

ناپایداری ژنومی و متابولیکی در طی تخمیر بلندمدت یک سویه صنعتی از مخمر ساکارومایسس سرویزیه مهندسی شده برای مصرف قندهای C5^۱

کیانا اکبری

دانشجوی مقطع کارشناسی مترجمی زبان واحد الکترونیکی دانشگاه آزاد اسلامی

چکیده

پایداری ژنتیکی و استواری متابولیکی در سویه‌های تولیدی از معیارهای کلیدی در فرایند تولید محصولات زیست پایه از طریق تخمیر میکروبی در مقیاس صنعتی به‌شمار می‌آیند. در این پژوهش، این ویژگی‌ها در یک سویه تولید کننده اتانول صنعتی از *Saccharomyces cerevisiae* که به‌منظور تخمیر هم‌زمان قندهای D-xylose و L-arabinose همراه با گلوکز از طریق ادغام کروموزومی چندین کپی از ژن‌های محوری برای استفاده از این قندهای پنتوز (C5) مهندسی شده بود، مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از کشت‌های نوبتی در بیورآکتور کنترل شده که شرایط تخمیر بلندمدت صنعتی را شبیه‌سازی می‌کند، مشاهده شد که مصرف D-xylose و L-arabinose از حدود نسل پنجاهم به بعد دچار نوسانات قابل توجهی می‌شود. این نوسانات به‌نظر نمی‌رسد ناشی از حضور کلون‌های کم مصرف C5 باشند که در طول کشت‌های متوالی با فراوانی کمتر از ۱٫۵ درصد ظاهر شدند و دلیل آن کاهش تعداد نسخه‌های ترانس‌ژن‌های رمزکننده آنزیم‌های مسیر جذب قندهای C5 بود. همچنین، زیرجمعیت‌های غنی شده با بیان کم یا زیاد RAD52، که سطح بیان آنها متناسب با نرخ نوترکیبی همولوگ گزارش شده است، نقصی در جذب قند C5 نشان ندادند، که نشان می‌دهد مکانیسم‌های دیگری ممکن است مسئول تنوع تعداد کپی ترانس‌ژن‌ها باشند. همچنین، زیرجمعیت‌های غنی شده با بیان کم یا زیاد RAD52، که سطح بیان آنها متناسب با نرخ نوترکیبی همولوگ گزارش شده است، نقصی در جذب قند C5 نشان ندادند، که بیانگر نقش سازوکارهای دیگری در تغییر تعداد نسخه‌های ترانس‌ژن‌ها است. در مجموع، این پژوهش، وجود ناپایداری‌های ژنتیکی و متابولیکی را در یک مخمر صنعتی نشان می‌دهد که هرچند در شرایط آزمایشگاهی خفیف بودند، اما در شرایط صنعتی سخت‌تر می‌توانند تأثیرات منفی بیشتری بر عملکرد تولیدی ایجاد کنند.

واژگان کلیدی: ناهمگنی فنوتیپی، پایداری ژنتیکی، سویه صنعتی مخمر، نوترکیبی همولوگ، زایلوز، آرابینوز، اتانول قرمز، ناپایداری متابولیکی

^۱ این مقاله ترجمه مقاله ای انگلیسی با عنوان زیر می باشد:

Genomic and metabolic instability during long-term fermentation of an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered for C5 sugar utilization

۱-مقدمه

پایداری ژنتیکی و متابولیکی میکروارگانیسم‌هایی که از طریق مهندسی متابولیک برای تولید محصولات زیستی از منابع تجدیدپذیر طراحی می‌شوند، یکی از موضوعات اساسی در زیست‌فناوری نوین به شمار می‌رود (اولسون و همکاران، ۲۰۲۲). به طور کلی پذیرفته شده است که بار متابولیکی ناشی از بیان مسیرهای بیگانه یا مصنوعی و نیز سمیت احتمالی ناشی از تجمع متابولیت‌های حد واسط یا محصولات نهایی، از مهم‌ترین عواملی هستند که ظهور خودبه‌خودی تغییرات ژنوتیپی و فنوتیپی را تحریک می‌کنند (راگبیورگ و همکاران، ۲۰۱۸؛ راگبیورگ و سامر، ۲۰۱۹).

با این حال، سازوکارهای زیربنایی ناپایداری سویه‌های تولیدکننده هنوز به خوبی شناخته نشده‌اند؛ زیرا این ناپایداری می‌تواند منشأ ژنتیکی یا غیرژنتیکی داشته باشد، و برهم‌کنش میان این دو عامل، مطالعه و کنترل پدیده‌ی ناپایداری سویه را پیچیده‌تر می‌سازد (کاپ، ۲۰۲۱). سویه‌هایی که با مسیرهای مصنوعی یا مدارهای ژنتیکی مهندسی و طراحی می‌شوند، اغلب در تخمیرهای بلندمدت، فنوتیپ تولیدی خود را از دست می‌دهند؛ این امر ناشی از ناپایداری ژنتیکی، بار متابولیکی، عدم تعادل میان آنزیم‌ها و کوفاکتورها و تجمع ترکیبات سمی است (مو و ژانگ، ۲۰۲۳).

مطالعات پیشین عمدتاً بر پایداری ژنتیکی در باکتری‌ها متمرکز بوده‌اند، جایی که افزایش فراوانی درج عناصر متحرک در ژن‌های ترانس‌ژن موجود بر روی پلاسمیدها (هایک و همکاران، ۲۰۲۳) یا کروموزوم‌ها (راگبیورگ و همکاران، ۲۰۱۸) عامل اصلی کاهش توان تولیدی تلقی شده است. در نتیجه، حذف انتخابی این عناصر متحرک و ترانس‌پوزازهای متناظر آن‌ها می‌تواند راهبردی مؤثر برای تثبیت سویه‌های باکتریایی صنعتی باشد (هایک و همکاران، ۲۰۲۳).

در *Saccharomyces cerevisiae*، فرآیند نوترکیبی همولوگ (Homologous Recombination – HR) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین سازوکارهای ژنتیکی منجر به از دست رفتن توان تولید گزارش شده است (لی و همکاران، ۲۰۲۱؛ دو مول و همکاران، ۲۰۲۳). این پدیده به‌ویژه در مورد تولید وانیلین- β -گلوکوزید (دامبروزیو و همکاران، ۲۰۲۰) به خوبی نشان داده شده است. در اغلب موارد، ناپایداری ناشی از HR در سویه‌های تولیدی به دلیل حذف آسان ژن‌های بیگانه‌ی گُذکننده آنزیم‌های مسیر متابولیکی است که به صورت چندنسخه‌ای و با پروموتورها و ترمیناتورهای یکسان در ژنوم ادغام شده‌اند (راگبیورگ و سامر، ۲۰۱۹).

علاوه بر ناپایداری ژنتیکی، در دهه اخیر منابع غیرژنتیکی ناپایداری سویه‌ها نیز مورد توجه قرار گرفته است که این امر به ناهمگنی درون جمعیتی سلول‌ها نسبت داده می‌شود. نکته قابل توجه، ناهمگونی متابولیکی با سلول‌های میکروبی کلونال است که در سطوح متابولیت (شیائو و همکاران، ۲۰۱۶) و جریان‌های متابولیکی متفاوت هستند، در مطالعات مختلف گزارش شده است (دلوینی و همکاران، ۲۰۱۴). برای مثال، ناپایداری متابولیکی در یک مخمر تولیدکننده نارینجین که توسط ادغام چندین ژن مهندسی شده بود، آشکار شد که در آن تولید نارینجین پس از ۲۰۰ نسل به سرعت کاهش یافت (لو و همکاران، ۲۰۲۰).

یک استراتژی شامل حفظ مزیت رشد انتخابی برای غنی‌سازی جمعیت‌های تولیدکننده از طریق حذف سلول‌هایی که نارینجین کمتری تولید می‌کنند، ۹۰٪ از تیترا نارینجین را تا ۳۲۴ نسل حفظ کرد. عوامل مؤثر از نویز مولکولی درون سلولی شامل بیان ژن تصادفی (تاخاویو و هاینمون، ۲۰۱۸) تا عوامل محیطی (شرایب و آکرم، ۲۰۲۰) متغیر است. راهبردی که در آن با حفظ مزیت رشد انتخابی، جمعیت‌های تولیدکننده از طریق حذف سلول‌های با تولید پایین‌تر تقویت می‌شوند، توانست تا ۳۲۴ نسل حدود ۹۰٪ درصد از سطح تولید را حفظ کند. عوامل سببی این پدیده می‌تواند از نویز مولکولی

درون سلولی شامل بیان تصادفی ژن‌ها (تاخویو و هاینمون، ۲۰۱۸) تا تغییرات محیطی (شرایب و آکرم، ۲۰۲۰) (متغیر باشد. به‌ویژه، نويز در بیان ژن‌های دخیل در ترمیم DNA و نوترکیبی (کاپ، ۲۰۱۰) می‌تواند به ناهمگنی در نرخ نوترکیبی در میان سلول‌ها منجر شود (آپهوف و همکاران، ۲۰۱۶؛ لیو و همکاران، ۲۰۱۹).

