

بهبود تولید و مقاومت به اتانل در مخمر ساکارومایسیس سرویزیه با راهبرد مهندسی تکاملی با استفاده از تنش ۱- بوتانل

فاطمه شیخی^{۱,۲*}، خسرو رستمی^۱، مهرداد آذین^{۱*}، محمدعلی اسداللهی^۳، منصور ابراهیمی^۳، پیام غیاثی^۵ و امیر فیضی^۶



^۱ ایران، تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده بیوتکنولوژی

^۲ ایران، اهواز، موسسه تحقیقات و آموزش توسعه نیشکر و صنایع جانی خوزستان

^۳ ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، گروه زیست‌فتاوری

^۴ ایران، قم، دانشگاه قم، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوانفورماتیک

^۵ آلمان، هایدلبرگ، آزمایشگاه زیست‌شناسی مولکولی، هایدلبرگ

^۶ انگلستان، اکسفورد، گروه بیوتکنولوژی درمانی اوامس

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴

چکیده

در فرایند تولید بیوatanل، عوامل بسیار مهمی وجود دارد که کارایی تولید را تحت تاثیر قرار می‌دهد. تجمع اتانل در طول فرآیند تخمیر و اثر بازدارندگی بر رشد اجتناب‌ناپذیر است. افزایش تحمل به اتانل در سویه ساکارومایسیس سرویزیه منجر به افزایش قدرت بقا و در نهایت افزایش تولید اتانل خواهد شد. رویکرد مهندسی تکاملی یک راهبرد مناسب برای بهبود صفت پیچیده تحمل به اتانل در سویه ساکارومایسیس سرویزیه است. سازوکار اثر سمیت الكلهای کوتاه زنجیره بر مخمر مشابه است. در تحقیق حاضر، سویه آزمایشگاهی ساکارومایسیس سرویزیه CEN PK 113-7D باراهمبرد مهندسی تکاملی طی یک دوره کشت ۱۴۴ روزه تحت تنش ۱- بوتانل قرار گرفت و نرخ ویژه رشد (μ) سویه تکامل یافته از $10^{0.48} \text{ h}^{-1}$ به $10^{0.84} \text{ h}^{-1}$ ارتقا یافت. افزایش تحمل به تنش ۱- بوتانل منجر به افزایش تحمل به اتانل و همچنین افزایش تولید اتانل در سویه تکامل یافته شد. میزان تولید اتانل از $68/50$ گرم بر لیتر در سویه والد به $87/02$ گرم بر لیتر در سویه تکامل یافته افزایش یافت. نتایج تعیین توالی کل ژنوم سویه‌های تکامل یافته و مقایسه آن با سویه والد تغییرات پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی ژن‌های درگیر در این صفت را آشکار نمود. تغییرات در ژن‌هایی مثل *FAB1*, *CIA1*, *PGM2*, *MTH1*, *TCB1*, *YAP1801*, *UBP2*, *IAH1* و *Ayجاد شده بود* که این ژن‌ها در ارتباط با انتقال مواد درون سلول و مسیرهای دخیل در ترکیب و ساختار غشاء سیتوپلاسمایی، ساختار دیواره سلولی، متابولیسم قند، متابولیسم لپیدها بودند. در تحقیق حاضر، برای اولین بار اهمیت گروه جدیدی از ژن‌های دخیل در افزایش تحمل به اتانل گزارش شده است.

واژه‌های کلیدی: تحمل به اتانل، ساکارومایسیس سرویزیه، مهندسی تکاملی، ۱-بوتانل، تعیین توالی کل ژنوم

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۵۶۲۷۶۶۳۶، پست الکترونیکی: azin@irost.ir

مقدمه

تغییر در آب و هوای جهانی، انرژی زیستی و برپایه منابع تجدیدپذیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۳۰). برای کاهش مسائل آلودگی محیط زیست ناشی از استفاده بیش

در طی سال‌های اخیر به دلیل رشد سریع قیمت سوخت-های فسیلی، کاهش سریع ذخایر سوخت و بالاخره بدلیل افزایش آلودگی محیط زیست توسط سوخت‌های فسیلی و

الکل دهیدروژنаз را غیرفعال می‌سازد. همچنین این ترکیب موجب آسیب به DNA می‌توکندریایی و تجزیه‌ی بیومولکول‌ها می‌شود و از جایه‌جایی عناصر از غشاهای زیستی در سلول‌ها جلوگیری می‌کند. تجمع اتانل در محیط باعث مهار رشد سلول‌مخمر شده و بر روی سیستم انتقال درون سلولی آن تاثیر می‌گذارد و درنهایت باعث کاهش مقدار اتانل تولیدی می‌شود (۱۸). مهار متابولیسم، کاهش برداشت سوبسترا توسط مخمر، کاهش رشد، تغییر در ساختار غشاء و افزایش نفوذپذیری از جمله تغییرات دیگری است که اتانل در مخمر ایجاد می‌کند و درنهایت مرگ سلول مخمر را به دنبال دارد (۱۹). تا به امروزه تحقیقات بسیاری در جهت شناسایی عملکرد سامانه پاسخ به تنش اتانل در مخمر انجام گرفته، اما ساز و کار تحمل مخمر اتانل در این مخمر به طور کامل شناسایی نشده است. تحمل به اتانل به شبکه پیچیده‌ای بستگی دارد که در سطح زنوم باهم واکنش متقابل دارند و تلاش‌های پژوهشگران در جهت شناسایی زن‌های مرتبط با این صفت ادامه دارد (۱۵). در تحقیقی که برای بررسی اساس مولکولی مقاومت مخمر ساکارومایسین سرویزیه در برابر تنش اتانل انجام شده است، بیش از ۷۰۰ زن موثر بر مقاومت مخمر در برابر تنش ناشی از غلظت بالای اتانل شناسایی شده‌اند (۳۸). با توجه به فقدان دانش لازم در مورد صفت تحمل به اتانل در ساکارومایسین سرویزیه، پیچیدگی‌های مربوط به سازوکار این صفت و تنوع رئیتیکی بسیار بالا و همچنین محدودیت موجود در اعمال گسترده دستکاری زن‌ها که مانع عملکرد سلول می‌شود، به راهکارهای موثرتری برای افزایش مقاومت مخمر به تنش‌های محیطی مانند تنش اتانل نیاز است. امروزه از رویکرد مهندسی تکاملی (Evolutionary engineering) به عنوان یک رویکرد علمی استفاده می‌شود که در آن با استفاده از اعمال فشار انتخابی، میکروارگانیسمی با فنوتیپ موردنظر به دست می‌آید. پس از انجام مهندسی تکاملی و دستیابی به میکروارگانیسم با فنوتیپ دلخواه، با توالی‌بابی آن می‌توان تغییرات

از حد از سوخت‌های فیزیکی در دهه‌های گذشته، تلاش‌های عظیمی در جهت یافتن منابع سوخت پایدار و تجدیدپذیر شده است. سوخت‌های زیستی میکروبی، سوخت‌های مایع و گازی هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند (۱). بیوأتانل یک سوخت‌سازگار با محیط زیست و جایگزین مناسبی برای سوخت‌های فیزیکی است (۲۰). اتانل عمده‌ای از طریق فرآیند تخمیر با استفاده از مخمر ساکارومایسین سرویزیه تولید می‌شود. بنابراین تخمیر اتانلی توسط ساکارومایسین سرویزیه به عنوان فرایند بیوتکنولوژی صنعتی بسیار مهم و به لحاظ اقتصادی سودآور به شمار می‌آید. با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد این میکروارگانیسم مانند توانایی تولید غلظت بالای اتانل از مواد تجدیدپذیر و تحمل غلظت بالای اتانل و سایر ترکیبات مهارکننده، مخمر ساکارومایسین سرویزیه از مدت‌ها قبل به عنوان یک کارخانه سلولی در صنعت تخمیر استفاده می‌شود (۳۱). با وجود این، تولید مقرون به صرفه اتانل و راندمان بالا جزء چالش‌های اصلی این صنعت به شمار می‌رود (۱۸). افزایش تولید اتانل در فرآیند صنعتی به عوامل مختلف بستگی دارد و مهمترین عامل، چگونگی عملکرد و قدرت بقاء مخمر در شرایط تخمیر می‌باشد. در طول فرایند تولید اتانل، مخمر ساکارومایسین سرویزیه با تنش‌های مختلف از جمله افزایش غلظت اتانل، درجه حرارت بالا و فشار اسمزی حاصل از غلظت بالای قند رویرو است (۶). یکی از مشکلات عمده در ارتباط با تولید اتانل، سمیت این ماده برای رشد مخمر ساکارومایسین سرویزیه است که باعث مهار رشد شده و در نتیجه باعث کاهش مقدار اتانل و راندمان تولید در صنایع تخمیر می‌شود (۲۴). اتانل باعث مهار آنزیم‌های مهم مسیر گلیکولیتیک و القاء تولید رادیکال آزاد اکسیژن در مخمر می‌شود (۱۱). اتانل، استحکام غشاهای سلولی را مختل می‌کند، اندوسیتوز را مهار کرده، نیروی محرکه‌ی پروتونی غشاهای داخلی میتوکندریایی را بلوكه می‌کند و چندین آنزیم مهم مانند پروتئین کیناز A و

