Biological Journal of Microorganism
Year 11, No.43, Autumn 2022
Received: 2021-08-30
Accepted: 2022-01-18

(Research Paper)

Improving Ethanol Tolerance in Industrial Yeast Strain by a Combination of Mutation and Evolutionary Engineering

Fatemeh Sheikhi
Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran- Industrial group. Sugarcane Training and Research Institute, Ahvaz. Iran, f.sheikhi@irost.ir
Khosrow Rostami
Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran, rostami@irost.ir
Mehrdad Azin*
Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran, azin@irost.ir
Mohammad-Ali Asadollahi
Department of Biotechnology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran, ma.asadollahi@ast.ui.ac.ir
Mansour Ebrahimi
Bioinformatics Research Group, Green Research Center, University of Qom, Qom, Iran, mansour@future.org
Payam Ghiaci
Swedish National Research Institute, Gutenberg, Sweden, payam.ghiaci@gu.se

Abstract

Introduction: Tolerance to ethanol is a key characteristic of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Any increase in ethanol tolerance in the industrial strains could lead to faster and more complete fermentations, and may also allow the production of more alcohol. Due to the complex nature of ethanol tolerance, it appears that a large increase in ethanol tolerance requires several changes in the yeast's genome. Several approaches that rely on the effect of (random) variation generated by evolutionary engineering or mutagenesis have successfully yielded strains with increased ethanol tolerance.

*Corresponding Author

2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)

10.22108/BJM.2022.130167.1411

20.1001.1.23225173.1401.11.43.3.4

Materials and Methods: In the present study, to improve the ethanol tolerance phenotype in the industrial Ethanol Red strain, the parent strain was mutated physically and chemically. The mutants were screened using 1-butanol containing medium. The primary parent and the mutants were evolved within 144 days with evolutionary engineering strategy, while ethanol production of the selected strains was investigated

Results: According to the increase in the maximum growth rate, 8 strains were selected including parental strain and mutants, and the amounts of ethanol production of these strains were evaluated after evolutionary adaptation tests. Ethanol production of ER 103 and ER 106 which were mutated with EMS before the adaptive evolution test and then evolved at 11 and 9% v/v ethanol was improved from 103.44 ± 0.5 g/L to 112.45 ± 1 and 112.3 ± 0.9 g/L, respectively.

Discussion and Conclusion: Due to the extensive capabilities of the evolutionary engineering method in creating capable strains in order to increase ethanol tolerance in industrial strains, the evolutionary engineering strategy was used. To increase the genetic diversity of the primary population, before starting the adaptive evolution experiments, mutation with ethyl methane sulfonate was used, which was more efficient than ultraviolet radiation in accelerating the evolution process to achieve the desired phenotype.

Key words: Ethanol Tolerance, Mutation, Ethanol Red, Evolutionary Engineering

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال یازدهم، شماره ۴۳، پاییز ۱۴۰۱ ، صفحه ۱۳ – ۲۸
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۸ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۸

مقاله پژوهشی

بهبود تحمل به اتانول سویهٔ صنعتی مخمر با ترکیبی از جهش‌زایی و مهندسی تکاملی

فاطمه شیخی: دانشجوی دکتری پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران- گروه صنعت، موسسهٔ تحقیقات و آموزش توسعهٔ نیشکر و صنایع، اهواز، ایران، f.sheikhi@irost.ir
خسرو رستمی: دانشیار پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران، rostami@irost.ir
مهرداد آذین*: استاد پژوهشکدهٔ زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران- مجتمع تحقیقاتی عصر انقلاب- تهران- ایران، azin@irost.ir
محمدعلی اسدالهی: استادیار گروه زیست‌فناوری، دانشکدهٔ علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران، ma.asadollahi@ast.ui.ac.ir
منصور ابراهیمی: استاد گروه بیوانفورماتیک، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه قم، قم، ایران، mansour@future.org
پیام غیاثی: استادیار موسسهٔ ملی تحقیقات سوئد، گوتنبرگ، سوئد، payam.ghiaci@gu.se

چکیده

مقدمه: تحمل در برابر اتانول یکی از ویژگی‌های شاخص *ساکارومایسس سرویزیه* است. افزایش بیشتر تحمل در برابر اتانول در سویه‌های صنعتی مخمر می‌تواند به تخمیر سریع‌تر، کامل‌تر و افزایش تولید اتانول منجر شود. با ماهیت پیچیدهٔ صفت تحمل اتانول، به نظر می‌رسد افزایش تحمل اتانول به تغییر چندین ژن مخمر بستگی دارد. روش‌های مختلفی که به تأثیر تغییرات (تصادفی) تولیدشده توسط مهندسی تکامل یا جهش‌زایی تکیه می‌کنند، با افزایش تحمل اتانول، ایجاد سویه‌های کارآمد را درپی دارند.

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)

10.22108/BJM.2022.130167.1411
20.1001.1.23225173.1401.11.43.3.4

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر برای بهبود فنوتیپ تحمل اتانول، سویهٔ Ethanol Red که یک سویهٔ صنعتی است، به دو روش فیزیکی و شیمیایی جهش داده شد و جدایه‌های جهش‌یافته با استفاده از محیط حاوی ۱- بوتانل غربال شدند. جهش‌یافته‌ها همراه با سویهٔ والد اولیه طی ۱۴۴ روز با راهبرد مهندسی تکاملی با الکل خو داده شدند و میزان تولید اتانول در سویه‌های منتخب بررسی شد.

نتایج: بعد از آزمون‌های تکامل تطبیقی، با توجه به افزایش حداکثر نرخ ویژه رشد، ۸ سویه شامل سویهٔ والدی و جهش‌یافته‌ها انتخاب شدند و میزان تولید اتانول آنها بررسی شد. میزان تولید اتانول دو سویهٔ ER ۱۰۳ و ER ۱۰۶ که قبل از انجام آزمون تکامل تطبیقی با اتیل متان سولفونات جهش یافته و سپس به‌ترتیب در غلظت ۱۱ و ۹ درصد (حجم در حجم) اتانول تکامل یافته بودند، به‌ترتیب به ۱±۱۱۲/۴۵ و ۰/۹±۱۱۲/۳ گرم در لیتر رسید؛ درحالی‌که این مقدار برای سویهٔ والد ۰/۵±۱۰۳/۴۴ گرم در لیتر بود.

بحث و نتیجه‌گیری: از راهبرد مهندسی تکاملی در ایجاد سویه‌های توانمند با هدف افزایش تحمل به اتانول در سویه‌های صنعتی به‌دلیل قابلیت‌های بالای آن استفاده شد. برای افزایش تنوع ژنتیکی جمعیت اولیه، قبل از شروع فرایند تکامل تطبیقی، از جهش‌زایی با اتیل متان سولفونات استفاده شد که در سرعت‌بخشیدن به روند تکامل برای دستیابی به بهبود فنوتیپ مدنظر کارآمدتر از اشعه فرابنفش عمل کرد.

واژه‌های کلیدی: تحمل به اتانول، جهش‌زایی، Ethanol Red، مهندسی تکاملی

مقدمه

هزاران سال است که از مخمرها برای تهیه غذاهای تخمیرشده و نوشیدنی‌ها مانند نان، آبجو و شراب استفاده می‌شود؛ با این حال، انتخاب یک نوع یا گونهٔ مخمر خاص برای یک کاربرد صنعتی خاص اغلب براساس داده‌های علمی است و نه مستندات تاریخی که از گذشته به جای مانده است (۱). تولید محصولات زیست‌فناورانه نوین، مانند تولید سوخت‌های زیستی، مخمر را با محیط‌ها و چالش‌هایی روبه‌رو می‌کند که با آنچه در تخمیر غذاهای سنتی مشاهده می‌شود، متفاوت است (۲). ایمنی محیط زیست و تأمین انرژی مهم‌ترین نگرانی در سناریوی کنونی جهان است که در آن تقاضا برای انرژی به‌دلیل افزایش مداوم جمعیت و کیفیت زندگی به‌طور چشمگیری رو به افزایش است. در مقایسه با تمام سوخت‌های زیستی تجدیدپذیر و در دسترس، اتانول زیستی یکی از امیدوارکننده‌ترین گزینه‌های سوخت زیستی است و این امکان را دارد که با جایگزینی بنزین و سوخت‌های فسیلی، بخشی از انرژی مورد نیاز در دنیا را فراهم کند (۳).

اتانول زیستی ازنظر حجمی و اقتصادی یک محصول استراتژیک در حوزهٔ زیست‌فناوری است. امروزه حجم الکل تخمیری تولیدشده در سراسر جهان بسیار حیرت‌انگیز است؛ به‌طوری‌که سالانه بیش از ۱۰۰ میلیارد لیتر اتانول سوختی و خوراکی تولید می‌شود (۴).

