

## بهبود تولید و مقاومت به اتانل در مخمر ساکارومایسس سرویزیه با راهبرد مهندسی

### تکاملی با استفاده از تنش ۱- بوتانل

فاطمه شیخی<sup>۱</sup>، خسرو رستمی<sup>۱</sup>، مهرداد آذین<sup>۱\*</sup>، محمدعلی اسداللهی<sup>۳</sup>، منصور ابراهیمی<sup>۴</sup>، پیام غیاثی<sup>۵</sup> و امیر فیضی<sup>۶</sup>

<sup>۱</sup> ایران، تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده بیوتکنولوژی

<sup>۲</sup> ایران، اهواز، موسسه تحقیقات و آموزش توسعه نیشکر و صنایع جانبی خوزستان

<sup>۳</sup> ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، گروه زیست‌فناوری

<sup>۴</sup> ایران، قم، دانشگاه قم، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوانفورماتیک

<sup>۵</sup> آلمان، هایدلبرگ، آزمایشگاه زیست‌شناسی مولکولی، هایدلبرگ

<sup>۶</sup> انگلستان، اکسفورد، گروه بیوتکنولوژی درمانی اوماس

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴

#### چکیده

در فرایند تولید بیواتانل، عوامل بسیار مهمی وجود دارد که کارایی تولید را تحت تاثیر قرار می‌دهد. تجمع اتانل در طول فرایند تخمیر و اثر بازدارندگی بر رشد اجتناب‌ناپذیر است. افزایش تحمل به اتانل در سویه ساکارومایسس 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 ساکارومایسس سرویزیه است. سازوکار اثر سمیت الکل‌های کوتاه زنجیره بر مخمر مشابه است. در تحقیق حاضر، سویه آزمایشگاهی ساکارومایسس سرویزیه CEN PK 113-7D با راهبرد مهندسی تکاملی طی یک دوره کشت ۱۴۴ روزه تحت تنش ۱- بوتانل قرار گرفت و نرخ ویژه رشد ( $\mu$ ) سویه تکامل یافته از  $0.048 \text{ h}^{-1}$  به  $0.084 \text{ h}^{-1}$  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 *IAH1*، *UBP2*، *TCB1*، *YAP1801*، *MTH1*، *PGM2*، *CIA1* و *FAB1* ایجاد 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 لیپیدها 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، ساکارومایسس سرویزیه، مهندسی تکاملی، ۱-بوتانل، تعیین توالی کل ژنوم

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۵۶۲۷۶۶۳۶، پست الکترونیکی: [azin@irost.ir](mailto:azin@irost.ir)

#### مقدمه

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 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

الکل دهیدروژناز را غیرفعال می‌سازد. همچنین این ترکیب موجب آسیب به DNA میتوکندریایی و تجزیه‌ی بیومولکول‌ها می‌شود و از جابه‌جایی عناصر از غشاهای زیستی در سلول‌ها جلوگیری می‌کند. تجمع اتانل در محیط باعث مهار رشد سلول مخمر شده و بر روی سیستم انتقال درون سلولی آن تاثیر می‌گذارد و در نهایت باعث کاهش مقدار اتانل تولیدی می‌شود (۱۸). مهار متابولیسم، کاهش برداشت سوپسترا توسط مخمر، کاهش رشد، تغییر در ساختار غشاء و افزایش نفوذپذیری از جمله تغییرات دیگری است که اتانل در مخمر ایجاد می‌کند و در نهایت 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 به اتانل در این مخمر به طور کامل شناسایی نشده است. تحمل به اتانل به شبکه پیچیده‌ای بستگی دارد که در سطح ژنوم باهم واکنش متقابل دارند و تلاش‌های پژوهشگران در جهت شناسایی ژن‌های مرتبط با این صفت ادامه دارد (۱۵). در تحقیقی که برای بررسی اساس مولکولی مقاومت مخمر ساکارومایسس سرویزیه در برابر تنش اتانل انجام شده است، بیش از ۷۰۰ ژن 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 ساکارومایسس سرویزیه، پیچیدگی‌های مربوط به سازوکار این صفت و تنوع ژنتیکی بسیار بالا و همچنین محدودیت موجود در اعمال گسترده دستکاری ژن‌ها 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 مورد نظر به دست می‌آید. پس از انجام مهندسی تکاملی و دستیابی به میکروارگانیسم با فنوتیپ دلخواه، با توالی‌یابی آن می‌توان تغییرات

از حد از سوخت‌های فسیلی 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). بیواتانل یک سوخت سازگار با محیط زیست و جایگزین مناسبی برای سوخت‌های فسیلی است (۲۰). اتانل عمدتاً از طریق فرآیند تخمیر با استفاده از مخمر ساکارومایسس سرویزیه تولید می‌شود. بنابراین تخمیر اتانلی توسط ساکارومایسس سرویزیه به عنوان فرآیند 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 ساکارومایسس 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 فرآیند تولید اتانل، مخمر ساکارومایسس سرویزیه با تنش‌های مختلف از جمله افزایش غلظت اتانل، درجه حرارت بالا و فشار اسمزی حاصل از غلظت بالای قند روبرو است (۶). یکی از مشکلات عمده در ارتباط با تولید اتانل، سمیت این ماده برای رشد مخمر ساکارومایسس 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 بلوکه می‌کند و چندین آنزیم مهم مانند پروتئین کیناز A و

