌شوند (Lin *et al.*, 2013). میزان و نسبت منولیگنول‌ها، ترکیب، مقدار و ساختار لیگنین را مشخص می‌کنند. این مشخصات لیگنین، فاکتورهای کلیدی برای بهره‌برداری مؤثر از حذف لیگنین حین تبدیل دومین دیواره‌ی سلولی به سوخت‌های زیستی می‌باشد. مهندسی مسیر لیگنین در گونه‌های گیاهی بسیاری انجام گرفته است از جمله صنوبر، اکالیپتوس، چمن، یونجه و ذرت.

مهندسی مسیر مونولیگنول در گیاهان چوبی: گیاهان چوبی در بیوسنتز لیگنین تخصصی شده‌اند و پایه‌ی ژنتیکی و بیوشیمیایی آن‌ها در چوبی شدن تأثیر زیادی دارد (Li *et al.*, 2006). شکل‌گیری چوب یک پروسه‌ی اصلی از تمایز آوند چوبی است که به صورت مداوم از تقسیم سلولی کامبیوم آوندی مشتق می‌شود. در بازدانگان تنها یک نوع سلول بصورت عمده در دومین دیواره‌ی ضخیم وجود دارد. لیگنین جزء اصلی دیواره‌ی سلولی ثانویه است که بیش از ۲۰٪ وزن خشک چوب را تشکیل می‌دهد. در چوب صنوبر، نسبت S/G تقریباً دو است (Hu *et al.*, 1999). به دلیل اهمیت اقتصادی لیگنین، به عنوان ماده‌ی اولیه یا سوخت‌های زیستی مطالعات زیادی در گونه‌های متفاوت چوب (چوب نرم و سخت) روی آن انجام گرفته است. مهندسی ژن‌های مسیر مونولیگنول می‌تواند مقدار لیگنین درخت را اصلاح کند (Lu *et al.*, 2010). کاهش بیان ژن ٤ کومارات کوآنزیم آ لیگاز (٤CL) در صنوبر ترمیولویدس منجر به کاهش ٤٥ درصدی مقدار لیگنین و کاهش زیر واحدهای S و G و در نتیجه افزایش ۱۵٪ مقدار سلولز شد (Hu *et al.*, 1999). خاموش کردن ژن ٤CL توسط RNAi در کاج باعث کاهش مقدار لیگنین تا سقف ٣٦٪ و افزایش پلی ساکاریدی که فقط برای گالاکتان مشاهده شده، می‌شود. خاموشی ژن ٤CL توسط تکنیک آنتی‌سنس در گیاه صنوبر باعث افزایش عملکرد قندسازی تا سقف ٦٥٪ گردیده است (Min *et al.*, 2012). ژن CALD5H از آنزیم‌های کلیدی برای بیوسنتز منولیگنول S می‌باشد (Humphreys *et al.*, 1999). بیان ژن CALD5H در صنوبر و هیبرید آن باعث افزایش لیگنین و نسبت S/G شده است (Franke *et al.*, 2000). خاموشی آنتی سنس ژن ٤CL و بیان ژن CALD5H در صنوبر ترمیولویدس باعث کاهش ٥٢٪ مقدار لیگنین و افزایش ٦٤٪ نسبت S/G لیگنین گردیده است (Li *et al.*, 2003). در هیبرید تراریخت شده‌ی صنوبر زمانی که ژن CCR توسط آنتی سنس خاموش می‌شود، مقدار لیگنین تا ٥٠٪ کاهش پیدا می‌کند و این گیاهان تراریخت کارایی بهتری در خمیری شدن دارند (Leple *et al.*, 2007). رشد صنوبرهای دارای بازدارنده‌ی CCR دارای ١٦١٪ محصول و بازده بیشتر اتانول در مقایسه با گونه‌های وحشی آن است. در صنوبر رادیاتا محتوی لیگنین در لاین CCR RNAi، 46% و در لاین آنتی سنس CCR صنوبر نروژ ٨٪ کاهش پیدا کرده است (Wadenback et al., 2008). سینامیل الکل دهیدروژناز، آخرین مرحله بیوسنتز منولیگنول را کاتالیز می‌کند و هیدروکسی سینامول آلدهید را به الکل تبدیل می‌کند. صنوبرهای تراریخت بازدارنده‌ی CAD، رشد معمولی در زمین دارند و چوبشان هم به آسانی استخراج می‌شود (Baucher *et al.*, 1996).

