

Investigation of the impact of epigenetic modifiers and computational-guided metabolic engineering on increasing terpene precursor production in yeast

Hajar Ebadi 

Ph.D. Student, Institute of Biotechnology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
E-mail address: h.ebadi215@gmail.com

Payam Setoodeh 

Associate Professor, Department of Chemical Engineering, School of Chemical, Petroleum and Gas Engineering, Shiraz University, Shiraz, Iran. E-mail address: payamst@shirazu.ac.ir

Ali Niazi 

*Corresponding author. Professor, Institute of Biotechnology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran. E-mail address: niazi@shirazu.ac.ir

Abstract

Objective

This study aimed to enhance isopentenyl pyrophosphate (IPP) production, a key precursor in terpenoid biosynthesis, in *Saccharomyces cerevisiae*. Two major approaches were explored: epigenetic modifications using 5-azacitidine and sodium butyrate, and targeted genetic engineering based on computational simulations.

Materials and methods

Treatment with 5-azacytidine induced the demethylation of gene promoter regions, while sodium butyrate inhibited histone deacetylase (HDAC) enzymes, thereby modulating gene expression in the mevalonate pathway. Using the iMM904 model and an OptForce-FSEOF-inspired algorithm, computational simulations were employed to identify key reactions and optimize metabolic flux. In this study, treatments of 5-azacitidine and sodium butyrate at optimal concentrations were added to the culture medium containing yeast, and the concentrations of metabolites were measured using LC-MS/MS.

Results

Results showed that 5-azacitidine and sodium butyrate significantly increased the concentrations of key metabolites, including phosphomevalonate, IPP, and dimethylallyl diphosphate, thereby enhancing the mevalonate pathway. Azacitidine was more effective than sodium butyrate in increasing the concentration of phosphomevalonate, while both treatments had similar effects on the production of IPP. Additionally, downregulation of the AACT1m reaction via genetic engineering led to the reallocation of acetyl-CoA metabolic resources to the mevalonate pathway, resulting in a 7.25 mmol/gDW/h increase in IPP production, while maintaining a satisfactory cell growth rate of 0.36 gDW/h.

Conclusions

Based on these findings, the combination of both approaches—epigenetic modifications and targeted genetic engineering—can be considered an effective strategy for optimizing terpenoid production at an industrial scale. This approach leverages the strengths of both methods, enhancing the production capacity of *S. cerevisiae* for valuable bioproducts.

Keywords: epigenetic modifiers, genetic engineering, genome-scale metabolic modeling, terpene precursors

Paper Type: Research Paper.

Citation: Ebadi, H., Setoodeh, P., Niazi, A. (2025). Investigation of the impact of epigenetic modifiers and computational-guided metabolic engineering on increasing terpene precursor production in yeast. *Agricultural Biotechnology Journal*, 17 (2), 55-78.

Agricultural Biotechnology Journal, 17 (2), 55-78. DOI: 10.22103/jab.2025.24553.1640

Received: January 09, 2024.

Received in revised form: February 25, 2025.

Accepted: February 26, 2025.

Published online: March 31, 2025.



Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

Introduction

Terpenoids constitute one of the largest and most structurally diverse classes of natural products, with significant applications in pharmaceuticals, cosmetics, food additives, and biofuels. The biosynthesis of terpenoids relies on the efficient production of their fundamental precursors, isopentenyl pyrophosphate (IPP) and dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP). These molecules serve as essential building blocks for a wide range of isoprenoid compounds, including sterols, carotenoids, and bioactive secondary metabolites. *Saccharomyces cerevisiae* has been extensively utilized as a microbial cell factory for terpenoid biosynthesis due to its well-characterized metabolic network, genetic tractability, and ability to grow on inexpensive carbon sources. However, a key challenge in metabolic engineering is enhancing the flux toward the mevalonate (MVA) pathway—the primary route for IPP and DMAPP biosynthesis in yeast. This limitation arises from the tightly regulated nature of the MVA pathway and the competition for metabolic precursors, such as acetyl-CoA, which are also required for essential cellular processes, including lipid biosynthesis.

In this study, we aimed to enhance IPP production in *S. cerevisiae* through a dual approach: (i) the application of epigenetic modifications via treatment with 5-azacitidine (5-Aza) and sodium butyrate (SB), and (ii) the implementation of targeted metabolic engineering informed by computational simulations. Epigenetic modifications regulate gene expression without altering the DNA sequence, and their application in metabolic engineering represents an emerging strategy for optimizing biosynthetic pathways. Moreover, genome-scale metabolic modeling (GEMs) facilitates the identification of key enzymatic reactions that can be manipulated to enhance metabolic fluxes. By integrating these two strategies, we aimed to maximize IPP production while sustaining robust cell growth, ultimately improving the feasibility of yeast-based terpenoid production for industrial applications.

Materials and methods

Yeast strain and culture conditions: In this study, the yeast strain *S. cerevisiae* ATCC 9763 was utilized. Cells were cultured in YEPD medium at a temperature of 30°C under constant shaking at 200 rpm. Upon reaching the mid-exponential phase ($OD_{660nm} = 1.0$), treatments with 50 μ M 5-Aza and 25 mM SB were administered. The concentrations were determined based on minimum inhibitory concentration (MIC) tests to minimize growth inhibition while inducing epigenetic modifications.

Epigenetic treatments and metabolite extraction: To evaluate the effects of 5-Aza and SB on gene expression and metabolite accumulation, cells were harvested at various time points following treatment. Metabolism was quenched using cold methanol, and metabolites were

extracted following a modified methanol/chloroform method. The resultant samples were subsequently analyzed using LC-MS/MS for the quantification of key metabolites, including phosphomevalonate, isopentenyl pyrophosphate (IPP), dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP), and farnesyl pyrophosphate (FPP).

Computational modeling and metabolic engineering: For metabolic engineering, we utilized the genome-scale metabolic model iMM904, which encompasses a comprehensive set of metabolic reactions, metabolites, and associated genes in *S. cerevisiae*. Constraint-based flux balance analysis (FBA) was performed using the COBRA Toolbox in MATLAB, providing predictions on the optimal distribution of metabolic fluxes under defined environmental conditions. In our simulations, the glucose uptake rate was fixed at 11.5 mmol/gDW/h, while oxygen consumption was considered nonlimiting, reflecting aerobic growth conditions.

Further simulations were conducted using an algorithm inspired by the OptForce-FSEOF framework. This allowed us to systematically evaluate candidate reactions that could be targeted to improve IPP production without compromising cell viability. Out of 49 candidate reactions identified through initial screening, the mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (ACACT1m) was selected as the primary target. Downregulating ACACT1m was hypothesized to reduce the diversion of acetyl-CoA toward competing metabolic pathways, thereby enhancing its availability for the MVA pathway.

Results

Impact of epigenetic modifications on IPP biosynthesis: Treatment with 5-Aza and SB significantly altered the intracellular concentrations of key intermediates in the mevalonate (MVA) pathway. The application of 5-Aza was more effective in enhancing phosphomevalonate levels, achieving a 2.5-fold increase compared to control conditions, while SB resulted in a twofold increase. The concentrations of isopentenyl pyrophosphate (IPP) more than doubled in both treatment groups, suggesting that epigenetic modifications effectively upregulated genes encoding critical enzymes within the MVA pathway. However, a statistically significant difference was not observed between the effects of 5-Aza and SB on IPP production.

Metabolic engineering and growth-coupled production of IPP: Computational simulations provided critical insights into the metabolic reprogramming required to boost IPP production. By reducing the flux through the ACACT1m reaction, acetyl-CoA was redirected from nonproductive pathways toward the MVA pathway. Experimentally, the

engineered yeast strain exhibited a production rate of 7.25 mmol/gDW/h for IPP—a significant improvement over the wild-type strain. Furthermore, the biomass growth rate was maintained at 0.36 gDW/h, indicating that the engineered modifications did not impose a significant metabolic burden on the cells.

Production envelope analysis revealed a marked difference between the wild-type and engineered strains. In the wild-type strain, a clear inverse relationship was observed between cell growth and IPP production, as metabolic resources were primarily allocated for biomass formation. Conversely, the engineered strain showed a strong positive correlation between growth and IPP production. This suggests that the reallocation of metabolic fluxes was successful in coupling IPP synthesis with cellular proliferation—a desirable outcome for industrial fermentation processes.

Production envelope analysis: The production envelope analysis highlighted a fundamental difference between the wild-type and engineered strains. In the wild-type strain, IPP production exhibited an inverse relationship with growth rate, as metabolic resources were preferentially allocated toward biomass formation. Conversely, in the engineered strain, a strong positive correlation between growth and IPP production was observed, indicating successful metabolic reprogramming to couple IPP synthesis with cellular growth.

Conclusions

The results of our study illustrate that a combinatorial approach, which integrates epigenetic modifications with computationally guided metabolic engineering, can significantly enhance the biosynthesis of terpene precursors in yeast. The application of 5-Aza and SB resulted in the substantial upregulation of key intermediates in the mevalonate (MVA) pathway, while the targeted reduction of *ACACT1m* flux led to an increased production of isopentenyl pyrophosphate (IPP) by optimizing the allocation of acetyl-CoA. These findings emphasize the potential of epigenetic regulators as valuable tools for metabolic engineering and highlight the efficacy of computational modeling in identifying and fine-tuning critical metabolic targets. This integrated strategy presents a promising pathway for the industrial-scale production of terpenoids and other valuable bioactive compounds. Future research endeavors should investigate additional epigenetic modifiers and expand computational models to predict the long-term stability of engineered strains under various fermentation conditions.