از بین تمام میکروارگانسیم‌ها، مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* به‌عنوان یک میکروارگانسیم[1] GRAS (عموماً بی‌خطر) طبقه‌بندی شده است و قادر به تولید بالاترین میزان اتانول زیستی است. تولید اتانول در طیف وسیعی از

pH و تنش‌های مختلف ازجمله فشار اسمزی، درجه حرارت بالا و غلظت بالای اتانول به‌عنوان محصول فرایند صورت می‌گیرد. پایداری نسبتاً زیاد در شرایط سخت و خشن صنعتی و انعطاف‌پذیری در سازگاری مؤثر برای تخمیرهای در مقیاس بزرگ باعث انتخاب مخمر *ساکاروما یسس سرویزیه* برای طیف وسیعی از فرایندهای صنعتی زیستی ازجمله فرایندهای تولید اتانول تخمیری شده است. این ویژگی‌های خاص باعث کاهش آلودگی و پایین‌آوردن هزینهٔ تقطیر در فرایند تخمیر می‌شود و به همین دلیل استفاده از این مخمر در تولید اتانول زیستی رایج و گسترده است (۵). تولید مقرون‌به‌صرفه اتانول و راندمان بالا، همواره از چالش‌های اصلی این صنعت بوده و هرگونه افزایش در غلظت اتانول تولیدی در طول تخمیر ازنظر کیفیت و ملاحظات اقتصادی مطلوب است. افزایش تولید اتانول طی فرایند به عوامل متعددی وابسته و چگونگی عملکرد و قدرت بقا و حفظ فیزیولوژی سلول مخمر در شرایط تخمیر از عوامل مهم است (۶). ترکیب مواد مغذی محیط تخمیر در فیزیولوژی سلول مخمر از اهمیت حیاتی برخوردار است. عواملی مانند در دسترس بودن مواد معدنی، برای مثال پتاسیم، گوگرد، منیزیم، عناصر کمیاب، ویتامین‌ها (برای مثال، بیوتین، ریبوفلاوین و اسید پانتوتنیک)، فاکتورهای رشد (برای مثال، استرول‌ها و اسیدهای چرب) و همچنین اکسیژن برای رشد سلول‌ها مؤثر است. این عوامل به‌طور چشمگیری بر رشد مخمر، تحمل تنش و بازده تولید اتانول تأثیرگذار هستند (۷)؛ در مقابل، عوامل تنش‌زا بر رشد و متابولیسم مخمر و درنتیجه، کارایی تخمیر الکلی تأثیر منفی می‌گذارند. تنش‌های شایع در فرایند تولید الکل تخمیری را می‌توان به‌صورت تنش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی توصیف کرد. تحمل تنش در مخمر ازنظر ژنتیکی پیچیده است و ژن‌های زیادی را درگیر می‌کند (۸). براساس مطالعات مختلف، در میان این تنش‌ها، اتانول به‌عنوان تنش اصلی، مسئول کاهش تولید اتانول و توقف تخمیر است. به‌دلیل اهمیت زیست‌شناسی، اکولوژیکی و صنعتی، دربارهٔ تحمل اتانول مطالعات زیادی انجام شده است (۹). تجمع اتانول در طول فرایند تخمیر در بیوراکتور و اثر بازدارندگی آن بر رشد اجتناب‌ناپذیر است. اتانول بر فیزیولوژی سلول مخمر به روش‌های مختلف تأثیر می‌گذارد؛ ازجمله می‌توان به تأثیرات مضر آن بر ساختار و عملکرد غشای سلولی مخمر اشاره کرد. اتانول همچنین باعث اختلال در آنزیم‌های مهم مسیر گلیکولیتیک و تولید رادیکال آزاد اکسیژن در مخمر می‌شود. همچنین، اتانول اندوسیتوز سلول را مهار می‌کند، بر فعالیت پمپ‌های هیدروژنی غشاهای داخلی میتوکندریایی تأثیر می‌گذارد و باعث مهار آنزیم‌هایی مانند الکل دهیدروژناز می‌شود. تجمع اتانول بر سیستم انتقال درون سلولی نیز تأثیر می‌گذارد و درنهایت باعث کاهش مقدار اتانول تولیدی می‌شود (۱۰).

مهار متابولیسم، کاهش مصرف سوبسترا توسط مخمر، کاهش رشد، تغییر در ساختار غشا و افزایش نفوذپذیری ازجمله تغییراتی‌اند که اتانول در مخمر ایجاد می‌کند و درنهایت، مرگ سلول مخمر را به دنبال دارد. در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای شناسایی سازوکارهای پاسخ به تنش اتانول انجام شده و باوجود مطالعات وسیع، سازوکار تحمل به اتانول در این مخمر به‌طور کامل شناسایی نشده است. به عبارت دیگر، صفت تحمل در برابر اتانول به شبکهٔ پیچیده‌ای وابسته است که واکنش‌های متقابلی در سطح ژنوم با هم دارند (۱۱). تاکنون مشخص شده است در ارتباط با صفت تحمل به اتانول، ژن‌های متعددی دخیل‌اند که شامل طیف وسیعی

از گروه‌های عملکردی شامل بیوسنتز پروتئین، متابولیسم اسیدآمینه و نوکلئوتید، انتقال، چرخهٔ رشد سلولی و رشد، متابولیسم اسیدهای چرب و ارگوسترول، سازمان‌یابی دیواره سلول و غشا و بیوسنتز پرولین و تریپتوفان است. هرکدام از این ژن‌ها در گروه‌های عملکردی مختلف طبقه‌بندی شده‌اند. تعداد زیادی از این ژن‌ها که عملکرد چندگانه دارند، با هم میانکش می‌دهند. پیچیدگی شبکهٔ پاسخ مخمر طوری است که مسیرها به‌طور مداوم برنامه‌ریزی می‌شوند و این موضوع تعیین سازوکار تحمل اتانول را مشکل کرده است. بسیاری از ژن‌های شناخته‌شده که در تحمل به اتانول نقش دارند، مربوط به ترکیب غشای سلولی‌اند؛ برای مثال، ژن‌های *ETR1*، *OAR1*، *SUR4*، *FEN1* و *HTD2* مربوط به متابولیسم اسیدهای چرب اشباع غشا و ژن‌های *DEP1*، *FEN2*، *UME6*، *HAC1* و *PEX15* مربوط به متابولیسم لیپیدها و اسیدهای چرب هستند (۱۲).

افزایش تحمل به اتانول در مخمرهای صنعتی به تخمیر سریع‌تر و کامل‌تر منجر شده است و همچنین باعث افزایش بازده تولید، کارایی و پایداری سویه در فرایند خواهد شد. سویه‌ها قادر به افزایش زمان عملکرد فرایند تخمیر به مدت طولانی‌تر در حضور اتانول هستند. علاوه بر این، تحقیق بر سویه‌های مقاوم در برابر تنش اتانول نشان داده است این سویه‌ها از قابلیت‌های دیگر مانند مقاومت به سایر عوامل تنش‌زا ازجمله فشار اسمزی و تنش اکسایشی و حرارتی برخوردارند (۱۳).

در مسیر بهبود سویهٔ *ساکارومایسس سرویزیه* برای افزایش تحمل به اتانول، از دو رویکرد مهندسی ژنتیک[۲] و مهندسی تکاملی[۳] می‌توان بهره برد. در هر دو رویکرد، تغییرات اعمال‌شده به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم ازطریق تغییرات ژنتیکی اتفاق می‌افتند و تمام این تغییرات نیازمند درک سطح بالایی از توانمندی سلول در برابر تنش های مدنظر و ژن‌های مؤثر در این صفت فنوتیپی است (۱۴). با وجود این، استفاده از رویکرد مهندسی ژنتیک در توسعه سویهٔ *ساکارومایسس سرویزیه* با محدودیت‌هایی همراه است که به چند مورد می‌توان اشاره کرد:

۱) نیاز به اطلاعات گسترده دربارهٔ ژنتیک و بیوشیمی مسیرهای متابولیک؛ ۲) پیچیدگی پاسخ‌های فیزیولوژیک سلولی (فعال‌کردن بعضی مسیرها باعث مهار برخی دیگر می‌شود که باید بتوان تخمین زد پیامد تغییری که در مسیر متابولیک ایجاد می‌کنیم، چیست؟) و ۳) سخت‌بودن همسانه‌سازی در سویه‌های صنعتی به‌دلیل پیچیدگی ژنتیکی و پلی‌پلوئیدی‌بودن آنها، استفاده از ارگانسیم‌های تغییر شکل یافتهٔ ژنتیکی را در صنایع دشوار کرده است. به عبارت دیگر، رویکرد مهندسی تکاملی در صفات پلی‌ژنیک مانند صفت تحمل به اتانول به‌طور چشمگیری موفق‌تر بوده است (۱۶و۱۵).