مهندسی مسیر منولیگنول در گیاهان علفی: گیاهان علفی چند ساله عملکرد زیست توده‌ای بالایی دارند و می‌توانند در زمین‌های حاشیه‌ای رشد کنند. یونجه بعنوان یک گیاه بالقوه برای سوخت زیستی در نظر گرفته شده است. در یونجه عملکرد ٤ آنزیم C4H و COMT و CAD و CCR در مسیر منولیگنول مشخص شده است. همبستگی قوی منفی بین مقدار لیگنین و آزادسازی قند توسط هیدرولیز آنزیمی مشاهده شده است. بیشترین قندسازی مؤثر ۷۹٪ در لاین HCT است که دارای کمترین مقدار لیگنین می باشد. بیشترین قند در گیاهان تراریخت نسبت به گونه‌های وحشی از آوند چوبی آزاد می‌شود، که نشان داد اصلاح لیگنین، همیشه دسترسی به رسوب همی سلولز آنزیم‌های تخریبی را افزایش می‌دهد (Chen and Dixon, 2007). همچنین ژن COMT یونجه‌های تراریخته که لیگنین S آن‌ها کاهش یافته برای تولید اتانول مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که عملکرد اتانول بیش از ۲۷۷ L/ton و ۷۱۹٪ بیشتر از گونه‌های وحشی شده است (Dien *et al*., 2011).

رشد لیگنین تراریخته: بدلیل اینکه لیگنین برای رشد نرمال و نمو گیاه ضروری است، کاهش شدید مقدار لیگنین می‌تواند روی رشد گیاه مؤثر باشد (Novaes *et al*., 2010). بجز CAD، بازدارنده‌ی باقی ژن‌های مسیر منولیگنول مثل C3H و CCR و HCT به میزان زیاد، منتهی به فنوتیپ کوتولگی شدید می‌شود (Franke *et al*., 2002). کاهش عملکرد زیست توده بر تولید اتانول عوارض جانبی خواهد داشت. برای مثال، بازدارندگی بیان ژن CCR در هیبرید صنوبر نسبت به گونه‌ی وحشی، ۱٦۱٪ افزایش تولید اتانول داشته است. اگر بعد منفی عملکرد در نظر گرفته شود، اتانول تولید شده توسط ژن CCR صنوبر تراریخته فقط ۵۷٪ بیشتر از اتانول تولید شده توسط گونه‌ی وحشی است (Wagnet *et al*., 2009). رشد ممکن است بدلیل اختلال در سیگنال‌های اکسین یا تغییر در سطح اسید سالیسیلیک باشد ولی نه بوسیله ی کاهش مقدار لیگنین، زیرا پایین آوردن سطح اسید سالیسیلیک به حالت عادی، رشد را به حالت اولیه برمی‌گرداند. ژن بازدارنده‌ی HCT در آرابیدوپسیس باعث حفظ کاهش لیگنین مستقل از سطح اسید سالیسیلیک می‌شود (Gallego-Giraldo *et al*., 2011). در مورد ذرت با لیگنین کم و جهش در bm2، زمان گلدهی بیشتری نسبت به گونه‌ی وحشی آن دارد. اخیراً، نقشه یابی براساس شبیه سازی نشان داد که ژن bm2، متیلن تتراهیدرو فولیت ردوکتاز را رمزگذاری می‌کند که درگیر بیوسنتز SAM می‌باشد (Tang *et al*., 2014). این کار نمونه‌ای از اجتناب ژن‌های مسیر لیگنین را برای تولید گیاهان تراریخت با لیگنین کم فراهم می‌کند، ولی عملکرد زراعی تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد.

اصلاح ساختار لیگنین: با اینکه کاهش لیگنین توسط خاموشی یا کاهش بیان ژن‌های مسیر منولیگنول در تمام گونه‌های آزمایش شده یک روش امید بخش برای بهبود سوخت‌های زیستی است، افزایش بهره‌وری قندسازی می‌تواند با کاهش زیست توده به خطر افتد. استراتژی جایگزین تغییر ساختار لیگنین بدون تأثیر بر رشد گیاه، برای تهیه‌ی موادی که واسازی راحتتری دارند مورد مطالعه قرارگرفته است. به هم پیوستن اتصالات جدید در لیگنین راه موثری برای هضم آسان گیاهان، بدون تأثیر بر رشد گیاه است (Wilkerson *et al*., 2014).