برای مثال، ما اخیراً گزارش دادیم که میزان خودبه‌خودی HR می‌تواند تا ۱۰ برابر در جمعیت کلونی ساکارومایسس سرویزیه بسته به سطح بیان ژن‌هایی که بر فعالیت HR تأثیر می‌گذارند، چه به‌طور مستقیم (مانند RAD52 که در مراحل اولیه مسیرهای HR دخیل است) و چه به‌طور غیرمستقیم (مانند RAD27 که در بلوغ قطعات اوکاساکی دخیل است) متفاوت باشد (لیو و همکاران، ۲۰۱۹). این ناهمگنی وابسته به HR می‌تواند هم موجب ظهور رفتارهای سازشی تحت شرایط تنش‌زا شود و هم بروز واریانت‌های با عملکرد پایین را تسهیل کند.

در این پژوهش، پایداری ژنومی و متابولیکی یک سویه صنعتی تولیدکننده اتانول که برای تخمیر هم‌زمان قندهای C5 (زایلوز و آرابینوز) با گلوکز مهندسی شده است، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که از حدود نسل پنجاهم به بعد، نرخ مصرف زایلوز و آرابینوز دچار نوسان شد، بی‌آن‌که تغییر ژنومی عمده‌ای در سطح جمعیت مشاهده شود. افزون بر این، کلون‌هایی با کاهش یا از دست رفتن کامل توانایی در مصرف این قندها از جمعیت کلی جداسازی شدند. بررسی‌ها نشان داد که فنوتیپ این واریانت‌ها ناشی از تغییر در تعداد نسخه‌های ژن‌های ترانسژن در مسیر مصرف قندهای C5 است. هرچند فراوانی این کلون‌ها کمتر از ۵/۱ درصد جمعیت بود، ولی این رخداد می‌تواند در بازه‌های طولانی‌تر و در شرایط سخت صنعتی به کاهش ظرفیت تخمیری این قندها منجر شود.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. سویه‌ها، پلاسمیدها و محیط‌های کشت

تمام آزمایش‌ها با استفاده از سویه (*S. cerevisiae* HDY.GUF12) (دیتز، ۲۰۱۳؛ جنروز و همکاران، ۲۰۱۷) (لسافر فرانسه) انجام شد. سویه HDY.GUF12 حاوی ترکیب RAD52-YFP-tdTomato با استفاده از استراتژی CRISPR-Cas9 (رایان و همکاران، ۲۰۱۶) به دست آمد. پلاسمید pCas9-amdSYM با کپی بالا [مشترک شده از pML107 (لاوگری و همکاران، ۲۰۱۵)]، که به طور مداوم ژن کد کننده اندونوکلئاز Cas9 را بیان می‌کند و حامل یک کاست بیان RNA راهنما (gRNA) است، برای تبدیل سویه HDY.GUF12 استفاده شد. یک قطعه‌ی ترمیم‌کننده حاوی-YFP tdTomato-SpHis5 و همولوژی‌هایی با RAD52 از سویه JA0241 (لیو و همکاران، ۲۰۱۹) (آغازگرهای GATCCCAA TACCAGGCACA و CATAGTTCAATTGCGTGACATC) تکثیر شد و برای ترمیم شکستگی دو رشته‌ای ایجاد شده توسط اندونوکلئاز Cas9 استفاده شد. توالی هدف gRNA با استفاده از نرم‌افزار آنالین CRISPR-direct شناسایی و در ناحیه ۳' UTR ژن RAD52 قرار داده شد. اتصال توالی کاست بیان gRNA به پلاسمید pCas9-amdSYM با استفاده از لیگاز DNA T4 انجام شد. سلول‌های مخمر با استفاده از روش (دیتز، ۲۰۱۳) (ترانسفورم شدند. سلول‌های ترانسفورم شده روی صفحات YNB استامید (۷/۱ گرم در لیتر پایه نیتروژن مخمر بدون اسیدهای آمینه و نیتروژن، ۶/۶ گرم در لیتر K₂SO₄، ۶/۶ گرم در لیتر استامید و ۲۰ گرم در لیتر D-گلوکز) به عنوان کاست amdSYM انتخاب شدند که توانایی استفاده از استامید را به عنوان تنها منبع نیتروژن می‌دهد (سولیس-اسکلانته و همکاران، ۲۰۱۳). ساختارهای سویه و پلاسمید با تکثیر و تعیین توالی PCR تأیید شدند. یک محیط کشت مخمر معدنی مصنوعی اقتباس شده از دستورالعمل وردوین که در (وردوین و همکاران، ۱۹۹۲) شرح داده شده است، برای کشت‌های سریالی در میکروپلیت‌ها استفاده شد. این محیط کشت، با نام SHD2، حاوی ۵ برابر عناصر کمیاب بیشتر از دستورالعمل اصلی، ۱/۰ مولار پتاسیم

هیدروژن فتالات، ۱۶ گرم در لیتر-D گلوکز، ۱۳ گرم در لیتر-D زایلوز و ۱۱ گرم در لیتر-L آرابینوز بود و در pH 5/0 تنظیم شد. محیط کشت YPD حاوی ۲۰ گرم در لیتر-D گلوکز، ۲۰ گرم در لیتر باکتوپپتون و ۱۰ گرم در لیتر عصاره مخمر بود. محیط کشت YNB حاوی ۷/۱ گرم در لیتر پایه نیتروژن مخمر بدون اسیدهای آمینه و نیتروژن، ۵ گرم در لیتر سولفات آمونیوم و با قندهای مناسب، همانطور که در بخش‌های بعدی نشان داده شده است، تکمیل شد.

۲-۲. تخمیر دسته‌ای

کشت‌ها در ۷۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت ۲ YNB X حاوی ۶۰ گرم در لیتر-D گلوکز، ۲۶ گرم در لیتر-D زایلوز و ۲۲ گرم در لیتر-L آرابینوز در یک بیوراکتور ۱ لیتری (سولاریس بایوتک سولوشنز) انجام شد. سرعت هم زدن و دما به ترتیب روی ۴۰۰ دور در دقیقه و ۳۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و pH روی ۵/۵ حفظ شد. جریان هوا در ۱۸ ساعت اول (تا زمانی که تمام گلوکز مصرف شود) با سرعت ۱۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه حفظ شد، قبل از اینکه شرایط بی‌هوازی (تزریق N₂) اعمال شود. سلول‌ها در اولین دسته با OD = 0/1 از پیش‌کشت شبانه سویه WT HDY.GUF12 تلقیح شدند و قبل از تلقیح در دسته بعدی با همان OD اولیه، به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. کشت‌های دسته‌ای سریالی به صورت تکراری انجام شد تا به ۹۰ (۱۵ دسته متوالی) یا ۹۶ (۱۶ دسته متوالی) برسد. نمونه‌ها به طور منظم در طول کشت‌ها جمع‌آوری شدند تا اندازه‌گیری‌های OD و تعیین مقدار متابولیت‌های بیشتر انجام شود. در پایان هر دسته، سلول‌ها نیز در محلول گلیسرول ذخیره شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۳. کشت متوالی در میکروپلیت‌ها و مرتب‌سازی سلول‌ها