ظهور تکامل تطبیقی باعث شد سؤالات بنیادی فرضیه‌ها دربارهٔ چگونگی تکامل به چالش کشیده شود. علاوه بر این، مطالعات تکاملی باعث به وجود آمدن موجودات جدید با ترکیب منحصربه‌فردی از ویژگی‌ها شده است (۱۷). هر میکروارگانیسم به‌عنوان یک واحد زندهٔ آزمایش‌های تکاملی، ابزار مفیدی برای بررسی و درک مسائل عمومی و الگوهای تکامل است و این مطالعه برای یافتن راه‌حل‌های تطبیقی، سازشی و تغییرات در اثر شرایط زیستی مفید است (۱۹و۱۸).

در رویکرد مهندسی تکاملی برای بهبود صفت تحمل به اتانول *ساکارومایسس سرویزیه*، آزمایش‌های تکامل تطبیقی[۴] در شرایط دلخواه و با استفاده از اعمال فشار انتخابی به مدت طولانی طراحی می‌شوند (۲۰). وقتی زمان تولید نسل میکروارگانیسم، کوتاه و اندازهٔ جمعیت

بزرگ باشد، آزمایش‌ها در شرایط ایده آل خواهند بود؛ زیرا بسیاری از جهش‌های خودبه‌خودی در هر نسل اتفاق می‌افتد و نسل تطبیق‌یافته به سرعت در کل جمعیت تکثیر می‌شود (۲۱). در مهندسی تکاملی، مدت زمان و میزان جمعیت اولیه از عوامل مؤثر هستند (۲۲). به عبارت دیگر، هرچه جمعیت آزمایش‌شده بیشتر باشد، احتمال وقوع جهش‌های بیشتر، مفیدتر و زیادتر است. همچنین از لحاظ آماری طی آزمون‌های طولانی مدت امکان جداسازی فنوتیپ مطلوب‌تر افزایش می‌یابد (۲۳).

نرخ جهش خودبه‌خودی بیشتر ارگانیسم‌ها معمولاً پایین بوده و در حدود $۱۰^{-۹}$ تا $۱۰^{-۱۰}$ در هر نسل است؛ بنابراین در شرایط رشد، هر عاملی، هرچند کوچک که باعث افزایش نرخ جهش شود، زمینه را برای جهش‌های مفید فراهم می‌کند. جهش‌زایی با استفاده از اشعه یا مواد شیمیایی اغلب باعث افزایش تنوع ژنتیکی جمعیت اولیه در آزمایش‌های تکاملی می‌شود (۲۴) و ژنوم جمعیت اولیه را برای آزمایش‌های تکامل تطبیقی آماده می‌کند.

با توجه به دمای جوش پایین اتانول و تبخیر آن حین کشت‌های مدت‌دار، احتمال تکثیر و گسترش جمعیت‌های کاذب مخمر نسبت به صفت مقاومت به اتانول وجود دارد. همچنین در تحقیقات اخیر نشان داده شده است سازوکار سمیت الکل‌های کوتاه زنجیره بر مخمرها، به‌ویژه سویهٔ مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* مشابه است (۲۵). با توجه به اینکه ۱- بوتانل یک الکل کوتاه زنجیره با ساختار مشابه اتانول، اما با نقطه جوش بالاتر است، در مطالعه حاضر از ۱- بوتانل برای ایجاد فشار انتخابی در آزمایش‌های تکامل تطبیقی استفاده شد و سپس میزان تحمل به اتانول و تولید اتانول سویهٔ تکامل‌یافته با سویهٔ والد مقایسه شد.

در تحقیق حاضر، از سویهٔ *ساکارومایسس سرویزیه* Ethanol red که یک سویهٔ صنعتی و دارای بازده تولید الکل بالا است و در شرایط پر تنش تخمیر، توانایی زیادی در حفظ حیات خود دارد، به‌عنوان سویهٔ والد استفاده شد. سپس برای تعیین میزان تحمل به اتانول و ۱- بوتانل، نرخ ویژهٔ رشد این سویه در غلظت‌های مختلف اتانول نسبت به حالت شاهد بدون الکل ارزیابی شد. به‌منظور افزایش میزان تنوع ژنتیکی جمعیت اولیه، سویهٔ مذکور در شرایط جهش‌زایی تابش اشعه فرابنفش[۵] و اتیل متان سولفونات[۶] قرار گرفت. سپس سویه‌های جهش‌یافته با استفاده از پلیت‌های حاوی غلظت معینی از ۱- بوتانل جداسازی شدند و در ادامه، سویه‌های به‌دست‌آمده طی ۴۸ دوره متوالی به مدت ۱۴۴ روز تحت آزمایش‌های تکامل تطبیقی قرار گرفتند و بعد از مقایسهٔ نرخ ویژهٔ رشد، سویه‌های نهایی انتخاب شدند و تأثیر افزایش مقاومت به اتانول در آنها در میزان تولید اتانول در شرایط نیمه‌پیوسته[۷] بررسی شد.

مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت و شرایط کشت مخمرها: سویهٔ صنعتی *ساکارومایسس سرویزیه* Ethanol red اهداشده توسط *Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability* دانشگاه صنعتی دانمارک به‌عنوان سویهٔ والد برای آزمایش‌های تکامل تطبیقی استفاده شد. سویهٔ والد در محیط کشت YPD (مرک) رشد داده شد. این محیط حاوی ۲۰ گرم در لیتر گلوکز، ۲۰ گرم در لیتر پپتون و ۱۰ گرم در لیتر عصاره مخمر بود. برای ساخت محیط جامد، ۲ درصد وزنی آگار (مرک) به سایر مواد افزوده شد و درنهایت، محیط‌ها در دمای ۱۲۱ درجه

سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل شدند. این سویه با ۶ تکرار و سویهٔ حاصل از جهش‌زایی با ۲ تکرار طی ۴۸ مرحله متوالی در میکروپلیت‌های با ۹۶ چاهک کشت داده شدند. به عبارت دیگر، در هر چاهک جمعیتی حاصل از هر سویه در شرایط تنش الکل قرار گرفت. غلظت اتانول به تدریج در طول کشت‌های متوالی افزایش یافت؛ به‌طوری‌که غلظت اتانول از ۸ درصد (حجم در حجم) در ابتدا، تا غلظت ۹ درصد (حجم در حجم) افزایش یافت و قبل از هر کشت در حضور اتانول، به‌عنوان فشار انتخابی، سلول‌ها در محیط تازه YPD به مدت ۳۰ دقیقه برای آزمایش‌های تکامل تطبیقی بازیابی شدند. در تحقیق حاضر، افزایش نرخ رشد ویژه به‌عنوان پارامتر انتخابی برای جداسازی سویه‌های با تحمل بالاتر به الکل انتخاب شد. جمعیت مخمری با رشد مکرر در غلظت بالای تنش الکل با آن خوگرفته و سازگار شده است که درنهایت به تکثیر جمعیت برتر در این شرایط منجر شد و سویه‌های تکامل‌یافته با استفاده از آزمون t-test با سطح اطمینان ۹۵ درصد و p-value<۰/۰۵ در بهبود نرخ ویژهٔ رشد به دست آمدند (۲۵).

در روش دیگر از یک غلظت ثابت اتانول ۱۱ درصد (حجم در حجم) استفاده شد؛ به‌طوری‌که در ۴۸ مرحله این غلظت ثابت ماند و جمعیت‌هایی انتخاب و به‌طور متوالی کشت شدند که قادر به رشد در این غلظت بودند.

همچنین، از ۱- بوتانل به‌عنوان فشار انتخابی استفاده شد؛ به‌طوری‌که غلظت آن به تدریج در طول کشت‌های متوالی افزایش یافت و از ۱/۸ درصد (حجم در حجم) شروع شد و در انتها تا غلظت ۲ درصد (حجم در حجم) افزایش یافت. قبل از هر مرحله کشت در پلیت‌های حاوی ۱- بوتانل، به‌عنوان فشار انتخابی، سلول‌ها در محیط تازه YPD به مدت ۳۰ دقیقه برای آزمایش‌های تکامل تطبیقی بازیابی شدند (۲۶و۲۲).

بررسی تحمل سویهٔ صنعتی مخمر به اتانول: برای بررسی میزان تحمل به تنش الکل، قبل از شروع آزمایش‌های تکامل تطبیقی، سویهٔ *ساکاروما یسس سرویزیه* Ethanol red در محیط YPD کشت داده شد. سپس ۲×۱۰^{۸} سلول مخمر به محیط کشت YPD حاوی غلظت‌های مختلف اتانول از ۰ تا ۱۱ درصد (حجم در حجم)، تلقیح و نرخ ویژه رشد آن بر پایهٔ سینتیک رشد مشخص شد. همچنین، نرخ رشد ویژه این سویه در غلظت ۰/۵ تا ۲ درصد (حجم در حجم) ۱- بوتانل به همین روش تعیین شد.