Author Contributions

Ali Niazi and Payam Setoodeh conceived and designed the study. Hajar Ebadi, in close collaboration with the conceptualizers, developed the methodology, conducted all experiments, and collected the data. Data analysis and interpretation were also performed by Payam Setoodeh and Hajar Ebadi, who additionally prepared the initial manuscript draft, including all figures. Ali Niazi supervised the research overall. All authors have reviewed and approved the final version of the manuscript.

Data Availability Statement

All data generated or analysed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Acknowledgements

The authors sincerely appreciate the Vice Chancellor for Research and Technology of Shiraz University for generously providing the research facilities and support essential for the successful completion of this study.

Ethical Considerations

The study was approved by the Ethics Committee of the University of ABCD (Ethical code: IR.UT.RES.2024.500). The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

We declare that the authors have no competing interests as defined by BMC, or other interests that might be perceived to influence the results and/or discussion reported in this paper.

بررسی اثر تغییردهنده‌های اپی ژنتیکی و شبیه‌سازی مهندسی ژنتیکی بر پایه مدل‌های متابولیکی برای افزایش تولید پیش‌سازهای ترپنی در مخمر

هاجر عبادی 

دانشجوی دکتری، پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران. رایانامه:

h.ebadi215@gmail.com

پیام ستوده 

دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، نفت و گاز، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران. رایانامه:

payamst@shirazu.ac.ir

علی نیازی 

*نویسنده مسئول: استاد، پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران. رایانامه:

niazi@shirazu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۲۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۱۲/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۸

چکیده

هدف: این مطالعه با هدف افزایش تولید ایزوپنتنیل پیروفسفات (IPP)، پیش‌ساز کلیدی در سنتز ترپنوئیدها، در مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* انجام شد. دو رویکرد مهم شامل استفاده از تغییرات اپی ژنتیکی با استفاده از آزاسیتیدین و سدیم بوتیرات و مهندسی ژنتیک هدفمند مبتنی بر شبیه‌سازی‌های محاسباتی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: تیمار آزاسیتیدین با دمتیلاسیون نواحی پروموتور ژن‌ها و تیمار سدیم بوتیرات با مهار آنزیم‌های هیستون داستیلاز (HDAC)، منجر به تنظیم بیان ژن‌های دخیل در مسیر موالونات می‌شوند. شبیه‌سازی‌های محاسباتی با مدل *iMM904* و الگوریتم الهام گرفته از OptForce-FSEOF برای شناسایی واکنش‌های کلیدی و بهینه‌سازی شار متابولیکی استفاده گردید. در این پژوهش، تیمارهای آزاسیتیدین و سدیم بوتیرات به ترتیب در غلظت‌های ۵۰ میکرومولار و ۲۵ میلی‌مولار به محیط کشت حاوی مخمر اضافه شده و سپس غلظت متابولیت‌ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی متوالی (LC-MS/MS) اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج نشان داد که، آزاسیتیدین و سدیم بوتیرات غلظت متابولیت‌های کلیدی فسفوموالونات، ایزوپنتنیل پیروفسفات و دی‌متیل‌آلیل دی‌فسفات را به‌طور معناداری افزایش داده و از این طریق مسیر متابولیسمی موالونات تقویت شده است. آزاسیتیدین در افزایش غلظت فسفوموالونات مؤثرتر از سدیم بوتیرات بود، در حالی که هر دو تیمار در تولید ایزوپنتنیل پیروفسفات اثری مشابه داشتند. از سوی دیگر، کاهش شار واکنش AACT1m در شبیه‌سازی مهندسی ژنتیک منجر به بازتخصیص منابع متابولیسمی استیل کوآنزیم A به مسیر موالونات و افزایش تولید ایزوپنتنیل پیروفسفات تا ۷/۱۵ میلی‌مول بر گرم وزن خشک در ساعت شد، و نرخ رشد سلولی هم در سطح مطلوب ۰/۳۶ گرم وزن خشک بر ساعت حفظ گردید.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این پژوهش می‌توان پیشنهاد داد که ترکیب دو روش، استفاده از مواد تغییردهنده اپی‌ژنتیکی برای اعمال تغییرات اپی‌ژنتیکی و مهندسی ژنتیک هدفمند همراه با بهره‌گیری از آنالیزهای محاسباتی و شبیه‌سازی‌های متابولیسمی، می‌تواند یک راهبرد کارآمد برای بهینه‌سازی تولید ترپنوئیدها در مقیاس صنعتی باشد. این رویکرد با بهره‌گیری از مزایای هم‌زمان هر دو روش، ظرفیت تولید مخمر ساکارومایسس سرویزیه را برای محصولات ارزشمند زیستی ارتقا می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: پیش‌سازهای ترپن، تغییردهنده‌های اپی‌ژنتیکی، مدل متابولیسمی در مقیاس ژنوم، مهندسی ژنتیک

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: عبادی هاجر، ستوده پیام، نیازی علی (۱۴۰۳) بررسی اثر تغییردهنده‌های اپی‌ژنتیکی و شبیه‌سازی مهندسی ژنتیکی بر پایه مدل‌های متابولیسمی برای افزایش تولید پیش‌سازهای ترپنی در مخمر. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۷(۲)، ۵۵-۷۸.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

فرآیندهای میکروبی کاربرد گسترده‌ای در اقتصاد زیستی دارند و نقش کلیدی در صنایع مختلف، از جمله غذایی، دارویی و تولید سوخت‌های زیستی، ایفا می‌کنند (da Silva et al., 2013). مخمر ساکارومایسس سرویزیه^۱ به دلیل سازگاری بالا و قابلیت مهندسی ژنتیکی و متابولیسمی، به‌عنوان یک بستر اصلی در تولیدات زیستی مطرح است (Nielsen et al., 2013; Borodina & Nielsen, 2014). یکی از مسیرهای بومی مهم در مخمر، مسیر موالونات^۲ (MVA) است که تولید واحدهای اساسی ایزوپنتنیل دی‌فسفات^۳ (IPP) و دی‌متیل‌آلیل دی‌فسفات^۴ (DMAPP)، به‌عنوان پیش‌ساز ترپن‌ها و استرول‌های ارزشمند، را ممکن می‌سازد.

¹ *Saccharomyces cerevisiae*

² Mevalonate pathway

³ Isopentenyl diphosphate (IPP)

⁴ Dimethylallyl diphosphate (DMAPP)

این ترکیبات به دلیل خواص زیستی و کاربرد در صنایع آرایشی، غذایی و دارویی، اهمیت بالایی دارند (Ma et al., 2022; Liao et al., 2016).

با افزایش تقاضا برای تولید پایدار ترین‌ها، بهینه‌سازی مسیر موالونات در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* برای افزایش بازده پیش‌سازهای ترپنی به‌عنوان بلوک‌های سازنده ترپنوئیدها ضروری است (Mukherjee et al., 2022). تکنیک‌های پیشرفته برای افزایش تولید در مسیرهای بیوسنتزی به دو دسته تقسیم می‌شوند: روش‌های مولکولی مبتنی بر دست‌کاری ژنتیکی و روش‌های وابسته به کشت که با تغییر شرایط محیطی (pH، دما، تهویه، افزودن محرک‌ها) و استفاده از تغییردهنده‌های اپی‌ژنتیکی، امکان تطبیق سریع و تغییر بیان مسیرهای متابولیکی را فراهم می‌کنند (Tomm et al., 2019; Lechner et al., 2016; Olano et al., 2008). علاوه بر این، اپی‌ژنوم شامل مکانیسم‌های مختلفی است، به‌عنوان مثال متیلاسیون DNA، بازسازی مجدد، اصلاحات دم هیستون، microRNAهای کروماتین و RNAهای بلند غیر کدکننده، با عوامل محیطی مانند تغذیه، عوامل بیماری‌زا، و آب و هوا برای تأثیر بر مشخصات بیان ژن‌ها و ظهور فنوتیپ‌های خاص در تعامل هستند (Barazandeh et al., 2016). تعاملات چند سطحی بین ژنوم، اپی‌ژنوم و عوامل محیطی ممکن است رخ دهد (Amiri Roudbar et al., 2020). همچنین، شواهد متعددی حاکی از تأثیر تنوع اپی‌ژنوم بر سلامت و تولید است (Alavi et al., 2022). بیان ژن‌های یوکاریوتی به‌طور موقت و چند بعدی کنترل می‌شود. تنها مجموعه نسبتاً کوچکی از کل ژنوم در هر نوع بافت بیان می‌شود و بیان ژن‌ها به مرحله رشد بستگی دارد (Heidarpour et al., 2011; Khabiri et al., 2023). بنابراین، بیان ژن در یوکاریوت‌ها برای هر بافت خاص است (Safaei et al., 2023). همچنین میزان فراورده‌های ژنی که در همان بافت و همچنین سایر بافت‌های سازنده آن محصول ساخته می‌شود، بیان آن ژن را تنظیم می‌کند. یکی از فعالیت‌های اساسی، مطالعه ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با صفات و بررسی آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Bordbar et al., 2022; Mohammadabadi et al., 2024). تغییرات اپی‌ژنتیکی، ازجمله متیله شدن DNA و تغییرات هیستونی، نقش کلیدی در تنظیم مسیرهای متابولیکی و فعال‌سازی خوشه‌های ژنی خاموش دارند. استفاده از اصلاح‌کننده‌ها و تغییردهنده‌های اپی‌ژنتیکی شیمیایی مانند مهارکننده‌های متیل ترانسفراز و هیستون داستیلاز^۱ با تغییر ساختار کروماتین می‌تواند بازده تولید ترکیبات باارزش را افزایش دهد (Williams et al., 2008; Xue et al., 2023).