برای شروع کشت‌های متوالی در میکروپلیت‌ها، سوسپانسیون‌های سلولی هر سویه (سویه‌های WT و RAD52-YFP) (tdTomato) که از پیش‌کشت‌های شبانه در محیط SHD2 به دست آمده بودند، در یک فلاورپلیت ۴۸ خانه‌ای (۸۰۰ میکرولیتر در OD₆₀₀ = 0/1) تلقیح شدند. کشت‌ها در Beckman Coulter Bio lector Pro GmbH در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در محیط SHD2، تحت شرایط تکثیر به مدت ۲۴ ساعت با فرکانس تکان دادن ۱۰۰۰ دقیقه-۱ برای اطمینان از سرعت بالای انتقال اکسیژن انجام شد. پس از آن، کشت در شرایط تولید برای ۴۸ ساعت آخر با فرکانس تکان دادن ۸۰۰ دقیقه-۱ پس از افزودن ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت تازه برای کاهش سرعت انتقال اکسیژن انجام شد. پس از این چرخه کشت اولیه (C0)، OD (۶۰۰ نانومتر) (اندازه‌گیری شد، سلول‌ها برداشت شدند و مایع رویی برای تجزیه و تحلیل بیشتر HPLC در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، در حالی که رسوب در PBS دوباره به حالت تعلیق درآمد و قبل از مرتب‌سازی سلول‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در این مرحله، سلول‌ها نیز در محلول گلیسرول ذخیره شدند و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سلول‌ها با استفاده از FACS Aria III بر اساس حالت سفارشی (۰-۱۶) با نازل ۸۵ میکرومتری مرتب شدند. یک گیت اول برای انتخاب سلول‌ها بر اساس سیگنال‌های فلورسانس YFP (لیزر ۴۸۸ نانومتر، فیلتر ۳۰/۵۳۰) و tdTomato (لیزر ۵۶۱ نانومتر، فیلتر ۱۵/۵۸۲) اعمال شد. بر اساس نمودار FSC-Area در مقابل FSC-Height (لیزر ۵۶۱ نانومتر)، سلول‌های منفرد با اندازه و دانه‌بندی سلولی مشابه انتخاب شدند. در نهایت، بر اساس هیستوگرام فلورسانس YFP-tdTomato (لیزر ۵۶۱ نانومتر، فیلتر ۱۵/۵۸۲)، سلول‌های منفرد با ۱۰٪ بالاترین (تغییر نام داده شده به Rad52-high و ۱۰٪ پایین‌ترین (تغییر نام داده شده به Rad52-low) سطح فلورسانس Rad52-YFP-tdTomato به طور همزمان مرتب شده و در PBS بازیابی شدند. سویه WT بدون این گیتینگ نهایی (سلول‌های منفرد ۱۰۰٪ WT) جداسازی شد. پس از جداسازی سلول‌ها، سلول‌های بازیابی شده [تقریباً ۲ × ۱۰^۵ سلول برای هر سویه] برداشت شدند و در ۸۰۰ میکرولیتر از محیط کشت تازه به حالت تعلیق درآمدند تا در یک فلاورپلیت ۴۸ چاهکی تلقیح شوند. این سلول‌ها به عنوان چرخه کشت C0 کشت، نمونه‌برداری و طبقه‌بندی شدند، به جز در مراحل زیر: شرایط تکثیر ۴۸ ساعت

طول کشید؛ فقط سلول‌های با Rad52 بالا از کشت‌های Rad52 بالا بازیابی شدند، در حالی که فقط سلول‌های با Rad52 پایین از کشت‌های Rad52 پایین بازیابی شدند، بنابراین کشت‌ها به ترتیب با سلول‌های با Rad52 بالا یا پایین غنی شدند. در مجموع نه چرخه کشت برای هر شرایط (Rad52) پایین، Rad52 بالا و سویه (WT) انجام شد تا به بیش از ۹۰ نسل برسد.

۲-۴. آزمایش‌های تکثیر و تجزیه و تحلیل رشد با سنجش‌های نقطه‌ای

حدود ۱۵۰۰ سلول از یک کشت شبانه روی صفحات YNB حاوی ۲۰ گرم در لیتر-D گلوکز، ۱۰ گرم در لیتر-D زایلوز و ۱۰ گرم در لیتر-L آرابینوز پخش شدند. سپس کلون‌های هر صفحه با کشت تکثیر روی صفحات YNB حاوی ۲۰ گرم در لیتر-D گلوکز، ۲۰ گرم در لیتر-D زایلوز یا ۲۰ گرم در لیتر-L آرابینوز منتقل شدند. کلون‌هایی که رشد متفاوتی در محیط کشت زایلوز و/یا آرابینوز نسبت به محیط کشت گلوکز نشان دادند، انتخاب و با سنجش‌های نقطه‌ای بیشتر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. آن‌ها به مدت یک شب در صفحات YPD رشد داده شدند و قبل از ارسال به رقت‌های سریالی ۱/۱۰، در آب استریل MilliQ با غلظت 2×10^7 سلول در میلی‌لیتر به حالت تعلیق درآمدند. قطراتی (۵ میکرولیتر) از هر رقت روی صفحات YNB تازه تهیه شده حاوی ۲۰ گرم در لیتر-D گلوکز، ۲۰ گرم در لیتر-D زایلوز یا ۲۰ گرم در لیتر-L آرابینوز قرار داده شدند و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

۲-۵. روش‌های تحلیلی برای متابولیت‌ها

مایعات رویی کشت‌ها قبل از تجزیه و تحلیل با استفاده از HPLC با سرنگ (۲/۱۰ میکرومتر) فیلتر شدند. نمونه‌های کشت‌های متوالی در میکروپلیت با استفاده از HPLC Agilent 1200 Series مجهز به ستون Aminex HPX-87H متصل به پیش‌ستون تجزیه و تحلیل شدند. سایر نمونه‌ها با استفاده از سیستم HPLC Vanquish یا Ultimate 3000 مجهز به ستون REZEX ROA-Organic Acid H⁺ متصل به پیش‌ستون تجزیه و تحلیل شدند. برای همه آزمایش‌ها، محلول شوینده ۵ میلی‌مولار H₂SO₄ بود که با سرعت ۵/۰ میلی‌لیتر در دقیقه به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد کار می‌کرد. ترکیبات توسط یک آشکارساز RI شناسایی و با استفاده از نرم‌افزار Chromeleon از روی منحنی‌های استاندارد تعیین مقدار شدند.

۲-۶. سنجش‌های PCR در زمان واقعی

DNA ژنومی با استفاده از کیت خالص‌سازی Master Pure Yeast DNA استخراج و توسط Nano Drop اندازه‌گیری شد. تعداد کپی پنج ژن مورد نظر با استفاده از سیستم PCR در زمان واقعی MyIQ از Bio-Rad تعیین شد. مخلوط واکنش (حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر) حاوی ۵/۱۲ میکرولیتر بافر iQ SYBR Green Supermix، ۳ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت نهایی ۲۵۰ نانومولار و ۱۰ نانوگرم DNA بود. برنامه ترموسایکلینگ شامل یک مرحله نگه‌داشتن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۴۰ سیکل ۱۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۴۵ ثانیه‌ای در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد بود. برای مرتبط کردن تعداد کپی هر ژن با مقدار Ct، منحنی‌های کالیبراسیون با هر جفت آغازگر روی رقت‌های سریالی DNA از سویه WT انجام شد. تعداد کپی ژنوم ابتدا با استفاده از ژن ACT1 به عنوان مرجع تعیین شد و به ما امکان محاسبه تعداد کپی هر ژن مورد نظر را داد. سپس داده‌های حاصل با شرایط اولیه سویه WT که تعداد کپی ژن‌ها برای آن مشخص است، نرمال‌سازی شدند.

۲-۷. تعیین توالی ژنوم

سلول‌ها مستقیماً از گلیسرول استوک در محیط کشت YPD کشت داده شدند تا 10^9 سلول به دست آید DNA. ژنومی با استفاده از کیت DNA Midi کشت خون و سلول طبق پروتکل سازنده که برای سلول‌های مخمر با اصلاحات زیر اقتباس شده است، استخراج شد: (۱) هضم لیتیکاز به مدت ۲ ساعت ادامه یافت؛ (۲) هضم پروتئیناز K به مدت ۳ ساعت ادامه یافت؛ (۳) بقایای سلولی با سانتریفیوژ در سرعت ۵۰۰۰ گرم به مدت ۲۰ دقیقه و با فیلتر کردن مایع رویی (۲/۰ میکرومتر) قبل از اعمال به نوک ژنومی متعادل، رسوب داده شدند؛ (۴) DNA (رسوب داده شده در ایزوپروپانول با سانتریفیوژ در سرعت ۵۰۰۰ گرم به مدت ۲۰ دقیقه رسوب داده شد، دو بار در اتانول سرد ۷۰٪ شسته شد، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک شد و یک شب در بافر EB حل شد DNA. توسط NanoDrop تعیین کمیت شد و کنترل کیفیت آن با Qubit و Fragment Analyzer تأیید شد. توالی‌یابی تک‌مولکولی با خوانش‌های طولانی و بلادرنگ در پلتفرم توالی‌یابی جنینان با یک توالی‌یاب PacBio Sequel II انجام شد. کتابخانه SMRTBell با استفاده از یک کیت آماده‌سازی SMRTbell 3.0 تهیه شد DNA. ژنومی (۱ میکروگرم) از هر سویه با استفاده از لوله‌های g برش داده شد و قطعات DNA تقریباً ۱۰ کیلوبایتی تولید شد DNA. ژنومی برش داده شده به واکنش‌های آنزیمی منتقل شد تا برآمدگی‌های تک رشته‌ای حذف شوند و هرگونه آسیبی که ممکن است در ستون فقرات DNA وجود داشته باشد، ترمیم شود. یک واکنش-A tailing به دنبال آن اتصال آداپتور برآمدگی بارکددار برای تولید الگوهای SMRT Bell انجام شد. پس از تیمار نوکلئاز، نمونه برای قطعات بالای ۵ کیلوبایت با مهره‌های PB با غلظت ۳۵٪ AMPure انتخاب شد و برای بدست آوردن کتابخانه‌های نهایی حدود ۱۰ کیلوبایت، تکثیر هم‌مولار انجام شد. یک کمپلکس پلیمراز SMRTBell آماده توالی‌یابی با استفاده از کیت اتصال ۲/۳ و پرایمر Sequel II 3.2 ایجاد شد. دستگاه PacBio Sequel برای بارگذاری یک کتابخانه ۹۰ بعد از ظهر برنامه‌ریزی شد و در حالت CCS روی PacBio SMRTcell 8M، با Sequencing Plate 2.0، ۲ ساعت زمان پیش‌گسترش و بدست آوردن یک فیلم ۱۵ ساعته به ازای هر SMRTcell، توالی‌یابی شد.