برای محاسبهٔ نرخ ویژه رشد برای هر نمونه، از تابع رشد نمایی استفاده شد. مقادیر اولیه $OD_{۶۰۰}$ یکسان برای همه چاهک‌ها محاسبه و استفاده شد. نرخ ویژه رشد با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

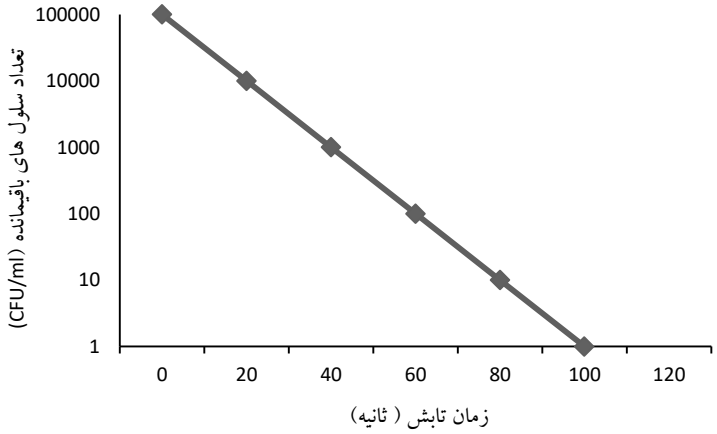
$$\mu=(\ln X_2 - \ln X_1)/(t_1 - t_2)$$

جهش‌زایی

جهش‌زایی با اشعه فرابنفش: در ابتدا مخمر در محیط کشت مایع YPD به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس سوسپانسیون سلولی با تعداد ۲×۱۰^{۸} سلول مخمر در یک میلی‌لیتر بافر Tris-HCl با pH ۷ تهیه شد. به‌منظور سرعت‌بخشیدن به مرحله غربالگری، ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی در پلیت‌های حاوی محیط کشت استریل YPDA همراه با غلظت‌های ۲، ۲/۲۵ یا ۲/۵ درصد حجم در حجم الکل ۱- بوتانل، تلقیح و کاملاً پخش شد. سپس پلیت‌ها برای زمان‌های ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ ثانیه از فاصله ۲۰ سانتی‌متری در معرض اشعه فرابنفش ناشی از لامپ،

T8 615/30wقرار گرفت و بلافاصله در شرایط تاریکی به مدت ۵-۳ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا جهش‌یافته‌ها رشد کنند (۲۷). منحنی مرگ سلولی رسم شد (شکل ۱).

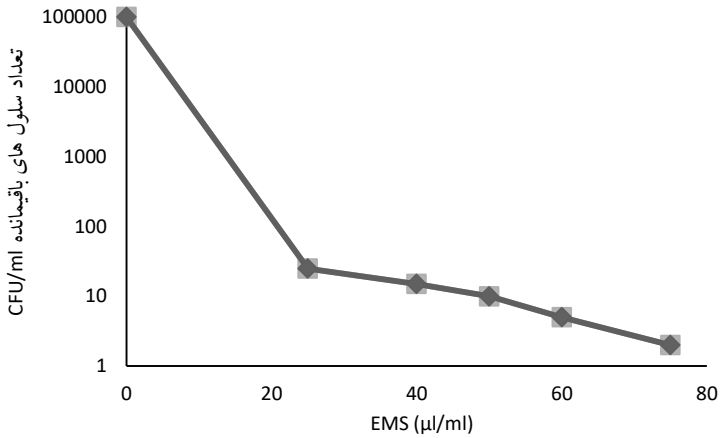
جهش‌زایی با اتیل متان سولفونات: به این منظور $۲×۱۰^{۸}$ سلول مخمر از محیط کشت مایع YPD، تهیه و سپس سوسپانسیون سلولی در بافر فسفات سدیم با غلظت ۰/۱ مولار و pH ۷/۲ در یک لوله درپیچ‌دار تهیه شد و به مدت ۱ تا ۴ ساعت روی شیکر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۱۰ rpm در مجاورت ۵۰، ۷۵، ۲۵ میکرولیتر اتیل متان سولفونات (سیگما) قرار گرفت. واکنش با رقیق‌کردن سوسپانسیون سلولی به نسبت ۱:۱۰ با محلول ۵ درصد (وزن در حجم) تیوسولفات سدیم تازه تهیه شده متوقف شد. سلول‌ها با سانتریفیوژکردن در دور ۳۰۰۰ rpm، ته‌نشین و پس از شستشو با آب مقطر استریل رقیق‌سازی شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده روی سطح محیط کشت YPDA حاوی ۲، ۲/۲۵ و ۲/۵ درصد ۱- بوتانل، کاملاً پخش و به مدت ۵ روز در ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. منحنی مرگ سلولی براساس تغییرات رشد سلول‌ها در مقایسه با نمونه شاهد بدون اتیل متان سولفونات رسم شد (۲۷و۲۶).



شکل ۱- منحنی مرگ سلولی در اثر اشعه UV در مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* Ethanol red

جدول ۱- مشخصات لامپ UV

داده‌های الکتریکی	توان	۳۰
	ولتاژ	۱۱۰
	آمپر	۳۷۰-۴۰۰
	فرکانس	۵۰-۶۰
داده‌های نورسنجی	قدرت تابشی	۲۰۰-۲۸۰nm
طول عمر	عمر مفید	ساعت ۱۰۸۰۰
	مصرف انرژی	۳۰kWh/۱۰۰۰h



شکل ۲- منحنی مرگ سلولی در اثر EMS در مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* Ethanol red

آزمایش‌های تکامل تطبیقی: در تحقیق حاضر از دو محیط کشت YPD و ملاس برای آزمایش‌های تکامل تطبیقی و از دو نوع الکل اتانول و ۱- بوتانل به‌عنوان تنش فیزیولوژیک استفاده شد. محیط کشت ملاس با رقیق‌کردن ملاس نیشکر در آب مقطر تا بریکس ۱۸ تهیه شد. پس از تهیه رقت، به‌منظور حذف ناخالصی‌های جامد، محیط کشت آماده‌شده در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۲۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از افزودن ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم و ۲ گرم در لیتر اوره (مرک)، محیط کشت با افزودن اسید سولفوریک در pH ۴/۵ تنظیم شد. محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شد (۲۸).

برای شروع آزمایش‌های تکامل تطبیقی، با توجه به میزان نرخ ویژه رشد سویهٔ والد، از غلظت اولیه ۸ درصد (حجم در حجم) تا ۱۱ درصد (حجم در حجم) اتانول و از غلظت ۱/۸ درصد (حجم در حجم) تا ۲/۵ درصد (حجم در حجم) ۱- بوتانل استفاده شد که به‌طور مستقیم و بدون استریل‌کردن به محیط کشت اضافه شد. هر میکروپلیت با فویل غشایی کاملا محکم پوشیده شد تا از تبخیر الکل جلوگیری شود. میکروپلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دورrpm ۷۰ گرماگذاری شدند. برای جلوگیری از تبخیر محیط از بیرونی‌ترین ردیف‌های میکروپلیت استفاده نشد.

خوگیری سویه‌ها با اندازه‌گیری میزان کدورت در OD_{600} هر دو ساعت یک بار با استفاده از دستگاه (Bio tech, USA) خوانش شد و نرخ ویژه رشد تمام سویه‌ها حین انجام آزمایش‌های تکامل تطبیقی محاسبه شد. به‌منظور نگهداری و حفظ تمامی رده‌های سلول تکامل‌یافته، قبل از هر بار تکرار کشت، ۰/۲ میلی‌لیتر از کشت قبلی به ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول گلیسرول ۴۰ درصد در محیط کشت YPD تازه، اضافه و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد (۲۵). افزایش غلظت الکل محیط کشت در آزمایش‌های تکامل تطبیقی بعد از خوگیری سویه‌ها با غلظت الکل انجام شد؛ به‌طوری‌که بیشترین نرخ رشد سویه‌ها در غلظت اولیه افزایش یافته و بعد از طی زمان تثبیت شده بود.