مواد و روشها

محیط‌های کشت و شرایط کشت مخمرها: سویه آزمایشگاهی هاپلولئید ساکارومایسین سرویزیه CEN.PK ۱۱۳.۷D به عنوان سویه والد برای آزمایش‌های تکامل YPD تطبیقی استفاده شد. سویه والد در محیط کشت ۲۰ گرم (مرک) رشد داده شد. این محیط حاوی ترکیبات (۲۰ گرم در لیتر گلوكز، 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 در نهایت محیط‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل شدند. این سویه با ۶ تکرار طی ۴۸ مرحله متوالی در میکروپلیت کشت داده شد و سویه‌های تکامل یافته با توجه به بهبود نرخ ویژه رشد به دست آمدند. غلظت ۱- بوتانل به تدریج در طول کشت‌های متوالی افزایش یافت بطوریکه غلظت ۱- بوتانل از ۱/۸ درصد (حجم در حجم) شروع و نهایتاً تا غلظت ۲ درصد (حجم در حجم) افزایش یافت و قبل از هر کشت در حضور ۱- بوتانل به عنوان فشار انتخابی، سلول‌ها در محیط تازه YPD به مدت ۳۰ دقیقه برای آزمایش‌های تکامل تطبیقی بازیابی شدند (۲۲).

بررسی تحمل سویه‌های صنعتی مخمر به اتانل: برای بررسی میزان تحمل به اتانل و ویژگی‌های رشد سویه CEN.PK ۱۱۳-۷D قبل از شروع آزمایش‌های تکامل تطبیقی، این سویه در معرض غلظت‌های مختلف اتانل از ۰ تا ۱۱ درصد (حجم در حجم) قرار گرفت و سرعت رشد ویژه آن مشخص شد. همچنین نرخ رشد ویژه این سویه در غلظت ۰/۵ تا ۲ درصد (حجم در حجم) ۱- بوتانل نیز تعیین شد.

آزمایش‌های تکامل تطبیقی: محیط کشت ملاس با رقیق کردن ملاس نیشکر در آب مقطر تا بریکس ۱۸ تهیه شد. پس از تهیه رقت، به منظور حذف ناخالصی‌های جامد، محیط کشت آماده شده در rpm ۵۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه،

تکنولوژی‌ای (SNP) ایجاد شده در آن را با میکروارگانیسم والد مقایسه کرد و سپس با بررسی ژن‌های تغییریافته، نحوه عملکرد آنها در این ویژگی را بررسی کرد تا در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرد. گسترش علوم بیوانفورماتیک، توسعه بیش از پیش توالی‌بایی و تعیین توالی نسل جدید به عنوان تحولی اساسی در مسیر استخراج اطلاعات ژنتیکی از سامانه‌های زیستی، جنبه‌های بی‌حد و حصری از اطلاعات کل ژنوم، رونویسی و اپی‌ژنوم گونه‌ها را آشکار کرده است. این قابلیت بسیاری از موانع مهم در استخراج اطلاعات از ژنوم را برطرف کرده و باعث ایجاد مسیرهای نوینی در توسعه میکروارگانیسم‌های مهم مورد استفاده در فرایندهای زیستی شده است (۷).

در تحقیقات انجام شده تاکنون در زمینه بهبود صفت مقاومت به تنش اتانل با رویکرد مهندسی تکاملی، از غلظت اتانل به عنوان فشار انتخابی استفاده شده است (۱۰، ۱۱، ۱۸). با توجه به دمای جوش پایین اتانل و تبخیر آن در حین کشت‌های مدت‌دار، احتمال تکثیر و گسترش جمعیت‌های کاذب مخمر نسبت به صفت مقاومت به اتانل وجود دارد. از طرفی در تحقیقات اخیر نشان داده شده است که سازوکار سمیت الكلهای کوتاه زنجیره بر مخمرها، به ویژه سویه مخمر ساکارومایسین سرویزیه، مشابه می‌باشد (۲۲، ۴۰). با توجه به این که ۱- بوتانل یک الكل کوتاه زنجیره با ساختار مشابه اتانل ولی دارای 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 اتانل و تولید اتانل سویه تکامل یافته با سویه والد مقایسه شد. در ادامه، ژنوم سویه منتخب تکامل یافته استخراج و توالی کل ژنوم آن تعیین شد. بدین ترتیب، تغییرات تکنولوژی‌ای ایجاد شده در سویه‌های تکامل یافته با میکروارگانیسم مادر مقایسه و ژن‌های جدیدی که در ارتباط با این صفت دستخوش تغییر شده بودند، معرفی شدند.

این مرحله ۲۰ گرم در لیتر بود که در مرحله هوایی که برای تکثیر سویه‌ها استفاده شد، سویه‌ها بر روی محیط کشت YPD در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و دور ۲۵۰ rpm در شیکر انکوباتور به مدت ۸ ساعت گرمگذاری شدند. از یک محفظه شیشه‌ای (Gas tight box) با قابلیت تنظیم و حفظ فشار گاز داخل محفظه از طریق یک خروجی گاز استفاده شد. این محفظه دارای یک ورودی برای گاز نیتروژن و یک خروجی برای هوا و اکسیژن بود و برای فراهم کردن شرایط کشت بی‌هوایی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). پس از ۸ ساعت هوادهی، غلاظت گلوكر محیط کشت به ۲۰۰ گرم در لیتر رسانده شد. کشت در شرایط بی‌هوایی در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با دور همزن ۷۰ rpm برای تولید اتابل به مدت ۳۶ ساعت ادامه یافت. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد.

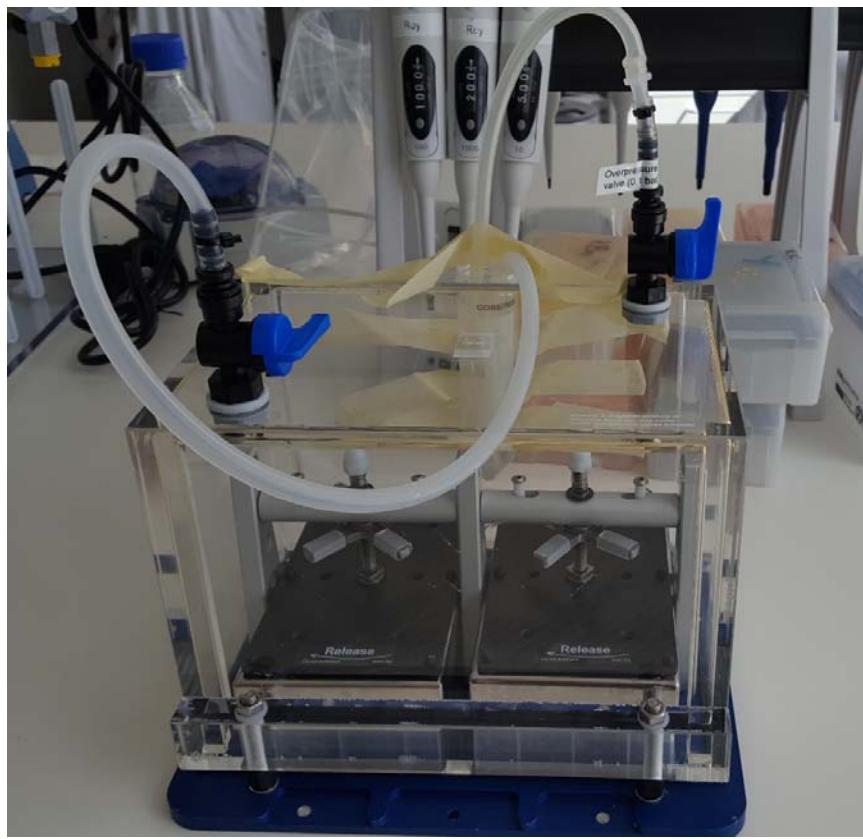
استخراج ژنوم و تعیین توالی کل ژنوم: تغییرات ژنومی در سویه‌های تکامل یافته توسط تعیین توالی کل ژنوم (WGS) مشخص شد. کلون‌های تکامل یافته از نمونه‌های جمعیتی منتخب مربوطه بروی پلیت YPD انتخاب شدند. سه کلونی از هر جمعیت منتخب بعد از آزمایش‌های تکاملی، به طور تصادفی بروی پلیت YPD انتخاب و به طور مجزا در محیط مایع YPD رشد داده شدند. بعد از تعیین میزان تولید و مقاومت این کلون‌ها، DNA کلون‌های تایید شده با استفاده از کیت Qiagen® استخراج شد. غلاظت DNA نهایی با استفاده از (Invitrogen Qubit 2.0) Qubit Fluorometer با دقت بسیار بالا اندازه‌گیری شد و کیفیت و کمیت ژنوم استخراج شده تایید گردید. نمونه‌های ژنوم خالص شده با استفاده از پلتفرم ایلومینا (Illumina) NextSeq Mid Output v2، با کیت NextSeq 500 یابی شدند. هر قطعه توالی خوانده شده (read) از ۱۵۰ جفت باز تشکیل شده بود که با پوشش $100\times$ تعیین توالی شدند.