## مواد و روشها

**محیط‌های کشت و شرایط کشت مخمرها:** سویه آزمایشگاهی هاپلوئید ساکارومایسس سرویزیه CEN.PK 113.7D به عنوان سویه والد برای آزمایش‌های تکامل تطبیقی استفاده شد. سویه والد در محیط کشت YPD (مرک) رشد داده شد. این محیط حاوی ترکیبات (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 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 113-7D 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 ۵۰۰۰ rpm به مدت ۲۵ دقیقه،

تک‌نوکلئوتیدی (SNP) ایجاد شده در آن را با میکروارگانسیم والد مقایسه کرد و سپس با بررسی ژن‌های تغییر یافته، نحوه عملکرد آن‌ها در این ویژگی را بررسی کرد تا در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گیرد. گسترش علوم بیوانفورماتیک، توسعه بیش از پیش توالی‌یابی 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 میکروارگانسیم‌های 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 فشارانتخابی 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 الکل‌های کوتاه زنجیره بر مخمرها، به ویژه سویه مخمر ساکارومایسس سرویزیه، مشابه می‌باشد (۲۲، ۴۰). با توجه به این که ۱- بوتانل یک الکل کوتاه زنجیره با ساختار مشابه اتانل ولی دارای نقطه جوش بالاتر است، در مطالعه حاضر از ۱- بوتانل برای ایجاد فشارانتخابی 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 تک‌نوکلئوتیدی ایجاد شده در سویه‌های تکامل یافته با میکروارگانسیم 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 هوازی 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 گرماگذاری 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 بی‌هوازی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). پس از ۸ ساعت هوادهی، غلظت گلوکز محیط کشت به ۲۰۰ گرم در لیتر رسانده شد. کشت در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با دور همزن ۷۰ rpm برای تولید اتانل به مدت ۳۶ ساعت ادامه یافت. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد.

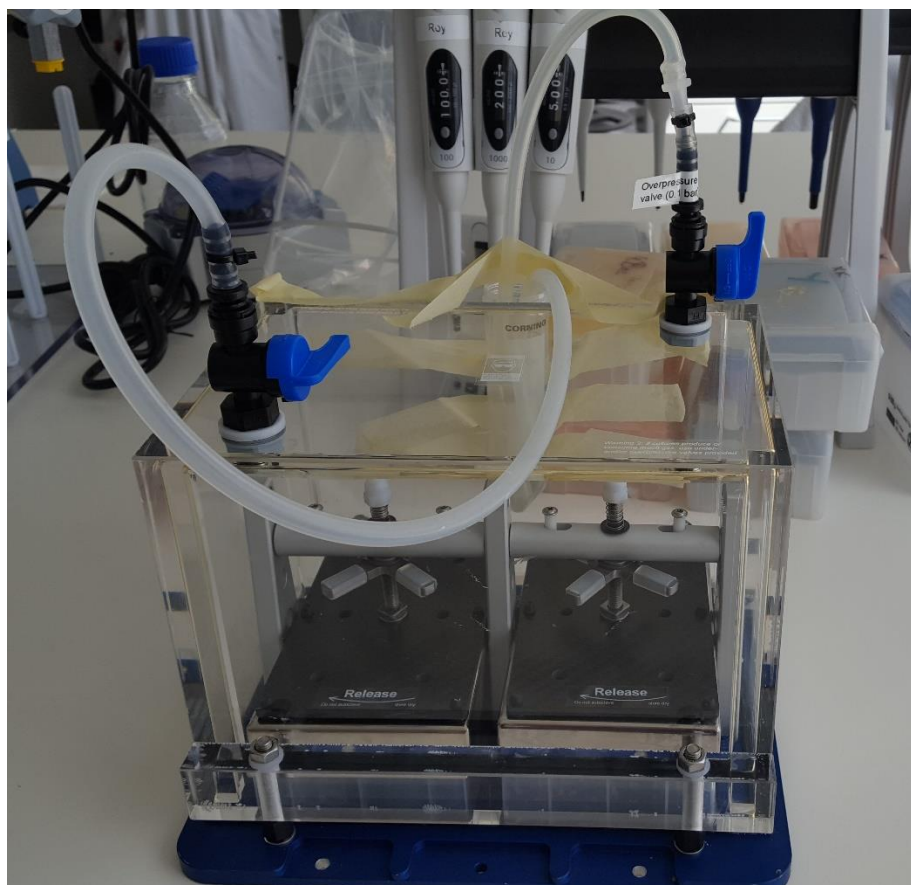
**استخراج ژنوم و تعیین توالی کل ژنوم:** تغییرات ژنومی در سویه‌های تکامل یافته توسط تعیین توالی کل ژنوم (WGS) مشخص شد. کلون‌های تکامل یافته از نمونه‌های جمعیتی منتخب مربوطه بر روی پلیت YPD انتخاب شدند. سه کلونی از هر جمعیت منتخب بعد از آزمایش‌های تکاملی، به‌طور تصادفی بر روی پلیت YPD انتخاب و به‌طور مجزا در محیط مایع YPD رشد داده شدند. تعیین میزان تولید و مقاومت این کلون‌ها، DNA کلون‌های تایید شده با استفاده از کیت Qiagen® استخراج شد. غلظت 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 500، با کیت NextSeq Mid Output v2 توالی-یابی شدند. هر قطعه توالی خوانده شده (read) از ۱۵۰ جفت باز تشکیل شده بود که با پوشش ۱۰۰x 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 روی 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 غلظت اولیه ۱/۸ درصد (حجم در حجم) ۱- بوتانل استفاده شد که به‌طور مستقیم و بدون استریل کردن به محیط کشت اضافه شد. هر میکروپلیت با فویل گشایی کاملاً محکم پوشیده شد تا از تبخیر الکل جلوگیری شود. میکروپلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و دور ۷۰ rpm گرماگذاری شد. برای جلوگیری از اثر تبخیر محیط از بیرونی‌ترین ردیف‌های میکروپلیت استفاده نشد.