بررسی تولید اتانول توسط مخمر: از میکروپلیت‌های با عمق ۵۰ میلی‌متر برای کشت سویه‌های منتخب برای اندازه‌گیری میزان اتانول

تولیدشده استفاده شد و در هریک ۲ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته شد. غلظت قند در این مرحله (مرحله رشد هوازی و تکثیر سویه‌ها)، ۲۰ گرم در لیتر بود. سویه‌ها در محیط کشت YPDدر دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۵۰ rpm در شیکر انکوباتور به مدت ۸ ساعت گرماگذاری شدند. از یک محفظه شیشه‌ای[8] با قابلیت تنظیم و حفظ فشار گاز داخل محفظه ازطریق یک خروجی گاز استفاده شد. این محفظه دارای یک ورودی برای گاز نیتروژن و یک خروجی برای هوا و اکسیژن بود و برای فراهم‌کردن شرایط کشت بی‌هوازی و تولید اتانول استفاده شد. پس از ۸ ساعت هوادهی، غلظت گلوکز محیط کشت به ۳۰۰ گرم در لیتر رسانده شد. کشت در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور همزن ۷۰rpm به مدت ۳۶ ساعت ادامه یافت. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند.

آنالیز دستگاهی: برای تعیین غلظت اتانول و گلوکز باقی‌مانده در محیط کشت، نمونه‌ها با کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) آنالیز شدند. از ستون تعویض یونی (Aminex HPX-87H (1250140), Bio-Rad, Hercules, California, USA) به‌عنوان فاز ثابت و از اسید سولفوریک ۰/۵ میلی‌مولار به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد. ترکیبات با استفاده از یک آشکارساز RI شناسایی شدند (۲۷). از آب میلیکیو[9] استریل برای رقیق‌سازی نمونه‌ها استفاده شد. از هر نمونه ۲۰ میکرولیتر به ستون با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت جریان فاز متحرک ۰/۶ میلی‌لیتر در دقیقه تزریق شد. نمونه‌های استاندارد با رقیق‌کردن محلول‌های گلوکز و اتانول با غلظت‌هایی تهیه شدند که دامنه حساسیت تشخیص ستون را پوشش می‌داد. حجم نهایی نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در ویال‌هایHPLC ۰/۵ میلی‌لیتر بود.

نتایج

بررسی رشد سویه و تعیین تحمل به الکل: میزان رشد سویهٔ *ساکارومایسس سرویزیه* گونهٔ Ethanol red قبل از شروع آزمایش‌های تکامل تطبیقی ارزیابی شد. سویه در معرض غلظت‌های مختلف اتانول از ۰ تا ۱۱ درصد (حجم در حجم) قرار گرفت و نرخ رشد ویژه سویه در هریک از غلظت‌های یادشده تعیین شد (شکل ۳). نرخ رشد ویژه سویهٔ مذکور در غلظت ۰ تا ۲ درصد ۱- بوتانل نیز تعیین شد (شکل ۴). در این مطالعه، تمام تک‌کلونی‌های حاصل از جهش با تابش فرابنفش و اتیل متان سولفونات و سویهٔ والدی ابتدا در محیط کشت YPD کشت داده شدند و جمعیت حاصل کشت هریک از آنها که جمعیت اولیه نام گرفت، با ۶ تکرار در آزمایش‌های تکامل تطبیقی در شرایط تنش اتانول و ۱- بوتانل قرار گرفتند.

این جمعیت‌ها در دو حالت کلی تنش افزایشی و ثابت در محیط کشت YPD در معرض اتانول و ۱- بوتانل قرار گرفتند. همچنین این جمعیت‌ها در محیط کشت ملاس در شرایط تنش افزایشی اتانول قرار گرفتند؛ به‌طوری‌که در تنش افزایشی از ۸ درصد تا ۹ درصد (حجم در حجم) و در تنش ثابت با ۱۱ درصد اتانول سازگار شدند. طرح آزمایش در شکل ۵ به‌طور شماتیک آورده شده است. سویه‌ها در شرایط فشار انتخابی هر دو نوع الکل، تا ۱۴۴ روز متوالی کشت شدند. انتقال سویه به یک محیط تازه حاوی غلظت اتانول بالاتر در رویکرد افزایشی زمانی انجام شد که

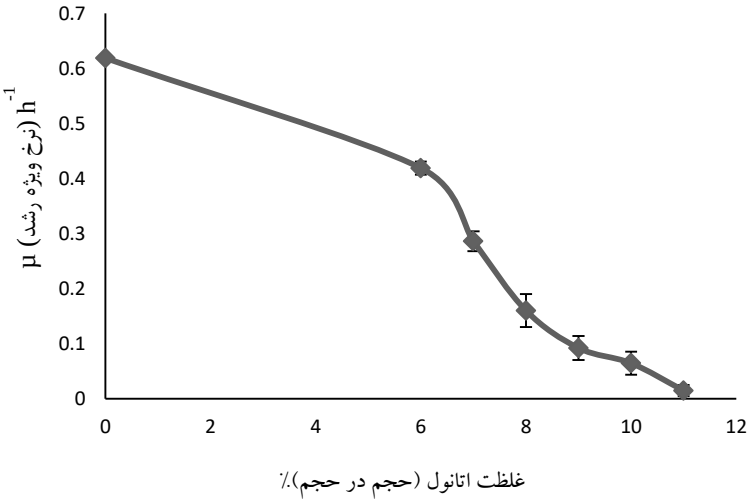
نرخ ویژه رشد در غلظت قبلی برای چندین نسل ثابت باقی مانده بود. پس از ۴۸ دوره کشت طی ۱۴۴ روز، در رویکرد ثابت نیز برخی از رده‌های سلولی آزمایش‌شده قادر به رشد در غلظت ۱۱ درصد (حجم در حجم) اتانول بودند؛ درحالی‌که سویهٔ والد قادر به رشد در این غلظت نبود. همچنین، نرخ رشد برخی از سویه‌ها در غلظت ۹ درصد (حجم در حجم) اتانول بهبود یافت.

به‌طور کلی، بعد از ۱۴۴ روز آزمایش‌های تکامل تطبیقی، افزایش تحمل به اتانول در جدایه‌های جهش‌یافته با اتیل متان سولفونات هم نسبت به سویهٔ والدی که فقط با آزمایش تکامل تطبیقی با اتانول و ۱-بوتانل سازگار شده بودند و هم نسبت به جدایه‌های جهش‌یافته با تابش فرابنفش بالاتر بود (جدول ۲).

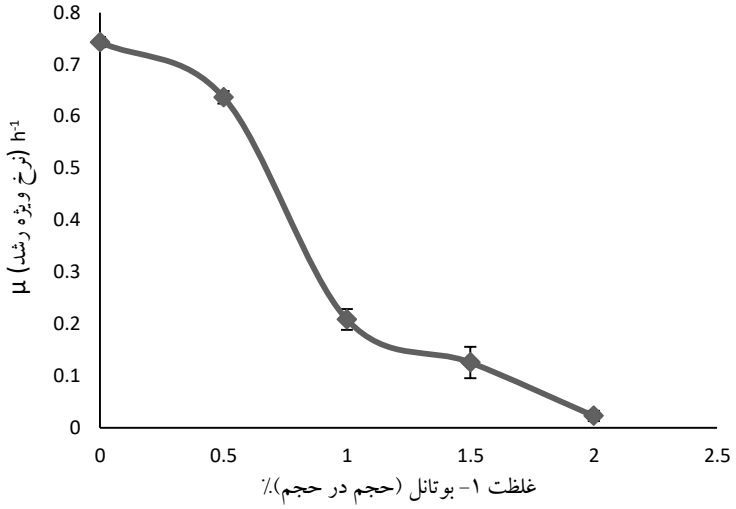
حداکثر نرخ ویژه رشد به تدریج در طول آزمایش‌های تکامل تطبیقی افزایش یافت. در برخی مراحل کاهش نرخ ویژه رشد نیز مشاهده شد؛ اما پس از ۴۸ دوره کشت متوالی در شرایط تنش اتانول، حداکثر نرخ ویژه رشد یک سویه از h^{-1} ۰/۰۹۵ به h^{-1} ۰/۱۹ ارتقا یافت (شکل ۶).

به‌منظور مشابه‌سازی با شرایط صنعتی برای انتخاب سویه‌های برتر از لحاظ مقاومت به اتانول، از محیط کشت ملاس استفاده شد. معیار انتخاب سویه‌های برتر، توان تکثیر بالاتر طی کشت‌های پی‌درپی در شرایط تنش اتانول و محاسبهٔ زمان نسل بود. میزان نرخ ویژه رشد سویهٔ منتخب در محیط کشت ملاس از h^{-1} ۰/۰۹۵ به h^{-1} ۰/۱۲ افزایش یافت.