در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شد. پس از افزودن ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم و ۲ گرم در لیتر اوره (مرک)، pH محیط توسط اسید سولفوریک ۴/۵ تنظیم و سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شد (۱).

برای شروع آزمایش‌های تکامل تطبیقی، با توجه به میزان نرخ ویژه رشد سویه والد، از غلاظت اولیه ۱/۸ (حجم در حجم) ۱- بوتائل استفاده شد که به طور مستقیم و بدون استریل کردن به محیط کشت اضافه شد. هر میکروپلیت با فویل غشایی کاملاً محکم پوشیده شد تا از تبخیر الكل جلوگیری شود. میکروپلیتها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و دور ۷۰ rpm گرمگذاری شد. برای جلوگیری از اثر تبخیر محیط از بیرونی ترین ردیف‌های میکروپلیت استفاده نشد.

خوگیری سویه‌ها با اندازه‌گیری میزان کدورت در OD₆₀₀ و محاسبه نرخ ویژه رشد تمام سویه‌ها حین انجام آزمایش‌های تکامل تطبیقی پایش شد. به منظور نگهداری تمامی رددهای سلول تکامل یافته، قبل از هر بار تکرار کشت، ۰/۲ میلی لیتر از کشت قبلی به ۰/۲ میلی لیتر از محلول گلیسروول تکامل یافته، در محیط کشت YPD تازه (حجم در حجم) اضافه و در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد ذخیره شد (۲۲). نرخ ویژه رشد مخمر در طول تکرار کشت در محیط حاوی غلاظت مذکور الكل کاهش و افزایش یافت و درنهایت پس از ۶۴ روز نرخ ویژه جمعیت‌ها ثابت شد و کاهش نیافت. در این زمان، میزان غلاظت ۱- بوتائل از ۱/۸ درصد (حجم در حجم) به ۲ درصد در کشت‌ها افزایش یافت.

بررسی تولید کمی اتابل توسط مخمر: از میکروپلیت‌های با عمق ۵ سانتی‌متر برای کشت سویه‌های منتخب برای اندازه‌گیری میزان اتابل تولید شده استفاده شد، به طوری که حجم نهایی محیط کشت ۲ میلی لیتر شد. غلاظت قدر در



شکل ۱- محفظه شیشه‌ای با قابلیت تنظیم فشار برای کشت بی‌هوایی سویه‌ها و تولید اتانل

آنالیز دستگاهی: برای تعیین غلظت اتانل و گلوکز باقیمانده در محیط کشت، نمونه‌ها با کروماتوگرافی مایع (Ultimate 3000، Thermo Fisher (HPLC) با فشار بالا (HPLC) آنالیز شدند. از ستون (Scientific, Waltham, MA, USA) تعویض یونی (Aminex HPX-87H Product no: 1250140, Bio-Rad, Hercules, California, USA) به عنوان فاز ثابت و از اسید سولفوریک ۱ میلی‌مولار به عنوان فاز متحرک استفاده شد. ترکیبات با استفاده از یک آشکارساز RI شناسایی شدند (۳۲). از آب میلیکیو (MilliQ water) استریل برای رقیق‌سازی نمونه‌ها استفاده شد. از هر نمونه ۲۰ میکرو‌لیتر در ستون با دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و با سرعت جريان فاز متحرک ۰/۶ میلی‌لیتر در دقیقه تزریق شد. نمونه‌های استاندارد با رقیق کردن محلول‌های گلوکز و اتانل به غلظت‌هایی که دامنه

کیفیت توالی خوانده شده در ۸۰٪ قرائت از تمام موارد با نمره کیفیت Q30 تصمین شد. از برنامه- Trimmomatic- ۰.۳۲ برای پیرایش توالی آداپتور با پارامترهای پیش فرض برای داده‌های تعیین توالی در همه نمونه‌ها استفاده شد (۹). هر نمونه حاوی بیش از ۱۰ میلیون توالی خوانده قابل نقشه‌برداری بود. هر نمونه با ۴ تکرار تکنیکال برای هر کلون تکامل یافته نسبت به ژنوم مرجع CEN.PK113-7D (http://cenpk.tudelft.nl) نقشه‌برداری و با استفاده از پایپلاین GATK مطابقت داده شد. تجدید چینش INDEL حذف تکراری SNP در همه نمونه‌ها به طور همزمان با استفاده از پارامترهای استاندارد فیلترینگ انجام شد (۳۶، ۱۶). برای مرتبسازی و فهرست‌بندی فایل‌های تراز از SAMtools استفاده شد (۲۶).

جدول ۲- ترکیبات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز					
		ترکیب	غلط	حجم	غلظت نهایی
				(میکرولیتر)	
IX	۲۵	۲X	مستر میکس آنزیم فیوزن ۲X Master Mix (Phusion U)		
۰/۵	۱	۱۰ پیکو مول	پرایمر Forward		
میکرومول					
۰/۵	۱	۱۰ پیکو مول	پرایمر Reverse		
میکرومول					
۱۰-۲۵۰	۱		ژنوم		
نانوگرم					
۳%	۱/۵	DMSO ۱۰۰%			
	۲۰/۵	آب مقطر استریل			

سویه در معرض غلظت‌های مختلف اتابل از ۰ تا ۱۱ درصد (حجم در حجم) قرار گرفت و نرخ رشد ویژه سویه در هر یک از غلظت‌های یاد شده نیز تعیین شد (شکل ۲). همچنین نرخ رشد ویژه سویه مذکور در غلظت ۰ تا ۲ درصد -۱- بوتالن نیز تعیین شد (شکل ۳). در این مطالعه، سویه مخمر تا ۲ درصد (حجم در حجم) -۱- بوتالن سازگار شد. سویه‌ها تحت فشار انتخابی -۱- بوتالن، تا ۱۴۴ روز متوالی کشت شدند. انتقال سویه به یک محیط تازه حاوی غلظت -۱- بوتالن بالاتر زمانی انجام شد که سرعت رشد در غلظت قبلی برای چندین نسل ثابت باقی ماند بود. پس از ۴۸ دوره کشت در طی ۱۴۴ روز، برخی از رده‌های سلولی مورد آزمایش قادر به رشد در غلظت٪۲ (حجم در حجم) -۱- بوتالن بودند، در حالی که سویه والد قادر به رشد در این غلظت نبود.

حداکثر نرخ ویژه رشد به تدریج در طول آزمایش‌های تکامل تطبیقی افزایش یافت. اگرچه، در برخی مراحل کاهش نرخ رشد نیز مشاهده شد، اما پس از ۴۸ دوره کشت متوالی تحت تنش -۱- بوتالن، جداکثر نرخ ویژه رشد یک سویه از 0.048 h^{-1} به 0.084 h^{-1} ارتقا یافت (شکل ۴).

حساسیت تشخیص ستون را پوشش می‌داد، تهیه شدند. حجم نهایی نمونه‌های جمع‌آوری شده در ویالهای HPLC ۰/۵ میلی لیتر بود.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): جهت تایید SNP های حاصل از تفسیر تعیین توالی کل ژنوم در سویه‌های تکامل یافته از روش (واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) PCR برای تکثیر قطعات حاوی جهش-ها استفاده شد و در دستگاه ترموسایکلر BIORAD مدل ۵۸۲BR با سیکل ارائه شده در جدول ۱ قرار داده شد.