خوگیری سویه‌ها با اندازه‌گیری میزان کدورت در OD<sub>600</sub> و محاسبه نرخ ویژه رشد تمام سویه‌ها حین انجام آزمایش-های تکامل تطبیقی پیش شد. به منظور نگهداری تمامی رده‌های سلول تکامل یافته، قبل از هر بار تکرار کشت، ۰/۲ میلی لیتر از کشت قبلی به ۰/۲ میلی لیتر از محلول گلیسرول ۴۰٪ 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 غلظت مذکور الکل کاهش و افزایش یافت و در نهایت پس از ۶۴ روز نرخ ویژه جمعیت‌ها ثابت شد و کاهش نیافت. در این زمان، میزان غلظت ۱- بوتانل از ۱/۸ درصد (حجم در حجم) به ۲ درصد در کشت‌ها افزایش یافت.

**بررسی تولید کمی اتانل توسط مخمر:** از میکروپلیت‌های با عمق ۵ سانتی‌متر برای کشت سویه‌های منتخب برای اندازه‌گیری میزان اتانل تولید شده استفاده شد، به‌طوری که حجم نهایی محیط کشت ۲ میلی لیتر شد. غلظت قند در



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

**آنالیز دستگاهی:** برای تعیین غلظت اتانل و گلوکز باقیمانده در محیط کشت، نمونه‌ها با کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) Product no: Aminex HPX-87H تعویض یونی (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 جریان 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 تضمین شد. از برنامه Trimmomatic- 0.32 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 چینی INDEL حذف تکراری SNP در همه نمونه‌ها به طور همزمان با استفاده از پارامترهای استاندارد فیلترینگ انجام شد (۱۶،۳۶). برای مرتب‌سازی و فهرست‌بندی فایل‌های تراز از SAMtools استفاده شد (۲۶).

جدول ۲- ترکیبات واکنش زنجیره‌های پلیمرز

غلظت نهایی	حجم (میکرولیتر)	غلظت	ترکیب
IX	۲۵	2X	مستر میکس آنزیم فیوژن 2X Master Mix (Phusion U)
۰/۵	۱	۱۰ پیکو مول	پرایمر Forward
میکرومول ۰/۵	۱	۱۰ پیکو مول	پرایمر Reverse
میکرومول ۲۵۰-۱۰	۱		ژنوم
نانوگرم ۳/۳	۱/۵		DMSO ۱۰۰%
	۲۰/۵		آب مقطر استریل

سویه در معرض غلظت‌های مختلف اتانل 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- بوتانل نیز تعیین شد (شکل ۳). در این مطالعه، سویه مخمر تا ۲ درصد (حجم در حجم) ۱- بوتانل سازگار شد. سویه‌ها تحت فشار انتخابی ۱- بوتانل، تا ۱۴۴ روز متوالی کشت شدند. انتقال سویه به یک محیط تازه حاوی غلظت ۱- بوتانل بالاتر زمانی انجام شد که سرعت رشد در غلظت قبلی برای چندین نسل ثابت باقی مانده 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- بوتانل 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- بوتانل، حداکثر نرخ ویژه رشد یک سویه از  $0.048h^{-1}$  به  $0.084h^{-1}$  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 پلیمرز ( Polymerase chain reaction ) (PCR): جهت تایید SNP های حاصل از تفسیر تعیین توالی کل ژنوم در سویه‌های تکامل یافته از روش (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز) 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 پلیمرز

مرحله	دما (سانتی گراد)	زمان (ثانیه)
واسرشتگی اولیه	۹۸	۳۰
واسرشتگی	۹۸	۱۰
متغیر براساس		
اتصال	آغازگر	۶۰
تکثیر	۷۲	۳۰-۱۵۵/kb
	تکرار مرحله ۲-۴ (۳۰ بار)	
تکثیر	۷۲	۱۰
توقف واکنش	۴	