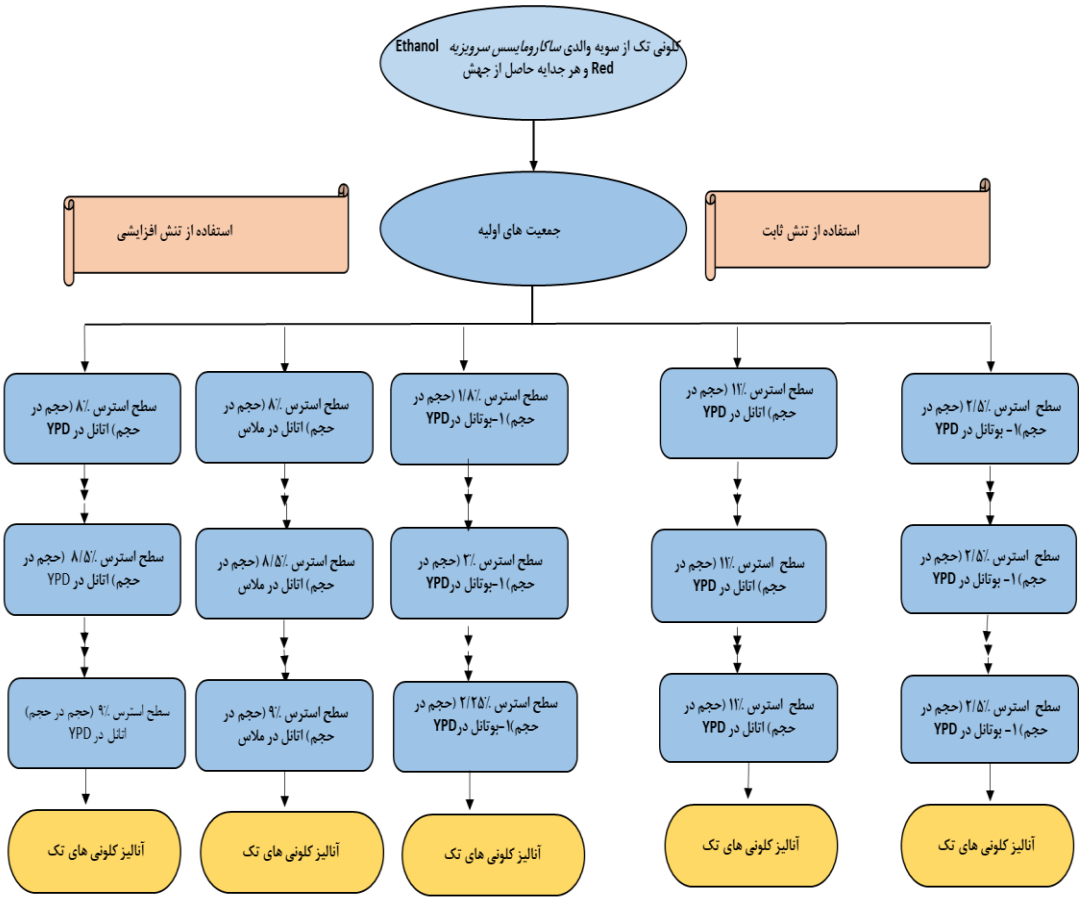
از میان سویه‌های تطابق‌یافته با ۱۱ درصد (حجم در حجم) اتانول، نرخ رشد ویژه یک سویهٔ والدی و یک جدایهٔ حاصل از جهش بعد از تطابق به‌ترتیب به h^{-1} ۰/۱۶۲ و h^{-1} ۰/۱۷۵ رسید. سویه‌های منتخب بعد از آزمایش تکامل تطبیقی در جدول ۱ آورده شده‌اند.



شکل ۳- منحنی نرخ ویژه رشد سویهٔ Ethanol red در غلظت‌های مختلف اتانول. هر داده میانگین ۳ تکرار است.



شکل ۴- منحنی نرخ ویژه رشد سویهٔ Ethanol red در غلظت‌های مختلف ۱- بوتانول. هر داده میانگین ۳ تکرار است.



شکل ۵- فلوچارت آزمایش‌های تطبیقی

جدول ۲- سویه‌های منتخب بعد از آزمایش‌های تکامل تطبیقی

میزان افزایش نرخ ویژه رشد جدایه‌های ثانویه نسبت به سویهٔ اولیه بعد از تکامل تطبیقی[۱۰]	درصد (حجم در حجم) ۱- بوتانل در محیط کشت جداسازی استفاده‌شده بعد از جهش‌زایی	زمان جهش	نوع جهش‌زایی	درصد اتانول / ۱- بوتانل تطابق‌یافته	محیط کشت	سویه
۰/۰۷۹	–	–	–	۹ درصد	YPD	Ethanol Red (E1)
۰/۰۶۷	–	–	–	۱۱ درصد	YPD	Ethanol Red (E2)
۰/۰۵	–	–	–	۹ درصد	YPD	Ethanol Red (E3)
۰/۰۹۵	۲/۲۵	۱ ساعت	۲۵ میکرولیتر EMS	۹ درصد	YPD	ER 106
۰/۰۷۶	۲/۲۵	۱ ساعت	۷۵ میکرولیتر EMS	۱۱ درصد	YPD	ER 103
۰/۰۷۴	۲/۲۵	۱ ساعت	۵۰ میکرولیتر EMS	۲/۵ درصد	YPD	ER 105
۰/۰۲۵	۲/۲۵	۲ساعت	۷۵ میکرولیتر EMS	۹ درصد	ملاس	ER 108
۰/۰۷۰	۲	۲۰ ثانیه	UV	۹ درصد	YPD	ER 202

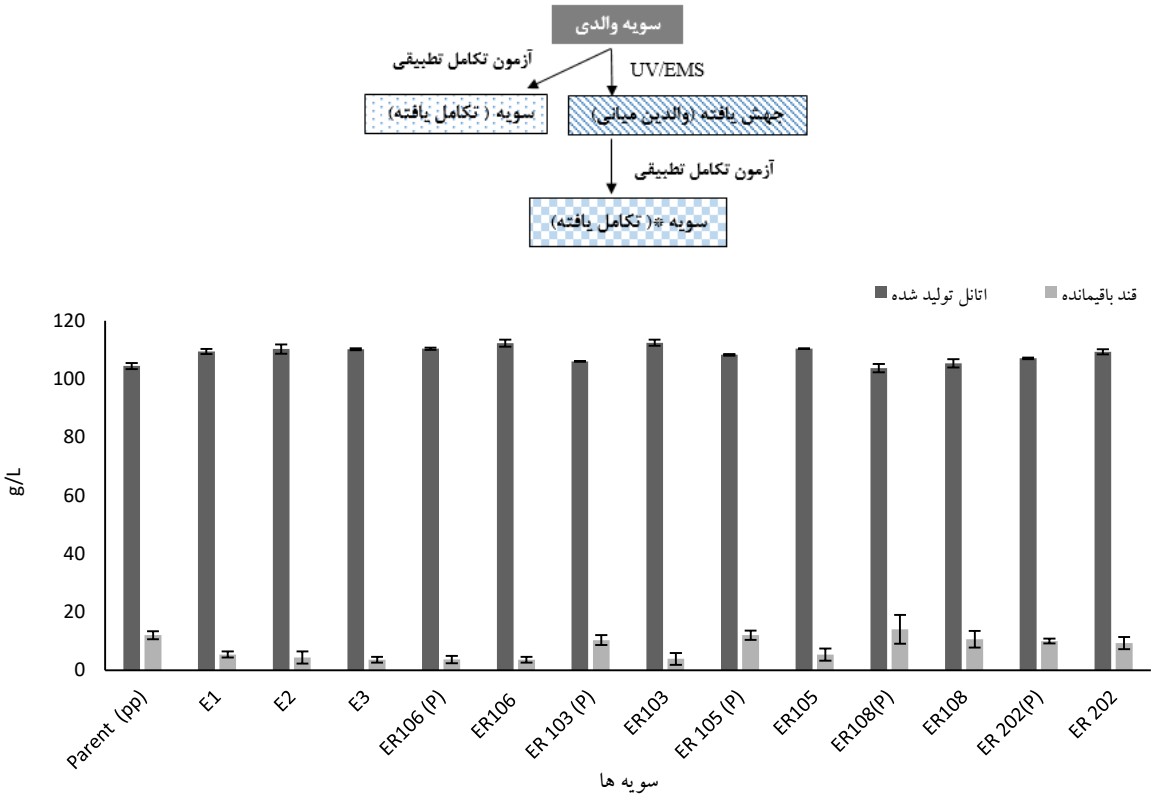
تعیین میزان تولید اتانول سویه‌های منتخب: برای بررسی تأثیر افزایش مقاومت به اتانول سویه‌های تکامل‌یافتهٔ منتخب بر افزایش تولید اتانول آنها، میزان تولید اتانول و مصرف گلوکز هر سویهٔ تکامل‌یافته مشخص شد (شکل ۶). برای مشخص‌شدن تأثیر افزایش تحمل به دو نوع الکل استفاده‌شده بر میزان تولید اتانول، از ۳۰۰ گرم بر لیتر غلظت گلوکز در محیط کشت غذادهی شد. در محیط YPD حاوی ۳۰۰ گرم در لیتر گلوکز، تغییرات جمعیت سلول سویه‌های تکامل‌یافته با والدین متناظر آنها تفاوت معنی‌داری وجود داشت.