مهندسی آنزیم‌های مصنوعی: بواسطه‌ی جهش‌زایی، Jung و همکاران (۲۰۱۲) منولیگنول ٤ متیل

ترانسفراز (MOMT4) را مهندسی کردند که می‌تواند جایگاه اختصاصی پی- هیدروکسیل از منولیگنول را متیله کند و برای اتصال در طول پلیمریزاسیون لیگنین مهم می‌باشد. بیان ژن MOMT4 در آرابیدوپسیس باعث اتریفیکاسیونپی-هیدروکسیل در پیش سازهای منومر لیگنین می‌شود که پلیمریزاسیون بین اتصالات زنجیره‌های جانبی کربن و منومرهای متداول لیگنین را مسدود می‌کند و متعاقباً باعث کاهش مقدار لیگنین می‌شود. رشد گیاهان تأثیر شدیدی در ژن‌های MOMT4 در آرابیدوپسیس نداشته است که مقدار لیگنین تا ۳٤٪ کاهش می‌یابد. بیان MOMT4 هیدرولیز کربوهیدرات‌های دیواره‌ی سلولی را افزایش می‌دهد و ۲۲٪ قند بیشتری نسبت به گونه‌ی وحشی تولید می‌کند.

مهندسی پکتین: پکتین از عمده اجزای دیواره‌ی سلولی اولیه در دولپه‌ای‌ها و تک لپه‌ای‌هایی غیر از گندمیان می‌باشد که ۳۰٪ تا ۳۵٪ از وزن خشک دیواره را تشکیل می‌دهد. این ترکیب جزء همیشگی دومین دیواره‌ی سلولی در چمن‌ها می‌باشد. پکتین پلیمر خطی غنی از گالاکتورونیک اسید است. هموگالاکتورونان (HG) حدود ٦٥٪ از پکتین را تشکیل می‌دهد (Mohnen, 2008). HG می‌تواند توسط اتصالات متیل استر به بعضی از موقعیت‌های C6 اضافه شود. بقیه‌ی عمده پکتین، رامنوز گالاکتورونال ۱ و ۲ می‌باشد (RG1,2) که به ترتیب شامل ۲۰٪ تا ۳۵٪ و ۱۰٪ پکتین می‌باشد (Mohnen, 2008). در آرابیدوپسیس‌های تراریخت با افزایش بیان ژن‌های های کد کننده‌ی پلی گالاکتوروناز (PG) یا پکتین متیل استراز (PMEI) برگ‌های گندم و تنباکو ۳ برابر افزایش بهره وری قند داشتند، که به دلیل اصلاح ساختار و معماری پکتین می‌باشد. در صنوبر، انتشار بیشتر پنتوز و هگزوز باعث کاهش پکتین توسط پکتیت لیاز شد و قندسازی در چوب را بهبود داد (Biswal *et al*., 2014).

مهندسی آنزیم‌های تخریب کننده دیواره‌ی سلولی در گیاهان: هیدرولیز پلیمرهای زیستی دیواره‌ی سلولی نیاز به هیدرولاز پلی ساکاریدها دارد تا باندهای گلیکوزیدی یا باندهای گزیلوزیدی در سلولز و همی سلولز را بشکند. هیدرولیز پلی ساکاریدها بطور عمده توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها انجام می‌شود (Tomme *et al*., 1995). هیدرولیزهای قارچی نسبت به هیدرولیزهای باکتریایی منحصر به فرد و بسیار متفاوت‌اند، که شامل کمپلکسی از سلولز و همی سلولز بنام سلولوزوم است (Bayer *et al*., 2004). آنزیم‌های قارچی و باکتریایی از مکانیزیم‌های متفاوتی برای ساختار شکنی دیواره سلولی گیاهی استفاده می‌کنند (Ding *et al*., 2012). سلولوزوم باکتریایی اولین هضم کننده‌ی ترکیب لایه‌ی میانی می‌باشد، در حالی که سلولوزوم قارچی دیواره‌ی سلولی را هضم می‌کند، ترکیب لایه‌ی میانی را کامل رها می‌کند و باقی می‌گذارد. هیدرولیز کامل پلی ساکارید، نیاز به هیدرولیز داخلی و خارجی با هم دارد. هیدرولیز سلولز به منومرهای گلوکز نیاز به ۳ نوع آنزیم دارد endo-1,4-β-glucanases ،exo-1,4-β-glucanases و β-D-glucosidases. اگزو و اندو گلوکاناز می‌تواند سلولز را به سلوبیوز هیدرولیز کند که می‌تواند به وسیله‌ی β-D-glucosidases به گلوکز تبدیل شود (Singhania *et al*., 2013). دو آنزیمی که درگیرمحور میانی زایلن است endo-1,4-β-D-xylanase (xynA) و β-xylosidase (xyD) می‌باشند. α-glucuronidase (aguA) پیوند گلیکوزیدی بین MeGlcA و واحدهای محور میانی گزیلور را می