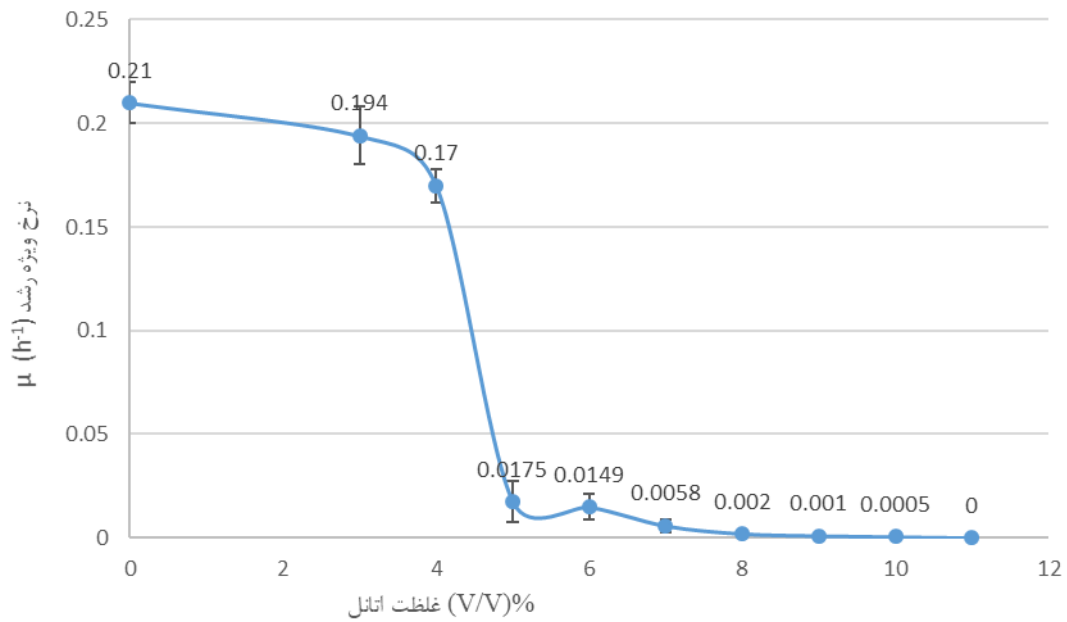
برای مبنای آغازگرها برای هر جهش دمای اتصال تعیین شد. تمام واکنش‌های زنجیره ایی پلیمرز با استفاده از با Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix Waltham, Thermo Scientific, F565S (شماره محصول: ۵۰، ماساچوست، ایالات متحده آمریکا) با حجم ۵۰ میکرولیتر طبق جدول ۲ در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. آغازگرهای استفاده شده در کل این پروژه را می توان در جدول ۳ مشاهده کرد..

## نتایج

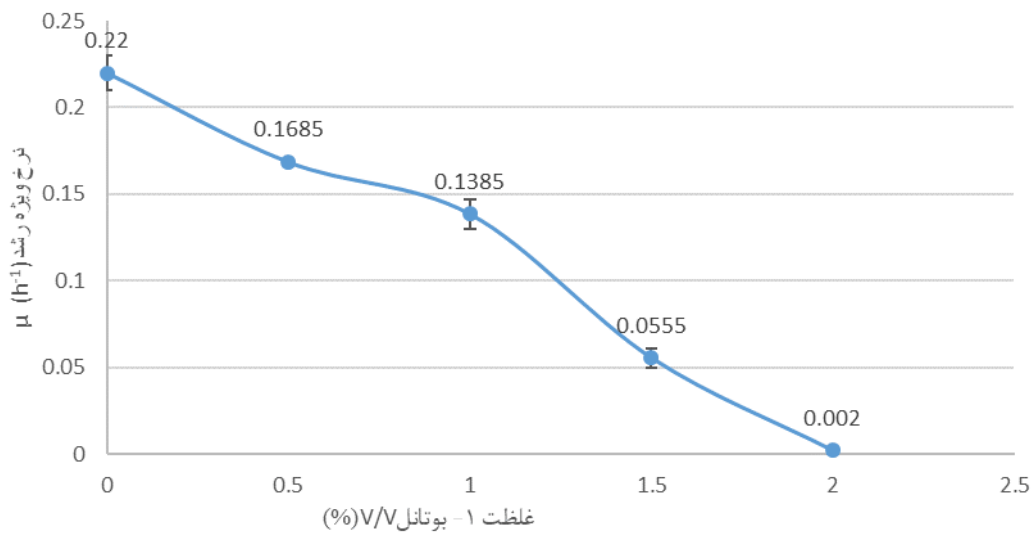
بررسی رشد سویه و تعیین تحمل به الکل: میزان رشد سویه ساکارومایسس سرویزیه CEN.PK 113-7D، قبل از شروع آزمایش‌های تکامل تطبیقی ارزیابی شد.