۲-۸. تحلیل بیوانفورماتیک

ابزار CCS (نسخه ۰/۳/۶) از مجموعه smrttools، با پارامترهای پیش‌فرض، برای تولید داده‌های CCS اصلاح‌شده از داده‌های خام استفاده شد. این CCS ها با استفاده از lima به ازای هر نمونه دی‌مالتی‌پلکس شدند. مونتاژ با hifiasm برای به دست آوردن دو هاپلوتیپ از سویه‌های دیپلوئید انجام شد. هر کانتیگ با استفاده از nucmer در برابر سویه مرجع S288C ترازبندی شد. بنابراین، می‌توان بر اساس درصد تشابه بین S288C و مجموعه‌های hifiasm، یک نام کروموزومی به هر کانتیگ اختصاص داد. ابزار pbmm2 برای هم‌تراز کردن مجموعه‌های خوانش‌ها با مجموعه مرجع دیپلوئیدی (سویه RAD52-YFP-tdTomato) استفاده شد. خط لوله pbsv برای فراخوانی گونه‌های ساختاری با حداقل اندازه تنظیم شده در دو نوکلئوتید استفاده شد. فایل‌های فراخوانی vcf مختلف با استفاده از VCFtools جمع‌آوری و تجزیه و تحلیل شدند. SV های مختلف یافت شده با استفاده از IGV تجسم و تأیید شدند.

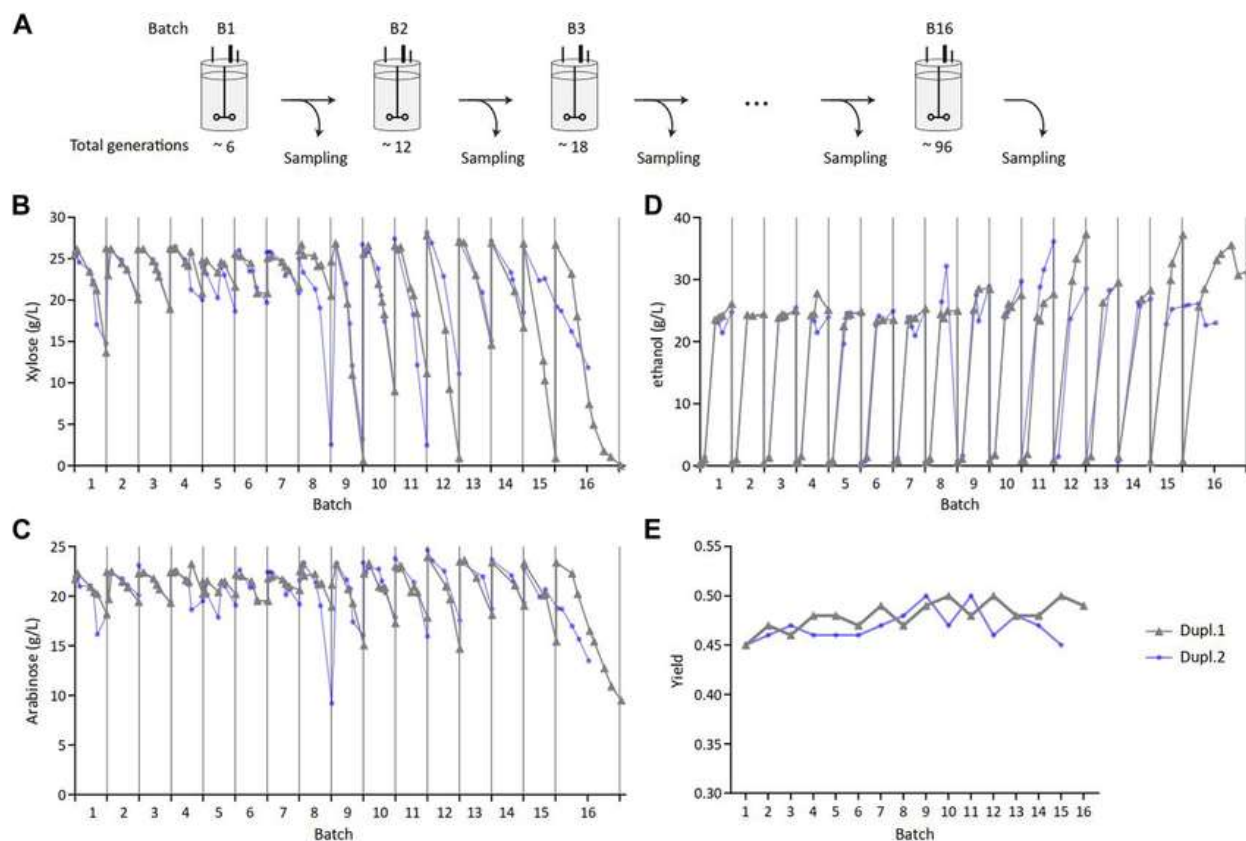
۳. نتایج و بحث

۳-۱. شناسایی ناپایداری جذب قند C5 در طول تخمیر طولانی مدت یک سویه صنعتی تخمیر طولانی مدت قند به اتانول با استفاده از سویه HDY.GUF12 تولیدکننده اتانول صنعتی انجام شد. این سویه از سویه دیپلوئید اتانول Red® (جاکوبوس و همکاران، ۲۰۲۱) مشتق شده است که قبلاً به صورت متابولیکی برای تخمیر D-زایلوز و L-آرابینوز با چندین درج کروموزومی ژن‌های کدکننده آنزیم‌های جذب قند C5 و مهندسی تکاملی برای بهینه‌سازی تخمیر

همزمان این قندها به همراه گلوکز (دیتز، ۲۰۱۳؛ دیمکه، ۲۰۱۳) مهندسی شده بود. این سویه به صورت تکراری (Dupl.1) و (Dupl.2) در ۱۶ بیوراکتور دسته‌ای متوالی که مربوط به حدود ۱۰۰ نسل بود رشد داده شد، که تقریباً با تعداد نسل‌ها از تلقیح اولیه تا فرآیند تخمیر صنعتی مطابقت داشت (راگیورگ و سامر، ۲۰۱۹). هر دسته ۴۸ ساعت طول کشید که شامل یک مرحله هوازی بود که حدود ۱۸ ساعت طول کشید و در طی آن گلوکز به طور کامل مصرف شد و به دنبال آن یک مرحله بی‌هوازی بود که در طی آن زایلوز و آرابینوز به اتانول تخمیر شدند. همانطور که در شکل‌های ۱ B و ۱ C نشان داده شده است، مصرف این قندهای C5 بین دسته‌ها نوسان داشت، از نسل ۵۰ شروع شد و از مصرف کم تا مصرف کل متغیر بود. همین روند برای تولید اتانول مشاهده شد (شکل ۱D). علاوه بر این، بازده اتانول در محدوده ۴۵ تا ۵۰ درصد قندهای مصرف شده در کل دسته متوالی اندازه‌گیری شد (شکل ۱E). همچنین تأیید شد که تحمل اتانول جمعیت سلولی گرفته شده در دسته‌های متوالی قابل مقایسه بود، که نشان می‌دهد نوسانات مشاهده شده در مصرف C5 با اثر سمی ناشی از تولید بالای اتانول مرتبط نیست، بلکه به دلیل تفاوت در توانایی مصرف زایلوز و آرابینوز است.

این الگوی مصرف C5 با مطالعات قبلی که مصرف کامل زایلوز و آرابینوز را با این سویه در سایر شرایط آزمایشگاهی گزارش کرده بودند، در تضاد بود (دیتز، ۲۰۱۳). با این وجود، بعید است که این نوسانات بسیار متغیر و غیرقابل پیش‌بینی در مصرف قند C5 منشأ ژنتیکی داشته باشند، زیرا مدت زمان هر تخمیر دسته‌ای برای تولید گونه‌های ژنتیکی حاوی این صفت فنوتیپی بسیار کوتاه است. این موضوع با توالی‌یابی طولانی کل ژنوم که بر روی نمونه‌های حاصل از چهار کشت دسته‌ای انجام شد، تأیید شد که هیچ تفاوت ژنومی بین نمونه‌های آزمایش شده در سطح جمعیت نشان نداد. بنابراین، نوسانات فنوتیپی که مشاهده کردیم می‌تواند ناشی از رویدادهای اپی‌ژنتیکی باشد که می‌توانند سطح بیان ژن‌های تراریخته یا سایر ژن‌های درون‌زا دخیل در مصرف قند C5 را تعدیل کنند (فرانسوا و همکاران، ۲۰۲۰).

