

توسعه جدایه پربازده ساکارومایسس سرویزیه از طریق جهش‌زایی تصادفی، مهندسی تکاملی و بهینه‌سازی مبتنی بر روش سطح پاسخ

زهرا فتحی^{۱*}، هادی سعیدی^۲

۱. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری میکروبی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

چکیده

سابقه و هدف: مخمر ساکارومایسس سرویزیه کاربردهای گسترده‌ای در تولید خمیرمایه نانوائی و تولید اتانول زیستی دارد و از ویژگی‌های شاخص و مهم این سویه که کاربرد آن در صنعت تولید اتانول را تحت تاثیر قرار می‌دهد، می‌توان به تحمل در برابر غلظت‌های بالاتر اتانول اشاره کرد. افزایش تحمل در برابر اتانول در سویه‌های صنعتی منجر به تخمیر سریع‌تر، کامل‌تر و افزایش راندمان تولید اتانول در صنعت می‌شود.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر به منظور بهبود فنوتیپ تحمل اتانول، جدایه‌ی برتر با تحمل بیشترین غلظت اتانول، تحت تیمار با ماده شیمیایی اتیدیوم بروماید و اعمال گزینش بر مبنای تکامل تطبیقی و مهندسی تکاملی قرار داده شدند. جدایه‌های جهش‌یافته با استفاده از محیط حاوی غلظت‌های رو به افزایش اتانول از غلظت ۸٪ تا غلظت ۱۲٪ اتانول در طی ۱۴۴ روز خو داده شده و غربال شدند. غلظت اتانول تولید شده توسط جدایه‌ها بر مبنای تقطیرمستقیم و الکل‌سنجی تعیین شد. میزان تولید اتانول توسط این جدایه با متد سطح پاسخ بهینه‌سازی شد.

یافته‌ها: جدایه طی اعمال جهش‌زایی با اتیدیوم بروماید و همچنین اعمال آزمون‌های تکامل تطبیقی و مهندسی تکاملی از غلظت ۸٪ تا غلظت ۱۲٪ اتانول طی ۱۴۴ روز به غلظت ۱۲٪ اتانول خو داده شد. در این مطالعه بهترین جدایه با قابلیت تولید بیشترین میزان اتانول جدایه F1 نامگذاری شد. پس از اعمال روش‌های جهش‌زایی و گزینش بر مبنای تکامل تطبیقی، توان تولید اتانول توسط این جدایه 10.25 ± 0.10 ٪ شد. این جدایه همچنین با اعمال شرایط بهینه تولید شامل درصد بریکس ۲۶، سولفات آمونیوم ۲۰ گرم در لیتر و میزان تلقیح 10^9 میزان تولید اتانول توسط این جدایه از 10.25 ± 0.10 ٪ به 11.25 ± 0.11 ٪ رسید.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که جدایه F1 از نظر میزان تولید اتانول می‌تواند سویه کارآمدی برای استفاده در صنعت تولید اتانول کشور جهت افزایش راندمان تولید باشد.

واژه‌های کلیدی: اتانول، ساکارومایسس سرویزیه، جهش‌زایی، مهندسی تکاملی

Development of a High-Ethanol Producing *Saccharomyces cerevisiae* isolate through Random Mutagenesis, Evolutionary Engineering, and Response Surface Methodology Optimization

Zahra Fathi^{1*}, Hadi Saeidi²

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran

Abstract

Introduction: *Saccharomyces cerevisiae* yeast has wide applications in the production of baker's yeast and the production of bioethanol, and one of the important characteristics of this strain, which affects its use in the ethanol production industry, is tolerance to higher concentrations of ethanol. Increasing the tolerance against ethanol in industrial strains leads to faster, more complete fermentation and increasing the efficiency of ethanol production in the industry.

Materials and Methods: In the current research, in order to improve the phenotype of ethanol tolerance, the superior isolate with the highest concentration of ethanol was treated with the chemical substance ethidium bromide and selection was applied based on adaptive evolution and evolutionary engineering. Mutant isolates were cultured using medium containing increasing concentrations of ethanol from 8% to 10% ethanol concentration during 144 days and screened. The amount of ethanol production by this isolate was optimized by the response surface method.

Results: The isolate was acclimated to 10% ethanol concentration during 144 days from 8% concentration to 10% concentration of ethanol during mutagenesis with ethidium bromide as well as adaptive evolution and evolutionary engineering tests. In this study, the best isolate with the ability to produce the highest amount of ethanol was named *Saccharomyces cerevisiae* F1. After applying mutagenesis and selection methods based on adaptive evolution, the ethanol production capacity of this isolate was $10 \pm 0.25\%$. Also, by applying the optimal production conditions including the percentage of brix 26, sulfate ammonium 20 g/l, and Inoculation rate 10^9 the amount of ethanol production by this isolate reached from $10 \pm 0.25\%$ to $11 \pm 0.25\%$.

Conclusion: The results of this study showed that the strain of *Saccharomyces cerevisiae* ZF2 can be an efficient strain for use in the country's ethanol production industry in terms of ethanol production to increase production efficiency.

Key words: Bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, Mutation, Evolutionary engineering

مقدمه

از سالیان دور از مخمرها برای تهیه غذاهای تخمیر شده و نوشیدنی‌ها مانند نان، آبجو و نوشیدنی‌های الکلی استفاده می‌شود (۱). اتانول مایعی است بی‌رنگ، قابل تجزیه و قابل اشتعال که می‌توان از آن در صنعت به عنوان حلال و ماده واسطه شیمیایی برای تولید بیشتر ترکیبات آلی استفاده نمود، همچنین اتانول به دلیل داشتن عدد اکتان بالا به عنوان مهم‌ترین سوخت زیستی شناخته شده که می‌تواند به تنهایی به عنوان سوخت و حامل اکسیژن به کار رود (۲). از مهم‌ترین نگرانی‌های جهان کنونی، ایمنی محیط زیست و تامین انرژی می‌باشد چرا که در آن تقاضا برای انرژی به دلیل افزایش مداوم جمعیت و کیفیت زندگی به‌طور چشمگیری افزایش پیدا کرده است. اتانول در مقایسه با تمام سوخت‌های زیستی تجدیدپذیر و در دسترس، یکی از امیدوار کننده‌ترین گزینه‌های سوخت زیستی می‌باشد که با جایگزینی بنزین و سایر سوخت‌های فسیلی می‌تواند بخشی از انرژی مورد نیاز دنیا را فراهم کند (۳). از نظر حجمی و اقتصادی اتانول زیستی یک محصول استراتژیک در حوزه زیست فناوری می‌باشد چراکه سالانه در سراسر جهان حجم

حیرت انگیزی از الکل تخمیری تولید می‌شود که این حجم بالغ بر ۱۰۰ میلیارد لیتر می‌باشد (۴). در صنعت، اتانول را از دو طریق می‌توان تولید کرد: روش اول سنتزی از اتیلن و روش دوم به‌صورت تخمیری می‌باشد. اتانول حاصل از روش اول منشا فسیلی دارد چراکه اتانول از اتیلن سنتز می‌گردد و خود اتیلن نیز از ترکیبات هیدروکربن گازی حاصل از نفت به‌وجود می‌آید پس تمایز اصلی اتانول سنتتیک با بیواتانول در این است که اولی ترکیبی تجدیدناپذیر با منشا فسیلی می‌باشد اما دومی ترکیبی تجدیدپذیر با منشا غیرفسیلی می‌باشد (۵). سه گروه قندی، نشاسته‌ای و سلولزی از مواد اولیه زیستی برای تولید بیواتانول اند که عمدتاً نیز منشا گیاهی دارند. مهم‌ترین، فراوان‌ترین، ارزان‌ترین و در دسترس‌ترین منابع برای تولید اتانول، ضایعات صناعی نظیر کشاورزی می‌باشد. همچنین برخی از میکروارگانیسم‌هایی نظیر مخمرها، باکتری‌ها و قارچ‌ها قادر به تولید بیواتانول می‌باشند (۶). از بین تمام میکروارگانیسم‌ها، مخمر ساکارومایسس سرویزیه به عنوان یک میکروارگانیسم GRAS (Generally recognized as safe) (عموماً بی‌خطر) طبقه‌بندی شده و قادر به تولید بالاترین میزان اتانول زیستی است. به‌علت پایداری نسبتاً زیاد در شرایط سخت و خشن صنعتی و همچنین انعطاف‌پذیری در سازگاری موثر برای تخمیرهای مقیاس بزرگ باعث شده تا مخمر ساکارومایسس سرویزیه برای طیف وسیعی از فرایندهای صنعتی زیستی از جمله تولید اتانول تخمیری برگزیده شود و تمام این ویژگی‌های خاص نیز باعث کاهش آلودگی و پایین آوردن هزینه‌ی تقطیر در فرایند تخمیر شده که به همین دلیل استفاده از این مخمر در تولید اتانول زیستی رایج و گسترده می‌باشد (۷). از چالش‌های اصلی این صنعت می‌توان به تولید مقرون به صرفه اتانول با

نویسنده مسئول: استادیار گروه زیست

شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه،

مراغه، ایران

آدرس الکترونیک:

z.fathi@maragheh.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۱/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۱۷