جدول ۳- فهرست آغازگرهای استفاده شده برای تایید جهش‌های تک‌نوکلئوتیدی

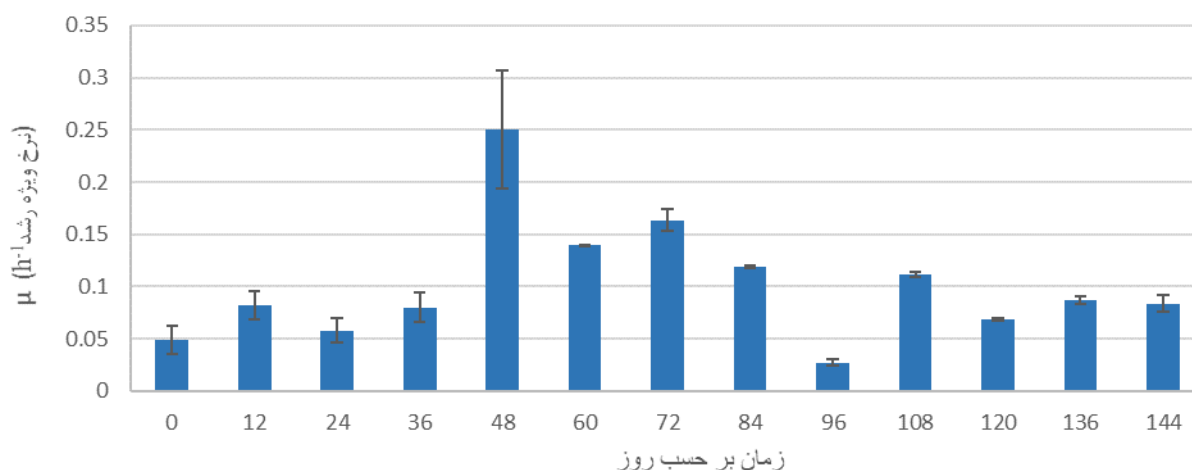
نام	توالی آغازگر ۳' → ۵'	نوکلئوتید	Tm (°C)
DAN4	Forward TCTACAACCTCCACCACT	۱۸	۵۸/۳
	Reverse GGAAGTGGTTGCTTTACTGA	۲۰	۵۹
ISC1	Forward GAAAATCAAACCCACCCTT	۱۹	۵۷/۲
	Reverse TCATCATCATCCCCGGTA	۱۸	۵۸/۳
CIA1	Forward ATGGCGTCTATCAATCTGAT	۲۰	۵۷/۷
	Reverse GCTGCTTTTTCTAGAGACCA	۲۰	۵۸/۸
UBP2	Forward GCCGAACGAAGATAATGAA	۲۰	۵۶/۶
	Reverse TGGAGGGACGTATTCAGTA	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 GGTAACCTTGTGCCTGACA	۱۹	۵۸/۸
PGM2	Forward GCCGCTTCTCACATCAT	۱۷	۵۸/۱
	Reverse CGTACTTTGCCAGAATT	۱۸	۵۶/۸
RTK1	Forward GGAGTATGCGCCATATGA	۱۸	۵۷/۵
	Reverse TCTTTATTCCCGTGTGCT	۱۸	۵۸/۲
SHE4	Forward GAATGATCCAATCGATAGCT	۲۰	۵۶/۲
	Reverse TCGACCACTGCTTTATCAA	۱۸	۵۷/۸
YAP1801	Forward CCGTTCGCATTGCACAA	۱۷	۵۹/۹
	Reverse GAGGTTGTTAGCATATTGGT	۲۰	۵۶/۶
SEC12	Forward GAAGTTCGTGACAGCTAGT	۱۹	۵۷/۹
	Reverse CCAATTCACCCTTCATGT	۱۷	۵۶



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



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



شکل ۴- تغییرات نرخ ویژه رشد سویه ساکارومایسس سرویزیه طی آزمایش‌های تکامل تطبیقی در شرایط تنش ۱- بوتانل. غلظت بوتانل تا روز شصت و چهارم برابر با ۱.۸٪ (حجم در حجم) بود و سپس به ۲٪ افزایش داده شد.

۱۶۳/۳۴ گرم در لیتر و میزان مصرف گلوکز ۸۷/۱±۰.۲/۷۶ گرم در لیتر و برای سویه E2 که در محیط کشت ملاس در غلظت ۲ درصد (حجم در حجم) ۱- بوتانل تکامل یافته بود به ۷۸/۱±۳/۳۷ گرم در لیتر و میزان مصرف گلوکز ۱۵۹/۳۴ گرم در لیتر ارتقا یافته بود و این در حالی است که میزان تولید اتانل سویه والد تحت شرایط مذکور ۶۸/۵±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 اتانل (شکل ۶) و سرعت مصرف قند شده که نهایتاً میزان تولید اتانل نیز در این دوسویه تکامل یافته افزایش یافت.

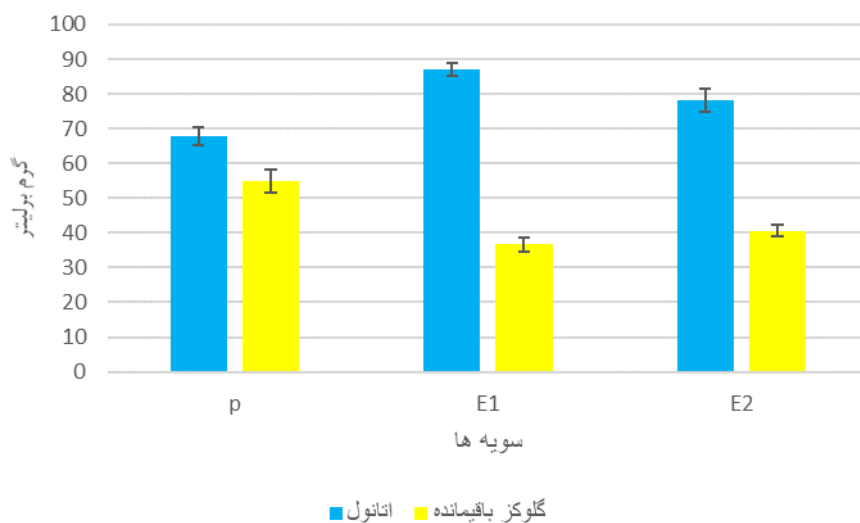
**نتایج حاصل از تفسیر توالی یابی کل ژنوم:** برای رمزگشایی از مسیرهای جهش یافته در هنگام سازگاری با ۱-بوتانل، ژنوم سویه‌های منتخب تکامل یافته در طول آزمایش، مجدداً توالی‌یابی و شناسایی شد، ۶۸ جهش در مناطق رمزگذار ژن، از جمله ۳۸ جهش missense، ۷۸ جهش خاموش و ۶ حذف در ژنوم اتفاق افتاده بود. برخی جهش‌ها در 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 الکل، از محیط کشت ملاس استفاده شد. معیار انتخاب سویه‌های برتر، توان تکثیر بالاتر طی کشت‌های پی در پی تحت تنش الکل و محاسبه زمان نسل بود. میزان نرخ ویژه رشد سویه منتخب در محیط کشت ملاس از ۰/۰۴۸ h<sup>-1</sup> به ۰/۰۰۶ h<sup>-1</sup> ارتقا یافته بود.