جدول ۱- چرخه دمایی مورد نیاز برای واکنش زنجیره ایی پلیمراز

مرحله	دما (سانتی گراد)	زمان (ثانیه)
واسرشنگی اولیه	۹۸	۳۰
واسرشنگی	۹۸	۱۰
متغیر براساس آغازگر		متغیر
اتصال	۶۰	۱۵-۳۰ s/kb
تکثیر	۷۲	تکرار مرحله ۲-۴ (۳۰ بار)
تکثیر	۷۲	۱۰
توقف واکنش	۴	

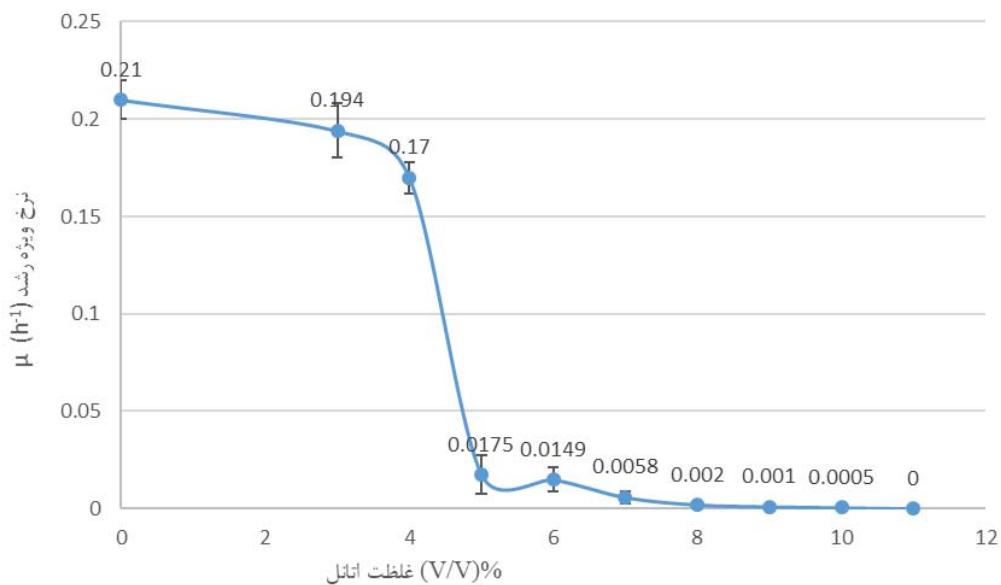
برای مبنای آغازگرها برای هر جهش دمای اتصال تعیین شد. تمام واکنشهای زنجیره ای پلیمراز با استفاده از با Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix Waltham، Thermo Scientific، F565S (شماره محصول: ۰۵۰، ماساچوست، ایالات متحده آمریکا) با حجم میکرولیتر طبق جدول ۲ در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. آغازگرهاست از رده‌های سلولی مورد آزمایش قادر به رشد در در جدول ۳ مشاهده کرد...

نتایج

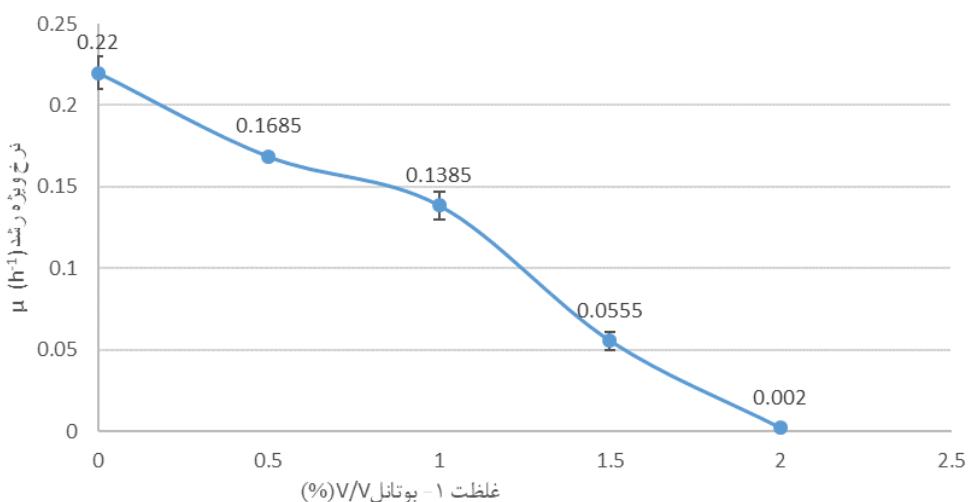
بررسی رشد سویه و تعیین تحمل به الکل: میزان رشد سویه ساکارومایسین سرویزیه CEN.PK 113-7D، قبل از شروع آزمایش‌های تکامل تطبیقی ارزیابی شد.

جدول ۳- فهرست آغازگرهای استفاده شده برای تایید جهش‌های تکنولوژی

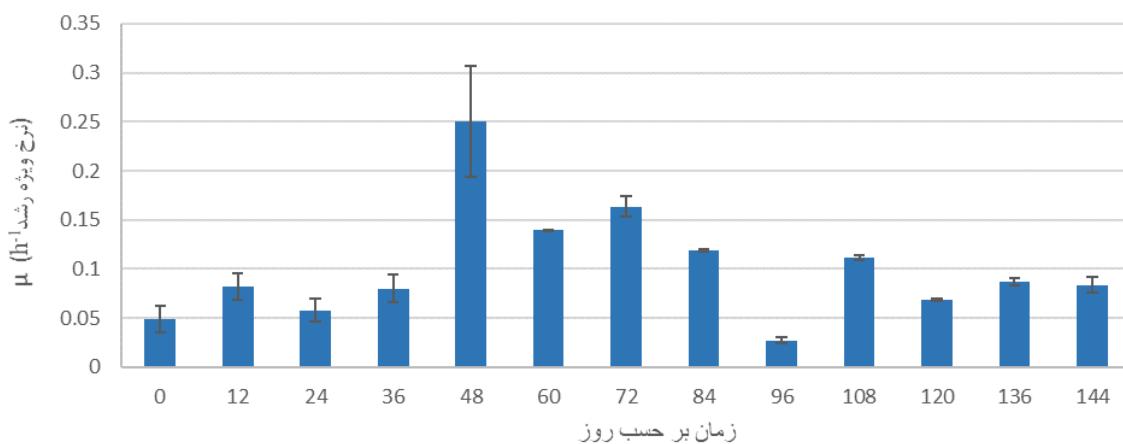
نام	توالی آغازگر $5' \rightarrow 3'$	نوکلئوتید	Tm (°C)
DAN4	Forward TCTACAACCTCCACCACT	۱۸	۵۸/۳
	Reverse GGAAGTGGTTGCTTACTGA	۲۰	۵۹
ISC1	Forward GAAAATCAAACCCACCCTT	۱۹	۵۷/۲
	Reverse TCATCATCATCCCCGGTA	۱۸	۵۸/۳
CIA1	Forward ATGGCGTCTATCAATCTGAT	۲۰	۵۷/۷
	Reverse GCTGCTTTCTAGAGACCA	۲۰	۵۸/۸
UBP2	Forward GCCAACGAAAGATAATGAA	۲۰	۵۶/۶
	Reverse TGGAGGGACGTATTCACTGA	۱۹	۵۸/۲
IAH1	Forward AGATGGCAAAGATCAGTA	۱۸	۵۴/۲
	Reverse CCATCATCTAGCACATCTCT	۲۰	۵۷/۶
FAB1	Forward ACAATAGCTCTGCAACA	۱۷	۵۴/۷
	Reverse ATCGCTAGTATATCGGGATTC	۲۱	۵۷/۷
TUB3	Forward GGAACACGCAGACTGTA	۱۷	۵۷/۲
	Reverse AGAACTCCTCAGCGTAAGA	۱۹	۵۸/۷
MTH1	Forward AGCAGACCCATCCAACAT	۱۸	۵۹/۸
	Reverse GGTAAACTTGTGCCTGACA	۱۹	۵۸/۸
PGM2	Forward GCCGCTTCTCACATCAT	۱۷	۵۸/۱
	Reverse CGTACTTTGCCAGAATT	۱۸	۵۶/۸
RTK1	Forward GGAGTATGCCCATATGA	۱۸	۵۷/۵
	Reverse TCTTTATTCCCGTGTGCT	۱۸	۵۸/۲
SHE4	Forward GAATGATCCAATCGATAGCT	۲۰	۵۶/۲
	Reverse TCGACCACTGCTTATCAA	۱۸	۵۷/۸
YAP1801	Forward CCGTTCGCATTGCACAA	۱۷	۵۹/۹
	Reverse GAGGTTGTTAGCATATTGGT	۲۰	۵۶/۹
SEC12	Forward GAAGTTCGTGACAGCTAGT	۱۹	۵۷/۹
	Reverse CCAATTACCCCTTCATGT	۱۷	۵۶



شکل ۲- منحنی نرخ ویژه رشد سویه ساکارومایسین سرویزیه در غلظت‌های مختلف اتانول، هر داده میانگین ۳ تکرار می‌باشد.



شکل ۳- منحنی نرخ ویژه رشد سویه ساکارومایسین سرویزیه در غلظت‌های مختلف ۱-بوتانول، هر داده میانگین ۳ تکرار می‌باشد.



شکل ۴- تغییرات نرخ ویژه رشد سویه ساکارومایسین سروبیزیه طی آزمایش‌های تکامل تطبیقی در شرایط تنفس ۱- بوتانل. غلظت بوتانل تا روز شصت و چهارم برابر با ۱٪ (حجم در حجم) بود و سپس به ۰.۲٪ افزایش داده شد.