شکند. سلولاز و زایلناز بصورت هم افزایی عمل می کنند تا هیدرولیز سلولز و تولید جریان دوم تخمیر قند پنتاز (پنتوز) بهبود یابد. هیدرولازهای پلی ساکاریدها از باکتری‌ها در حال حاضر بصورت تجاری در دسترس می‌باشد. برای مثالCellicCTec2 مخلوط سلولاز، β-گلیکوزیداز و همی سلولاز می باشد. بعضی از محصولات گیاهی برای بیان آنزیم‌های تخریب کننده دیواره‌ی سلولی تولیدی توسط قارچ‌ها و باکتری‌ها برای تولید اگزوژن اتانول لیگنوسلولوزی استفاده شده است. اخیراً، محققین شروع به استفاده از مزیت‌های پایداری دمایی آنزیم‌های تخریب کننده دیواره‌ی سلولی گزیلانازها کردند که تولید کننده‌ی ماده‌هایی هستند که قابلیت هضم خودشان را دارا و می‌توانند برای هیدرولیز سلولز توسط سلولاز اگزوژنز یا با اضافه کردن مقدار کمی همی‌سلولز پردازش شوند (Shen *et al*., 2012).

دیدگاه آینده: تحقیقات اخیر در مورد بیوتکنولوژی گیاهی، مهندسی موفقی را برای کاهش مقاومت دیواره‌ی سلولی برای تولید سوخت زیستی لیگنوسلولزی نشان داد. موثرترین اصلاح، هدف قرار دادن مسیر منولیگنول یا کاهش ارتباط متقابل بین لیگنین و کربوهیدرات بر اساس درک فعلی از بیوسنتز لیگنین می‌باشد. در حالی که افزایش پیشرفت تولیدات اتانول توسط مطالعات تکنولوژی که بصورت عمده از آزمایشگاه‌های تحت شرایط کاملاً کنترل شده بوجود می‌آید قابل دسترسی است. روش‌های جدید نیاز به انجام آزمایش‌هایی بعنوان فرایندهای صنعتی دارند، اثرات دیگر مثل اثرات محیطی، ثبات ژن و غیره باید در نظر گرفته شود. درک ما از بیوسنتز سلولز، همی‌سلولز، لیگنین در طول شکل‌گیری دیواره‌ی سلولی هنوز محدود می‌باشد. شکل‌گیری دیواره‌ی سلولی نسبت به پیش‌بینی‌های ما یک فرایند بسیار پیچیده‌ای است. کاهش هزینه‌ی سرمایه‌ی تولید سوخت زیستی لیگنو سلولزی بستگی به توضیح بیشتر و اصلاح شکل‌گیری و ساختار دیواره‌ی سلولی گیاهی دارد. شبکه‌های ژنتیکی فاکتورهای رونویسی شکل‌دهی دومین دیواره‌ی سلولی را کنترل می‌کند. درک ما از شبکه‌ی تنظیمی دیواره‌ی سلولی دومین در گونه‌های سوخت زیستی ابتدایی می‌باشد. استراتژی‌های مختلف، شامل بیان و آنالیزهای محاسباتی در مقیاس بزرگ برای شناسایی ژن‌های شبکه‌ی نظارتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Wang *et al*., 2012). یک سیستم پربازده ژنومی برای کشف و ارزش بخشیدن به عوامل رونویسی که مختص هدایت سنتز تنظیم مرحله‌ای بیان شبکه‌ی ژنی هستند، برای مطالعه‌ی تشکیل چوب توسعه یافته است. این سیستم شامل یک سیستم پروتوپلاستی با توان بالا، توالی یابی RNA با توان بالا، محاسبه توسط مدل گرافیکی گاوسی بر پایه‌ی الگوریتم (GGM)، اعتبارسنجی توسط توالی یابی ایمونوپرسیپیتیشن کروماتین (ارزش بخشیدن توسط توالی‌یابی chip رسوب‌دهی ایمنی کروماتین چیپ سکونس روشی که برای برهمکنش پروتئین با اسید نوکلئیک استفاده می‌شود) (Lin *et al*., 2013).