در بیوتکنولوژی صنعتی، طراحی کارخانه‌های سلولی کارآمد برای حداکثرسازی تولید محصولات دارویی و صنعتی یک چالش مهم است. مهندسی متابولیک به‌وسیله دست‌کاری ژنتیکی، به‌عنوان روشی پیشرفته‌تر از روش‌های سنتی مانند غربالگری جهش‌زایی تصادفی و انتخاب سویه مناسب، با استفاده از ابزارهایی مانند مدل‌سازی متابولیکی امکان شبیه‌سازی دقیق ساختار و عملکرد شبکه‌های متابولیکی را فراهم می‌آورد. این ابزارها به پیش‌بینی تغییرات ژنتیکی موردنیاز برای بهینه‌سازی تولید کمک کرده و

¹ HDAC Inhibitor

فرآیندهای تولید را کارآمدتر و مقرون به صرفه تر می سازند (Rangel et al., 2020; Park et al., 2009; Simeonidis & Price, 2015).

مدل سازی متابولیکی به ابزاری قدرتمند و مقرون به صرفه در مهندسی متابولیک برای طراحی و بهینه سازی سویه های میکروبی تبدیل شده است. این روش از مدل های متابولیکی ژنوم-مقیاس^۱ (GMMs) برای پیش بینی تغییرات ژنتیکی مؤثر بر تولید ترکیبات هدف استفاده می کند. تحلیل موازنه شار^۲ (FBA) به عنوان یکی از رایج ترین روش های محدودیت-محور در این حوزه، از مدل های متابولیکی برای شبیه سازی توزیع بهینه شارها در شبکه متابولیکی تحت محدودیت های معین استفاده کرده و امکان پیش بینی پاسخ سلول به مداخلات ژنتیکی را فراهم می سازد (Curran et al., 2011; Kim et al., 2014).

الگوریتم های تحلیل مبتنی بر محدودیت ها (COBRA^۳) مانند OptForce، OptKnock، FSEOF، مداخلات و تغییرات ژنتیکی بالقوه را شناسایی کرده و اهداف بهینه سازی تولید متابولیت های هدف را تعیین می کنند (Feist et al., 2010b). الگوریتم OptForce تغییرات شار متابولیکی مورد نیاز برای دستیابی به تولید بیشینه متابولیت های هدف را طبقه بندی و تمامی مداخلات ممکن را برای دستیابی به این اهداف شناسایی می کند (Ranganathan et al., 2010). از سوی دیگر، FSEOF^۴ واکنش های کلیدی را که افزایش شار آنها به طور مستقیم یا غیرمستقیم منجر به بهبود تولید محصول هدف می شود، شناسایی می کند (Hyung Jin Choi et al., 2010). همبند سازی رشد با تولید محصول متابولیکی مطلوب، یکی از رویکردهای نوآورانه این حوزه، تولید متابولیت هدف را به رشد سلولی مرتبط و پایداری سویه های مهندسی شده را تضمین می کند. این روش ها علاوه بر بهبود بهره وری، محدودیت های روش های مبتنی بر آزمون و خطا در آزمایشگاه را کاهش داده و تولید ترکیبات ارزشمند زیستی را ارتقا می دهند (Alter & Ebert, 2019). این پژوهش به دنبال آن است که با بررسی هر دو رویکرد مذکور (تغییردهنده های اپی ژنتیکی و مهندسی ژنتیکی مبتنی بر زیست شناسی سامانه ای محاسباتی)، یک راهبرد جامع برای بهینه سازی تولید پیش سازهای ترپن ها در مخمر ساکارومایسس سرویزیه ایجاد کند.

مواد و روش ها

سویه مخمر و محیط کشت: سویه ATCC® 9763 از مخمر ساکارومایسس سرویزیه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد رشد داده شد. پس از آن که سلول ها به فاز نمایی میانی رسیدند ($OD_{660nm} = 1.0$)، ۵۰ میکرولیتر از کشت اولیه به عنوان مایه

¹ Genome-scale Metabolic Models

² Flux Balance Analysis

³ Constraint-Based Optimization and Reconstruction Analysis

⁴ Flux Scanning based on Enforced Objective Function

تلقیح ۵۰ میلی‌لیتر محیط YEPD^۱ غنی‌شده با تیمارهای ۵۰ میکرومولار آزاسیتیدین^۲، ۲۵ میلی‌مولار سدیم بوتیرات^۳ کشت گردید و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۰۰ در دقیقه انکوبه شدند. برای اندازه‌گیری و تعیین مراحل رشد، هر ۶ ساعت چگالی نوری (OD) سلول‌های کشت‌شده با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. تعیین غلظت مورد استفاده برای هر تیمار، بر اساس نتایج آزمون حداقل غلظت بازدارنده انجام شد.

جمع آوری سلول‌ها و خاموش کردن متابولیسم: برای خاموش کردن سریع متابولیسم سلولی، ۴۰ میلی‌لیتر متانول ۶۰ درصد سرد (۴۸-درجه سانتی‌گراد) به ۱۰ میلی‌لیتر از کشت سلولی (معادل ۱۰ میلی‌گرم وزن خشک سلول) اضافه شد. نمونه‌ها به سرعت سه بار وارونه شد تا از چسبیدن کشت به سطح داخلی لوله سانتریفیوژ جلوگیری شود. سپس سلول‌ها با سانتریفیوژ در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه با دور $4000 \times g$ رسوب داده شدند. مایع رویی ترکیبی از محیط کشت و محلول خاموش‌سازی به سرعت دور ریخته شد. این فرآیند برای ۳۰ ثانیه دیگر تکرار شد تا مایع رویی به طور کامل حذف شود. رسوب سلولی حاصل در نیتروژن مایع فریز شد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج متابولیت‌ها: رسوب سلولی با استفاده از تکنیک فریز-ذوب با محلول متانول/کلروفرم برای استخراج متابولیت‌های قطبی و غیرقطبی درونی، مطابق با روش توصیف شده انجام شد (Dunn & Winder, 2011). به طور خلاصه ابتدا سه محلول تهیه شد: محلول ۱ (۸۰ درصد متانول، ۲۰ درصد آب)، محلول ۲ (کلروفرم ۱۰۰ درصد) و محلول ۳ (آب). سپس رسوب سلولی با ۴۰۰ میکرولیتر از محلول ۱ مخلوط شد و روی یخ خشک قرار داده شد. در مرحله بعد سوسپانسیون تهیه شده با ۲۵۰ میکرولیتر از محلول ۱ و ۶۰۰ میکرولیتر از محلول ۲ ترکیب شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه همگن شد. این مخلوط تحت چهار چرخه فریز-ذوب قرار گرفت که هر چرخه شامل غوطه‌وری در نیتروژن مایع به مدت ۱ دقیقه و سپس ذوب شدن روی یخ خشک و همگن کردن به مدت ۳۰ ثانیه بود. پس از تکمیل چرخه‌های فریز-ذوب، مخلوط در دمای ۹- درجه سانتی‌گراد و دور g $\times 13000$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مخلوط روی یخ خشک نگهداری شد و ۳۵۰ میکرولیتر از محلول ۳ به آن اضافه گردید. مخلوط به مدت ۳۰ ثانیه دیگر همگن شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور g $\times 13000$ در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. لایه بالایی حاصل (استخراج متانول/آب) و لایه پایینی (استخراج کلروفرم) با دقت به لوله‌های جداگانه منتقل شدند. حلال تبخیر و نمونه خشک گردید.

کروماتوگرافی مایع - طیف‌سنجی جرمی متوالی^۴: جهت اندازه‌گیری غلظت متابولیت‌های کلیدی مسیر موالونات، نمونه‌ها، در مخلوط ۱:۱ استونیتریل-آب حل شده و سپس در حجم ۵ میکرولیتر به دستگاه کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی Agilent 6495 Triple Quadrupole تزریق شدند. جداسازی ترکیبات بر روی یک ستون ZIC-HILIC با ابعاد ۱۰۰ ×

¹ Yeast Extract Peptone Dextrose

² 5-Azacitidine

³ Sodium Butyrate

⁴ LC-MS/MS

۲/۱ میلی‌متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتر انجام شد. فاز متحرک متغیر (گرادیان) شامل مخلوطی از استونیتریل و آب حاوی ۰/۱ درصد اسید فرمیک بود. شرایط بهینه برای جداسازی ترکیبات به این صورت تنظیم شد، در ابتدا از مخلوطی حاوی ۹۵ درصد فاز متحرک آلی (استونیتریل) و ۵ درصد فاز متحرک آبی استفاده و پس از آن به تدریج نسبت فاز آلی طی ۱۰ دقیقه تا ۵۰ درصد کاهش یافت. سپس، این نسبت به مدت ۲ دقیقه ثابت نگه داشته شد و نهایتاً در مدت ۳ دقیقه به شرایط اولیه (۹۵ درصد فاز آلی) بازگردانده شد. پس از هر آنالیز، ستون به مدت ۵ دقیقه با فاز متحرک اولیه شستشو داده شد. شناسایی ترکیبات با روش مانیترینگ واکنش چندگانه (MRM) در حالت یون مثبت و با استفاده از منبع یونیزاسیون الکترواسپری (ESI) و به کمک پایگاه اطلاعات Yeast Metabolome Database صورت گرفت. پیش از آنالیز نمونه‌ها، دستگاه با استفاده از مخلوط استاندارد متابولیت‌ها کالیبره شد.

تحلیل آماری: تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شده و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شدند. تحلیل داده‌های آماری، شامل ANOVA، آزمون توکی، مقادیر p تعدیل شده، و تولید نمودارهای جعبه‌ای، با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 8 انجام شد.