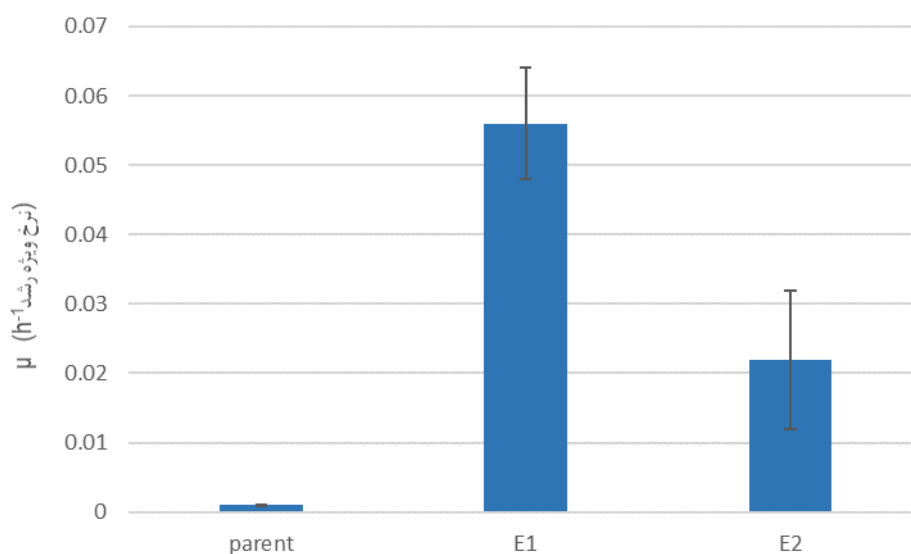
**تعیین میزان تولید اتانل سویه‌های منتخب:** برای بررسی تأثیر افزایش مقاومت به ۱- بوتانل سویه‌های تکامل یافته منتخب بر افزایش تولید اتانل آنها، میزان تولید اتانل و مصرف گلوکز هر سویه تکامل یافته مشخص شد (شکل ۵). برای مشخص شدن تأثیر افزایش مقاومت به اتانل بر میزان تولید اتانل، از غلظت گلوکز ۲۰۰ گرم بر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

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

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



شکل ۵- میزان تولید اتانول سویه‌های تکامل یافته و گلوکز 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 ویژه رشد دوسویه تکامل یافته در طی آزمایش‌های تکامل تطبیقی در غلظت ۹٪ حجم در حجم اتانول

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

در این مطالعه، جهش‌های تک‌نوکلوتیدی 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 توالی‌یابی کل ژنوم و ژن‌های مرتبط

ژن	اسید آمینه تغییر یافته	شماره کروموزوم	شرح کار پروتئین
YAP1801	Gln575His	۹ کروموزوم	پروتئین متصل شونده به کلاترین در فرایند اندوسیتوز و دخیل‌سازی ماندھی اسکلت سلولی
CIA1	Arg63Phe	۴ کروموزوم	از پروتئین‌های کلاستر سولفور-اهن سیتوزلی دخیل در ریوستن متیونین، دخیل در سازماندهی زیرواحد بزرگ ریوزم
RTK1	Pro585Thr	۴ کروموزوم	پروتئین مورد نیاز برای بیوژنز ریوزم
TCB1	Asp96Asn	۱۵ کروموزوم	از پروتئین‌های دخیل در سازماندهی غشای شبکه اندوپلاسمی و تنظیم دفسفوریل شدن فسفاتیدیل اینوزیتول
SHE4	Lys25Asn	۱۵ کروموزوم	پروتئین متصل شونده به میوزین و دخیل در سازماندهی میوزین و اکتین، انتقال سلولی
IAH1	Lys163Asn	۱۵ کروموزوم	آنزیم هیدرولیز کننده ایزوآمیل استات استراز
DAN4	Glu181Lys	۱۰ کروموزوم	مانوپروتئین دیواره سلولی، بیان ژن در شرایط بی‌هوایی
UBP2	Asp342Ala	۱۵ کروموزوم	آنزیم پروتئاز یوبی‌کیتین وابسته به تیول دخیل در تنظیم داستوره کردن لیپیدهای غشاء میتوکندری
PGM2	Met226Ilu	۱۳ کروموزوم	آنزیم فسفوگلو موتاز
TUB3	Ala338Val	۱۳ کروموزوم	پروتئین آلفا توبولین، نقش در تقسیم سلولی
MTH1	Cys329Trp	۴ کروموزوم	پروتئین داخل غشایی، دخیل در انتقال گلوکز و انتقال سیگنال
SEC12	Lys25Asn	۱۴ کروموزوم	پروتئین مورد نیاز برای تشکیل وزیکول COP11 برای انتقال از شبکه اندوپلاسمی به شبکه گلژی
FAB1	Asn582Ser	۶ کروموزوم	پروتئین فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ فسفو کیناز، نقش در هموستازی سلول