۱۶۳/۳۴ ۸۷/۰۲±۱/۷۶ گرم در لیتر و میزان مصرف گلوکز ۱۴۵/۰ ۶۸/۵۲±۲/۴۶ گرم بر لیتر و میزان مصرف گلوکز ۱۴۵/۰ گرم بر لیتر بود. این داده‌ها نشان می‌دهد که افزایش تحمل مخمر در برابر ۱- بوتانل منجر به افزایش تحمل به اتانول (شکل ۶) و سرعت مصرف قدر شده که نهایتاً میزان تولید اتانول نیز در این دوسویه تکامل یافته افزایش یافت.

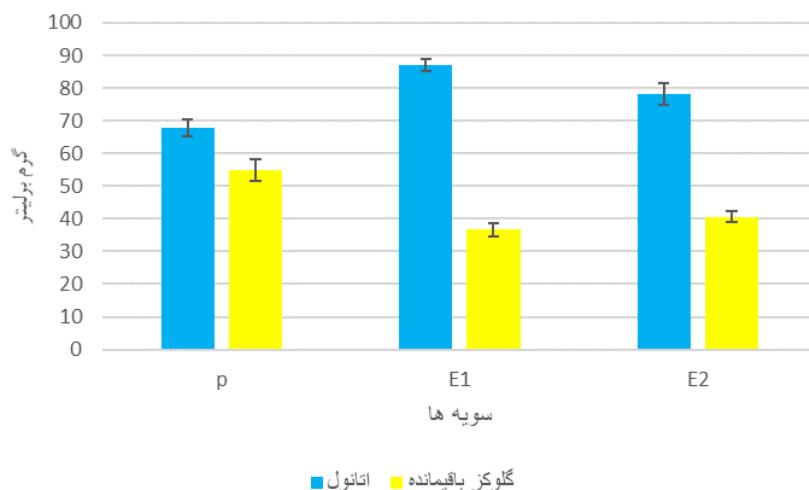
نتایج حاصل از تفسیر توالی یابی کل ژنوم: برای رمزگشایی از مسیرهای جهش یافته در هنگام سازگاری با ۱- بوتانل، ژنوم سویه‌های منتخب تکامل یافته در طول آزمایش، مجددًا توالی یابی و شناسایی شد، ۶۸ جهش در مناطق رمزگذار ژن، از جمله ۳۸ جهش ۷۸ جهش خاموش و ۶ حذف در ژنوم اتفاق افتاده بود. برخی جهش‌ها در منطقه رمزگذار ژن غالب ژن‌های شناسایی شده، در ارتباط با انتقال مواد درون سلول و مسیرهای دخیل در ترکیب و ساختار غشاء سلولی، ساختار دیواره

به منظور مشابه سازی با شرایط صنعتی برای انتخاب سویه‌های برتر به لحاظ مقاومت به الكل، از محیط کشت ملاس استفاده شد. معیار انتخاب سویه‌های برتر، توان تکثیر بالاتر طی کشت‌های بی در بی تحت تنفس الكل و محاسبه زمان نسل بود. میزان نرخ ویژه رشد سویه منتخب در محیط کشت ملاس از $10^{0.48} \text{ h}^{-1}$ به $10^{0.06} \text{ h}^{-1}$ ارتقا یافته بود.

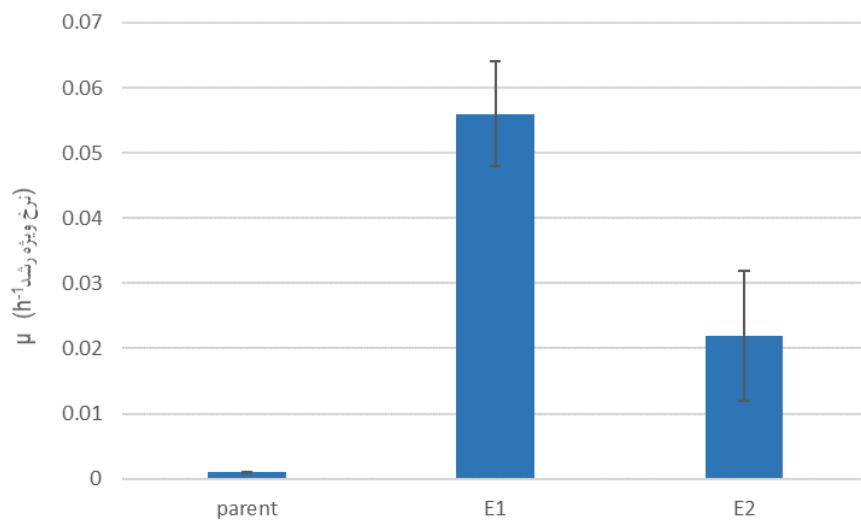
تعیین میزان تولید اتانول سویه‌های منتخب: برای بررسی تأثیر افزایش مقاومت به ۱- بوتانل سویه‌های تکامل یافته منتخب بر افزایش تولید اتانول آنها، میزان تولید اتانول و مصرف گلوکز هر سویه تکامل یافته مشخص شد (شکل ۵). برای مشخص شدن تاثیر افزایش مقاومت به اتانول بر میزان تولید اتانول، از غلظت گلوکز ۲۰۰ گرم بر لیتر محیط کشت استفاده شد. در محیط YPD حاوی ۲۰۰ گرم در لیتر گلوکز، تغییرات جمعیت سلول سویه‌های تکامل یافته با والدین متناظر آنها تقاضه معنی‌داری وجود داشت.

میزان تولید اتانول و مصرف گلوکز برای دو سویه تکامل یافته افزایش یافت. تولید اتانول سویه تکامل یافته E1 منتخب که در محیط کشت YPD در غلظت ۲ (حجم در حجم) ۱- بوتانل تکامل یافته بود به

سلولی، متابولیسم قند و متابولیسم لیپید بودند با استفاده از واکنش زنجیره‌ایی پلیمراز تایید شدند (جدول ۱).



شکل ۵- میزان تولید اتانول سویه‌های تکامل یافته و گلوكز باقیمانده در محیط کشت در مقایسه با سویه والد. P سویه والد، E1 سویه تکامل یافته در محیط کشت ملاس و E2 سویه تکامل یافته در محیط کشت YPD



شکل ۶- تغییرات نرخ رشد دوسویه تکامل یافته در طی آزمایش‌های تکامل تطبیقی در غلاظت ۹٪ حجم در حجم اتانول

تکامل یافته در محیط کشت ملاس بیشتر بود. برخی از SNPs‌های سویه‌های تکامل یافته با طراحی آغازگرها و انجام PCR تأیید شدند (جدول ۴).

دراین مطالعه، جهش‌های تکنولوژی در مناطق غیر رمزگذار ژن حذف شدند. تعداد جهش‌های یافت شده در سویه تکامل یافته در محیط کشت YPD نسبت به سویه‌ی

جدول ۴- فهرست SNPs تایید شده حاصل از توالی‌بایی کل ژنوم و ژن‌های مرتبط

ژن	شماره کروموزوم	اسید آمینه تغییر یافته	شرح کار پروتئین
YAP1801	Gln575His	۹	پروتئین متصل شونده به کالاترین در فرایند اندوسیتوز و دخیل سازماندهی اسکلت سلولی
CIA1	Arg63Phe	۴	از پروتئین‌های کلاستر سولفور-اهن سیتوزلى دخیل در بیوسترن متیونین، دخیل در سازماندهی زیرواحد بزرگ ریبوزم
RTK1	Pro585Thr	۴	پروتئین مورد نیاز برای بیوژنر ریبوزم
TCB1	Asp96Asn	۱۵	از پروتئین‌های دخیل در سازماندهی غشاء شبکه اندوپلاسمی و تنظیم دفسفوریله شدن فسفاتیدیل اینوزیتول
SHE4	Lys25Asn	۱۵	پروتئین متصل شونده به میوزین و دخیل در سازماندهی میوزین و اکتین، انتقال سلولی
IAH1	Lys163Asn	۱۵	آنژیم هیدرولیز کننده ایزوآمیل استات استراز
DAN4	Glu181Lys	۱۰	مانوپروتئین دیواره سلولی، بیان ژن در شرایط بی‌هوایی
UBP2	Asp342Ala	۱۵	آنژیم پروتئاز یوبی‌کیتیون وابسته به تیول دخیل در تنظیم دستاوردهای غشاء میتوکندری
PGM2	Met226Ilu	۱۳	آنژیم فسفوگلوموتاز
TUB3	Ala338Val	کروموزوم ۱۳	پروتئین آلفا توبولین، نقش در تقسیم سلولی
MTH1	Cys329Trp	۴	پروتئین داخل غشاء‌ای، دخیل در انتقال گلوکز و انتقال سیگنال
SEC12	Lys25Asn	۱۴	پروتئین مورد نیاز برای تشکیل وزیکول COP11 برای انتقال از شبکه اندوپلاسمی به شبکه گلتری
FAB1	Asn582Ser	۶	پروتئین فسفاتیدیل اینوزیتول ۳فسفوکیناز، نقش در هموستازی سلول

نتایج تعیین توالی کل ژنوم منجر به آشکارسازی تغییرات تک‌نوکلوتیدی در ژنوم سویه‌های منتخب شد. اغلب SNPs برای بار نخست در این مقاله در رابطه با این صفت گزارش می‌شوند. این SNPs در ژن‌هایی *TCB1*, *TCB1*, *YAP1801*, *UBP2*, *FAB1*, *DAN4*, *SEC12*, *TUB3* و *FAB1* هستند. جهش‌های روی داده در ژن‌های *TUB3* و *FAB1* صفت گزارش می‌شوند.