مدل‌سازی شبکه متابولیکی و چارچوب محاسباتی: جهت تجزیه و تحلیل و بهینه‌سازی تولید ایزوپنتنیل پیروفسفات (IPP) در ساکارومایسس سرویزیه، از مدل *imm904* (Pereira et al., 2016) به عنوان مدل متابولیکی ژنوم-مقیاس اصلاح شده، استفاده گردید. این مدل شامل شبکه‌ای از تمامی واکنش‌های متابولیکی شناخته شده است که در فرآیندهای مختلف سلولی از جمله متابولیسم کربوهیدرات‌ها و ایزوپرنوئیدها دخالت دارند. مدل مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از COBRA Toolbox در محیط نرم‌افزار متلب برای انجام بهینه‌سازی مبتنی بر محدودیت‌ها و شبیه‌سازی‌های رفتارهای متابولیکی به کار گرفته شد. به منظور حل مسائل برنامه‌ریزی خطی و بهینه‌سازی جریان‌های متابولیکی، از ابزار حل مسایل ریاضی Gurobi استفاده شد.

مرحله اولیه آماده‌سازی مدل و کاهش واکنش‌ها: در ابتدا، برای ساده‌سازی مدل *imm904* (Pereira et al., 2016) شامل ۹۰۵ ژن متابولیکی، ۱۲۲۸ متابولیت و ۱۵۸۰ واکنش بیوشیمیایی) و افزایش دقت شبیه‌سازی‌ها، تعدادی از متابولیت‌ها و واکنش‌های مربوط به مسیرهای متابولیکی مسدود و بدون هدف از مدل حذف شدند. این موارد شامل آن‌های بودند که در مسیرهای متابولیکی فعال نقشی نداشته یا تأثیری بر تولید محصول هدف نداشتند. پس از کاهش و ساده‌سازی مدل (مدل کاهش یافته *imm904* شامل ۶۱۲ ژن متابولیکی، ۶۳۲ متابولیت و ۸۶۰ واکنش بیوشیمیایی)، نسخه کارآمد برای انجام شبیه‌سازی‌ها و تحلیل‌های بعدی آماده گردید.

شبیه‌سازی شرایط رشد هوازی و محدودیت‌های مربوطه: شبیه‌سازی شرایط رشد هوازی با مصرف گلوکز به مدل به عنوان تنها منبع کربن در محیط کشت به منظور تحلیل رفتار شبکه متابولیکی و بهینه‌سازی سنتز همبند-رشد ایزوپنتنیل پیروفسفات

انجام گرفت. محدودیتی برای نرخ مصرف گلوکز برابر با ۱۱/۵ میلی مول بر گرم وزن خشک بر ساعت تعیین گردید و شار مصرفی اکسیژن بدون محدودیت در نظر گرفته شد. بدین ترتیب با توجه به این میزان جذب گلوکز، شار مصرفی اکسیژن خود به خود در میزان متناسب تنظیم شده و محدود کننده رشد نبود. همچنین، برای تأمین نیازهای انرژی پایه سلولی، محدودیتی برای فعالیت‌های زیستی غیر مرتبط با رشد (شار واکنش ATPM) معادل ۱۰ میلی مول بر گرم وزن خشک بر ساعت در نظر گرفته شد (Pereira et al., 2016). این تنظیمات شرایط مشابهی را برای رشد سلولی در محیط‌های آزمایشگاهی فراهم آورده و امکان شبیه‌سازی دقیق فرآیندهای تولیدی در محیط‌های کشت واقعی را فراهم می‌آورد.

بهینه‌سازی محدودیت‌ها و واکنش‌ها: به منظور بهینه‌سازی عملکرد شبکه و افزایش تولید محصول هدف (IPP)، محدودیت‌های بالایی و پایینی شار (جریان) واکنش‌ها به‌طور سیستماتیک از طریق تغییرات در بردارهای حداقل و حداکثر شار بر مبنای ظرفیت شبکه متابولیکی در عبور جریان از هر واکنش (تحلیل تغییرپذیری شار FVA^۱) تعیین شدند (Gudmundsson & Thiele, 2010). این بردارها امکان تنظیم انعطاف‌پذیر محدودیت‌های جریان متابولیکی را فراهم می‌کنند. در این فرآیند، بهینه‌سازی به‌طور گام‌به‌گام و با در نظر گرفتن ویژگی‌های خاص هر واکنش، از جمله محدودیت‌های شار غیرمنفی و حداکثری، صورت پذیرفت. شبیه‌سازی رفتار متابولیکی مدل در مراحل مختلف فرآیند بر مبنای تحلیل موازنه شار و حل مساله برنامه‌ریزی خطی به فرم زیر انجام گرفت (Orth et al., 2010):

$$\max_v C^T v \quad (۱)$$

subject

to:

$$S.v = 0$$

$$v^L \leq v \leq v^U$$

که در آن C نشان‌دهنده یک بردار سطری است که ضرایب (وزن‌های) اختصاص داده شده به هر شار را در یک تابع هدف خطی در نظر گرفته شده، در بر دارد. S ماتریس استوکیومتری واکنش‌ها، v بردار شار واکنش‌ها و v^L و v^U به ترتیب با بردارهایی ستونی هستند که حد پایین و بالا را برای مقادیر شار واکنش‌ها مشخص می‌کنند.

الگوریتم بهینه‌سازی مبتنی بر OptForce و FSEOF: برای انجام بهینه‌سازی عملکرد متابولیکی و افزایش تولید همبند رشد IPP، از الگوریتمی که بر اساس مبانی الگوریتم‌های OptForce و FSEOF طراحی و اقتباس شده بود، استفاده گردید.

¹ Flux Variability Analysis

در این الگوریتم‌ها، به‌طور خاص برای بهینه‌سازی قدرت همبندسازی با رشد تلاش شد تا تولید IPP و رشد سلولی به‌طور هم‌زمان به بهترین و مناسب‌ترین میزان ممکن برسد. در این رویکرد، تابع هدف برای بهینه‌سازی به گونه‌ای تعریف شد که هم تولید زیست‌توده در سطحی قابل قبول حفظ گردد و هم حداقل میزان تولید IPP به بالاترین سطح ممکن نزدیک‌تر شود.

بهینه‌سازی گام‌به‌گام و تحلیل هدف: در گام نخست، با طرح یک مسأله بهینه‌سازی، با در نظر گرفتن ترکیبی خطی از تولید و رشد به‌عنوان تابع هدف، مطلوب‌ترین میزان شارهای تولید IPP و هم‌زمان زیست‌توده biomass_SC5_notrace با تعیین مقادیر بهینه وزن‌ها برای هر شار تعیین گردیدند. سپس توزیع و دامنه تغییرات شارها در مدل‌های سویه مهندسی و وحشی مورد مقایسه قرار گرفتند و واکنش‌های کلیدی با تغییرات قابل توجه به‌عنوان کاندیداهای اولیه تنظیم مشخص شدند.

ارزیابی تعادل تولید زیست‌توده و IPP: در گام پایانی، با در نظر گرفتن ضرایبی برای تنظیم حد بالا و پایین شار واکنش‌های انتخابی و تعیین قدرت همبندی تولید و رشد ($SoGC$)^۱ به عنوان تابع هدف مسأله بهینه‌سازی نهایی، سعی بر آن شد که با تغییر ضرایب تنظیمی^۲ (با کمترین سطح تغییرات مورد نیاز نسبت به حالت وحشی یا میزان حداقلی مجموع ضرایب تنظیمی)، به بهترین توزیع شار که منتج به مطلوب‌ترین میزان شارهای تولید IPP و تولید هم‌زمان زیست‌توده biomass_SC5_notrace می‌شود، برسیم.

$$SoGC = \frac{(product\ yield)^2}{slope} \quad (2)$$

منظور از $slope$ در فرمول بالا، شیب خط اتصال نقطه حداقل نرخ تولید در حداکثر نرخ رشد و نقطه حداکثر رشد در صفر تولید در نمودار محدوده تولید است. برای نمونه در فرمولاسیون مسأله بهینه‌سازی نهایی برای کاهش قابل توجه شار واکنش کاندیدای نوعی که مقادیر حداقل و حداکثر شار آن در مدل متابولیکی سویه مطلوب مثبت است، از رابطه زیر استفاده گردیده است:

$$v^U = v_{max} - \alpha(v_{max} - v_{max}^*) \quad (3)$$

که در آن، v^U حد بالای شار واکنش، v_{max} حداکثر شار آن در مدل سویه وحشی با هدف بهینه‌سازی سنتز زیست‌توده، α ضریب تنظیم شار آن واکنش، و v_{max}^* حداکثر شار آن در مدل سویه مطلوب با هدف ترکیب بهینه تولید و رشد است. در واقع در این فرمولاسیون با داشتن α حد بالای شار واکنش با ضریبی از تفاوت حداکثر شار در دو حالت مطلوب و وحشی تنظیم می‌گردد. برای ارزیابی تعادل بین تولید زیست‌توده و متابولیت مطلوب، تغییرات در تولید IPP مورد بررسی قرار گرفت. تابع هدف نهایی با وزن‌دهی معکوس مقادیر حداکثری IPP و زیست‌توده، کارایی تولید را نرمال‌سازی کرده و جریمه‌هایی^۳ برای انحراف از هدف و یا