نتایج تعیین توالی کل ژنوم منجر به آشکارسازی تغییرات تک‌نوکلوتیدی در ژنوم سویه‌های منتخب شد. اغلب SNPها برای بار نخست در این مقاله در رابطه با این صفت گزارش می‌شوند. این SNPها در ژن‌های *TCB1*، *YAP1801*، *UBP2*، *FAB1*، *DAN4*، *SEC12*، این ژن‌ها مرتبط با سازماندهی غشاء سیتوپلاسمی و غشاء اندامک‌های داخل سلولی و دیواره سلولی و متابولیسم لیپیدها هستند. جهش‌های روی داده در ژن‌های *TUB3* و

نتایج تعیین توالی کل ژنوم منجر به آشکارسازی تغییرات تک‌نوکلوتیدی در ژنوم سویه‌های منتخب شد. اغلب SNPها برای بار نخست در این مقاله در رابطه با این صفت گزارش می‌شوند. این SNPها در ژن‌های *TCB1*، *YAP1801*، *UBP2*، *FAB1*، *DAN4*، *SEC12*، این ژن‌ها مرتبط با سازماندهی غشاء سیتوپلاسمی و غشاء اندامک‌های داخل سلولی و دیواره سلولی و متابولیسم لیپیدها هستند. جهش‌های روی داده در ژن‌های *TUB3* و

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 الکل انتخاب شد. جمعیت طی مراحل مکرر رشد مداوم تحت غلظت بالای الکل با تنش موجود خوگرفته و رشد در حضور تنش پایدار، منجر به تکثیر جمعیت برتر در این شرایط شد. برای بررسی تاثیر افزایش تحمل به الکل بر افزایش تولید اتانل، از غلظت ۲۰۰ گرم بر لیتر گلوکز استفاده شد. نتایج نشان داد دو سویه تکامل یافته منتخب که براساس افزایش نرخ رشد ویژه تحت تنش 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 در نهایت 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 بیوسنتز 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 میانکشی دارند. پیچیدگی شبکه پاسخ مخمر طوری است که مسیرها به‌طور مداوم برنامه‌ریزی می‌شوند و این، تعیین سازوکار تحمل اتانل را مشکل کرده است. با وجود این، تلاش محققین برای شناسایی ژن‌های موثر بر این صفت همچنان ادامه دارد.

موریا و همکاران در تحقیقی اهمیت بیان ژن *MTH1* برای تنظیم بیان ژن *HIX1* در مسیرانتقال هگزوزها به داخل

*SHE4* در ارتباط با اسکلت سلولی و دینامیک درون سلولی، ژن آنزیم فسفولگوموتاز *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 واکنش‌گاه اجتناب‌ناپذیر است و اثر بازدارندگی آن بر روی رشد ثابت شده است (۱۷). یک رویکرد موفق برای بهبود تحمل تنش ساکارومایسس سرویزیه، بهبود مقاومت این سویه از طریق سازگاری فیزیولوژیکی با الکل 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 تنش‌زا شده و در نهایت راندمان تولید را بالا برد (۱،۱۰). در تحقیقات گذشته اثر سمیت مشابه الکل‌های کوتاه زنجیره بر روی ساکارومایسس 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 (۲۲،۴۰). 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 بیورژن ریبوزوم در سلول‌های یوکاریوت دارد. این پروتئین برای مخمر ساکارومایسس سرویزیه حیاتی بوده و در شروع ترجمه نقش بنیادی دارد. سلول‌های یوکاریوتی سازوکارهای مقابله‌ای زیادی از جمله تنظیم ترجمه و بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی محافظ را ایجاد کرده‌اند، و از طریق تقویت سیستم پروتئین‌سازی، پروتئین‌های مورد نیاز برای مقابله با شرایط تنش‌زا را سنتز می‌کنند. این پروتئین در بیورژن 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 الکل 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 اسید چرب غیراشباع، می‌شود. غشاء سلولی تحت تاثیر الکل‌ها تغییر ساختار داده و وارد فرآیند پاسخ می‌شود. افزایش دو اسید چرب غیراشباع اسید پالمیتیک و اسید اولئیک در غشاء ساکارومایسس سرویزیه باعث افزایش سیالیت غشاء و تحمل تنش اتانل می‌شود (۳۰). این دو اسید چرب 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 آگوسیتوز و اندوسیتوز، کنترل بسیاری از فرآیندهای سلولی ضروری مانند جذب مواد مغذی و انتقال سیگنال با واسطه گیرنده را برعهده دارند. ژن *YAP1801* پروتئینی را رمزگذاری می‌