راندمان بالا اشاره کرد و هرگونه افزایش در غلظت تولیدی اتانول در طول تخمیر از نظر کیفیت و ملاحظات اقتصادی مطلوب می باشد. افزایش اتانول تولیدی طی فرایند به عوامل متعددی بستگی دارد که چگونگی عملکرد و قدرت بقا و حفظ فیزیولوژی سلول مخمر در شرایط تخمیری از عوامل مهم آن می باشد (۸). بر اساس مطالعات مختلف صورت گرفته در مورد ترکیبات مواد مغذی و عوامل تنش زا بر رشد مخمر، درمیان عوامل تنش زا، اتانول به عنوان تنش اصلی، مسئول کاهش تولید اتانول و توقف تخمیر می باشد که به دلیل اهمیت زیست شناسی، اکولوژیکی و صنعتی درباره ی تحمل اتانول مطالعات زیادی صورت گرفته است (۹). اتانول از طریق روش های مختلفی بر فیزیولوژی سلول مخمر تاثیر می گذارد که از آن جمله می توان به تاثیرات مضر آن بر ساختار و عملکرد غشای سلولی مخمر اشاره کرد. همچنین اتانول باعث اختلال در آنزیم های مهم مسیر گلیکولیتیک و تولید رادیکال آزاد اکسیژن در مخمر شده و علاوه بر آن، اتانول اندوسیتوز سلول را مهار می کند، بر فعالیت پمپ های هیدروژنی غشاهای داخل میتوکندریایی تاثیر می گذارد و باعث مهار آنزیم هایی مانند الکل دهیدروژناز می شود. تجمع اتانول بر سیستم انتقال درون سلولی نیز تاثیر می گذارد و در نهایت باعث کاهش مقدار اتانول تولیدی می شود (۱۰). از جمله تغییراتی که اتانول در مخمر ایجاد می کند می توانیم به مهار متابولیسم، کاهش مصرف سوپسترا توسط مخمر، کاهش رشد، تغییر در ساختار غشا و افزایش نفوذپذیری اشاره کنیم که در نهایت منجر به مرگ سلول مخمر می شود. با توجه به اینکه در سال های اخیر تلاش های زیاد و مطالعات وسیعی برای شناسایی ساز و کارهای پاسخ به تنش اتانول انجام شده اما با این حال ساز و کار تحمل به اتانول در این مخمر به طور کامل شناسایی نشده، به عبارت دیگر صفت تحمل در برابر اتانول به شبکه ی پیچیده ای وابسته است که واکنش های متقابلی در سطح ژنوم باهم دارند (۱۱). یکی از دلایلی که

باعث شده تعیین ساز و کار تحمل اتانول مشکل شود، پیچیدگی شبکه ی پاسخ مخمر می باشد به طوری که مسیرها به طور مداوم برنامه ریزی می شوند. بسیاری از ژن های شناخته شده در تحمل به اتانول نقش دارند، مربوط به ترکیب غشای سلولی اند؛ برای مثال، ژن های *ETRI*، *OARI*، *SUR4*، *FENI* و *HTD2* مربوط به متابولیسم اسیدهای چرب اشباع غشا و ژن های *DEPI*، *FEN2*، *UME6*، *HACI* و *PEX15* مربوط به متابولیسم لیپیدها و اسیدهای چرب هستند (۱۲). افزایش تحمل به اتانول در مخمرهای سویه صنعتی به تخمیر سریع تر و کامل تر منجر می شود و همچنین باعث افزایش بازده تولید، کارایی و پایداری سویه حین فرایند خواهد شد. این سویه ها قادر به افزایش زمان عملکرد فرایند تخمیر به مدت طولانی تر در حضور اتانول می شوند. همچنین تحقیق بر سویه های مقاوم در برابر تنش اتانول نشان داده است که این سویه ها از قابلیت های دیگر مانند مقاومت به سایر عوامل تنش زا از جمله فشار اسمزی و تنش اکسایشی و حرارتی برخوردارند (۱۳). از دو رویکرد مهندسی ژنتیک و مهندسی تکاملی می توان در مسیر بهبود سویه ساکارومایسس سرویزیه برای افزایش تحمل به اتانول بهره برد. در هر دو این رویکردها، تغییرات اعمال شده به طور مستقیم یا غیرمستقیم از طریق تغییرات ژنتیکی اتفاق می افتد و تمامی این تغییرات نیازمند درک سطح بالایی از توانمندی سلول در برابر تنش های مدنظر و ژن های موثر در این صفات فنوتیپی می باشد (۱۴). مهندسی تکاملی رویکردی است جهت بهبود صفتی (صفت تحمل به اتانول ساکارومایسس سرویزیه) که در آن آزمایش های تکامل تطبیقی در شرایط دلخواه و با استفاده از اعمال فشار انتخابی به مدت طولانی طراحی می شوند (۱۵). هنگامی که زمان تولید نسل میکروارگانیسم، کوتاه و اندازه ی جمعیت بزرگ باشد، آزمایش ها در شرایط ایده آل خواهند بود؛ زیرا بسیاری از جهش های رخ داده در هر نسل خودبه خودی

است و نسل تطبیق یافته به سرعت در کل جمعیت تکثیر می یابد (۹). بنابراین از عوامل موثر در مهندسی تکاملی می توان به مدت زمان و میزان جمعیت اولیه اشاره کرد (۱۶). به عبارت دیگر می توان گفت، هرچه جمعیت آزمایش شده بیشتر باشد، احتمال وقوع جهش های بیشتر و مفیدتر، زیادتر است. همچنین از لحاظ آماری طی آزمون های طولانی مدت امکان جداسازی فنوتیپ مطلوب تر افزایش می یابد (۱۷). بیشتر ارگانیسم ها نرخ جهش پایینی یعنی در حدود 10^{-9} تا 10^{-10} در هر نسل دارند، بنابراین در شرایط رشد، هر عاملی هر چند کوچک که باعث افزایش نرخ جهش شود، زمینه را برای جهش های مفید فراهم می کند. جهش هایی که با استفاده از اشعه یا مواد شیمیایی رخ می دهد، اغلب باعث افزایش تنوع ژنتیکی جمعیت اولیه در آزمایش های تکاملی می شود (۱۸). رکیب مواد مغذی محیط تخمیر در فیزیولوژی سلول مخمر و همچنین توان تحمل و تولید اتانول مخمر از اهمیت حیاتی برخوردار می باشد. عوامل تاثیرگذاری مانند در دسترس بودن مواد معدنی، برای مثال پتاسیم، گوگرد، منیزیم، نیتروژن، عناصر کمیاب و همچنین اکسیژن برای رشد سلول ها موثر است. این عوامل به طور چشم گیری بر رشد مخمر، تحمل تنش و بازده تولید اتانول تأثیرگذار هستند (۱۹). یکی دیگر از پارامترهای مهم pH محیط تخمیر است که برای جلوگیری از رشد ناخواسته باکتری ها، به ویژه باکتری های اسید لاکتیک و رشد میکروارگانیسم های کشت شده باید کنترل شود (۲۰). ملاس با غلظت بالای قند برای تخمیر و تولید اتانول مناسب است و به عنوان منبع کربن در ابعاد صنعتی استفاده گسترده دارد (۲۱ و ۲۲). مخمر ساکارز را به دو مونوساکارید گلوکز و فروکتوز هیدرولیز و آن را به شکل منبع کربن در مسیرهای متابولیک خود مورد استفاده قرار می دهد. به دو علت اصلی ملاس چغندر یا نیشکر ماده اولیه و اصلی در تولید مخمر است: ۱- مخمر به خوبی از قند موجود در ملاس استفاده و

رشد می کند؛ ۲- استفاده از ملاس از نظر اقتصادی به صرفه است؛ زیرا پسایی است که بدون انجام هیچ عملیاتی از تصفیه شکر به دست می آید. ملاس به هر مایعی که در اجزای تشکیل دهنده آن بیش از ۴۳ درصد قند وجود داشته باشد، گفته می شود؛ عموماً این قند ساکارز است. ترکیب ملاس بسیار متفاوت بوده و به مراحل تصفیه شکر، موقعیت آب و هوایی و فصلی بستگی دارد. ملاس نیشکر محصول جانبی کارخانه تولید شکر از نیشکر است که دست کم ۴۶ درصد قند دارد و بیریکس آن نباید کم تر از ۷۹/۵ درصد باشد (۲۳). ملاس چغندر محصول جانبی تولید شکر از چغندر است که دارای دست کم ۴۸ درصد قند و بیریکس ۷۹/۵ است (۲۴). بهینه سازی یک محیط صنعتی یکی از راه های افزایش تولید بیواتانول است. محیط بهینه شده حاوی مقادیر بهینه تمام اجزاء از جمله منابع کربن و نیتروژن و فاکتورهای رشد و حداقل مقادیر مورد نیاز برای رشد و تولید متابولیت ها توسط یک میکروارگانیسم است (۲۵ و ۲۶). متد سطح پاسخ مجموعه ای از تکنیک های آماری می باشد که در بهینه سازی فرایندهایی به کار می رود که پاسخ مورد نظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تاثیر قرار می گیرد. شمای گرافیکی مدل ریاضی سبب تعریف واژه ی سطح پاسخ به این متد شده است. از مزایای این طرح آماری می توان به کاهش تعداد آزمایش ها اشاره کرد و هم چنین کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و اثر متقابل فاکتورها قابل برآورد می باشند. مهم ترین مسئله این تحقیق بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورها بود که از این رو طرح آماری سطح پاسخ انتخاب شد (۲۷ و ۲۸). در این روش با معیار قراردادن تعداد متغیرها، حدود بیشینه و کمینه تعیین شده برای هر متغیر، می توان ماتریس آزمایش را طراحی کرد. زمانی که تعداد متغیرها زیاد باشد، این روش درمقایسه با روش های پرحجمی مانند فاکتوریل کامل ارجحیت دارد و در شرایط خاص (مواردی که آزمایش تجربی نامنظم و غیر سیستمیک است) بسیار مفید می -