این نتیجه غیرمنتظره در مورد مصرف نوسانی قندهای C5 در طول دوره‌های تخمیر متوالی، ما را بر آن داشت تا وجود احتمالی کلون‌هایی را در جمعیت با ظرفیت متفاوت برای متابولیزه کردن این قندها بررسی کنیم. برای این منظور، نمونه‌های سلولی از هشت دسته مختلف روی پلیت‌های حاوی گلوکز، زایلوز و آرابینوز پخش شدند تا حدود ۱۰۰۰ کلون مجزا در هر دسته به دست آید که در محیط‌های کشت حاوی گلوکز، زایلوز یا آرابینوز تکثیر شدند. این آزمایش چندین کلون را که رشد متفاوتی روی زایلوز و/یا آرابینوز در مقایسه با گلوکز نشان می‌دادند، آشکار کرد که با ردیابی رقت‌های سلولی متوالی، بیشتر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در مجموع ۳۲ کلون که تغییر در جذب قند C5 را نشان می‌دادند، جداسازی شدند و تا ۵/۱٪ از کل کلون‌های آزمایش شده در هر دسته را تشکیل می‌دادند (شکل A ۲). دو سوم آنها از نظر توانایی رشد روی زایلوز و همه آنها از نظر توانایی رشد روی آرابینوز تحت تأثیر قرار گرفتند. این تغییر در نه مورد از این کلون‌ها تأیید شد (شکل B ۲) که کاهش قابل توجهی در مصرف قند C5 و تولید اتانول پس از ۲۴ ساعت کشت، در مقایسه با سویه اولیه و جمعیت انبوه نشان دادند (شکل C ۲) به ویژه، تولید اتانول با مصرف قند C5 همبستگی داشت، که نشان می‌دهد بازده اتانول این کلون‌ها صرف نظر از سطح مصرف قند C5، بدون تغییر باقی مانده است.



شکل ۱

ناهمگونی در مصرف زایلوز و آرابینوز و تولید اتانول در کشت‌های متوالی دسته‌ای. (الف) کشت‌های سریالی انجام شده در راکتور دسته‌ای برای رسیدن به ۹۶ نسل. نمونه‌ها از دو کشت موازی (Dupl.1 و Dupl.2) به طور منظم برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی جمع‌آوری شدند. اندازه‌گیری زایلوز خارج سلولی (B)، آرابینوز (C) و اتانول (D) در طول کشت‌ها. (ه) بازده اتانول از آخرین اندازه‌گیری‌های هر دسته تخمین زده شده و با تقسیم تعداد کل کربن تولید شده بر تعداد کل کربن مصرف شده از گلوکز، زایلوز و آرابینوز محاسبه شده است.

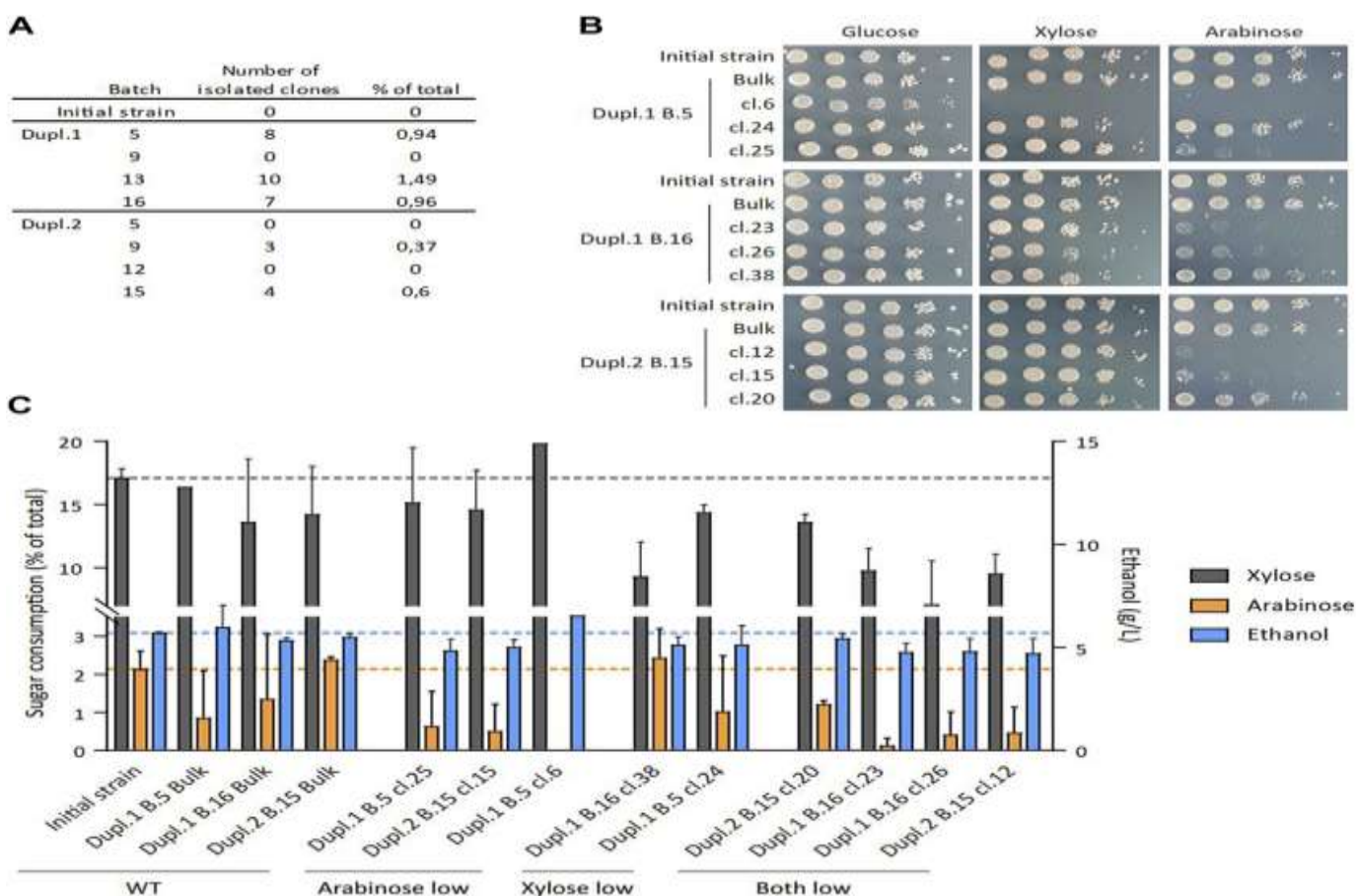
۳.۲ کلون‌های تخمیرکننده‌ی کم C5 در جمعیت انبوه سویه‌های صنعتی به دلیل تنوع تعداد کپی ترانس‌ژن‌ها هستند.

ما این سوال را مطرح کردیم که آیا وجود کلون‌های جدا شده از قندهای C5 با مصرف کم در جمعیت انبوه می‌تواند نتیجه‌ی از دست دادن ترانس‌ژن‌های دخیل در متابولیسم آنها باشد یا خیر. از آنجایی که بیشتر کلون‌های حفظ شده در این مطالعه، فنوتیپ کم مصرف آرابینوز را نشان دادند، از روش RT-PCR به عنوان روش مناسب برای تعیین تعداد کپی ترانس‌ژن‌های مرتبط با آرابینوز *araA*، *araB*، *araD* و *araT* استفاده شد و از *ACT1* به عنوان مرجعی برای نرمال‌سازی استفاده شد (شکل ۳)، زیرا در حال حاضر از PCR کمی مطلق برای تعیین تعداد کپی ژن در مخمر تراریخته استفاده می‌شود (شیروانی و همکاران، ۲۰۲۰).

همانطور که در شکل ۳ گزارش شده است، تعداد کپی این ژن‌ها کاهش یافته است، به طوری که *araB* که L-ریبولوکیناز را کد می‌کند بیشترین تأثیر را پذیرفته است (یعنی از ۵ به دو کپی در بیشتر کلون‌ها)، و پس از آن *araA* که ایزومراز آرابینوز را

کد می‌کند و *araD* که اپیماز تبدیل L-ریبولوز به زایلوز را کد می‌کند، قرار دارند، در حالی که تعداد کپی *araT* که ناقل آرابینوز را کد می‌کند هیچ تغییری نشان نداد. کارهای قبلی نشان داده است که میزان جذب قند C5 با تعداد کپی ترانسژن مرتبط است (Dietz, 2013)، که نشان می‌دهد کاهش تعداد کپی ترانسژن‌های مرتبط با آرابینوز که مشاهده کردیم می‌تواند فنوتیپ کم‌مصرف را در کلون‌های جدا شده توضیح دهد. بنابراین، در طول کشت، سلول‌های نادر در جمعیت، اصلاح ژنومی را نشان دادند، حداقل در تعداد کپی ترانسژن، که بر توانایی آنها در مصرف قندهای C5 تأثیر گذاشت.