¹ Strength of Growth Coupling

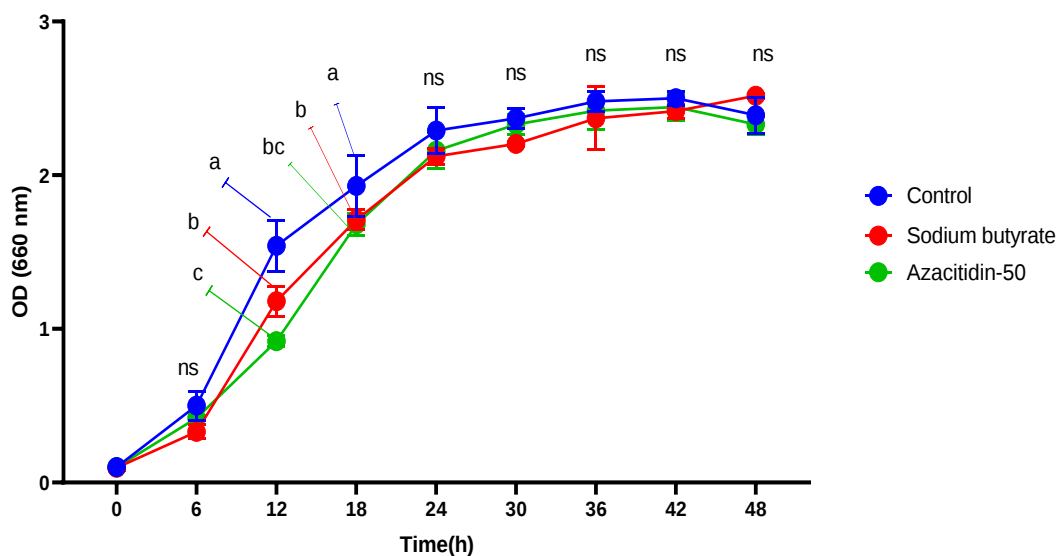
² Regulation Coefficients

³ Penalty parameters

صفر بودن حداقل شار تولیدی (برای تضمین تولید حداقلی) در نظر گرفته شد. در صورت عدم همگرایی، جریمه‌های قابل توجه و معناداری برای انحراف از هدف اعمال گردید.

نتایج

به منظور بررسی پاسخ سلول‌ها به تغییرات اپی‌ژنتیکی، از دو تیمار شیمیایی، آزاسیتیدین و سدیم بوتیرات استفاده گردید. با توجه به اینکه تیمارها در آزمون حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اثرات مهاري وابسته به غلظت نشان دادند، هدف نهایی ما انتخاب غلظت‌هایی از تیمارها بود که اطمینان حاصل شود که چگالی نوری (OD_{660} نانومتر) نمونه‌های تیمار شده تا حد امکان به نمونه‌های شاهد نزدیک باشد. شکل ۱ فازهای رشد را بر اساس چگالی نوری (OD_{660} نانومتر) در طول زمان برای ساکارومایسس سرویزیه تحت کنترل و نمونه‌های تیمار نشان می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهند که ترکیبات آزمایش شده آزاسیتیدین و سدیم بوتیرات در غلظت‌های ۵۰ میکرومولار و ۲۵ میلی‌مولار، بر روی رشد سلول‌های ساکارومایسس سرویزیه فقط در ساعت‌های ۱۲ و ۱۸ اختلاف معنی‌داری با کنترل داشته و در دیگر ساعات تفاوت معنی‌داری نشان داده نشد. از این رو غلظت‌های انتخاب شده کمترین تفاوت را با شرایط کنترل دارند.



شکل ۱. منحنی رشد مخمر ساکارومایسس سرویزیه در شرایط شاهد، تیمار آزاسیتیدین و سدیم بوتیرات

Figure 1. The growth curve of *Saccharomyces cerevisiae* under control, azacitidine, and sodium butyrate treatment conditions

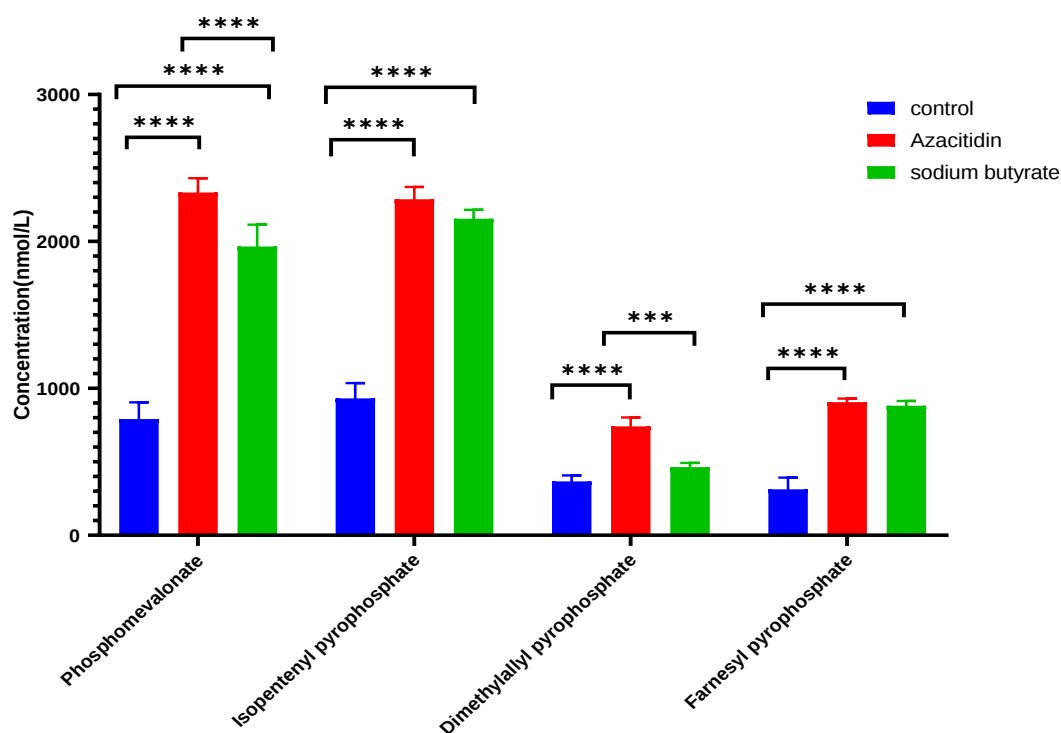
تجزیه و تحلیل اثر تیمارهای اپی‌ژنتیکی آزاسیتیدین و سدیم بوتیرات بر غلظت متابولیت‌های کلیدی مسیر مولونات نشان داد که هر دو تیمار به طور قابل توجهی منجر به افزایش غلظت فسفوموالونات، ایزوپنتنیل پیروفسفات، دی‌متیل آلیل پیروفسفات و

فارنسیل پیروفسفات (FPP) نسبت به گروه شاهد شدند. آزاسیتیدین اثری قوی تر بر افزایش غلظت فسفوموالونات داشت، به طوری که غلظت این متابولیت بیش از ۲/۵ برابر گروه کنترل افزایش یافت. سدیم بوتیرات نیز منجر به افزایش حدود دو برابری این متابولیت شد، اما اثر آن به اندازه آزاسیتیدین قوی نبود. هر دو تیمار آزاسیتیدین و سدیم بوتیرات به طور معناداری غلظت ایزوپنتنیل پیروفسفات را بیش از دو برابر افزایش دادند، اما اختلاف آماری معناداری بین اثر این دو تیمار بر تولید IPP مشاهده نشد. این نشان می دهد که هر دو تیمار تأثیر مشابهی بر تولید IPP دارند (شکل ۲). دی متیل آلایل دی فسفات عمدتاً تحت تأثیر آزاسیتیدین قرار گرفت و غلظت آن به طور قابل توجهی افزایش یافت، در حالی که سدیم بوتیرات تأثیر قابل توجهی بر غلظت این متابولیت نداشت. فارنسیل پیروفسفات نیز در هر دو تیمار به طور معناداری افزایش یافت، اما اختلاف آماری معناداری بین اثر این دو تیمار بر تولید FPP مشاهده نشد (شکل ۲). نتایج این مطالعه نشان می دهد که آزاسیتیدین در افزایش غلظت فسفوموالونات و DMAPP مؤثرتر از سدیم بوتیرات است، در حالی که هر دو تیمار بر تولید IPP و FPP تأثیر مشابهی دارند (شکل ۲). این یافته ها پتانسیل بالای تیمارهای اپی ژنتیکی در تقویت مسیرهای متابولیکی مرتبط با تولید ترپنوئیدها را تأیید می کند و نشان می دهد که آزاسیتیدین و سدیم بوتیرات می توانند به عنوان یک ابزار مؤثر برای بهینه سازی تولید این متابولیت های کلیدی مورد استفاده قرار گیرد.

شناسایی واکنش کلیدی برای بهینه سازی تولید IPP: در این پژوهش، با هدف به حداکثر رساندن تولید محصول IPP و حفظ رشد سلولی در سطحی قابل قبول، با ایجاد حداقل تغییرات در شبکه متابولیکی مخمر، از یک الگوریتم ترکیبی با الهام از OptForce-FSEOF استفاده گردید. شبکه متابولیکی ژنوم-مقیاس *imm904* به منظور بهینه سازی تولید پیش ماده ترپنی در مسیر موالونات مورد بررسی قرار گرفت. مقصود از این تحلیل، شناسایی واکنش هایی بود که تنظیم آن ها می تواند به افزایش تولید IPP منجر شود، درحالی که پایداری شبکه و رشد سلولی نیز حفظ گردد. در مرحله اولیه، ۴۹ واکنش (جدول تکمیلی) به عنوان کاندیدهای مؤثر شناسایی شدند که تغییر و تنظیم شار آن ها امکان بهینه سازی تولید محصول را فراهم می کرد.