های منتخب قادر به مصرف گلوکز بیشتر و تولید اتانل بالاتری شدند.

در تحقیق حاضر، افزایش نرخ رشد ویژه به عنوان پارامتر انتخابی برای جداسازی سویه‌های با تحمل بالاتر به الكل انتخاب شد. جمعیت طی مراحل مکرر رشد مدام تحت غلاظت بالای الكل با تنفس موجود خوگرفته و رشد در حضور تنفس پایدار، منجر به تکثیر جمعیت برتر در این شرایط شد. برای بررسی تاثیر افزایش تحمل به الكل بر افزایش تولید اتانل، از غلاظت ۲۰۰ گرم بر لیتر گلوکز استفاده شد. نتایج نشان داد دو سویه تکامل یافته منتخب که براساس افزایش نرخ رشد ویژه تحت تنفس انتخاب شده بودند نسبت به سویه والد میزان اتانل بالاتری در شرایط یکسان تولید کردند. به نظر می‌رسد، تحمل این سویه‌ها نسبت به اتانل بهبود یافته و قادر به استفاده از گلوکز بیشتری نسبت به سویه والد بوده و به رشد خود در این شرایط ادامه دادند و درنهایت میزان اتانل بیشتری نسبت به سویه والد تولید کردند.

در ارتباط با صفت تحمل به اتانل، ژن‌های متعددی دخیل هستند که طیف وسیعی از مسیرهای متابولیسمی مانند بیوستر پروتئین، مسیر انتقال مواد به داخل سلول، چرخه رشد سلولی و رشد، متابولیسم اسیدهای چرب، سازمان-یابی دیواره سلول و غشاء را دربرمی‌گیرند. هرکدام از این ژن‌ها، در گروه‌های عملکردی مختلف طبقه‌بندی شده‌اند. با وجود این، سازوکار تحمل به اتانل بهطور کامل شناخته نشده است. تعداد زیادی از این ژن‌ها دارای عملکرد چندگانه بوده و باهم میانکش دارند. پیچیدگی شبکه پاسخ مخمر طوری است که مسیرها به طور مدام برنامه‌ریزی می‌شوند و این، تعیین سازوکار تحمل اتانل را مشکل کرده است. با وجود این، تلاش محققین برای شناسایی ژن‌های موثر براین صفت همچنان ادامه دارد.

موریا و همکاران در تحقیقی اهمیت بیان ژن *MTH1* برای تنظیم بیان ژن *HIX1* در مسیر انتقال هگزووزها به داخل

SHE4 در ارتباط با اسکلت سلولی و دینامیک درون سلولی، ژن آنزیم فسفوگلوموتاز 2 (*PGM2*) و *MTH1* دخیل در متابولیسم گلوکز، ژن آنزیم ایزوآمیل استات استراز *IAHI* و *CIA1* رمزگذار پروتئینی که در همانندسازی و تعمیر ژنوم نقش داشته و از طرفی در حفظ و نگهداری تلومر موثر است.

بحث

امروزه تولید بیواتانل از چشم‌انداز کاملاً منحصر به فردی در جهان برخوردار است و همچنان به عنوان یک محصول راهبردی محسوب می‌شود و امنیت انرژی را تضمین می‌کند (۲،۳). افزایش تولید اتانل در فرآیند صنعتی به عوامل مختلف بستگی دارد و مهمترین عامل، چگونگی عملکرد و قدرت بقاء مخمر در شرایط تخمیر می‌باشد. تجمع اتانل در طول فرآیند تخمیر در واکنش گاه اجتناب‌ناپذیر است و اثر بازدارندگی آن بر روی رشد ثابت شده است (۱۷). یک رویکرد موفق برای بهبود تحمل تنفس ساکارومایسیس سرویزیه، بهبود مقاومت این سویه از طریق سازگاری فیزیولوژیکی با الكل هاست (۵) و انتخاب سویه مقاومی که ناشی از جهش ایجاد شده در اثر فشار انتخابی باشد، می‌تواند باعث افزایش طول عمر مخمر در شرایط تنفس‌زا شده و درنهایت راندمان تولید را بالا برد (۱۰،۱۱). در تحقیقات گذشته اثر سمیت مشابه الكل‌های کوتاه زنجیره بر روی ساکارومایسیس سرویزیه ثابت شده است. براساس این پژوهش‌ها، سویه‌هایی که طی آزمایش‌های تکامل تطبیقی در برابر بوتانل بهبود یافته‌اند، در برابر اتانل نیز مقاومت بالاتری از خود نشان می‌دهند (۴۰،۲۲). در این تحقیق نیز از ترکیب ۱-بوتانل که سمیت نسبتاً بالاتری نسبت به سایر انواع بوتانل و همچنین اتانل دارد (۲۲)، به عنوان فشار انتخابی استفاده شد. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد افزایش تحمل به این ترکیب منجر به افزایش تحمل به اتانل نیز می‌شود و علاوه بر این، سویه-

افزایش سنتز پروتئین در سلول حین مواجهه مخمر با تنش اتانل در مطالعات قبلی اثبات شده است (۱۱). پروتئین سیتوزولیک و هسته‌ای آهن-گوگردی حاصل از بیان ژن *CIA1* عملکرد بسیار مهمی در پردازش *tRNA* و بیوزنر ریبوزوم در سلول‌های یوکاریوت دارد. این پروتئین برای مخمر ساکارومایسیس سرویزیه حیاتی بوده و در شروع ترجمه نقش بنیادی دارد. سلول‌های یوکاریوتی سازوکارهای مقابله‌ای زیادی از جمله تنظیم ترجمه و بیان ژن‌های آتنی اکسیدانی محافظت را ایجاد کرده‌اند، و از طریق تقویت سیستم پروتئین‌سازی، پروتئین‌های مورد نیاز برای مقابله با شرایط تنش‌زا را سنتز می‌کنند. این پروتئین در بیوزنر ریبوزوم موثر بوده و باعث افزایش سنتز پروتئین در پاسخ به تنش شده و با افزایش همانندسازی DNA، باعث افزایش نرخ رشد می‌شود (۳۷).

تنش اکسایشی یک چالش برای شرایط هموستاز سلولی است و تنش الكل یکی از عواملی است که می‌تواند منجر به ایجاد این شرایط اکسایشی در سلول مخمر شود. محصول ژن *UBP2* یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی مسیر غیراشباع‌کردن اسیدهای چرب در میتوکندری است که اثر آنتاگونیستی بر فعالیت پروتئین ژن *RSP5* داشته و منجر به سنتز اسید‌چرب اولئیک، یک اسید‌چرب غیراشباع، می‌شود. غشاء سلولی تحت تاثیر الكل‌ها تغییر ساختار داده و وارد فرآیند پاسخ می‌شود. افزایش دو اسید‌چرب غیراشباع اسید پالمتوئیک و اسید اولئیک در غشاء ساکارومایسیس سرویزیه باعث افزایش سیالیت غشاء و تحمل تنش اتانل می‌شود (۳۰). این دو اسید‌چرب بهویژه اسید اولئیک در گونه‌های مقاوم به اتانل دیده شده‌اند (۱۲، ۱۳).