روی هم رفته، این نتایج وجود کلون‌های کم مصرف قندهای C5 را که از توالی‌یابی اولیه ژنوم ما در سطح جمعیت جان سالم به در برده‌اند، آشکار کرد، احتمالاً به دلیل فراوانی کم این کلون‌ها که از ۱٫۵٪ کل جمعیت تجاوز نمی‌کردند. علاوه بر این، فراوانی این کلون‌های کم مصرف قند C5 از نظر آماری در طول دسته‌های تخمیر متوالی تغییر نکرد، که نشان می‌دهد این رویداد نادر ممکن است ناشی از بی‌ثباتی ژنتیکی ذاتی سویه مهندسی شده باشد. با این وجود، نمی‌توان رد کرد که در درازمدت، فراوانی این گونه‌ها، به ویژه در شرایط بی‌هوازی، افزایش یابد، با توجه به اینکه تأمین انرژی از قندهای C5 به ازای هر مول قند ۱۲٫۵٪ کمتر از گلوکز است. بنابراین، سلول‌هایی که تخمیر C5 را از دست می‌دهند، می‌توانند نسبت به سلول‌هایی که این توانایی را حفظ می‌کنند، از نظر تناسب اندام برتری داشته باشند. وجود این سطح پایین فرضی ناپایداری ژنتیکی پایه می‌تواند منجر به رانش ژنتیکی در جمعیت شود، به‌ویژه در بیوراکتورهای صنعتی که شرایط کشت سختگیرانه‌تر است.



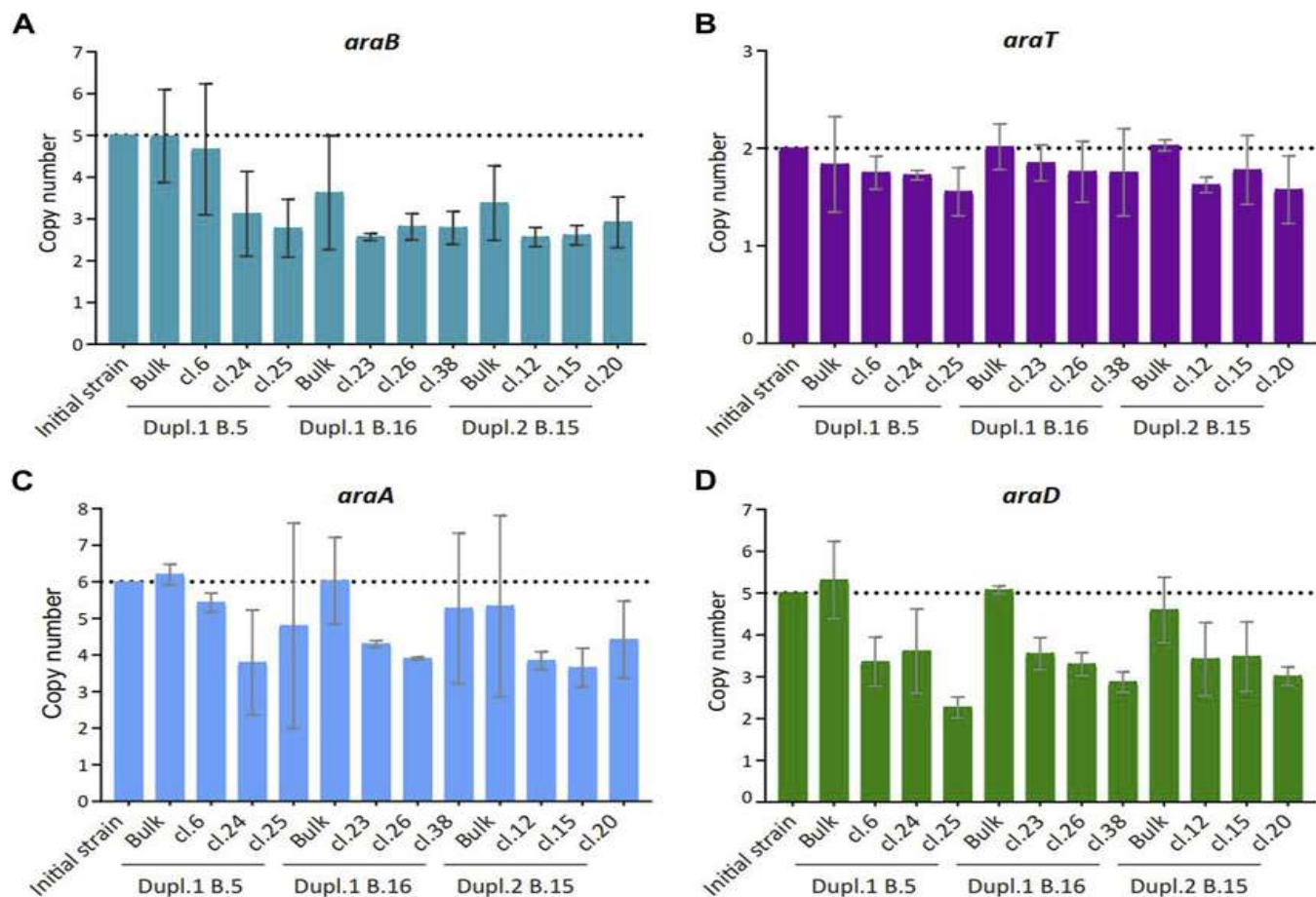
شکل ۲

فنوتیپ‌های کلون‌های جدا شده از کشت‌های متوالی. (الف) خلاصه تعداد کلون‌های شناسایی شده در هر دسته آزمایش شده که نقص رشد روی زایلوز و/یا آرابینوز را نشان می‌دهند. (ب) سنجش‌های لکه‌گذاری رقت‌های سریالی سوسپانسیون سلولی روی صفحات YNB حاوی قند مشخص شده در غلظت نهایی ۲۰ گرم در لیتر برای نه کلون انتخاب شده. (ج) اندازه‌گیری زایلوز، آرابینوز و اتانول خارج سلولی پس از ۲۴ ساعت در محیط YNB حاوی ۱۶ گرم در لیتر D-گلوکز، ۱۳ گرم در لیتر D-زایلوز و ۱۱ گرم در لیتر L-آرابینوز برای نه کلون انتخاب شده ($n = 2$).

۳.۳. غنی‌سازی در سلول‌هایی که سطوح بالای Rad52 را بیان می‌کنند، ناپایداری ژنومی را افزایش نمی‌دهد.

در مخمر، تغییرات تعداد کپی (CNV) عمدتاً به دلیل رویدادهای HR است (Zhang و همکاران، ۲۰۱۳). انتظار می‌رود این رویدادها زمانی که تراخیته‌ها در چندین کپی وارد می‌شوند یا جایی که پروموتورها و ترمیناتورهای یکسان در کاست‌های بیان مانند HDY.GUF12 وجود دارند، بیشتر رخ دهند (شکل تکمیلی S1) زیرا آنها توالی‌های تکراری را تشکیل می‌دهند و می‌توانند مسئول CNV مشاهده شده باشند (Hastings و همکاران، ۲۰۰۹). قبلاً نشان داده شده است که میزان HR خود به خودی در جمعیت کلونی *S.cerevisiae* با سطح بیان ژن‌های دخیل در فعالیت HR مانند RAD52 همبستگی مثبت دارد (Liu و همکاران، ۲۰۱۹).

برای بررسی اینکه آیا زیرجمعیت‌هایی که RAD52 بیشتری بیان می‌کنند، تغییرات ژنومی بیشتری را انباشته می‌کنند و بنابراین همزمان نقص‌هایی در جذب قند C5 دارند، ما مرتب‌سازی سلولی متوالی را انجام دادیم که شامل غنی‌سازی منظم جمعیت در سلول‌های بیان‌کننده Rad52 بالا یا پایین بود. سلول‌ها به طور متوالی در میکروپلیت‌ها کشت داده شدند و بر اساس بیان Rad52 به لطف ادغام کاست گزارشگر YFP-tdTomato در ۵' در جایگاه اصلی RAD52 مرتب شدند. نه چرخه کشت با مرتب‌سازی متوالی سلول‌های ۱۰٪ سلول‌های با بالاترین بیان Rad52 (Rad52-high) و ۱۰٪ سلول‌های با کمترین بیان Rad52 (Rad52-low) به صورت موازی انجام شد، در حالی که سویه بدون برجسب (WT) بدون مرتب‌سازی سلولی کشت داده شد (شکل A۴؛ شکل تکمیلی S6). این چرخه‌های کشت به ما اجازه داد تا برای هر شرایط به بیش از ۹۰ نسل برسیم (جدول تکمیلی S2) که به ترتیب غنی‌سازی قابل توجهی در سلول‌های با Rad52 بالا و پایین داشتند، همانطور که در پروفایل فلورسانس جمعیت‌ها نشان داده شده است (شکل تکمیلی S7).



شکل ۳

تعداد کپی ژن‌های ترانس ژن دخیل در مصرف آرابینوز در کلون‌های انتخاب شده جدا شده از کشت‌های دسته‌ای. تعداد کپی ژن‌های *araB* (A)، *araT* (B)، *araA* (C) و *araD* (D) با استفاده از qPCR تعیین شد. ژن ACT1 به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شد و داده‌ها با شرایط سویه اولیه (WT (n = 3) نرمال‌سازی شدند.