میزان تولید اتانول و مصرف گلوکز برای همه سویه‌های تکامل‌یافته افزایش یافته بود. از میان تمام سویه‌های منتخب، بیشترین تولید اتانول مربوط به دو سویهٔ ER۱۰۳ و ER۱۰۶ بود که قبل از انجام آزمون تکامل تطبیقی با اتیل متان سولفونات جهش یافتند و سپس به‌ترتیب در غلظت ۱۱ و ۹ درصد (حجم در حجم) اتانول تکامل یافته بودند. میزان تولید اتانول این دو سویه به‌ترتیب به ۱±۱۱۲/۴۵ و ۰/۹±۱۱۲/۳ گرم در لیتر رسید و کمترین میزان تولید مربوط به سویهٔ تکامل‌یافتهٔ ER۲۰۲ بود که با تابش فرابنفش جهش یافته و در محیط کشت YPD در غلظت ۹ درصد (حجم در حجم) اتانول تکامل یافته بود. میزان تولید اتانول توسط این سویه به ۰/۳±۱۰۷/۱۲ گرم در لیتر رسید. این در حالی است که میزان تولید اتانول سویهٔ والد در شرایط مذکور ۱/۱±۱۰۳/۴۴ گرم بر لیتر بود. این داده‌ها نشان می‌دهند افزایش تحمل مخمر به اتانول و ۱- بوتانل، به افزایش تولید اتانول و مصرف قند در سویه‌های تکامل‌یافته منجر شد (شکل ۶).

تولید اتانول سویه‌های منتخب از بین جمعیت‌هایی که هیچ نوع جهشی بر آنها اعمال نشده

بود و تنها طی آزمایش‌های تکاملی در معرض غلظت ۹ و ۱۱ درصد (حجم در حجم) اتانول قرار گرفته بودند نیز با استفاده از آزمون t-test با سطح اطمینان ۹۵ درصد و p-value<۰/۰۵ نسبت به سویهٔ والدی به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود.

به‌منظور بررسی اثرات جهش بر میزان تولید اتانول سویه‌ها، میزان تولید والدین میانی سویه‌های منتخب (جهش‌یافته‌های قبل از آزمایش‌های تکامل تطبیقی) نیز ارزیابی شد. آزمون‌ها نشان‌دهندهٔ افزایش میزان تولید اتانول والدین میانی نسبت به سویهٔ اولیه به‌جز سویهٔ ۱۰۸ ER (جهش‌یافته با اتیل متان سولفونات) بود.



شکل ۶- میزان تولید اتانول در سویه‌های منتخب، سویه‌های والدین میانی و سویهٔ والد اولیه

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش رشد تقاضای جهانی اتانول زیستی، گسترش پاندمی COVID-19 در سراسر جهان و نیاز به تولید هرچه بیشتر اتانول به‌عنوان ماده ضدعفونی‌کننده در سال‌های اخیر، در زمان حاضر نیاز به حجم زیادی از اتانول زیستی وجود دارد (۲۹). این بدان معناست که بهبود عملکرد و بهره‌وری در هر مرحله از تولید این محصول بسیار ضروری است. بسیاری از این شرایط با مهندسی میکروارگانیسم‌ها قابل حل است و با طراحی دوبارهٔ مسیرهای متابولیسمی، به افزایش سطح عملکرد و بهره‌وری منجر می‌شود؛ درنهایت، مواد اولیه مورد نیاز در مقیاس کارخانه‌های تولیدکننده و میزان سرمایه و هزینه‌های تولید کاهش می‌یابد (۳۰و۳۱).

دربارهٔ محصولات زیستی که مصرف انسانی دارند، هنوز استفاده از میکروارگانیسم‌های تغییریافته از لحاظ ژنتیکی در بسیاری از کشورها ازجمله ایران با منع قانونی همراه است؛ بنابراین، استفاده از راهبردهایی مانند مهندسی تکاملی می‌تواند در این زمینه گره‌گشا باشد.

برای تولید کارآمد و مقرون‌به‌صرفهٔ اتانول، تخمیر سریع لازم است؛ ازاین‌رو، یک سویهٔ مخمر باید دارای سرعت رشد خوب و میزان تولید اتانول در غلظت بالای اتانول باشد (۳۲). در مطالعات متعددی که تاکنون انجام شده است، سویه‌ها بر اثر جهش‌هایی که در ژنوم آنها رخ می‌دهد با استفاده از مواد جهش‌زا یا جهش‌های خودبه‌خودی ازطریق انطباق تکاملی جمعیت مخمری با تنش اتانول سازگار می‌شوند و میزان رشد مخمر در تنش افزایش می‌یابد. درواقع جهش هنگامی رخ می‌دهد که مخمر در غلظت کشنده یا مهارکنندهٔ رشد اتانول قرار گیرد و با تغییرات حاصل از جهش، بقای خود را در حدود این غلظت الکل به‌طور چشمگیری در مقایسه با سویه‌های اجدادی بهبود می‌دهد (۳۳و۳۴)؛ بنابراین، نرخ رشد ویژه به‌عنوان پارامتر انتخاب مناسبی برای آزمایش‌های تکامل تطبیقی برای صفت تحمل اتانول محسوب می‌شود (۳۵). برای بررسی تأثیر افزایش تحمل به الکل بر افزایش تولید اتانول، از غلظت ۳۰۰ گرم بر لیتر گلوکز استفاده شد. نتایج نشان دادند تحمل این سویه‌ها نسبت به اتانول بهبود یافته و قادر به استفاده از گلوکز بیشتری نسبت به سویهٔ والد بوده است و به رشد خود در این شرایط ادامه دادند؛ درنهایت، میزان اتانول بیشتری نسبت به سویهٔ والد تولید کردند.

دینه و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از راهبرد مهندسی تکاملی با روش ناپیوسته، تحمل به اتانول یک سویهٔ *ساکارومایسس سرویزیه* هاپلوئید آزمایشگاهی را از ۸ درصد به ۱۰ درصد (حجم در حجم) بهبود بخشیدند (۱۳). در مطالعهٔ دیگری استنلی و همکاران در سال ۲۰۱۰ بعد از جهش سویهٔ *ساکارومایسس سرویزیه* W303-1A با اتیل متان سولفانات، میزان تحمل به اتانول سویه‌های جهش‌یافته و سویهٔ والدی را بعد از یک دوره آزمایش تکامل تطبیقی در اتانول به‌صورت پیوسته بررسی کردند و نشان دادند بعد از ۱۹۲ روز کشت مداوم در بیوراکتور در شرایط تنش اتانول، میزان تحمل به اتانول هر دو سویه از ۷/۵ درصد به ۹ درصد (حجم در حجم) ارتقا یافته بود؛ اما نرخ مصرف گلوکز در سویه‌ای که بدون هیچ‌گونه جهش‌زایی در شرایط تنش اتانول تکامل یافته بود، نسبت به سویهٔ دیگر افزایش یافته بود. تورانلی و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای از اتیل متان سولفانات برای جهش استفاده کردند و میزان تحمل یک سویهٔ *ساکارومایسس سرویزیه* هاپلوئید آزمایشگاهی CEN.PK 113-7D را از ۵ درصد (حجم در حجم) تا ۱۰ درصد افزایش دادند. در ادامه با روش مهندسی تکاملی تحمل به اتانول را تا ۱۲ درصد بهبود بخشیدند و سپس تغییرات در تعداد کروموزوم‌ها در سویه‌های تکامل‌یافته را بررسی کردند. در این تحقیق میزان راندمان تولید نسبت به سویهٔ والدی در شرایط یکسان افزایش یافته و ژنوم سویهٔ تکامل‌یافته دیپلوئید شده بود. در تحقیق حاضر افزایش تحمل به اتانول روش تنش افزایشی و ثابت طی ۱۴۴ روز و در کشت بسته، در میکروپلیت‌های با ۹۶ و ۲۴ چاهک و در حجم بسیار کم انجام شد. بهبود نرخ رشد طی روند تکاملی، در مقایسه با هزینه‌های بالای کشت پیوسته و حفظ شرایط بسیار سخت این سیستم‌ها، در زمان کوتاه و با صرف هزینه بسیار کم همراه بود. در این مطالعه تغییرات نرخ ویژه رشد ۱۰۰ جدایهٔ