نوع اجزای تشکیل دهنده غشاء سیتوپلاسمی سلول شامل پروتئین‌ها و لیپیدها با تنظیم فرآیندهای اگوستیوز و اندوسیتوز، کترول بسیاری از فرآیندهای سلولی ضروری مانند جذب مواد مغذی و انتقال سیگنال با واسطه گیرنده را بر عهده دارند. ژن *YAP1801* پروتئینی را رمزگذاری می-

سلول مخمر را بیان کردند (۲۷). در واقع ژن *MTHI* پروتئینی را رمزگذاری می‌کند که تنظیم کننده منفی مسیر انتقال سیگنال حسگر گلوکز بوده و میزان ورود و خروج گلوکز را به داخل سلول از طریق میانکش با پروتئین دو ژن *SNF3* و *RGT2* تنظیم می‌کند (۲۵). با توجه به افزایش میزان مصرف گلوکز سویه‌های تکامل یافته، به نظر می‌رسد که جهش در این ژن حائز اهمیت است. آنزیم فسفوگلوکوموتاز حاصل از ژن *PGM2*، مسئول تبدیل گلوکز-۱-فسفات به گلوکز-۶-فسفات است و این ترکیب ماده اولیه مسیر گلیکولیز و مسیر پتوزفسفات بوده و یکی از آنزیم‌های کلیدی در متابولیسم گلوکز به شمار می‌رود. از طرفی متابولیسم گلوکز به طور تنگاتنگی در مسیر تولید ترهالوز تاثیرگذار است. کربوهیدرات‌هایی مثل ترهالوز، مواد سازگار کننده‌ای هستند که می‌توانند در هنگام ورود نمک‌های اضافی از دهیدراته شدن برگشت‌ناپذیر سلول‌های مخمر جلوگیری کنند. مخمرها قادرند در شرایط تنش محیطی تا ۱۵٪ وزن خشک سلول ترهالوز در خود جمع کنند. تجمع ترهالوز تحت شرایط تنش اتانل هم مشاهده شده است و سلول‌هایی که قادر به تجمع ترهالوز نباشند، رشدشان در شرایط تنش اتانل کاهش و با تأخیر انجام می‌گیرد (۲۸). بعد از رهایی از تنش اتانل، ژن‌های تجزیه‌کننده ترهالوز نیز فعال شده و بیان آنها بالا می‌رود. تجمع ترهالوز با افزایش بیان ژن‌های مسئول سنتز ترهالوز مثل *UGP1*, *PGM2*, *TSL1*, *TPS2* کاهش نفوذپذیری غشاء سلولی می‌شود و این کار می‌تواند از طریق شکل‌گیری پروتئین‌ها باشد. در شرایط عادی، ترهالوز در سلول تجمع نمی‌یابد و برخلاف شرایط تنش اتانل، به سرعت تجزیه می‌شود؛ اما در شرایط تنش دما و اتانل این ترکیب در سلول تجمع یافته و باعث حفظ تمامیت سلول مخمر در این شرایط می‌شود. هرو و همکاران تاثیر آنزیم فسفوگلوکوموتاز بر تولید ترهالوز طی تنش اتانل را گزارش کردند (۲۳).

جوانه‌زدن و ساختار دیواره سلولی مخمر ساکارومایسیس سرویزیه بوده و از طریق وزیکول‌ها، حمل و نقل پروتئین صادراتی را از شبکه آندوپلاسمی به شبکه گلزاری منتقل می‌کند. ژن *SEC12* پروتئینی را رمزگذاری می‌کند که اولین مرحله تشکیل وزیکول COPII، شامل تبدیل Sar1p-GDP به Sar1p-GTP توسط عامل تبادل نوکلئوتید گوانین Sec12p می‌رسد این ژن در تکثیر و رشد مخمر تاثیرگذار باشد. در ساکارومایسیس سرویزیه، *TUB3* یکی از ژن‌هایی است که پروتئین آلفاتوبولین را رمزگذاری می‌کند. میکروتوبول‌ها عناصر اسکلتی محافظت شده‌ای هستند که در فرایندهای هسته‌ای مانند تکنیک کروموزوم در میتوز و میوز، جهت دوک همانندسازی و مهاجرت هسته‌ای در طی میتوز و جفت‌گیری تاثیرگذار هستند. بد و همکاران گزارش کرده‌اند که محصول این ژن با افزایش دینامیک میکروتوبول‌ها بر جوانه‌زدن و تکثیر مخمر تاثیرگذار است (۸). پروتئین ژن *SHE4* عضوی از خانواده پروتئین‌هایی است که برای اندوسیتوز و قطببندی اسکلت سلولی *She4p* اکتین در ساکارومایسیس سرویزیه مورد نیاز است. تنظیم تعامل بین موتور Myo3/5p و F-actin را بر عهده دارد و به نظر می‌رسد که برای عملکرد پروتئین میوزین حضور *She4p* ضروری است (۳۴). ژن‌های درگیر در جوانه زدن و دینامیک سلولی به دلیل این که منجر به تطابق درون سلولی مخمر با شرایط محیطی و توان ادامه بقا می‌شوند، حائز اهمیت هستند.

با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، استفاده از ۱- بوتanol به عنوان فشار انتخابی جایگزین اتانول، منجر به بهبود تحمل به اتانول در سویه تکامل یافته شده است و دو سویه منتخب نسبت به اتانول مقاوم‌تر شده‌اند. می‌توان از SNP‌های تایید شده در این تحقیق، برای مهندسی معکوس و بررسی اثر آن در سویه وحشی در مطالعات بعدی استفاده نمود.

کند که به پروتئین کلاترین متصل شده و در انتقال وزیکول به ارگانل مناسب نقش بهسازی دارد. این پروتئین همچنین در سازماندهی اسکلت سلولی نقش دارد (۳۹). شبکه آندوپلاسمی یک اندامک بسیار مهم در سلول‌های یوکاریوت به شمار می‌رود که نقش اساسی در سنتز لبیدهای ترشح پروتئین‌ها و انتقال سینگال کلسیم دارد. پروتئین حاصل از ژن *TCB1* که در شبکه آندوپلاسمی سنتز و ترشح شده، یکی از پروتئین‌هایی است که شبکه آندوپلاسمی را به غشاء پلاسمایی متصل می‌کند، در انتقال کلسیم و انتقال آن به داخل سلول و سازماندهی شبکه آندوپلاسمی تاثیرگذار است (۳۵).

ژن *DAN4* سنتز مانوپروتئین دیواره سلولی در مخمر را رمزگذاری می‌کند که در شرایط بی‌هوایی بیان می‌شود. به نظر می‌رسد که الیگوساکاریدهای کوچک مرتبط با مانوپروتئین‌ها نیز به ثبات دیواره سلول کمک می‌کنند. این پدیده را می‌توان با وجود پیوندهای قوی که بین ساکاریدهای مرتبط با این پروتئین‌ها وجود دارد، توضیح داد. وجود این نوع مانوپروتئین‌ها در ثبات دیواره سلولی بسیار موثر است (۴).

فسفاتیدیل اینوزیتول ۴, ۵ بیس فسفات در غشاء سیتوپلاسمی مخمر قرارداشته و دارای دو نقش ساختاری و سیگنالی است. در حفظ تمامیت سلول و هموستازی سلول از طریق دینامیک غشاء نقش داشته و همچنین در سازماندهی رشته‌های اکتین اسکلت سلولی تاثیرگذار است. ژن *FAB1* یک پروتئین ۲۵۷ کیلو دالتونی را رمزگذاری می‌کند که حاوی یک دامنه غنی از سیستین در انتهای *NH2* می‌باشد. *Fab1p* به عنوان یک فسفاتیدیل اینوزیتول ۴-فسفات کیناز عضوی از یک خانواده آنزیمی شناخته می‌شود که با فسفولیله کردن فسفولبیدها و ایجاد پیامبرهای ثانویه در مسیرهای مختلف انتقال پیام از جمله تکثیر، تمایز، کنترل سیکل سلولی تاثیرگذار است (۱۴,۳۳). پروتئین پوششی (COPII) نیز یکی از پروتئین‌های مهم در

سپاسگزاری

از حمایت مادی و معنوی موسسه تحقیقات و آموزش توسعه نیشکر و صنایع جانبی خوزستان و همچنین مرکز the Novo Nordisk Foundation Center for منابع

- میزان بیوآتانول تولیدی. پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۴، ۶۳۹-۶۲۶
- ۳- ممینی دهکردی. م. (۱۳۸۷). بهینه‌سازی تولید بیوآتانول در مخمر ساکارومایسیس سروزیزه از طریق مهندسی متabolیک. پایان‌نامه دکتری رشته میکروبیولوژی. دانشگاه اصفهان. صفحه ۲۵.
- 4- Abramova N, Sertil O, Mehta S. Lowry C.V. 2001. Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 183 (9):2881-7
- 5- Attfield, P.V. 1997. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. Nat. Biotechnol. 15, 1351–1357.
- 6- Bai FW, Chen LJ, Zhang Z, Anderson WA, Moo-Young M. 2004. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. J. Biotechnol. 110:287–293.
- 7- Behjati S, Tarpey PS. 2013. What is next generation sequencing? Archives of Disease in Childhood - Education and Practice 0: 1–3.
- 8- Bode CJ, Gupta J. ML, Suprenant K A, Himes R H. 2003. The two alpha-tubulin isoforms in budding yeast have opposing effects on microtubule dynamics *in vitro*. EMBO Rep. 4 (1):94-9.
- 9- Bolger Anthony m, Lohas Marc, Usadel Bjoern. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data. Bioinformatics 1:30(15):2114-20.
- 10- Cakar ZP, Seker UOS, Tamerler C, Sonderreger M, Sauer U. 2005. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res. 5:569–578.
- 11- Cakar, ZP., Turanli-Y, Alkim C., Yilmaz, U. 2012. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. FEMS Yeast Res. 12. 171–182.