بهینه سازی نهایی و انتخاب واکنش کلیدی: پس از بهینه سازی نهایی برای غربالگری واکنش های شناسایی شده و ارزیابی ضرایب تنظیمی، مشخص شد که فقط واکنش AACT1m (تولید استواستیل کوآنزیم A از دو مولکول استیل کوآنزیم A در میتوکندری) تأثیر قابل توجهی بر تولید IPP دارد. این واکنش، با بالاترین ضریب تنظیمی، به عنوان واکنش کلیدی برای کاهش شار یا بیان انتخاب شد. سایر واکنش ها، با ضرایب تنظیمی نزدیک به صفر، تأثیر اندکی بر تولید نشان دادند و از فرآیند انتخاب واکنش های تأثیرگذار حذف شدند. تنظیم شار واکنش AACT1m با کاهش شار آن، باعث بازتخصیص استیل کوآنزیم A به مسیر موالونات شد و بهینه ترین حالت برای تولید IPP فراهم گردید. این تغییر منجر به افزایش تولید IPP به ۷/۱۵ میلی مول بر گرم وزن خشک بر ساعت شد، و نرخ رشد سلولی در سطح ۰/۳۶ گرم وزن خشک بر ساعت حفظ گردید.

¹ Farnesyl Pyrophosphate

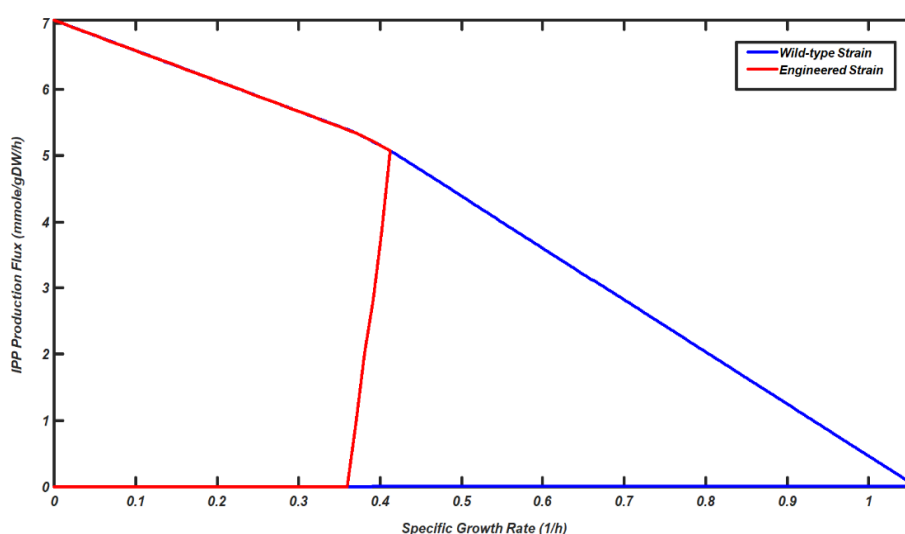


شکل ۲. تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای غلظت متابولیت‌های مسیر موالونات تحت تیمارهای آزاسیتیدین، سدیم بوتیرات و شاهد داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار و در سطوح معنی‌داری آماری *** $p < 0.001$ و **** $p < 0.0001$

Figure 2. Comparative analysis of metabolite concentrations in the mevalonate pathway under azacitidine, sodium butyrate, and control treatments. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (S.D.), with statistical significance levels of * $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$**

شکل ۳ نمودار محدوده شار تولید IPP (محور عمودی) بر حسب شار زیست‌توده (محور افقی) در دو حالت وحشی و مهندسی‌شده را نشان می‌دهد. در سویه مهندسی‌شده (با رنگ قرمز نشان داده شده است)، تولید IPP به‌طور هم‌زمان با افزایش نرخ رشد سلولی افزایش می‌یابد. تولید IPP به‌صورت هم‌بسته با رشد سلولی افزایش یافت. این سویه از یک نرخ رشد حدودی ۰/۳۶ گرم وزن خشک بر ساعت به بالا، رابطه‌ای مثبت و مستقیم بین نرخ رشد و شار تولید IPP نشان داد. در این سویه، حداکثر شار تولید IPP به ۷/۱۵ میلی‌مول بر گرم وزن خشک بر ساعت می‌رسد. این همبستگی نشان‌دهنده باز توزیع بهینه منابع متابولیکی در شبکه مهندسی‌شده است که به‌طور مؤثر مسیرهای متابولیکی را برای حمایت هم‌زمان از رشد و تولید محصول بازطراحی کرده است. در مقابل، در سویه وحشی، برخلاف سویه مهندسی‌شده، هیچ همبستگی میان رشد و تولید مشاهده نمی‌شود. با افزایش نرخ رشد، تولید IPP به‌تدریج کاهش یافته و به صفر نزدیک می‌شود. این موضوع نشان‌دهنده آن است که شبکه متابولیکی سویه وحشی اولویت را به تجمع زیست‌توده داده و تولید پیش‌سازترین را نادیده می‌گیرد. بنابراین، تفاوت‌های قابل‌توجهی میان دو سویه از نظر

همبستگی تولید و رشد مشاهده می‌شود. نمودار محدوده تولید (شکل ۳) همچنین نشان می‌دهد که شیب خط مرز حداقلی تولید در سویه مهندسی‌شده نشان‌دهنده حداقل فلاکس تولید ممکن با نرخ رشد مثبت است. این رابطه تأیید می‌کند که اصلاحات متابولیکی در سویه مهندسی‌شده، شار کربن را به‌طور بهینه به سمت مسیر تولید پیش‌ساز ترپن‌ها هدایت کرده، بدون اینکه بر رشد سلول تأثیر منفی بگذارد. در سویه وحشی، چنین مرزی وجود ندارد، زیرا تولید با رشد همراه نیست. این نتایج تأکید می‌کنند که با تنظیم هدفمند واکنش‌های کلیدی شبکه متابولیکی، می‌توان به حداکثر تولید IPP دست یافت و در عین حال نرخ رشد سلولی را حفظ کرد. این فرآیند بهینه‌سازی در سویه مهندسی‌شده منجر به افزایش تولید محصول هدف درحالی‌که پایداری شبکه حفظ می‌شود، گردید.



شکل ۳. نمودار محدوده تولید در سویه وحشی (آبی رنگ) و مهندسی‌شده (قرمز رنگ)

Figure 3. Production envelope plot for the wild-type strain (blue) and the engineered strain (red)

بحث

این مطالعه، به بررسی دو رویکرد برای افزایش تولید ایزوپنتنیل پیروفسفات، پیش‌ساز کلیدی در سنتز ترپنوئیدها، در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* پرداخته است. رویکردهای مورد استفاده شامل اصلاح و تغییر اپی‌ژنتیکی با آزاسیتیدین، سدیم بوتیرات و مهندسی ژنتیک هدفمند مبتنی بر آنالیز و شبیه‌سازی محاسبات بود. هر دو روش از طریق سازوکارهای عمل متفاوت، منجر به افزایش تولید IPP شدند. تغییردهنده‌های اپی‌ژنتیک، به‌عنوان داروهایی با قابلیت تغییر الگوهای بیان ژنی، هم در درمان سرطان کاربرد دارند و هم به‌عنوان ابزارهای قدرتمندی برای مهندسی متابولیک شناخته می‌شوند. این ترکیبات با هدف قرار دادن تغییرات اپی‌ژنتیکی، مانند متیلاسیون DNA و اصلاحات هیستونی، قادرند بیان ژن‌ها را تنظیم کرده و در نتیجه، مسیرهای بیوشیمیایی و متابولیکی سلول را دستخوش تغییر کنند (Heerboth et al., 2014; Bind et al., 2022). در یک پژوهش که بر روی یکی

از گونه‌های گیاه دارویی مریم‌گلی^۱ انجام گرفت، نشان داده شد که تیمار با آزاسیتیدین منجر به افزایش ۱/۵ تا ۵ برابری تولید تانشینون‌ها^۲، دسته‌ای از دی‌ترپنوئیدها شده است. این افزایش به دلیل دمتیلاسیون ناحیه پروموتور ژن سنتاز دی‌فسفات کوپالیل^۳ (CPS)، آنزیمی کلیدی در بیوسنتز دی‌ترپنوئیدها، بوده است. تحلیل توالی‌یابی نسل جدید (NGS) نشان داد که ۵۱ مورد از ۱۴۵ سیتوزین موجود در ناحیه پروموتور طی تیمار با آزاسیتیدین دمتیله شده‌اند و ۳۶ سایت اتصال احتمالی عوامل رونویسی در این نواحی دمتیله شده شناسایی شده‌اند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که سازوکارهای اپی‌ژنتیکی، به‌ویژه دمتیلاسیون DNA، یک راهبرد مؤثر برای افزایش تولید متابولیت‌های ارزشمند، از جمله ترپنوئیدها، در موجودات مختلف است (Yang et al., 2022). سدیم بوتیرات به‌عنوان یک تغییردهنده اپی‌ژنتیکی دیگر از طریق مهار آنزیم‌های هیستون داستیلاز باعث افزایش استیلاسیون هیستون‌ها می‌شود. این تغییرات اپی‌ژنتیکی منجر به باز شدن کروماتین و افزایش دسترسی عوامل رونویسی به DNA شده که در نتیجه آن بیان ژن‌ها به‌ویژه ژن‌های دخیل در مسیرهای متابولیکی تقویت می‌شود. فراتر از اثرات اپی‌ژنتیکی، این تیمار به‌صورت مستقیم بر مسیرهای متابولیک نیز تأثیر می‌گذارد. پس از ورود به سلول، سدیم بوتیرات به استیل کوآنزیم A متابولیزه می‌شود (Zhang et al., 2021; Leschelle et al., 2000). استیل کوآنزیم A نه تنها یک ورودی ضروری برای این مسیر است، بلکه نقش کلیدی در فرآیندهای مختلف بیوشیمیایی درون سلول دارد. با افزایش در دسترس بودن استیل کوآنزیم A، شار متابولیکی به سمت مسیر مولونات بیشتر شده و در نهایت منجر به افزایش تولید پیش‌سازهای ترپنوئیدی مانند IPP و دی‌متیل‌آلیل پیروفسفات می‌شود (Ku et al., 2020; Pietrocola et al., 2015).