مصرف قندهای C5 در پایان هر چرخه تعیین شد و هیچ تفاوتی بین سه جمعیت مشاهده نشد (شکل‌های B، C)، که نشان می‌دهد غنی‌سازی در سلول‌های Rad52 بالا منجر به اثرات فنوتیپی قابل مشاهده از نظر مصرف قند نشده است. شایان ذکر است که OD نهایی برای جمعیت‌های Rad52 بالا در مقایسه با جمعیت‌های Rad52 پایین و جمعیت‌های غیر مرتب شده به تدریج کاهش یافت (شکل D؛ جدول تکمیلی S2)، که می‌تواند به دلیل بیان بالای YFP-tdTomato، سطوح بالای بیان Rad52 یا پیامدهای غیرمستقیم این بیان‌های بالای ژن باشد که ممکن است باعث ایجاد برخی بار متابولیکی شود.

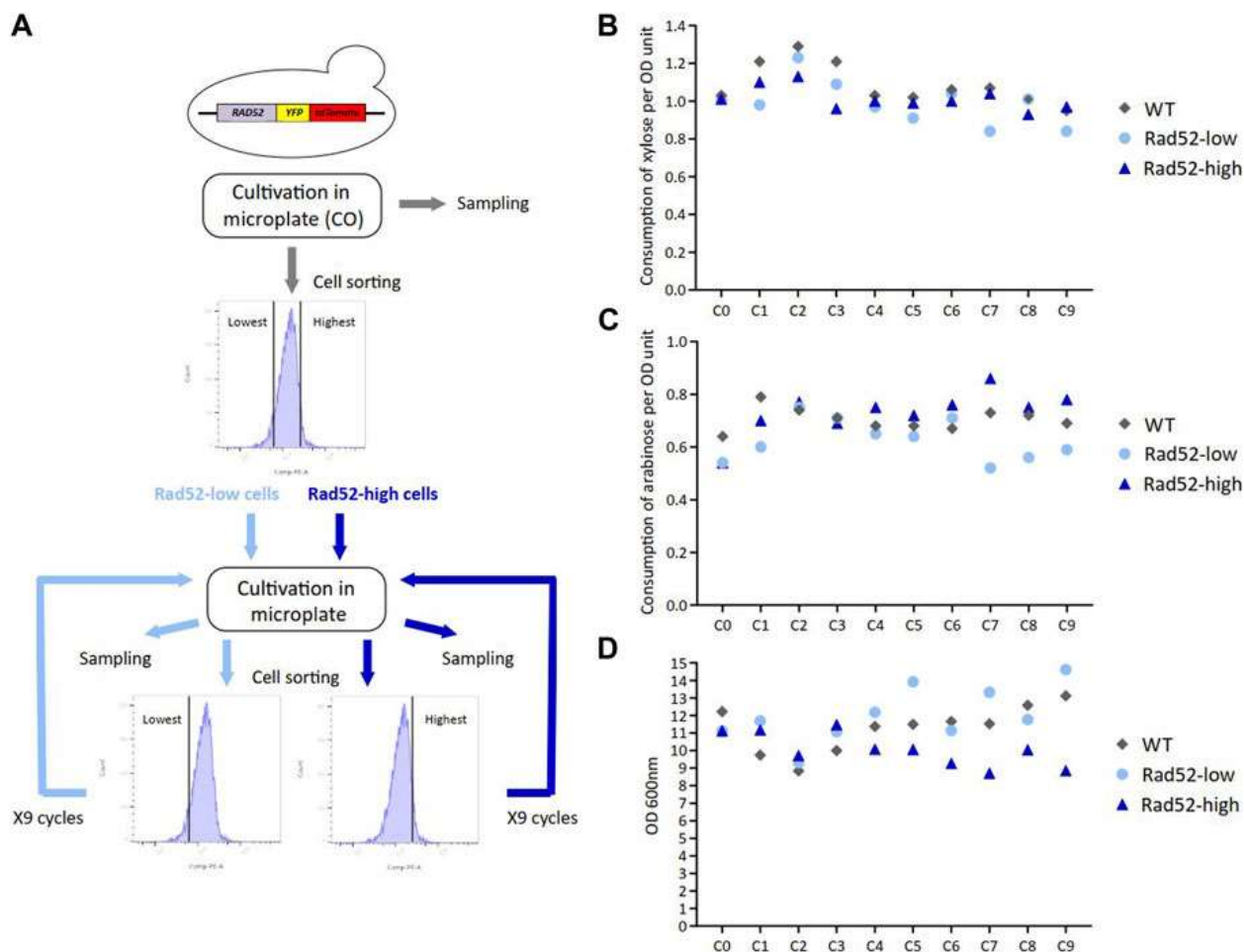
سپس ما این سوال را مطرح کردیم که آیا این غنی‌سازی منجر به ظهور تغییرات ژنومی در جمعیت با Rad52 بالا در طول کشت، علیرغم عدم وجود اثرات فنوتیپی بر مصرف قند، شده است یا خیر. ما توالی‌یابی با خوانش طولانی را روی نمونه‌هایی از چرخه‌های C0 و C9 برای سویه WT و از چرخه‌های C0، C3، C7 و C9 برای کشت‌های Rad52 بالا و Rad52 پایین انجام دادیم. ما هیچ تغییر ژنومی، از جمله در تراخیته‌ها در کشت‌های Rad52 بالا انتخاب شده، مطابق با پایداری در مصرف C5،

شناسایی نکردیم. با این حال، سه مورد کاهش هتروزیگوسیتی (LOH) در سویه WT از کشت C9 در مقایسه با کشت C0 مشاهده شد (جدول تکمیلی S4). این تغییرات ژنتیکی احتمالاً از طریق HR رخ داده و به جمعیت این سویه حمله کرده‌اند.

علاوه بر این، ما دو LOH مربوط به توالی‌های ترانسپوزونی را در جمعیت Rad52-low از کشت‌های C3، C7 و C9 شناسایی کردیم. در نتیجه، ما هیچ غنی‌سازی از تغییرات ژنومی مرتبط با HR را در سلول‌های Rad52-high شناسایی نکردیم، که نشان می‌دهد عوامل دیگری غیر از ناهمگونی در بیان RAD52 مسئول CNVs‌های مشاهده شده در سویه صنعتی WT هستند. از طرف دیگر، جمعیت‌های سلولی به اندازه کافی طولانی یا در شرایط چالش‌برانگیز کافی برای غنی‌سازی رویدادهای ژنومی مرتبط با HR کشت نشده‌اند (Liu و همکاران، ۲۰۱۹). یک کار اخیر از De Mol و همکاران (De Mol و همکاران، ۲۰۲۳) نشان داد که درج چند نسخه‌ای ژن گزارشگر پروتئین فلورسنت فیروزه‌ای تقویت‌شده با مخمر (yECFP) در ژنوم مخمر، تأثیر منفی بر خروجی yECFP داشته است.

آنها این اثر منفی را به تغییر در تعداد کپی‌های این ژن نسبت دادند و اظهار داشتند که HR می‌تواند با ایجاد این بی‌ثباتی ژنتیکی، نقش مهمی در این فرآیند ایفا کند. کار ما هیچ تأثیری از HR بر تعداد کپی ترانس‌ژن‌ها در سویه تولیدکننده، حتی در سلول‌های غنی‌شده با HR بالاتر، نشان نداد، که نشان می‌دهد عوامل دیگری مانند پدیده‌های اپی‌ژنتیکی می‌توانند درجات مختلفی از این کاهش در خروجی را ایجاد کنند، همانطور که توسط همین نویسندگان نیز پیشنهاد شده است (De Mol et al., 2023). جالب توجه است که آزمایش‌های تکامل آزمایشگاهی تطبیقی قبلی در یک سویه نو ترکیب صنعتی S. cerevisiae که برای بهبود استفاده همزمان از زایلوز و آرابینوز مهندسی شده بود، هیچ جهشی در ژن‌های هترولوگ آنزیم‌های تبدیل‌کننده پنتوز در سویه تکامل‌یافته در مقایسه با سویه‌های والدینی آن نشان نداد (Garcia Sanchez et al., 2010).

از سوی دیگر، افزایش فعالیت‌های مشاهده‌شده‌ی زایلوز ردوکتاز و زایلیتول دهیدروژناز این مسیر پنتوز، پیشنهاد شد که ناشی از یک یا چند تکثیر روی ژنوم ژن‌های XYL1 و XYL2 باشد. در مجموع، این نتایج نشان داد که CNV یک مکانیسم رایج برای تنظیم فعالیت‌های این مسیرهای هترولوگ است.