باشد. در این مطالعه ابتدا از نمونه‌های خمیرمایه و تخمیری جمع آوری شده، جدایه مخمر ساکارومایسس سروریه با قابلیت تحمل غلظت های اتانول بالاتر جداسازی می‌گردد و سپس با هدف افزایش توان تحمل و تولید غلظت‌های بالاتر اتانول، این جدایه با عوامل جهش‌زای شیمیایی (اتیدیوم بروماید) و همچنین راهبرد تکامل تطبیقی و مهندسی تکاملی به غلظت‌های اتانول بالاتر خو داده می‌شود. نهایتاً پس از بررسی توان تولید اتانول توسط جدایه توسعه یافته،

مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت و شرایط کشت مخمرها

جداسازی سلول‌های مخمر با تحمل به غلظت‌های بالاتر اتانول از خمیرمایه‌های مختلف موجود در کشور به عنوان جمعیت اولیه و سویه‌های والدی انجام شد. سویه‌ی والد در محیط کشت مایع YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) حاوی ۸٪ اتانول (حجم در حجم) کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور گرماگذاری شد. این محیط حاوی ۲۰ گرم در لیتر گلوکز (مرک)، ۲۰ گرم در لیتر پپتون (مرک) و ۱۰ گرم در لیتر عصاره مخمر (مرک) می‌باشد. 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. پس از ۴۸ ساعت رشد در محیط کشت مایع YPD حاوی ۸٪ اتانول، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط بر روی محیط‌های کشت YPDA (Yeast extract Peptone Dextrose Agar) حاوی ۸٪ اتانول منتقل و کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. کلنی‌های تشکیل شده برای سنجش توانایی تولید اتانول در ابتدا و سپس برای اعمال جهش‌زایی برداشت شدند.

جهش‌زایی با اتیدیوم بروماید

عوامل محیطی مهم تاثیرگذار در توان تولید اتانول از جمله بریکس محیط کشت، غلظت‌های سولفات آمونیوم و میزان تلقیح با استفاده از روش طراحی آزمایش سطح پاسخ (RSM) بهینه خواهد شد و تولید اتانول با راندمان بالا ایجاد خواهد گردد.

به این منظور 2×10^8 سلول 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 ساعت روی شیکر در ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۱۰ در مجاورت ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر اتیدیوم بروماید (سیگما) جهت ایجاد تنوع ژنتیکی قرار داده شد. سلول‌ها در دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ و ته‌نشین شدند و واکنش با شست و شوی سوسپانسیون سلولی با بافر فسفات سدیم متوقف شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده به محیط کشت مایع YPD حاوی ۸٪ (حجم در حجم) اتانول منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور گرماگذاری شد (۱۱ و ۲۹).

آزمایش‌های تکامل تطبیقی

در این آزمایش از محیط کشت ملاس برای آزمایش‌های تکامل تطبیقی و از الکل اتانول به عنوان تنش فیزیولوژیک در مجاورت غلظت ۵ میکروگرم بر لیتر اتیدیوم بروماید (سیگما) به عنوان عامل ایجاد جهش تصادفی و ایجاد تنوع ژنتیکی استفاده شد. محیط کشت ملاس با رقیق کردن ملاس چغندر قند در آب مقطر تا بریکس ۱۸ تهیه شد.

خوگیری سویه ها از طریق اندازه گیری میزان کدورت در OD₆₀₀ هر ۲۴ ساعت یکبار با استفاده از دستگاه (Bio tech, USA) خوانش می شود و هر دور در صورت افزایش کدورت به مرحله بعدی پاساژ داده خواهد شد. به منظور نگهداری و حفظ تمامی رده های سلول تکامل یافته، قبل از هربار تکرار کشت، ۰/۲ میلی لیتر از کشت قبلی به ۰/۲ میلی لیتر از محلول گلیسرول ۴۰ درصد در محیط کشت YPD تازه، اضافه و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد ذخیره سازی صورت گرفت. از تابع رشد نمایی برای محاسبه ی نرخ ویژه رشد برای هر نمونه استفاده گردید. مقادیر اولیه OD₆₀₀ یکسان برای همه چاهک ها محاسبه و مورد استفاده قرار گرفت. نرخ ویژه رشد با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۳۲).

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

بررسی توان تولید اتانول توسط جدایه های حاصل از

تکامل تطبیقی

جدایه مخمر حاصل از تطابق در محیط غلظت ۱۲٪ اتانول (حجمی - حجمی)، به محیط کشت YPDA حاوی ۱۲٪ اتانول منتقل و کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. کلنی های تشکیل شده برای سنجش توان تولید اتانول به ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت ملاس با بریکس ۲۲ حاوی ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم، محیط کشت با افزودن اسید سولفوریک در pH ۴/۵ منتقل و در دمای ۲۹ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری می شوند. پس از ۲۴ ساعت رشد هوازی و افزایش زیست توده سلولی، محیط جهت تولید اتانول بی هوازی می شود و در دمای ۲۹ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری می شوند. به منظور ایجاد شرایط بی هوازی جهت تولید اتانول از درپوش نازل دار و دارای قفل هوا جهت جلوگیری از ورود اکسیژن به داخل محفظه استفاده می شود. میزان تولید

پس از تهیه رقت، به منظور حذف ناخالصی های جامد، محیط کشت آماده شده در rpm ۵۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. پس از افزودن ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم، محیط کشت با افزودن اسید سولفوریک در pH ۴/۵ تنظیم شد. محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شد (۳۰). تکامل تطبیقی طی ۸۰ مرحله متوالی کشت جدایه ها و هر مرحله به مدت زمان ۲۴ ساعت، در میکروپلیت هایی با ۹۶ چاهک انجام خواهد شد. به عبارتی در هر چاهک جمعیتی حاصل از جدایه های جهش یافته در شرایط تنش الکل و غلظت غیرکشنده ماده جهش زای اتیدیوم بروماید قرار گرفت و غلظت اتانول به تدریج در طول کشت های متوالی افزایش خواهد یافت. در این تحقیق، مثبت بودن رشد سلول ها و افزایش کدورت محیط کشت در هر مرحله، به عنوان پارامتر انتخابی برای انتخاب و انتقال جدایه های با تحمل بالاتر به مرحله بعد مدنظر قرار می گیرد. جمعیت مخمری با رشد مکرر در حضور اتیدیوم بروماید و غلظت بالای تنش الکل با آن خو گرفته و سازگار شده که در نهایت به تکثیر جمعیت برتر در این شرایط منجر شد و سویه های تکامل یافته به غلظت های بالاتر اتانول انتقال داده می شوند (۳۱). باتوجه به جداسازی جدایه های اولیه در غلظت اتانول ۸٪، برای شروع آزمایش های تکامل تطبیقی از غلظت اولیه ۸٪ (حجم در حجم) تا ۱۲٪ درصد (حجم در حجم) اتانول، به صورت افزایش ۰.۵٪ اتانول در هر افزایش غلظت و ۱۰ پاساژ در هر غلظت جهت اعمال تطابق کارآمدتر، استفاده شد که به طور مستقیم و بدون استریل کردن به محیط کشت اضافه شد. سپس هر میکروپلیت با فویل غشایی کاملاً محکم پوشیده شد تا از تبخیر الکل جلوگیری شود. میکروپلیت ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور rpm ۷۰ گرماگذاری شدند. برای جلوگیری از تبخیر محیط از بیرونی ترین ردیف های میکروپلیت استفاده نشد (۱۱ و ۱۶). رشد مثبت با توجه به

آورده شده اند و در سه سطح وارد معادله سطح پاسخ می- شوند. پس از وارد نمودن این اطلاعات، نرم افزار ۱۵ آزمایش مختلف را برای انجام آزمایشها پیشنهاد نمود که همه آنها در جدول ۲ آورده شده است. عموماً معادله سطح پاسخ، مدل درجه دوم کامل یا فرم کاهیده آن است. مقدار تولید الکل براساس مقادیر واقعی محاسبه شد. از نرم افزار Minitab 19 جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ استفاده شد.