- ۱- درویشی ف، ابوالحسنی مقدمی ن، ۱۳۹۷، جداسازی سویه صنعتی ساکارومایسیس سروزیزه با قابلیت تحمل بالا به اتابل از کارخانه های الکل سازی ایران. پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۵۹۲، ۳۱. ۵۸۲
- ۲- فرامرزی س، انزایی ی، جعفریزاده مالیمیری ه. (۱۳۹۹). اثر تغییرات مقدار ملاس و سلنیوم بر رشد مخمر ساکارومایسیس سروزیزه و
- 12- Cavellini L, Meurisse J, Findinier J, Zoi E, Naima B.T, Allan M. Weissman M, Cohen M. 2017. An ubiquitin-dependent balance between mitofusin turnover and fatty acids desaturation regulates mitochondrial fusion. Nat. Commun. 8:15832.
- 13- ChenY, Feldman D.E, Deng C, Brown J.B, De Giacomo A.F, Gaw A.F, Shi G, Le Q.T ,Brown JM, Koong A.C. 2005. Identification of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways That Confer Resistance to Endoplasmic Reticulum Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cancer Res. 3(12):669-77
- 14- Cooke F.T, Dove S.K, McEwen R.K, Painter G, B. Holmes A, Hall, R.H. Michell M.N, Parker P. J. 1998. The stress-activated phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase Fab1p is essential for vacuole function in *S. cerevisiae*. Curr Biol.8 (22):1219-22.
- 15- Davis L, Stephanie A, Griffith D.A, Choi B, Cate J, Tullman E.D. 2018. Evolutionary engineering improves for medium-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol biofuels 11:90.
- 16- Depristo M.A, Banks E, Poplin R, V Garimella, et al. 2011. A framework for variation discovery and genotyping using next generation DNA sequence data. Nat. Genet.43, 491-498.
- 17- Ding J, Huang X, Zhang H, Zhao N, Yang D, Zhang K. 2009. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85:253–263.
- 18- Dinh TN, Nagahisa K, Hirasawa T, Furusawa C, Shimizu H. 2008. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration

- and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. *PloS One* 3: 2623.
- 19- Dragosits M, Mattanovich D. 2013. Adaptive laboratory evolution – Principles and applications for biotechnology. *Microbial Cell Fact.* 12: 64.
- 20- Dutta A. 2018. Cointegration and nonlinear causality among ethanol-related prices: evidence from Brazil. *GCB Bioenergy.* 10:335-342.
- 21- Fath S, Mancias JD, Xiping Bi, Goldberg J. 2007. Structure and organization of coat proteins in the COPII cage. *Cell.* 129(7):1325-36.
- 22- Ghiaci P, Norbeck J, Larsson C. 2013. Physiological adaptations of *Saccharomyces cerevisiae* evolved for improved butanol tolerance. *Biotechnol. Biofuels.* 6:101.
- 23- Herve A, Ansanay-Galeote S, Dequin BB. 2001. Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 498: 98-103.
- 24- Jia K, Zhang Y, Li Y. 2010. Systematic engineering of microorganisms to Improve alcohol tolerance. *Engineering Life. Sciences.* 10(2010): 422-429.
- 25- Lafuente MJ, Gancedo C, Jauniaux JC, Gancedo JM. 2002. Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 35 (1), 161-172.
- 26- Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics.* 25(14): 1754–1760.
- 27- Moriya H, Johnston M. 2003. Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. 1572–1577. *PNAS* .101. 6.
- 28- Mulet JM, Alejandro S, Carlos R. 2004. The trehalose pathway and intracellular glucose phosphates as modulators of potassium transport and general cation homeostasis in yeast. *Yeast.* 21: 569–582.
- 29- Roozbehani B, Imani MS, Mirdrikvand M, Cheshmeh RA. 2012. Modeling Direct Ethylene Hydration over Zirconium Tungsten Catalyst: Fundamental of Ethanol Production Using the Biggest Global Ethylene Feeding Pipeline in Iran. *EER.* 2: 28-36.
- 30- Silva GM, Daniel F, Christine V. 2015. K63 polyubiquitination is a new modulator of the oxidative stress response. *Nat Struct Mol Biol.* 22(2): 116–123.
- 31- Somda MK, Savadogo A, Ouattara CAT, Outtara AS, Traora AS. 2011a. Improvement of bioethanol production using amylase properties from *Bacillus licheniformis* and yeasts strains fermentation for biomass valorization. *Asian J. Biotechnol.*, 3:254-261.
- 32- Stanley D, Fraser S, Chambers P.J, Grant P.R, Stanley A .2010. Generation and characterization of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37:139–149.
- 33- Strahl T, Thorner J .2007. Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.*1771 (3):353-404.
- 34- Toi H, Fujimura-Kamada K, Irie K, Takai Y, Todo S, Tanaka K. 2003. She4p/Dim1p interacts with the motor domain of unconventional myosins in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.*14 (6):2237-49.
- 35- Toulmay A, Prinz WA. 2012. A conserved membrane-binding domain targets proteins to organelle contact sites. *J Cell Sci.* 125:49-58
- 36- Van der AGA, Carneiro MO, Hartl C, et al. 2018. From Fast Q data to high confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr protoc Bioinformatics.*15.3.
- 37- Vasundara S, Daili JAN, Holger W, Judita M, Antonio JP, Hartmut M, Roland L. 2007. Structure of the Yeast WD40 Domain Protein Cia1, a Component Acting Late in Iron-Sulfur Protein Biogenesis. *Cell press. Struct.* 15, 1246–1257.
- 38- Wallace-Salinas V, Gorwa-Grauslund MF. 2013. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnol.Biofuels.* 6:151.
- 39- Wendland B, Emr SD .1998. Pan1p, yeast eps15, functions as a multivalent adaptor that coordinates protein-protein interactions essential for endocytosis. *J Cell Biol.*141 (1):71-84.
- 40- Zverlov VV, Berezina O, Velikodvorskaya GA, Schwarz WH. 2006. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. *Appl Microbiol Biotechnol.* 71:587–597.

Improving ethanol production and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* through evolutionary engineering strategy using 1-butanol stress

Sheikhi F.^{1,2}, Rostami Kh.¹, Azin M.^{1*}, Asadollahi M.A.³, Ebrahimi M.⁴, Ghiaci P.⁵ and Feizi A.⁶

¹ Dept. of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, I.R. of Iran.

² Sugarcane Training and Research Institute, Khuzestan, I.R. of Iran.

³ Dept. of Biotechnology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan 81746-73441, I.R. of Iran.

⁴ Bioinformatics Research Group, Green Research Center, University of Qom, I.R. of Iran.

⁵ The European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany

⁶ OMass Therapeutics, Biotechnology, Oxford, England

Abstract

There are crucial factors in the bioethanol production process that affect production efficiency. Accumulation of ethanol during the fermentation process and the inhibitory effect on growth are inevitable. Increasing ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* enhances survival and ultimately increases ethanol production. The evolutionary engineering approach is a promising strategy to improve the complex trait of ethanol tolerance in the *Saccharomyces cerevisiae*. The toxicity mechanism of short-chain alcohols on yeast are similar. In this study, the laboratory strain of *Saccharomyces cerevisiae* CEN PK113-7D was exposed to 1-butanol stress by evolutionary engineering strategy during a 144-days culture period, after which the specific growth rate (μ) of the evolved strain was boosted from 0.48 h^{-1} to 0.84 h^{-1} . Increased stress tolerance of 1-butanol led to an increase in ethanol tolerance and also ethanol production in the evolved strain. Ethanol production improved from 68.50 g/L in the parent strain to 87.02 g/L in the evolved strain. The results of the whole genome sequencing of evolved strains and comparing it with the parent strain sequence revealed changes in the single nucleotide polymorphism (SNPs) of the genes involved in this trait. There were changes in genes such as *PGM2*, *MTH1*, *TCB1*, *YAP1801*, *UBP2*, *FAB1*, *IAH1* and *CIA1*. These genes were related to intracellular transport and pathways involved in cytoplasmic membrane composition and structure, cell wall structure, glucose metabolism, and lipids metabolism. So, the significance of this set of genes in the enhancement of ethanol tolerance was reported for the first time.

Key words: ethanol tolerance, *Saccharomyces cerevisiae*, evolutionary engineering, 1-butanol, whole genome sequencing.