تحلیل نتایج حاصل از آنالیز محاسباتی و شبیه‌سازی با شناسایی واکنش AACT1m، به‌عنوان نقطه‌ای کلیدی برای دست‌کاری ژنتیکی، چارچوبی برای مهندسی هدفمند مسیر متابولیکی مولونات فراهم کرد. این واکنش، که در مسیر تجزیه گلووتاریل کوآنزیم A به استیل کوآنزیم A در میتوکندری نقش دارد (Westover et al., 2001)، به‌عنوان نقطه رقابتی برای مصرف استیل کوآنزیم A شناسایی شد. گلووتاریل کوآنزیم A یک متابولیت واسطه در مسیر تجزیه آمینواسیدهای تریپتوفان و لایزین است (Bhatt et al., 2022) که از طریق مسیرهای چندمرحله‌ای به استیل کوآنزیم A تبدیل می‌شود. واکنش AACT1m به‌طور برگشت‌پذیر عمل می‌کند و در دو جهت، یعنی تولید استیل کوآنزیم A از استواستیل کوآنزیم A و مصرف استیل کوآنزیم A و تبدیل به استواستیل کوآنزیم، فعال است. این واکنش در میتوکندری توسط آنزیم استواستیل کوآنزیم A تیولاز^۴ میتوکندریایی کاتالیز می‌شود (Goudarzi, 2019). و ایزوفرمان آن ERG10 در سیتوپلاسم، کاتالیز این واکنش را که مرحله اول از مسیر مولونات در سیتوپلاسم است، بر عهده دارد (Hiser et al., 1994).

¹ Salvia Miltiorrhiza

² Tanshinones

³ Copalyl Diphosphate Synthase

⁴ Acetoacetyl-CoA thiolase

تحلیل‌ها نشان دادند که کاهش شار واکنش AACT1m در جهت مصرف استیل‌کوآنزیم A و تبدیل آن به استواسیل‌کوآنزیم A، به‌عنوان راهبرد هدفمند، جریان متابولیت‌ها را به سمت مسیر مولونات هدایت می‌کند و در نتیجه تولید ایزوپنتیل پیروفسفات را افزایش می‌دهد. این کاهش در مصرف استیل‌کوآنزیم A منجر به افزایش ذخایر آن در میتوکندری می‌شود. از آنجا که این متابولیت نمی‌تواند به‌طور مستقیم از میتوکندری به سیتوپلاسم منتقل شود، ابتدا به سترات تبدیل شده و سپس توسط آنزیم ATP سترات لیاز^۱ به استیل‌کوآنزیم A و اگزالواتات در سیتوپلاسم بازسازی می‌شود (Dolce et al., 2014; Orsó & Burkhardt, 2020).

این فرآیند افزایش منابع استیل‌کوآنزیم A در سیتوزول را تسهیل می‌کند که به‌عنوان متابولیت ورودی مسیر مولونات عمل می‌کند. افزایش ذخایر استیل‌کوآنزیم A، تولید پیش‌سازهای ترپنی مانند IPP را تقویت می‌کند. نتایج مطالعه نشان داد که کاهش شار AACT1m نه تنها تولید IPP را افزایش می‌دهد، بلکه نرخ رشد سلولی را در سطح قابل قبول حفظ می‌کند، بدون اینکه اختلالی در رشد سلولی ایجاد شود. تغییرات اپی‌ژنتیکی با استفاده از تغییردهنده‌های اپی‌ژنتیکی می‌تواند به‌طور گسترده‌ای بیان ژن‌ها را افزایش دهد، اما این فرآیند معمولاً به‌صورت غیرهدفمند و با کنترل محدود انجام می‌شود. این عدم دقت ممکن است منجر به فعال‌سازی مسیرهایی شود که به‌طور مستقیم به تولید متابولیت موردنظر کمک نمی‌کنند و حتی در برخی موارد ممکن است تأثیرات منفی بر کارایی شبکه متابولیکی داشته باشد، اگرچه این محدودیت در روش‌های اپی‌ژنتیکی را می‌توان با بهره‌گیری از ابزارهای پیشرفته ویرایش ژنومی نظیر سیستم‌های کریسپر^۲ برطرف کرد. در مقابل، مهندسی ژنتیک هدفمند با تمرکز بر انجام تغییرات خاص در واکنش‌های کلیدی مسیرهای متابولیکی، امکان تنظیم دقیق‌تر جریان متابولیت‌ها به سمت محصول هدف را فراهم می‌کند (Kang et al., 2019). ترکیب این دو رویکرد می‌تواند مزایای هر دو روش را تقویت کرده و تعادلی میان افزایش تولید و حفظ پایداری شبکه متابولیکی ایجاد کند.

استفاده از روش‌های ترکیبی، به‌ویژه برای بهینه‌سازی تولید ترپنوئیدها در مقیاس صنعتی می‌تواند پتانسیل تولید را افزایش دهد. این رویکرد ترکیبی، با افزایش بیان ژن‌های کلیدی در شبکه متابولیکی و کاهش رقابت برای منابع، بهینه‌سازی تولید را ممکن می‌سازد. علاوه‌براین، با استفاده از مدل‌سازی محاسباتی، می‌توان اثرات تغییرات اپی‌ژنتیکی را شبیه‌سازی کرده و غلظت بهینه و زمان‌بندی مناسب برای تیمارها را تعیین نمود. این امر به درک دقیق‌تر از چگونگی تأثیر تنظیمات اپی‌ژنتیکی بر کل شبکه متابولیکی کمک می‌کند. همچنین، مدل‌سازی می‌تواند در شناسایی ژن‌های جدیدی که می‌توانند اهداف مناسبی برای تغییرات اپی‌ژنتیکی باشند، مؤثر واقع شود.

نتیجه‌گیری: تیمارهای آزاسیتیدین و سدیم بوتیرات با سازوکارهای متفاوت، نظیر دمتیلاسیون DNA و مهار آنزیم‌های HDAC، توانستند بیان ژن‌های دخیل در مسیر مولونات را بهبود دهند و منابع متابولیکی را به سمت تولید IPP هدایت کنند. از

¹ ATP-citrate lyase

² CRISPR/Cas9

سوی دیگر، شبیه‌سازی‌های محاسباتی و کاهش شار واکنش ACAct1m توانستند تولید IPP را با حفظ نرخ رشد سلولی در سطح قابل قبول بهینه‌سازی کنند. ترکیب این دو رویکرد با استفاده هم‌زمان از ابزارهای تغییردهنده سطح اپی‌ژنتیکی و مهندسی ژنتیک هدفمند می‌تواند به‌طور مؤثری تولید متابولیت‌های ارزشمند را افزایش دهد و تعادلی میان افزایش تولید و حفظ پایداری شبکه متابولیکی ایجاد کند. این روش، راهکار امیدوارکننده‌ای برای بهینه‌سازی تولید ترپنوئیدها در مقیاس صنعتی ارائه می‌دهد و می‌تواند مبنای توسعه رویکردهای نوین در بیوتکنولوژی صنعتی باشد. در نهایت، تحقیقات بعدی می‌توانند با بررسی بیشتر غلظت و زمان‌بندی تیمارهای اپی‌ژنتیکی و بهبود مدل‌های محاسباتی، ظرفیت بهینه‌سازی این سیستم‌ها را گسترش دهند.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شیراز به جهت همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

- Alavi, M., Mozafari, M. R., Ghaemi, S., Ashengroph, M., Hasanzadeh Davarani, F., & Mohammadabadi, M. (2022). Interaction of epigallocatechin gallate and quercetin with spike glycoprotein (S-Glycoprotein) of SARS-CoV-2: In silico study. *Biomedicines*, 10(12), 3074. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123074>.
- Alter, T. B., & Ebert, B. E. (2019). Determination of growth-coupling strategies and their underlying principles. *BMC Bioinformatics*, 20(1), 447. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2946-7>.
- Amiri Roudbar, M., Mohammadabadi, M. R., Ayatollahi Mehrgardi, A., Abdollahi-Arpanahi, R., Momen, M., Morota, G., Brito Lopes, F., Gianola, D., & Rosa, G. J. M. (2020). Integration of single nucleotide variants and whole-genome DNA methylation profiles for classification of rheumatoid arthritis cases from controls. *Heredity*, 124(5), 658–674. <https://doi.org/10.1038/s41437-020-0301-4>
- Barazandeh, A., Mohammadabadi, M. R., Ghaderi-Zefrehei, M., & Nezamabadi-Pour, H. (2016). Genome-wide analysis of CpG islands in some livestock genomes and their relationship with genomic features. *Czech Journal of Animal Science*, 61(11), 487–495. <https://doi.org/10.17221/78/2015-CJAS>
- Bhatt, D. P., Mills, C. A., Anderson, K. A., Henriques, B. J., Lucas, T. G., Francisco, S., Liu, J., Ilkayeva, O. R., Adams, A. E., Kulkarni, S. R., Backos, D. S., Major, M. B., Grimsrud, P. A., Gomes, C. M., & Hirschey, M. D. (2022). Deglutarylation of glutaryl-CoA dehydrogenase by deacylating enzyme SIRT5 promotes lysine oxidation in mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 298(4), 101723. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101723>
- Bind, S., Bind, S., Sharma, A. K., & Chaturvedi, P. (2022). Epigenetic modification: A key tool for secondary metabolite production in microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 13, 784109. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.784109>
- Bordbar, F., Mohammadabadi, M., Jensen, J., Xu, L., Li, J., & Zhang, L. (2022). Identification of candidate genes regulating carcass depth and hind leg circumference in Simmental beef cattle using Illumina Bovine Beadchip and next-generation sequencing analyses. *Animals (Basel)*, 12(9), 1103. <https://doi.org/10.3390/ani12091103>