جدول ۱. عوامل اصلی (بریکس محیط، سولفات آمونیوم، میزان تلقیح) و سطوح آنها

بیشینه	کمینه	عامل
۲۶	۱۸	بریکس محیط (%)
۳۰	۱۰	سولفات آمونیوم (g/L)
۱۰ ^۹	۱۰ ^۷	میزان تلقیح (CELL/ML)

جدول ۲. آرایه های متعامد برای سطوح مختلف عوامل اصلی بریکس محیط، سولفات آمونیوم و میزان تلقیح

میزان تلقیح	سولفات آمونیوم	بریکس محیط	شماره آزمایش
۱۰ ^۷	۳۰	۲۲	۱
۱۰ ^۹	۱۰	۲۲	۲
۱۰ ^۸	۲۰	۲۲	۳
۱۰ ^۷	۲۰	۲۶	۴
۱۰ ^۸	۱۰	۲۶	۵

اتانول توسط جدایه خاصی با بالاترین میزان تولید جدایه های والدی مقایسه خواهد شد. جهت شناسایی فنوتیپی جدایه مخمر، آزمون های ریخت شناسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی به همراه تست های بیوشیمیایی افتراقی انجام می شود. کلنی ها پس از کشت روی محیط YPD آگار در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت از نظر ویژگی های ظاهری (رنگ، سطح، حاشیه و برجستگی) و به صورت میکروسکوپی مورد بررسی قرار می گیرند. همچنین توانایی تخمیر قندها شامل گلوکز، مالتوز، ساکاروز، لاکتوز و گالاکتوز بررسی خواهد شد (۳۳ و ۳۴).

ارزیابی تولید اتانول با روش تقطیر مستقیم و الکل سنجی نمونه

پس از اتمام فرایند ۴۸ ساعت کشت بی هوازی، کل محتویات محیط کشت درون بالن تقطیر ۵۰۰ میلی لیتری تخلیه گردید و با استفاده از سیستم تقطیر شیشه ای، اتانول تولید شده از محیط ملاس استخراج گردید. در نهایت ۱۰۰ میلی لیتر از مایع حاصل از تقطیر به منظور اندازه گیری درصد اتانول در یک استوانه مدرج ریخته شد و با استفاده از الکل سنج آنالوگ درصد اتانول سنجش شد.

طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ

از روش های متداول طراحی آزمون، روش سطح پاسخ برای ساخت مدل های تجربی استفاده می شود. روش سطح پاسخ مجموعه ای از تکنیک های آماری و ریاضیات کاربردی می باشد. هدف در این گونه طرح ها بهینه سازی پاسخ (متغیر خروجی) است که متاثر از چندین متغیر مستقل ورودی می باشد. روش سطح پاسخ برای بهینه سازی طرح، در کاهش هزینه روش های گران قیمت و بی نظمی های عددی مرتبط با آنها کاربرد دارد (۳۵). متغیرهای میزان بریکس، غلظت سولفات آمونیوم و میزان تلقیح سویه به محیط تخمیر، پارامترهای ورودی هستند که در جدول ۱

نتایج جهش‌زایی و مهندسی تکاملی

قبل از شروع آزمایش‌های تکامل تطبیقی میزان رشد جدایه های ساکارومایسس سرویزیه در محیط کشت YPD دارای ۸٪ اتانول تحت ارزیابی قرار گرفت. این جدایه ها پس از تیمار با ماده شیمیایی اتیدیوم بروماید و اعمال جهش‌زایی، در معرض غلظت‌های مختلفی از اتانول از ۸ تا ۱۲ درصد (حجم در حجم) قرار گرفت و نرخ رشد سویه در هر یک از غلظت‌های یاد شده تعیین گردید. در این مطالعه، کلنی‌های حاصل از جهش با اتیدیوم بروماید و سویه‌ی والدی ابتدا در محیط کشت YPD کشت داده شدند و جمعیت حاصل کشت هر یک از آن‌ها که جمعیت اولیه نامیده شد، طی ۱۴۴ روز در آزمایش‌های تکامل تطبیقی در شرایط تنش اتانول قرار گرفتند. در راستای مشابه‌سازی با شرایط صنعتی در جهت انتخاب جدایه‌های برتر از لحاظ مقاومت به اتانول، از محیط کشت ملاس در آزمایش‌های تکامل تطبیقی استفاده شد. معیارمان برای گزینش جدایه برتر، توان تکثیر و رشد طی کشت‌های پی‌درپی در شرایط تنش اتانول بود. این جمعیت‌ها در محیط کشت ملاس در دو حالت کلی تنش افزایشی و ثابت در معرض اتانول قرار گرفتند؛ به‌صورتی که از ۸ تا ۱۲ درصد در تنش افزایشی با نرخ افزایش ۵/۰٪ اتانول و در هر پله تحت تنش ثابت به مدت ۲۰ الی ۲۴ روز و ۱۰ الی ۱۲ پاساژ در هر پله قرار گرفته سازگار شدند. در شکل ۱، طرح شماتیک آزمایش-های فوق آورده شده است. این آزمایش به طوری انجام شد که در رویکرد افزایشی فرایند انتقال سویه به یک محیط تازه حاوی غلظت بالاتر اتانول زمانی صورت گرفت که نرخ رشد در غلظت قبلی برای چندین نسل ثابت باقی مانده بود. پس از بیش از ۲۰ دوره کشت که طی ۱۶۰ روز صورت گرفته بود، در رویکردی تنش افزایشی و ثابت در معرض قرار گرفتن تحت فشار انتخابی اتانول برخی از رده‌های سلولی آزمایش شده قادر به رشد در غلظت ۱۲٪ درصد

۶	۲۲	۲۰	۱۰. ^۸
۷	۲۲	۱۰	۱۰. ^۷
۸	۱۸	۱۰	۱۰. ^۸
۹	۱۸	۲۰	۱۰. ^۹
۱۰	۲۶	۲۰	۱۰. ^۹
۱۱	۱۸	۲۰	۱۰. ^۷
۱۲	۱۸	۳۰	۱۰. ^۸
۱۳	۲۶	۳۰	۱۰. ^۸
۱۴	۲۲	۳۰	۱۰. ^۹
۱۵	۲۲	۲۰	۱۰. ^۸

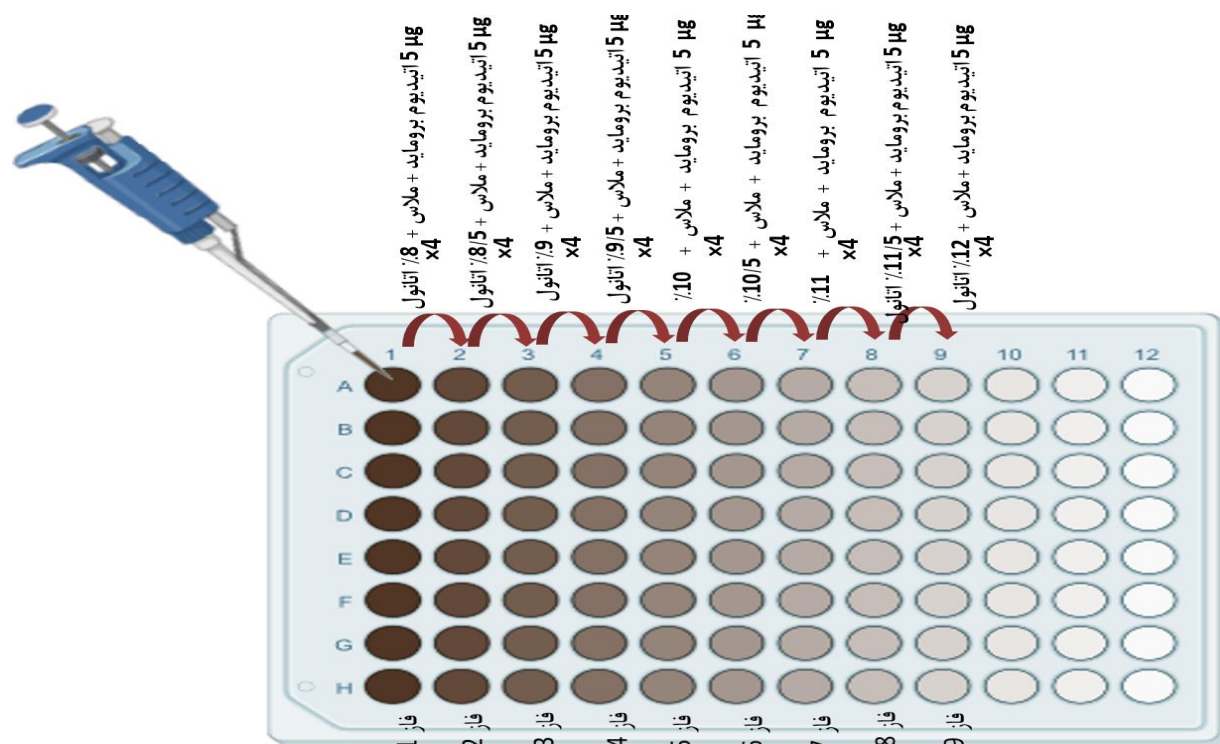
نتایج

جداسازی جدایه‌های با توان تحمل غلظت‌های بالاتر

اتانول

سلول‌های مخمر خمیرمایه‌های مختلف و نمونه های تخمیری موجود در کشور تحت تنش ثابت ۸ درصد (حجم در حجم) اتانول در محیط کشت مایع YPD قرار گرفتند و پس از ۴۸ ساعت رشد در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، کشت بر روی محیط YPDA انجام شد و مجدداً سلول‌های مخمری تحت تنش ۸ درصد اتانول قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت، کلنی‌های ۳ جدایه حاصل از غربال‌گری اولیه، تحت عنوان جمعیت اولیه و سویه‌های والدی جهت اعمال جهش‌زایی و آزمایش‌های تکامل تطبیقی بهره گرفته شد. جدایه‌های حاصل قابلیت تولید اتانول به طور میانگین 7 ± 0.5 درصد را در ابتدا و قبل از جهش‌زایی و اعمال مهندسی تکاملی نشان دادند.