منابع

1) Acad. Sci. U.S.A. 106, 13118–13123. Cosgrove, D.J. 2005. Growth of the plant cell wall. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6, 850–861.
2) Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M. and Negro, M. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. 3) Bioresour. Technol. 101, 4851–4861.
3) Balakshin, M.Y., Capanema, E.A. and Chang, H. 2008. Recent advances in the isolation and analysis of lignins and

lignin–carbohydrate complexes. In Characterization of Lignocellulosics (Hu, T., ed.), pp. 148–166. Oxford: Balckwell.

4) Baucher, M., Chabbert, B., Pilate, G., Van Doorsselaere, J., Tollier, M.T., Petit-Conil, M., Cornu, D., Monties, B., Van Montagu, M., Inze, D., Jouanin, L. and Boerjan, W. 1996. Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar (Populus tremula 9 P. alba). Plant Physiol. 112, 1479–1490.

5) Bayer, E.A., Belaich, J.-P., Shoham, Y. and Lamed, R. 2004. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. Annu. Rev. Microbiol. 58, 521–554.

6) Biswal, A.K., Soeno, K., Gandla, M.L., Immerzeel, P., Pattathil, S., Lucenius, J., Serimaa, R., Hahn, M.G., Moritz, T., Jonsson, L.J., Israelsson-Nordstre om, M.e and Mellerowicz, E.J. 2014. Aspen pectate lyase PtxtPL1-27 mobilizes matrix polysaccharides from woody tissues and improves saccharification yield. Biotechnol. Biofuels, 7, 11.

7) Carroll, A. and Somerville, C. 2009. Cellulosic biofuels. Annu. Rev. Plant Biol. 60, 165–182.

8) Chen, F. and Dixon, R.A. 2007. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. Nat. Biotechnol. 25, 759–761.

9) Coleman, H.D., Yan, J. and Mansfield, S.D. 2009. Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure. Proc. Natl.

10) DeMartini, J.D., Pattathil, S., Miller, J.S., Li, H., Hahn, M.G. and Wyman, C.E. 2013. Investigating plant cell wall components that affect biomass recalcitrance in poplar and switchgrass. Energy Environ. Sci. 6, 898–909.

11) Dien, B.S., Miller, D.J., Hector, R.E., Dixon, R.A., Chen, F., McCaslin, M., Reisen, P., Sarath, G. and Cotta, M.A. 2011. Enhancing alfalfa conversion efficiencies for sugar recovery and ethanol production by altering lignin composition. Bioresour. Technol. 102, 6479–6486.

12) Ding, S., Liu, Y., Zeng, Y., Himmel, M.E., Baker, J.O. and Bayer, E.A. 2012. How does plant cell wall nanoscale architecture correlate with enzymatic digestibility? Science, 338, 1055–1060.

13) Evert, R.F. 2006. Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development. pp. 357–405. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.

14) Field, C.B., Campbell, J.E. and Lobell, D.B. 2008. Biomass energy: the scale of the potential resource. Trends Ecol. Evol. 23, 65–72.

15) Franke, R., McMichael, C.M., Meyer, K., Shirley, A.M., Cusumano, J.C. and Chapple, C. 2000. Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the Arabidopsis gene encoding ferulate 5-hydroxylase. Plant J. 22, 223–234.

16) Franke, R., Hemm, M., Denault, J., Ruegger, M., Humphreys, J. and Chapple, C. 2002a. Changes in secondary metabolism and deposition of an unusual lignin in the ref8 mutant of Arabidopsis. Plant J. 30, 47–59.

17) Franke, R., Humphreys, J.M., Hemm, M.R., Denault, J.W., Ruegger, M.O., Cusumano, J.C. and Chapple, C. 2002b. The Arabidopsis REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. Plant J. 30, 33–45.