جهش‌یافته با حداقل ۲ تکرار بررسی شد که به انتخاب ۵ جدایه و درنهایت ۲ جدایهٔ برتر منجر شد. در این تحقیق از یک سویه های هاپلوئید آزمایشگاهی طی آزمایش‌های تکامل تطبیقی به‌عنوان شاهد استفاده شد و نتایج نشان دادند سویه‌های دیپلوئید با تکرار موجود در ماده ژنوم نسبت به تنش اتانول به‌صورت بالقوه مقاوم‌تر از سویه‌های هاپلوئید هستند؛ اما با روند کندتری نسبت به سویه‌های هاپلوئید با تنش خوگرفته‌اند و تطابق می‌یابند. به نظر می‌رسد یکی از دلایل این موضوع جهش‌های برگشتی است که در آلل‌های همسان طی زمان در ژنوم این سویه‌ها رخ می‌دهد. تورانلی و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه‌ای افزایش خوگیری به اتانول را با استفاده از اتیل متان سولفونات ثابت کردند. در تحقیق حاضر نیز سویه‌های جهش‌یافته با اتیل متان سولفونات نسبت به سویه‌های جهش‌یافته با اشعه فرابنفش و همچنین سویه‌هایی که فقط روند آزمایش تکامل تطبیقی را گذراندند، نسبت به اتانول مقاومت بیشتری را نشان دادند؛ با داده‌های حاصل از این مطالعه نتایج تورانلی تأیید شد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، استفاده از ۱- بوتانل به‌عنوان فشار انتخابی در مرحلهٔ غربالگری بعد از جهش، جایگزین مناسبی برای اتانول بوده است و به انتخاب جدایه‌هایی منجر شد که تحمل به اتانول در آنها افزایش یافته بود؛ اما در آزمایش‌های تکامل تطبیقی سویه‌های بهبودیافته عمدتا سویه‌هایی بودند که در شرایط تنش اتانول تکامل یافته بودند. همچنین، استفاده از محیط کشت ملاس تأثیر چندانی در روند بهبود مقاومت به اتانول در مقایسه با محیط آزمایشگاهی YPD نداشت.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر از حمایت مادی و معنوی مؤسسه تحقیقات و آموزش توسعهٔ نیشکر و صنایع جانبی خوزستان برخوردار بوده است. پژوهش در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی پژوهشکده زیست‌فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و همچنین مرکز the Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability دانشگاه صنعتی دانمارک انجام شده است؛ از اساتید، پرسنل محترم آزمایشگاه و بخش‌های مرتبط تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Barnett JA, Lichtenthaler FW. A history of research on yeast. *Yeast*. 2001; (18): 363-388.

(2) Steensels J, Snoek T, Meersman E, Picca Nicolino M, Voordeckers K, Verstrepen KJ. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology Reviews*. 2014; (38): 947–995.

(3) Mohseni M, Ebrahimi H. Isolation, identification and optimization of ethanol producing bacteria from Saccharomyces-based fermentation process of alcohol industries in Iran. *Biological Journal of Microorganism*. 2013; (7): 15-18.

(4) Azizi S, Tarinejad A, Pazhang M. Isolation, cloning and analysis of the hexose transporter 6 gene (HXT6) in a native strain of *Saccharomyces cerevisiae* IBRC-M30069. *Biological Journal of Microorganism*.2016; (5): 29-40.

(5) Rodionova MV, Poudyal RS, Tiwari I, Voloshin RA, Zharmukhamedov SK, Nam HG, et al . Biofuel production: challenges and opportunities. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2017; (42): 8450–8461.

(6) Dekker WJC, Wiersma SJ, Bouwknegt J, Mooiman C, Pronk JT. Anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D does not depend on synthesis or supplementation of unsaturated fatty acids. *FEMS Yeast Research*. 2019; (19): 6-9.

(7) Zabed H, Sahu JN, Suely A, Boyce AN, Faruq G. Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2017; (71): 475– 501.

(8) Hagman A, Sall T, Compagno C, Piskur j. Yeast 'make-accumulate-consume' life strategy evolved as a multi-step process that predates the whole genome duplication. *PLOS One*. 2013; 8: 68734.

(9) Deparis Q, Claes A, Foulquie-Moreno MR, Thevelein JM. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. *FEMS Yeast Research*. 2017; (17): 4.

(10) Argyros DA, Stonehouse EA. Yeast train improvement for alcohol production. In: G. M. Walker, C. Abbas, W. M. Ingledew, C. Pilgrim (Eds.). *The alcohol textbook* .6th ed. Duluth, USA: Ethanol Technology Institute. 2017; (6): 287-297.

(11) Wallace-Salinas.V. Gorwa-Grauslund.M.F. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnology for Biofuels*. 2013; (6): 151.

(12) Attfield PV. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology*.1997; (15): 1351–1357.

(13) Dinh TN, Nagahisa K, Hirasawa T, Furusawa C, Shimizu H. Adaptation of Saccharomyces cerevisiae cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. *Plos One*. 2008; (3): 2623.

(14) Lockshon D, Surface LE. Kerr EO, Kaeberlein M, Kennedy BK. The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. *Genetics*. 2007; (175): 7–91.

(15) Snoek T, Verstrepen KJ, Voordeckers K. How do yeast cells become tolerant to high ethanol concentrations? *Current Genetic*.2016; 62 (3): 475-80.

(16) Duan SF, Han PJ, Wang QM, Liu WQ, Shi JY, Li K, et al. The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from Far East Asia. *Nature Communications*. 2018; 9: 2690.

(17) Jia K, Zhang Y, Li Y. Systematic engineering of microorganisms to Improve alcohol tolerance. Engineering Life. *Sciences*. 2010; (10): 422-429.

(18) Bennett AF, Hughes BS. Microbial experimental evolution. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative, Comparative Physiology*. 2009; (297): 17–25.

(19) Alkım C, Turanlı-Yıldız B, Cakar PZ. Evolutionary engineering of yeast. Chapter 10. In Williams, JA Strain. *Engineering Methods and Protocols*. Springer Book. 2011; 64-80.

(20) Cakar ZP, Turanli-Yildiz B, Alkim C, Yilmaz U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. *FEMS Yeast Research*. 2012 ;(12): 171–182.

(21) Deparis Q, Claes A, Foulquié-Moreno MR, Thevelein JM. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. *FEMS Yeast Research*. 2017; (4): 1- 17.

(22) Fiedurek J, Skowronek M, Gromada A. Selection and adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to increased ethanol tolerance and production. *Polish Journal of Microbiology*. 2011; (60): 51-58.

(23) Stanley D, Chambers PJ, Stanley GA, Borneman A, Fraser S. Transcriptional changes associated with ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied*

Microbiology Biotechnology .2010; (88): 231–239 .

(24) Caspeta L, Chen Y, Ghiaci P, Feizi A, Buskov S, Hallstrom B, et al. Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. *Science*. 2014; (75): 75-78.

(25) Ghiaci P, Norbeck J, Larsson C. Physiological adaptations of *Saccharomyces cerevisiae* evolved for improved butanol tolerance. *Biotechnology for Biofuels*. 2013; 6: 101.

(26) Wallace-SalinasV, Gorwa-Grauslund MF. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnology for Biofuels*. 2013; (6): 151.

(27) Stanley D, Fraser S, Chambers PJ, Grant PR, Stanley A. Generation and characterization of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2010; (37): 139–149.

(28) Baltz RH. Mutagenesis in Streptomyces. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. *American Society for Microbiology*. 1986; 184-190.

(29) Abuga K, Nyamweya N. Alcohol-Based Hand Sanitizers in COVID-19 Prevention: *A Multidimensional Perspective Pharmacy*. 2021; (9): 64.

(30) Winston F. EMS and UV Mutagenesis in Yeast. *Current Protocols in Molecular Biology* .2008; (13): 1-5.

(31) Darvishi F, Abolhasan Moghaddami N. Isolation of industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* with high tolerance to ethanol from Iran's alcohol manufactures. *Journal of Molecular and Cellular Researches*. 2019; (4): 582-592.

(32) Turanlı-Yıldız B, Benbadis L, Alkım C, Sezgin T, Aks A, Gökçe A, et al. In vivo evolutionary engineering for ethanol-tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* haploid cells triggers diploidization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2017; 124 (3): 309-318.

(33) Liao JC, Luo M, Sammy P, Shanshan L. Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. *Nature Reviews Microbiology*. 2016; (14): 288–304.

(34) Ding J, Huang X, Zhang H, Zhao N, Yang D, Zhang K. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2009; (85): 253–263.

(35) Cakar ZP, TuranliYB, Alkim C, Yilmaz U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. *FEMS Yeast Research*. 2012; (12): 171–182.

---

[1]- Generally recognized as safe
[2]- Genetic engineering approach
[3]- Evolutionary engineering approach
[4]- Adaptive laboratory evolution
[5]- Ultraviolet rays
[6]- Ethyl Methyl Sulfonate
[7]- Fed-Batch
[8]- Gas tight box
[9]- MilliQ water
[10]- Adaptive gain