(حجم در حجم) اتانول بودند؛ درحالی که سویه ی والد قادر به رشد در این غلظت نبودند.



شکل ۱. طرح شماتیک جهش زایی و تکامل تطبیقی

جدایه F1 نامگذاری گردید. جدایه مورد بررسی پس از کشت روی محیط YPD آگار، کلنی‌هایی با رنگ کرم تا سفید، سطح صاف و حاشیه‌های مشخص ایجاد کرد که با ویژگی‌های شناخته‌شده ساکارومایسس سروزیه همخوانی داشت. مشاهده میکروسکوپی سلول‌ها شکل بیضوی و در حال جوانه زنی مشخص را نشان داد که بیانگر ریخت‌شناسی کلاسیک این گونه است (۳۳). در جدول ۳ آزمون‌های تخمیری نشان داد جدایه قادر به مصرف گلوکز، مالتوز، ساکاروز و گالاکتوز بوده اما لاکتوز را تخمیر نکرد؛ این الگوی متابولیکی کاملاً با مشخصات فنوتیپی ساکارومایسس سروزیه مطابقت دارد (۳۴). نتایج فوق در مجموع تأیید می‌کند که جدایه مورد نظر از نظر فنوتیپی با ساکارومایسس سروزیه

به تدریج در طول آزمایش‌های تکامل تطبیقی رشد مثبت در برخی از تکرارها مشاهده شد و بدین ترتیب به مرحله بعد تنش افزایشی ارتقاء یافتند. در برخی از تکرارها نیز در مراحل رشد مثبت مشاهده نگردید و کاهش رشد در این کشت‌ها نشان دهنده عدم تطابق با فشار تنشی اعمال شده و در نتیجه به حذف آن‌ها از ادامه مراحل تکامل شد. بنابراین پس از چندین دوره کشت متوالی در شرایط تنش انتخابی اتانول، از بین جدایه‌های تطابق یافته با ۱۲ درصد (حجم در حجم) اتانول، یک جدایه با قابلیت تحمل و رشد در بالاترین غلظت اتانول یعنی ۱۲٪ ارتقا پیدا کرد، که این جدایه دارای حداکثر رشد مثبت به عنوان جدایه‌های منتخب پس از آزمایش تکامل تطبیقی انتخاب شد. این جدایه تحت عنوان

تطابق کامل دارد و برای مطالعات بعدی مهندسی زیستی و بهینه سازی تولید اتانول قابل اعتماد است.

جدول ۳. نتایج آزمون های فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه مخمر ساکارومایسس سروریه

ساکارومایسس سروریه		ساکاروز	
عدم توانایی مصرف لاکتوز	منفی	محیط حاوی لاکتوز	تخمیر لاکتوز
توانایی مصرف گالاکتوز	مثبت	محیط حاوی گالاکتوز	تخمیر گالاکتوز

میزان تولید اتانول توسط جدایه ی منتخب

برای مشخص کردن تاثیر افزایش تحمل به الکل بر میزان اتانول تولیدی در جدایه های تکامل یافته منتخب، جدایه F1، بر افزایش تولید اتانول توسط آن ها، میزان تولید اتانول هر جدایه ی تکامل یافته مشخص گردید به صورت مستقیم با روش تقطیر و اندازه گیری درصد اتانول با الکل سنج انجام گردید که در شکل ۲ نشان داده شده است. در جهت بررسی اثرات جهش بر میزان تولید اتانول جدایه ها، میزان تولید والدین میانی جدایه ی منتخب (جهش یافته های قبل از آزمایش های تکامل تطبیقی) نیز مورد بررسی قرار گرفتند. آزمون ها نیز نشان دهنده ی افزایش میزان تولید اتانول والدین میانی نسبت به سویه ی اولیه می باشد.



تفسیر	نتیجه مشاهده شده	ویژگی / تست انجام شده	نوع آزمون
ویژگی تیپیک ساکارومایسس سروریه	مثبت	رنگ کرم تا سفید، سطح صاف، لبه های کامل و برجسته	مشاهده ماکروسکوپی کلنی
ریخت شناسی شاخص مخمرها	مثبت	سلول های بیضوی (۵-۱۰ میکرومتر) در حال جوانه زنی	مشاهده میکروسکوپی
توانایی تخمیر گلوکز	مثبت (تشکیل حباب گاز)	محیط حاوی گلوکز با لوله دورهام	تولید گاز از گلوکز
قابلیت مصرف گلوکز	مثبت (اسیدی شدن محیط)	محیط حاوی گلوکز	تخمیر گلوکز
ویژگی خاص ساکارومایسس سروریه	مثبت	محیط حاوی مالتوز	تخمیر مالتوز
تایید هویت گونه ای	مثبت	محیط حاوی ساکاروز	تخمیر ساکاروز

شکل ۲. تقطیر اتانول تولید شده با سیستم تقطیر شیشه ای

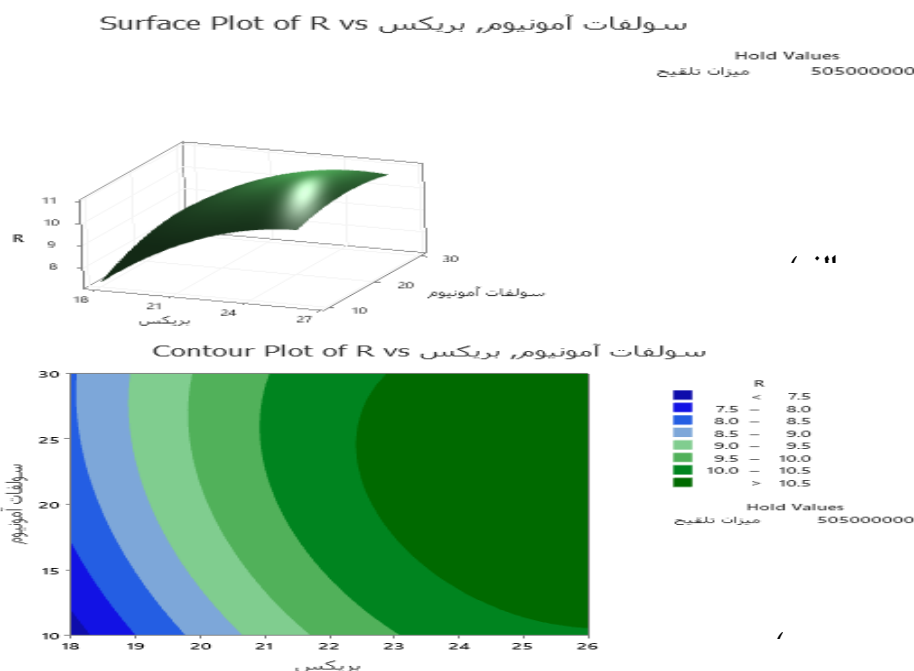
یافته ها

نتایج نشان داد که مقدار تولید اتانول برای جدایه تکامل یافته منتخب افزایش یافته است به طوری که بیشترین میزان تولید اتانول توسط سویه والد که قبل از انجام آزمون تکامل تطبیقی با اتیدیوم بروماید جهش و جدایه F1 منتخب به برابر با 1.0 ± 0.25 (حجم در حجم) اتانول تکامل یافت. بنابراین طبق این نتایج مقدار تولید اتانول با اعمال راهبردهای مهندسی تکاملی و فشار تنشی اتانول در این جدایه ۲۰٪ افزایش یافت. این داده‌ها نشان‌دهنده افزایش تحمل مخمر به اتانول می‌باشد که منجر به افزایش تولید اتانول در جدایه‌ی منتخب گردیده است.