18) Gallego-Giraldo, L., Escamilla-Trevino, L., Jackson, L.A. and Dixon, R.A. 2011. Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin down-regulated plants. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 108, 20814–20819.

19) Harada, T. and Cote, W.A. 1985. Structure of wood. In Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components (Higuchi, T., ed.), pp. 1–42. San Diego: Academic Press.

20) Himmel, M.E., Ding, S.Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W. and Foust, T.D. 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. Science, 315, 804–807.

21) Hu, W.-J., Harding, S.A., Lung, J., Popko, J.L., Ralph, J., Stokke, D.D., Tsai, C.-J. and Chiang, V.L. 1999. Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. Nat. Biotechnol. 17, 808–812.

22) Humphreys, J.M., Hemm, M.R. and Chapple, C. 1999. New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 96, 10045–10050.

23) Jung, J.H., Fouad, W.M., Vermerris, W., Gallo, M. and Altpeter, F. 2012. RNAi suppression of lignin biosynthesis in sugarcane reduces recalcitrance for biofuel production from lignocellulosic biomass. Plant Biotechnol. J. 10, 1067–1076.

24) Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J. and Stroeve, P. 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. Ind. Eng. Chem. Res. 48, 3713–3729.

25) Leple, J.C., Dauwe, R., Morreel, K., Storme, V., Lapierre, C., Pollet, B., Naumann, A., Kang, K.-Y., Kim, H., Ruel, K., Lefebvre, A., Joseleau, J.-P., Grima-Pettenati, J., De Rycke, R., Andersson-Gunneras, S., Erban, A., Fehrle, I., Petit-Conil, M., Kopka, J., Polle, A., Messens, E., Sundberg, B., Mansfield, S.D., Ralph, J., Pilate, G. and Boerjan, W. 2007. Downregulation of cinnamoyl-coenzyme A reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure. Plant Cell, 19, 3669–3691.

26) Li, L., Zhou, Y., Cheng, X., Sun, J., Marita, J., Ralph, J. and Chiang, V. 2003. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 100, 4939–4944.

27) Li, L., Lu, S. and Chiang, V. 2006. A genomic and molecular view of wood formation. Crit. Rev. Plant Sci. 25, 215–233.

28) Lin, Y.C., Li, W., Sun, Y.H., Kumari, S., Wei, H., Li, Q., Tunlaya-Anukit, S., Sederoff, R.R. and Chiang, V.L. 2013. SND1 transcription factor-directed quantitative functional hierarchical genetic regulatory network in wood formation in Populus trichocarpa. Plant Cell, 25, 4324–4341.

29) Lu, S., Li, L. and Zhou, G. 2010. Genetic modification of wood quality for second-generation biofuel production. GM Crops, 1, 230–236.

30) Lu, S., Li, Q., Wei, H., Chang, M.J., Tunlaya-Anukit, S., Kim, H., Liu, J., Song, J., Sun, Y.H., Yuan, L., Yeh, T.F., Peszlen, I., Ralph, J., Sederoff, R.R. and Chiang, V.L. 2013. Ptr-miR397a is a negative regulator of laccase genes affecting lignin content in Populus trichocarpa. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 110, 10848–10853.

31) Min, D., Li, Q., Jameel, H., Chiang, V.L. and Chang, H.-m. 2012. The cellulase-mediated saccharification on wood derived from transgenic low-lignin lines of black cottonwood (Populus trichocarpa). Appl. Biochem. Biotechnol. 168, 947–955.

32) Mohnen, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. Curr. Opin. Plant Biol. 11, 266277.

Novaes, E., Kirst, M., Chiang, V., Winter-Sederoff, H. and Sederoff, R. 2010. Lignin and biomass: a negative correlation for wood formation and lignin content in trees. Plant Physiol. 154, 555–561.

33) Pilate, G., Guiney, E., Holt, K., Petit-Conil, M., Lapierre, C., Leple, J., Pollet, B., Mila, I., Webster, E.A., Marstorp, H.G., Hopkins, D.W., Jouanin, L., Boerjan, W., Schuch, W., Cornu, D. and Halpin, C. 2002. Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. Nat. Biotechnol. 20, 607–612.