سلول مخمر را بیان کردند (۲۷). در واقع ژن *MTH1* پروتئینی را رمزگذاری می‌کند که تنظیم‌کننده 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 فسفوجلوکوموتاز حاصل از ژن *PGM2* مسئول تبدیل گلوکز ۱- فسفات به گلوکز ۶- فسفات است و این ترکیب ماده اولیه مسیر گلیکولیز و مسیر پنتوزفسفات بوده و یکی از آنزیم‌های کلیدی در متابولیسم گلوکز به شمار می‌رود. از طرفی متابولیسم گلوکز به‌طور 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 سلول-های 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 تاخیر 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* همراه است. ترهالوز باعث 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 فسفوجلوکوموتاز بر تولید ترهالوز طی تنش اتانل را گزارش کردند (۲۳).

جوانه‌زدن و ساختار دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه بوده و از طریق وزیکول‌ها، حمل و نقل پروتئین صادراتی را از شبکه آندوپلاسمی به شبکه گلژی 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 به *Sec12p* (GEF) را به انجام می‌رساند (۲۱). به نظر می‌رسد این ژن در تکثیر و رشد مخمر تاثیرگذار باشد. در ساکارومایسس سرویزیه، *TUB3* یکی از ژن‌هایی است که پروتئین آلفاتوبولین را رمزگذاری می‌کند. میکروتوبول‌ها عناصر اسکلتی محافظت شده‌ای هستند که در فرایندهای هسته‌ای مانند تفکیک 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 اکتین در ساکارومایسس سرویزیه مورد نیاز است. *She4p* تنظیم تعامل بین موتور *Myo3/5p* و F-actin را برعهده دارد و به نظر می‌رسد که برای عملکرد پروتئین میوزین حضور *She4p* ضروری است (۳۴). ژن‌های درگیر در جوانه‌زدن 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 به‌دست آمده در این پژوهش، استفاده از ۱- بوتانل به‌عنوان فشار انتخابی جایگزین اتانل، منجر به بهبود تحمل به اتانل در سویه تکامل یافته شده است و دو سویه منتخب نسبت به اتانل 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 به‌سزایی دارد. این پروتئین همچنین در سازمان‌دهی اسکلت سلولی نقش دارد (۳۹). شبکه اندوپلاسمی یک اندامک بسیار مهم در سلول‌های یوکاریوت به‌شمار می‌رود که نقش اساسی در سنتز لیپیدها، ترشح پروتئین‌ها و انتقال سینگال کلسیم دارد. پروتئین حاصل از ژن *TCBI* که در شبکه اندوپلاسمی سنتز و ترشح شده، یکی از پروتئین‌هایی است که شبکه اندوپلاسمی را به غشاء پلاسمایی متصل می‌کند، در انتقال کلسیم و انتقال آن به داخل سلول و سازماندهی شبکه اندوپلاسمی تاثیرگذار است (۳۵).

ژن *DAN4* سنتز مانوپروتئین دیواره سلولی در مخمر را رمزگذاری می‌کند که در شرایط بی‌هوازی بیان می‌شود. به نظر می‌رسد که ایگوساکاریدهای 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. درحفظ 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 سیستئین در انتهای NH2 می‌باشد. *Fab1p* به عنوان یک فسفاتیدیل اینوزیتول ۴-فسفات کیناز عضوی از یک خانواده آنزیمی شناخته می‌شود که با فسفریله کردن فسفولیپیدها 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

*Biosustainability* دانشگاه صنعتی دامنارک که قسمتی از

این طرح در آنجا انجام شد، تشکر و قدردانی می‌گردد.

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 بیواتانول تولیدی. پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۴، ۶۳۹-

۶۲۶

۳- ممبینی دهکردی. م. (۱۳۸۷). بهینه‌سازی تولید بیواتانول در مخمر

ساکارومایسس سروریزه از طریق مهندسی متابولیک. پایان‌نامه

دکتری رشته میکروبیولوژی. دانشگاه اصفهان. صفحه ۵-۲.

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 isotypes 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, Sonderegger 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

ساکارومایسس سروریزه با قابلیت تحمل بالا به اتانل از کارخانه

های الکل سازی ایران. پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۳۱، ۵۹۲-

۵۸۲

۲- فرامرزی س، انزابی ی، جعفریزاده مالمری ه. (۱۳۹۹). اثر تغییرات

مقدار ملاس و سلنیوم بر رشد مخمر ساکارومایسس سروریزه 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- Chen Y, 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*. *Mo. 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 *Baillus 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.<sup>1,2</sup>, Rostami Kh.<sup>1</sup>, Azin M.<sup>1\*</sup>, Asadollahi M.A.<sup>3</sup>, Ebrahimi M.<sup>4</sup>, Ghiaci P.<sup>5</sup> and Feizi A.<sup>6</sup>

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

<sup>2</sup> Sugarcane Training and Research Institute, Khuzestan, I.R. of Iran.

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

<sup>4</sup> Bioinformatics Research Group, Green Research Center, University of Qom, I.R. of Iran.

<sup>5</sup> The European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany

<sup>6</sup> 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 ( $\mu$ ) of the evolved strain was boosted from 0.48 h<sup>-1</sup> to 0.84 h<sup>-1</sup>. 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.