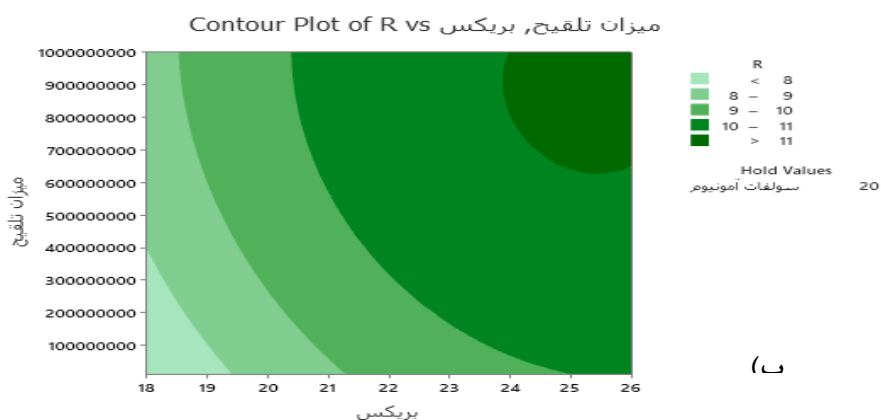
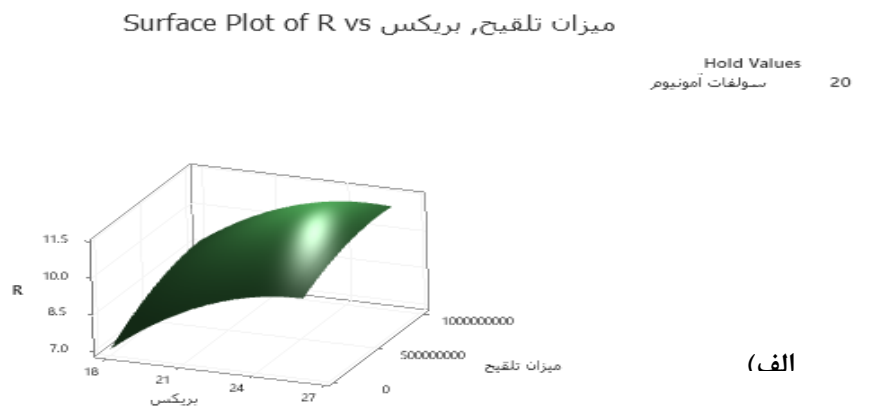
نتایج بهینه سازی تولید اتانول به روش پاسخ سطح

با استفاده از نمودار سه بعدی سطح پاسخ، تعامل بین دو عامل متغیر و سطوح بهینه آن‌ها به راحتی قابل درک است.

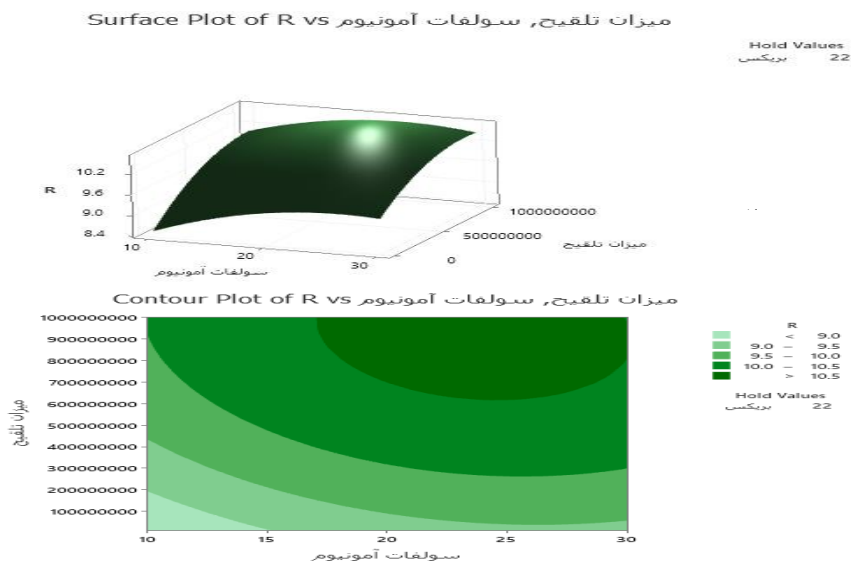
در شکل ۳، اثر بریکس محیط و سولفات آمونیوم بر غلظت اتانول (v/v) با در سطح صفر در نظر گرفتن متغیر دیگر نشان داده شده است. حداکثر غلظت اتانول در محدوده بریکس ۲۶٪ و 30 g/L سولفات آمونیوم مشاهده شد. شکل ۴، اثر متقابل بریکس محیط و میزان تلقیح را بر غلظت اتانول با در سطح صفر در نظر گرفتن متغیر دیگر نشان می‌دهد. همانطور که در نمودار نشان داده شده است، غلظت بهینه اتانول تحت افزایش بریکس از مقدار مرکزی محدوده آزمایش، نزدیک به ۲۶٪ و 10^9 cell/ml میزان تلقیح مشاهده شد. شکل ۵، اثر متقابل سولفات آمونیوم با میزان تلقیح را بر غلظت اتانول با در سطح صفر در نظر گرفتن متغیر دیگر نشان می‌دهد. همانطور که در نمودار نشان داده شده است، غلظت بهینه اتانول در محدوده 30 g/L سولفات آمونیوم و 10^9 cell/ml میزان تلقیح مشاهده شد. برای تایید شرایط بهینه آزمایش تایید در سه تکرار صورت گرفت. با آنالیز داده‌ها جهت بررسی رگرسیون داده‌های تجربی، مقادیر R -Squared (Pred) و R -Squared (adj)، تاییدکننده قابل قبولی برای رگرسیون بودند. مقدار 0.981 پارامتر R -sq نشان دهنده این است که بیش از ۹۸/۱ درصد داده‌های تجربی با مدل پیشنهادی قابل توصیف هستند و تنها حدود ۲ درصد خطا در پیش‌بینی داده‌ها وجود دارد.



شکل ۳. نمودارهای الف) سطح پاسخ و ب) کانتور، اثر بریکس محیط و سولفات آمونیوم بر غلظت اتانول (V/V) با سایر متغیرها



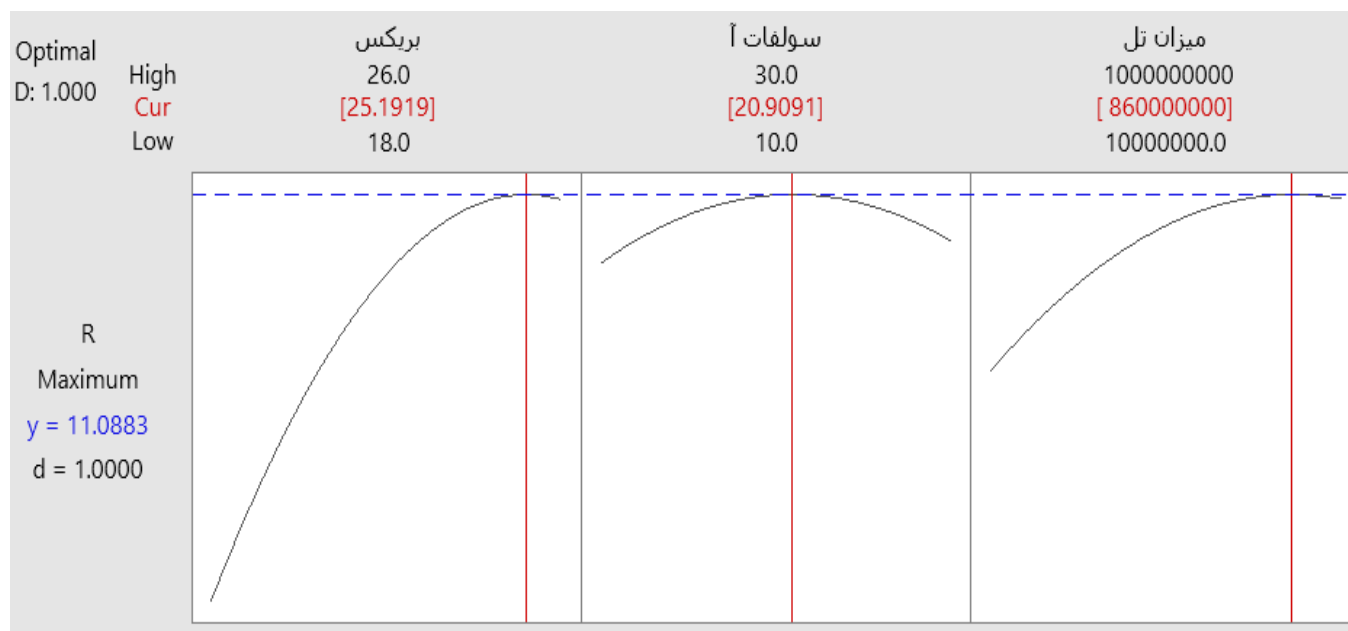
شکل ۴. نمودارهای الف) سطح پاسخ و ب) کانتور، اثر بریکس محیط و میزان تلقیح بر غلظت اتانول (V/V) با سایر متغیرها



شکل ۵. نمودارهای الف) سطح پاسخ و ب) کانتور، اثر سولفات آمونیوم و میزان تلقیح بر غلظت اتانول (v/v) با سایر متغیرها

هدف، تولید اتانول بالای ۱۰٪ است. حد پایین ۱۰٪ و حد بالایی ۱۱/۹٪ (v/v) می باشد. حداکثر پاسخ پیش بینی شده از مدل ۱۱/۰۸٪ (v/v) بود. همچنین آزمایش های مکرری جهت تأیید بهینه پیش بینی شده صورت گرفت. نتیجه حاصل از سه تکرار با مقدار پیش بینی شده منطبق بود. میانگین ۱۱٪ (v/v) بود که مدل ثابت شد. در مقایسه با محیط غیربهینه، نزدیک به ۱۰٪ افزایش در بازده نهایی اتانول تحت شرایط بهینه آماری مشاهده شد.