- Borodina, I., & Nielsen, J. (2014). Advances in metabolic engineering of yeast *Saccharomyces cerevisiae* for production of chemicals. *Biotechnology Journal*, 9(5), 609–620. <https://doi.org/10.1002/biot.201300445>
- Choi, H. S., Lee, S. Y., Kim, T. Y., & Woo, H. M. (2010). In silico identification of gene amplification targets for improvement of lycopene production. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(10), 3097–3105. <https://doi.org/10.1128/AEM.00115-10>
- Curran, K. A., Crook, N. C., & Alper, H. S. (2012). Using flux balance analysis to guide microbial metabolic engineering. *Methods in Molecular Biology*, 834, 197–216. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-483-4_13
- Dolce, V., Cappello, A. R., & Capobianco, L. (2014). Mitochondrial tricarboxylate and dicarboxylate-tricarboxylate carriers: from animals to plants. *IUBMB life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology)*, 66(7), 462–471. <https://doi.org/10.1002/iub.1290>
- Dunn, W. B., & Winder, C. L. (2011). Sample preparation related to the intracellular metabolome of yeast methods for quenching, extraction, and metabolite quantitation. *Methods in Enzymology*, 500, 277–297. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385118-5.00015-3>
- Feist, A. M., Zielinski, D. C., Orth, J. D., Schellenberger, J., Herrgard, M. J., & Palsson, B. Ø. (2010). Model-driven evaluation of the production potential for growth-coupled products of *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 12(3), 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2009.10.003>
- Goudarzi A. (2019). The recent insights into the function of ACAT1: A possible anti-cancer therapeutic target. *Life sciences*, 232, 116592. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116592>
- Gudmundsson, S., & Thiele, I. (2010). Computationally efficient flux variability analysis. *BMC Bioinformatics*, 11, 489. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-489>
- Heerboth, S., Lapinska, K., Snyder, N., Leary, M., Rollinson, S., & Sarkar, S. (2014). Use of epigenetic drugs in disease: An overview. *Genetics & Epigenetics*, 6, 9–19. <https://doi.org/10.4137/GEG.S12270>
- Heidarpour, F., Mohammadabadi, M. R., Zaidul, I. S. M., Maherani, B., Saari, N., Hamid, A. A., Abas, F., Manap, M. Y. A., Mozafari, M. R. (2011). Use of prebiotics in oral delivery of bioactive compounds: a nanotechnology perspective. *Die Pharmazie* 66(5), 319-324. <http://dx.doi.org/10.1691/ph.2011.0279>
- Hiser, L., Basson, M. E., & Rine, J. (1994). ERG10 from *Saccharomyces cerevisiae* encodes acetoacetyl-CoA thiolase. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(50), 31383–31389. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)31705-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)31705-8)
- Kang, J. G., Park, J. S., Ko, J. H., & Kim, Y. S. (2019). Regulation of gene expression by altered promoter methylation using a CRISPR/Cas9-mediated epigenetic editing system. *Scientific Reports*, 9(1), 11960. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48130-3>
- Khabiri, A., Toroghi, R., Mohammadabadi, M., & Tabatabaeizadeh, S. E. (2023). Introduction of a Newcastle disease virus challenge strain (sub-genotype VII.1.1) isolated in Iran. *Veterinary Research Forum*, 14(4), e221. <https://doi.org/10.30466/vrf.2022.548152.3373>
- Kim, B., Kim, W. J., Kim, D. I., & Lee, S. Y. (2015). Applications of genome-scale metabolic network model in metabolic engineering. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(3), 339–348. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1554-9>

- Ku, J. T., Chen, A. Y., & Lan, E. I. (2020). Metabolic engineering design strategies for increasing acetyl-CoA flux. *Metabolites*, 10(4), 166. <https://doi.org/10.3390/metabo10040166>
- Lechner, A., Brunk, E., & Keasling, J. D. (2016). The need for integrated approaches in metabolic engineering. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(11), a023903. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023903>
- Leschelle, X., Delpal, S., Goubert, M., Blottière, H. M., & Blachier, F. (2000). Butyrate metabolism upstream and downstream acetyl-CoA synthesis and growth control of human colon carcinoma cells. *European Journal of Biochemistry*, 267(21), 6435–6442. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01731.x>
- Liao, P., Hemmerlin, A., Bach, T. J., & Chye, M. L. (2016). The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production. *Biotechnology Advances*, 34(5), 697–713. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.03.005>
- Ma, Y., Zu, Y., Huang, S., & Stephanopoulos, G. (2023). Engineering a universal and efficient platform for terpenoid synthesis in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(1), e2207680120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2207680120>
- Mohammadabadi, M., Babenko, I. O., Borshch, O., Kalashnyk, O., Ievstafiieva, Y., & Buchkovska, V. (2024). Measuring the relative expression pattern of the UCP2 gene in different tissues of the Raini Cashmere goat. *Agricultural Biotechnology Journal*, 16(3), 317–332. <https://doi.org/10.22103/jab.2024.24337.1627>
- Mukherjee, M., Blair, R. H., & Wang, Z. Q. (2022). Machine-learning guided elucidation of contribution of individual steps in the mevalonate pathway and construction of a yeast platform strain for terpenoid production. *Metabolic Engineering*, 74, 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2022.10.004>
- Nielsen, J., Larsson, C., van Maris, A., & Pronk, J. (2013). Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(3), 398–404. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.03.023>
- Olano, C., Lombó, F., Méndez, C., & Salas, J. A. (2008). Improving production of bioactive secondary metabolites in actinomycetes by metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, 10(5), 281–292. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2008.07.001>
- Orsó, E., & Burkhardt, R. (2020). ATP-citrate lyase: A driver of metabolism and histone acetylation. *Current Opinion in Lipidology*, 31(6), 362–363. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000719>
- Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). What is flux balance analysis?. *Nature Biotechnology*, 28(3), 245–248. <https://doi.org/10.1038/nbt.1614>
- Park, J. M., Kim, T. Y., & Lee, S. Y. (2009). Constraints-based genome-scale metabolic simulation for systems metabolic engineering. *Biotechnology Advances*, 27(6), 979–988. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.05.019>
- Pereira, R., Nielsen, J., & Rocha, I. (2016). Improving the flux distributions simulated with genome-scale metabolic models of *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering Communications*, 3, 153–163. <https://doi.org/10.1016/j.meten.2016.05.002>
- Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Madeo, F., & Kroemer, G. (2015). Acetyl coenzyme A: A central metabolite and second messenger. *Cell Metabolism*, 21(6), 805–821. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.014>

- Ranganathan, S., Suthers, P. F., & Maranas, C. D. (2010). OptForce: an optimization procedure for identifying all genetic manipulations leading to targeted overproductions. *PLoS Computational Biology*, 6(4), e1000744. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000744>
- Rangel, A. T., Gomez Ramirez, J. M., Gonzalez Barrios, A. F. (2020) From industrial by-products to value-added compounds: the design of efficient microbial cell factories by coupling systems metabolic engineering and bioprocesses. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 14(6) 1228–1238. <https://doi.org/10.1002/bbb.2127>
- Safaei, S. M. H., Dadpasand, M., Mohammadabadi, M., Atashi, H., Stavetska, R., Klopenko, N., & Kalashnyk, O. (2022). An *Origanum majorana* leaf diet influences *Myogenin* gene expression, performance, and carcass characteristics in lambs. *Animals (Basel)*, 13(1), 14. <https://doi.org/10.3390/ani13010014>
- da Silva, T. L., Gouveia, L., & Reis, A. (2014). Integrated microbial processes for biofuels and high value-added products: The way to improve the cost effectiveness of biofuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(3), 1043–1053. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5389-5>
- Simeonidis, E., & Price, N. D. (2015). Genome-scale modeling for metabolic engineering. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(3), 327–338. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1576-3>
- Tomm, H. A., Ucciferri, L., & Ross, A. C. (2019). Advances in microbial culturing conditions to activate silent biosynthetic gene clusters for novel metabolite production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 46(9-10), 1381–1400. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02198-y>
- Westover, J. B., Goodman, S. I., & Freyman, F. E. (2001). Binding, hydration, and decarboxylation of the reaction intermediate glutaconyl-coenzyme A by human glutaryl-CoA dehydrogenase. *Biochemistry*, 40(46), 14106–14114. <https://doi.org/10.1021/bi015637p>
- Williams, R. B., Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Lee, A. E., & Cichewicz, R. H. (2008). Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 6(11), 1895–1897. <https://doi.org/10.1039/b804701d>
- Xue, M., Hou, X., Fu, J., Zhang, J., Wang, J., Zhao, Z., Xu, D., Lai, D., & Zhou, L. (2023). Recent advances in search of bioactive secondary metabolites from fungi triggered by chemical epigenetic modifiers. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 9(2), 172. <https://doi.org/10.3390/jof9020172>
- Yang, B. C., Lee, M. S., Lin, M. K., & Chang, W. T. (2022). 5-Azacytidine increases tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots through epigenetic modulation. *Scientific Reports*, 12(1), 9349. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12577-8>
- Zhang, L., Liu, C., Jiang, Q., & Yin, Y. (2021). Butyrate in energy metabolism: There is still more to learn. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 32(3), 159–169. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.12.003>