34) Shen, B., Sun, X., Zuo, X., Shilling, T., Apgar, J., Ross, M., Bougri, O., Samoylov, V., Parker, M., Hancock, E., Lucero, H., Gray, B., Ekborg, N.A., Zhang, D., Johnson, J.C.S., Lazar, G. and Raab, R.M. 2012. Engineering a thermoregulated intein-modified xylanase into maize for consolidated lignocellulosic biomass processing. Nat. Biotechnol. 30, 1131–1136.

35) Shen, H., Mazarei, M., Hisano, H., Escamilla-Trevino, L., Fu, C., Pu, Y., Rudis, M.R., Tang, Y., Xiao, X., Jackson, L., Li, G., Hernandez, T., Chen, F., Ragauskas, A.J., Stewart, C.N. Jr, Wang, Z.Y. and Dixon, R.A. 2013. A genomics

Gullion, T. and Clapham, D. 2008. Lignin biosynthesis in transgenic Norway spruce plants harboring an antisense construct for cinnamoyl CoA reductase (CCR). Transgenic Res. 17, 379–392.

45) Wang, S., Yin, Y., Ma, Q., Tang, X., Hao, D. and Xu, Y. 2012. Genome-scale identification of cell-wall related genes in Arabidopsis based on co-expression network analysis. BMC Plant Biol. 12, 138.

46) Wagner, A., Donaldson, L., Kim, H., Phillips, L., Flint, H., Steward, D., Torr, K., Koch, G., Schmitt, U. and Ralph, J. 2009. Suppression of 4-coumarate-CoA ligase in the coniferous gymnosperm Pinus radiata. Plant Physiol. 149, 370–383.

47) Wilkerson, C.G., Mansfield, S.D., Lu, F., Withers, S., Park, J.Y., Karlen, S.D., Gonzales-Vigil, E., Padmakshan, D., Unda, F., Rencoret, J. and Ralph, J. 2014. Monolignol ferulate transferase introduces chemically labile linkages into the lignin backbone. Science, 344, 90–93.

approach to deciphering lignin biosynthesis in switchgrass. Plant Cell, 25, 4342–4361.

36) Shi, R., Sun, Y.-H., Li, Q., Heber, S., Sederoff, R. and Chiang, V.L. 2010. Towards a systems approach for lignin biosynthesis in Populus trichocarpa: transcript abundance and specificity of the monolignol biosynthetic genes. Plant Cell Physiol. 51, 144–163.

37) Singhania, R.R., Patel, A.K., Sukumaran, R.K., Larroche, C. and Pandey, A. 2013. Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. Bioresour. Technol. 127, 500–507.

38) Smith, R.A., Schuetz, M., Roach, M., Mansfield, S.D., Ellis, B. and Samuels, L. 2013. Neighboring parenchyma cells contribute to Arabidopsis xylem lignification, while lignification of interfascicular fibers is cell autonomous. Plant Cell, 25, 3988–3999.

39) Sticklen, M. 2006. Plant genetic engineering to improve biomass characteristics for biofuels. Curr. Opin. Biotechnol. 17, 315–319.

40) Tang, H.M., Liu, S., Hill-Skinner, S., Wu, W., Reed, D., Yeh, C.T., Nettleton, D. and Schnable, T.S. 2014. The maize brown midrib2 (bm2) gene encodes a methylenetetrahydrofolate reductase that contributes to lignin accumulation. Plant J. 77, 380–392.

41) Tomme, P., Warren, R. and Gilkes, N. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. Adv. Microb. Physiol. 37, 1–81.

42) Van Acker, R., Leple, J.-C., Aerts, D., Storme, V., Goeminne, G., Ivens, B., Legee, F., Lapierre, C., Piens, K., Van Montagu, M.C.E., Santoro, N., Foster, C.E., Ralph, J., Soetaert, W., Pilate, G. and Boerjan, W. 2014. Improved saccharification and ethanol yield from field-grown transgenic poplar deficient in cinnamoyl-CoA reductase. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 111, 845–850.

43) Vanholme, R., Morreel, K., Ralph, J. and Boerjan, W. 2008. Lignin engineering. Curr. Opin. Plant Biol. 11, 278–285.

44) Wadenback, J., von Arnold, S., Egertsdotter, U., Walter, M.H., Grima-Pettenati, J., Goffner, D., Gellerstedt, G.,