مطابق شکل ۶ برای انتخاب شرایط و محدوده بهینه، مدل به طور جداگانه نیز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از گزارش اعتبارسنجی، معیارهای مورد نیاز با حداکثر اتانول به عنوان هدف انتخاب شدند. انتخاب راه حل ها نیز به طور خودکار توسط نرم افزار بازیابی شدند. هدف نهایی دستیابی به حداکثر بازده اتانول با بهینه کردن عوامل محدودکننده می باشد زیرا منبع کربن یکی از منابع غذایی پرهزینه برای تخمیر است. بنابراین بریکس ۲۵٪ ملاس انتخاب شد. سطوح سولفات آمونیوم در محدوده ۲۱ g/L و میزان تلقیح نیز در محدوده 10^7 cell/ml $86 \times$ انتخاب شد.



شکل ۶. پیش بینی بهینه حالت و بیشترین درصد اتانول تولید شده توسط متد سطح پاسخ

بحث و نتیجه گیری

باتوجه به افزایش رشد تقاضای جهانی اتانول زیستی، پاندمی اخیر COVID-19 در سراسر جهان و نیاز به تولید هرچه بیشتر اتانول در سال های اخیر، در زمان حاضر نیاز به حجم زیادی از اتانول زیستی وجود دارد (۳۶). این بدان معناست که در هر مرحله از تولید این محصول زیستی بهبود عملکرد و بهره وری بسیار ضروری می باشد. بسیاری از این شرایط با مهندسی میکروارگانیسم ها قابل برطرف شدن می باشد که با طراحی دوباره ی مسیرهای متابولیسمی منجر به افزایش سطح عملکرد و بهره وری می شود؛ درنهایت، مواد اولیه مورد نیاز در مقیاس کارخانه های تولیدکننده و میزان سرمایه و هزینه های تولید کاهش می یابد (۳۷ و ۳۸). به منظور تولید کارآمد و مقرون به صرفه اتانول، تخمیر سریع لازم است؛ از این رو، سویه مخمر برگزیده شده باید دارای سرعت رشد خوب و میزان تولید اتانول در غلظت بالای اتانول باشد (۳۹). طی مطالعات متعددی که تاکنون صورت گرفته است، جهش هایی که با استفاده از مواد جهش زا در ژنوم سویه ها رخ می دهد یا جهش های خودبه خودی که از طریق انطباق تکاملی جمعیت مخمری با تنش اتانول سازگار می شوند باعث می شود که میزان رشد مخمر در تنش افزایش یابد. در واقع جهش هنگامی صورت می گیرد که مخمر در غلظت کشنده یا مهارکننده رشد اتانول قرار می گیرد و با تغییرات حاصل از جهش، بقای خود را در حدود این غلظت الکل به طور چشم گیری در مقایسه با سویه های والدی بهبود می دهد (۴۰ و ۴۱). بنابراین، رشد مخمرها در غلظت بالای اتانول به عنوان

پارامتر انتخاب مناسبی برای آزمایش های تکامل تطبیقی برای صفت تحمل اتانول می باشد (۱۵). برای بررسی تأثیر افزایش تحمل به الکل بر افزایش تولید اتانول، از سنجش مستقیم تولید اتانول توسط جدایه مذکور استفاده شد. نتایج نشان دادند تحمل این سویه ها نسبت به اتانول بهبود یافته و همچنین توان تولید اتانول توسط این جدایه نسبت به سویه ی والد افزایش یافته است و علاوه بر اینکه رشد خود را در این شرایط ادامه دادند؛ درنهایت، میزان اتانول بیشتری نیز نسبت به سویه ی والدی تولید کردند. Dinh و همکاران (۲۰۰۸) با روش ناپیوسته و با استفاده از راهبرد مهندسی تکاملی، تحمل به اتانول یکی از سویه های ساکارومایسس سرویزیه هاپلوئید آزمایشگاهی را از ۸ درصد به ۱۰ درصد ارتقا دادند (۲۶). طی مطالعه دیگری Stanley و همکاران در سال ۲۰۱۰ پس از جهش سویه ی ساکارومایسس سرویزیه W303-1A با اتیل متان سولفونات، میزان تحمل به اتانول سویه های جهش یافته و سویه ی والدی را پس از یک دوره آزمایش تکامل تطبیقی در اتانول به صورت پیوسته بررسی کردند و نشان دادند که پس 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) افزایش یافته بود؛ اما میزان مصرف گلوکز در سویه ای که بدون هیچ گونه عامل جهش زایی در شرایط تنش اتانول تکامل یافته بود، نسبت به سویه ی دیگر نیز افزایش یافته بود (۴۲). Turanli و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه ای از اتیل متان

سولفونات برای جهش‌زایی استفاده کردند و میزان تحمل یک سویه ی ساکارومایسس سرویزیه هاپلوئید آزمایشگاهی CEN.PK 113-7D را از ۵ درصد تا ۱۰ درصد (حجم در حجم) افزایش دادند. در ادامه نیز با روش مهندسی تکاملی تحمل به اتانول را تا ۱۲ درصد افزایش دادند و پس از آن تغییرات در تعداد کروموزوم‌ها در سویه‌های تکامل یافته را مورد بررسی قرار دادند. در تحقیق حاضر افزایش تحمل به اتانول روش تنش‌افزایی و ثابت طی ۱۴۴ روز و در کشت بسته، در میکروپلیت‌های با ۹۶ چاهک و در حجم بسیار کم با غلظت‌های افزایشی ۰.۸٪ تا ۱۰٪ صورت گرفت (۳۹). بهبود نرخ رشدی که طی روند تکاملی صورت گرفت، در مقایسه با هزینه‌های بالای کشت پیوسته و حفظ شرایط بسیار سخت این سیستم‌ها، در زمان کوتاه و با صرف هزینه بسیار کمی همراه بود. در این مطالعه تغییرات رشدی و رشد مثبت مقاوم‌ترین جدایه‌های جهش‌یافته بررسی و در نهایت به انتخاب ۱ جدایه‌ی برتر منجر شد. همچنین در این تحقیق از سویه والد اولیه به‌عنوان شاهد استفاده شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، می‌توان از درصدهای تعیین شده‌ی اتانول به منظور فشار انتخابی در مرحله‌ی غربالگری و همچنین در مرحله بعد از جهش و تطابق سازشی همراه با فشار انتخابی بهره‌برد. این فرایند به انتخاب جدایه‌هایی منجر شد که تحمل به اتانول در آن‌ها افزایش یافته بود. استفاده از محیط کشت ملاس تاثیر چندانی در روند بهبود مقاومت به اتانول در مقایسه با محیط آزمایشگاهی YPD نداشت. در

سال ۲۰۱۲ Paradeep و همکاران مطالعه‌ای را تحت عنوان بهینه‌سازی فرایند تولید اتانول از طریق گندمیان انگشتی با استفاده از روش سطح‌پاسخ آغاز کردند. متغیرهایی که در این مطالعه بهینه شده بود عبارت بودند از: غلظت عصاره مخمر، سولفات منیزیم و pH محیط که پس از بهینه‌سازی این عوامل، غلظت اتانول به میزان ۱۳/۶۶ درصد رسید. مقادیر پیش‌بینی شده برای شرایط فرایند بهینه‌سازی شده با داده‌های تجربی هم‌خوانی خوبی داشت. تایید مدل ثابت کرد که تفاوت معناداری بین مقادیر پیش‌بینی شده و مشاهده شده وجود ندارد (۴۳). Ratnam و همکاران در سال ۲۰۰۳ مطالعه‌ای تحت عنوان تولید اتانول از نشاسته‌ی درخت نخل در مرحله‌ی تخمیر و در غلظت‌های مختلف انجام دادند. طی این آزمایش غلظت بهینه مشخص شد و سپس بهترین شرایط تولید اتانول تخمیر به مدت زمان ۱۷ ساعت و اسیدیته ۲ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای غلظت ۱۴۰ گرم در لیتر نشاسته به‌دست آمد که این مقادیر از طریق روش سطح پاسخ به‌دست آمدند. همچنین غلظت بهینه مشخص شده توسط روش سطح پاسخ با توجه زمان و هزینه با روش تجربی کاملاً هم‌خوانی داشت (۴۴). Gebregergs و همکاران در سال ۲۰۱۶ مطالعه‌ای تحت عنوان تولید اتانول صنعتی از پوست موز برای کشورهای درحال توسعه و بهینه‌سازی روش از طریق سطح پاسخ را انجام دادند. در واقع آن‌ها از پوست موز جهت تولید اتانول از طریق مخمر ساکارومایسس سرویزیه بهره بردند و اثرات عوامل هیدرولیز را

مورد بررسی قرار دادند و با طرح های سطح پاسخ ترکیبی بهینه از عوامل پیدا کردند. تجزیه و تحلیل ضریب همبستگی واریانس $R^2 = 0/865$ و R^2 تعدیل شده $= 0/9782$ بیانگر ارزیابی بسیار خوبی از داده های تجربی توسط مدل رگرسیون چندجمله ای درجه ی دوم می باشد. این مقدار همبستگی داده های تجربی بیانگر توانایی روش سطح پاسخ در صحت و درستی شرایط آزمایشگاهی می باشد (۴۵). در مطالعه فوق از پوست موز جهت تخمیر اولیه استفاده نمودند درحالی که در مطالعه ما از ملاس چغندر استفاده شد و ضریب همبستگی واریانس تقریباً مشابه بود. El-Gendy و همکارانش در سال ۲۰۱۳ مطالعه ای تحت عنوان طراحی و بهینه سازی فرایند تخمیر ملاس چغندر قند توسط ساکارومایسس سرویزیه با استفاده از روش سطح پاسخ انجام دادند. از روش سطح پاسخ بر اساس طراحی مرکزی نمای کامپوزیت به منظور ارزیابی و بهینه سازی شرایط برای تولید حداکثری بیواتانول بهره برده شد. در این آزمایش اهمیت دوره انکوباسیون، pH اولیه، دمای

انکوباسیون و غلظت ملاس در عملکرد بیواتانول مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از معادله ی مدل، تولید حداکثر اتانول در شرایط بهینه ۲۵۵ گرم در لیتر در اسیدیته ی ۵/۶ و دمای ۳۸ درجه سانتی گراد به دست آمد که با شرایط آزمایشگاهی آن همخوانی بالائی با مطالعه حاضر داشت (۴۶). در هر دو مطالعه از ملاس چغندر قند به عنوان منبع کربن استفاده شده است اما تفاوت در میزان الکل تولید شده ناشی از تفاوت در سایر عوامل از قبیل دما و pH و... و همچنین جدایه مخمری مورد استفاده در تولید می باشد. در تمامی موارد ذکر شده، روش سطح پاسخ بهینه ترین و بهترین شرایط را برای تولید اتانول تعیین کرده و همخوانی روش نتیجه تجربی با نتیجه ی مدل ارائه شده توسط روش سطح پاسخ تایید شده است، لذا جهت تولید بیواتانول با بالاترین راندمان و کمترین هزینه می توان از روش سطح پاسخ بهره برد و توصیه به استفاده از این روش در مدل های آزمایشگاهی می گردد.

منابع

1. Barnett JA, Lichtenthaler FW. A history of research on yeasts 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880-1900. *Yeast*. 2001;18(4):363-88.
2. Wang F, Jiang Y, Guo W, Niu K, Zhang R, Hou S, et al. An environmentally friendly and productive process for bioethanol production from potato waste. *Biotechnol Biofuels*. 2016;9(1):50.
3. Mohseni M, Ebrahimi H. Isolation, identification and optimization of ethanol producing bacteria from *Saccharomyces*-based fermentation process of alcohol industries in Iran. *J Microb Biol*. 2013;2(7):15-28.
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. *J Microb Biol*. 2016;5(18):29-40.
5. Liu X, Xu W, Mao L, Zhang C, Yan P, Xu Z, et al. Lignocellulosic ethanol production by starch-base industrial yeast under PEG detoxification. *Sci Rep*. 2016;6(1):20361.
6. Celińska E, Borkowska M, Białas W. Evaluation of a recombinant insect-derived amylase performance in simultaneous

- saccharification and fermentation process with industrial yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(6):2693–707.
7. Rodionova M V, Poudyal RS, Tiwari I, Voloshin RA, Zharmukhamedov SK, Nam HG, et al. Biofuel production: Challenges and opportunities. *Int J Hydrogen Energy.* 2017;42(12):8450–61.
 8. 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 Res.* 2019;19(6):foz060.
 9. Deparis Q, Claes A, Foulquié-Moreno MR, Thevelein JM. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. *FEMS Yeast Res.* 2017;17(4):fox036.
 10. Argyros DA, Stonehouse EA. Yeast train improvement for alcohol production. *alcohol Textb.* 2017;6:287–97.
 11. Wallace-Salinas V, Gorwa-Grauslund MF. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for
 12. Attfield P V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat Biotechnol.* 1997;15(13):1351–7.
 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(7):e2623.
 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(1):77–91.
 15. Petek-Cakar Z, Turanli-Yildiz B, Alkim C, Yilmaz Ü. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. *FEMS Yeast Res.* 2012;12(2):171–82.
 16. Fiedurek J, Skowronek M, Gromada A. Selection and adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to increased ethanol tolerance and production. *Pol J Microbiol.* 2011;60(1):51–8.
 17. Stanley D, Chambers PJ, Stanley GA, Borneman A, Fraser S. Transcriptional changes associated with ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;88(1):231–9.
 18. Caspeta L, Chen Y, Ghiaci P, Feizi A, Buskov S, Hallström BM, et al. Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. *Science (80-).* 2014;346(6205):75–8.
 19. Zabed H, Sahu JN, Suely A, Boyce AN, Faruq G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renew Sustain Energy Rev.* 2017;71:475–501.
 20. Pradeep P, Goud GK, Reddy OVS. Optimization of very high gravity (VHG) finger millet (ragi) medium for ethanolic fermentation by yeast. *Chiang Mai J Sci.* 2010;37(1):116–23.
 21. Springham DG, Moses V, Cape RE. *Biotechnology-the science and the business.* CRC press; 1999.
 22. Khongsay N, Laopaiboon L, Laopaiboon P. Growth and batch ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on sweet sorghum stem juice under normal and very high gravity conditions. 2010;
 23. Fishell VK, Aberle ED, Judge MD, Perry TW. Palatability and muscle properties of beef as influenced by preslaughter growth rate. *J Anim Sci.* 1985;61(1):151–7.
 24. Gulshan A. Bioethanol and recombinant proteins production from milk whey and molasses. 2014;
 25. Antoni D, Zverlov V V, Schwarz WH. Biofuels from microbes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;77(1):23–35.
 26. Briggs DE, Brookes PA, Stevens R, Boulton CA. *Brewing: science and practice.* Elsevier; 2004.
 27. Atkinson AC. Optimum experimental design. In: *International Encyclopedia of Statistical Science.* Springer; 2011. p. 1037–9.
 28. Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments.* John Wiley & Sons; 2016.
 29. Stanley D, Fraser S, Chambers PJ, Rogers P, Stanley GA. Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2010;37(2):139–49.

30. Baltz RH, Demain AL, Davies JE. Manual of industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology Press; 2010.
31. Ghiaci P, Norbeck J, Larsson C. Physiological adaptations of *Saccharomyces cerevisiae* evolved for improved butanol tolerance. *Biotechnol Biofuels*. 2013;6(1):101.
32. Sheikhi F, Rostami K, Azin M, Asadollahi M ali, Ebrahimi M, Ghiaci P. Improving Ethanol Tolerance in Industrial Yeast Strain by a Combination of Mutation and Evolutionary Engineering. *J Microb Biol*. 2022;11(43):13–28.
33. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification. 1983.
34. Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T. The yeasts: a taxonomic study. Elsevier; 2011.
35. Sasikumar E, Viruthagiri T. Optimization of process conditions using response surface methodology (RSM) for ethanol production from pretreated sugarcane bagasse: kinetics and modeling. *BioEnergy Res*. 2008;1(3):239–47.
36. Abuga K, Nyamweya N %J P. Alcohol-based hand sanitizers in COVID-19 prevention: a multidimensional perspective. 2021;9(1):64.
37. Winston F. EMS and UV mutagenesis in yeast. *Curr Protoc Mol Biol*. 2008;82(1):13.
38. Darvishi F, Abolhasan Moghaddami N. Isolation of industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* with high tolerance to ethanol from Iran's alcohol manufactures. *Cell Mol Res (Iranian J Biol)*. 2018;31(4):500–10.
39. Turanlı-Yıldız B, Benbadis L, Alkım C, Sezgin T, Akşit A, Gökçe A, et al. In vivo evolutionary engineering for ethanol-tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* haploid cells triggers diploidization. *J Biosci Bioeng*. 2017;124(3):309–18.
40. Liao JC, Mi L, Pontrelli S, Luo S. Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(5):288–304.
41. Ding J, Huang X, Zhang L, Zhao N, Yang D, Zhang K. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;85(2):253–63.
42. Elshreef AY. Effect of molasses levels as source of energy on broiler performance. *Fac Anim Prod Univ Khartoum*. 2010;
43. Pradeep P, Sarathi Reddy OV, Rama Mohan P, Ko S. Process optimization for ethanol production from very high gravity (VHG) finger millet medium using response surface methodology. *Iran J Biotechnol*. 2012;10(3):168–74.
44. Ratnam BVV, Narasimha Rao M, Damodar Rao M, Subba Rao S, Ayyanna C. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch using response surface methodology. *World J Microbiol Biotechnol*. 2003;19(5):523–6.
45. Gebregergs A, Gebresemati M, Sahu O. Industrial ethanol from banana peels for developing countries: Response surface methodology. *Pacific Sci Rev A Nat Sci Eng*. 2016;18(1):22–9.
46. El-Gendy NS, Madian HR, Amr SSA. Design and optimization of a process for sugarcane molasses fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *Int J Microbiol*. 2013;2013(1):815631.