شکل ۴

کشت‌های متوالی زیرجمعیت‌های غنی‌شده با سلول‌های بیان‌کننده‌ی Rad52 بالا یا پایین. گردش کار تجربی مرتب‌سازی متوالی سلول‌ها بر اساس سطح بیان Rad52 و کشت‌ها در آزمایش میکروپلیت. نمونه‌ها در پایان هر چرخه برای تجزیه و تحلیل بعدی جمع‌آوری شدند. (A). تعیین مقدار زایلوز خارج سلولی (B)، آرابینوز (C) و OD (D) از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده در پایان هر چرخه.

۴- نتیجه‌گیری

این کار به بررسی پایداری ژنتیکی و متابولیکی یک سویه مخمر صنعتی که به صورت متابولیکی برای تخمیر همزمان قند C5 با گلوکز تحت تنظیم دسته‌ای تخمیر متوالی مهندسی شده است و زمان و تعداد نسل مورد نیاز برای یک فرآیند تولید صنعتی را شبیه‌سازی می‌کند، اختصاص داده شده است. نتایج ما دو بینش را آشکار می‌کند که می‌تواند عملکرد تخمیر طولانی مدت سویه صنعتی را تحت تأثیر قرار دهد. اولاً، جذب D-زایلوز و L-آرابینوز از نسل پنجاهم به بعد نوسانات قابل توجهی را نشان داد و این نوسان، که بعید است منشأ ژنتیکی داشته باشد، می‌تواند منجر به از دست دادن عملکرد در درازمدت شود. ثانیاً، از دست دادن یا کاهش مصرف قند C5 از تعداد سلول‌های موجود در جمعیت انبوه کشف شده است. این رویداد فنوتیپی با تغییرات تعداد کپی در ترانس ژن‌های دخیل در جذب قند C5 مرتبط بود.

اگرچه در این کار، ناپایداری‌های ژنتیکی و متابولیکی بسیار کمی را گزارش می‌کنیم که بر قدرت تخمیری سویه مخمر تأثیری نداشته است، اما نمی‌توان این احتمال را رد کرد که این ناپایداری‌ها در شرایط تولید صنعتی تشدید شده و در نهایت منجر به از دست رفتن این قدرت شوند. بنابراین، ابزارهای خاصی که برای ارزیابی این تغییرات طراحی شده‌اند، باید در یک زمینه صنعتی مرتبط باشند، همراه با روش‌هایی که امکان از بین بردن ناپایداری ژنتیکی پایه را فراهم می‌کنند تا از قدرت و عملکرد سویه در درازمدت اطمینان حاصل شود.

منابع

1. Capp, J. P. (2010). Noise-driven heterogeneity in the rate of genetic-variant generation as a basis for evolvability. *Genetics* 185, 395–404. Doi: 10.1534/genetics. 110.118190
2. Capp, J. P. (2021). Interplay between genetic, epigenetic, and gene expression variability: considering complexity in evolvability. *Evol. Appl.* 14, 893–901. Doi: 10.1111/eva.13204
3. D'ambrosio, V., Dore, E., Di Blasi, R., Van Den Broek, M., Sudarsan, S., Horst, J. T., et al. (2020). Regulatory control circuits for stabilizing long-term anabolic product formation in yeast. *Metab. Eng.* 61, 369–380. doi:10.1016/j.ymben.2020.07.006
4. Delvigne, F., Zune, Q., Lara, A. R., Al-Soud, W., and Sorensen, S. J. (2014). Metabolic variability in bioprocessing: implications of microbial phenotypic heterogeneity. *Trends Biotechnol.* 32, 608–616. doi:10.1016/j.tibtech.2014.10.002
5. Demeke, M. M., Dietz, H., Li, Y., Foulquié-Moreno, M. R., Mutturi, S., Deprez, S., et al. (2013). Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. *Biotechnol. Biofuels* 6, 89.
6. De Mol, M. L., Marcoen, V., Maryns, I., Snoeck, N., Beauprez, J. J., De Maeseneire, S. L., et al. (2023). Evaluation of long-term fermentation performance with engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Fermentation* 9, 721. doi:10.3390/fermentation9080721
7. Dietz, H. (2013). Konstruktion und Charakterisierung von pentosefermentierenden Industriehefestämmen. PhD. Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
8. Francois, J. M., Alkim, C., and Morin, N. (2020). Engineering microbial pathways for production of bio-based chemicals from lignocellulosic sugars: current status and perspectives. *Biotechnol. Biofuels* 13, 118. doi:10.1186/s13068-020-01744-6
9. Garcia Sanchez, R., Karhumaa, K., Fonseca, C., Sánchez Nogué, V., Almeida, J. R., Larsson, C. U., et al. (2010). Improved xylose and arabinose utilization by an industrial recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain using evolutionary engineering. *Biotechnol. Biofuels* 3, 13. doi:10.1186/1754-6834-3-13
10. Generoso, W. C., Brinek, M., Dietz, H., Oreb, M., and Boles, E. (2017). Secretion of 2, 3-dihydroxyisovalerate as a limiting factor for isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 17. doi:10.1093/femsyr/fox029
11. Hastings, P. J., Lupski, J. R., Rosenberg, S. M., and Ira, G. (2009). Mechanisms of change in gene copy number. *Nat. Rev. Genet.* 10, 551–564. doi:10.1038/nrg2593
12. Heieck, K., Arnold, N. D., and Bruck, T. B. (2023). Metabolic stress constrains microbial L-cysteine production in *Escherichia coli* by accelerating transposition
13. Through mobile genetic elements. *Microb. Cell Fact.* 22, 10. doi:10.1186/s12934-023-02021-5

14. Jacobus, A. P., Gross, J., Evans, J. H., Ceccato-Antonini, S. R., and Gombert, A. K. (2021). *Saccharomyces cerevisiae* strains used industrially for bioethanol production. *Essays Biochem.* 65, 147–161. doi:10.1042/ebc20200160
15. Laughery, M. F., Hunter, T., Brown, A., Hoopes, J., Ostbye, T., Shumaker, T., et al. (2015). New vectors for simple and streamlined CRISPR-Cas9 genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 32, 711–720. doi:10.1002/yea.3098
16. Lee, S. W., Rugbjerg, P., and Sommer, M. O. A. (2021). Exploring selective pressure trade-offs for synthetic addiction to extend metabolite productive lifetimes in yeast. *ACS Synth. Biol.* 10, 2842–2849. doi:10.1021/acssynbio.1c00240
17. Liu, J., Francois, J. M., and Capp, J. P. (2019). Gene expression noise produces cell-to-cell heterogeneity in eukaryotic homologous recombination rate. *Front. Genet.* 10, 475. doi:10.3389/fgene.2019.00475
18. Lv, Y., Gu, Y., Xu, J., Zhou, J., and Xu, P. (2020). Coupling metabolic addiction with negative autoregulation to improve strain stability and pathway yield. *Metab. Eng.* 61, 79–88. doi:10.1016/j.ymben.2020.05.005
19. Mu, X., and Zhang, F. (2023). Diverse mechanisms of bioproduction heterogeneity in fermentation and their control strategies. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 50, kuad033. doi:10.1093/jimb/kuad033
20. Olsson, L., Rugbjerg, P., Torello Pianale, L., and Trivellin, C. (2022). Robustness: linking strain design to viable bioprocesses. *Trends Biotechnol.* 40, 918–931. Doi: 10.1016/j.tibtech.2022.01.004
21. Rugbjerg, P., Myling-Petersen, N., Porse, A., Sarup-Lytzen, K., and Sommer, M. O. A. (2018). Diverse genetic error modes constrain large-scale bio-based production. *Nat. Commun.* 9, 787. doi:10.1038/s41467-018-03232-w
22. Rugbjerg, P., and Sommer, M. O. A. (2019). Overcoming genetic heterogeneity in industrial fermentations. *Nat. Biotechnol.* 37, 869–876. doi:10.1038/s41587-019-0171-6
23. Ryan, O. W., Poddar, S., and Cate, J. H. (2016). CRISPR-Cas9 genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016, prot086827. doi:10.1101/pdb.prot086827
24. Schreiber, F., and Ackermann, M. (2020). Environmental drivers of metabolic heterogeneity in clonal microbial populations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 62, 202–211. doi:10.1016/j.copbio.2019.11.018
25. Shirvani, R., Barshan-tashnizi, M., and Shahali, M. (2020). An investigation into gene copy number determination in transgenic yeast; the importance of selecting a reliable real-time PCR standard. *Biologicals* 65, 10–17. doi:10.1016/j.biologicals.2020.04.001
26. Solis-Escalante, D., Kuijpers, N. G., Bongaerts, N., Bolat, I., Bosman, L., Pronk, J. T., et al. (2013). amdSYM, a new dominant recyclable marker cassette for *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 13, 126–139. Doi: 10.1111/1567-1364.12024
28. Takhaveev, V., and Heinemann, M. (2018). Metabolic heterogeneity in clonal microbial populations. *Curr. Opin. Microbiol.* 45, 30–38. doi:10.1016/j.mib.2018.02.004
29. Uphoff, S., Lord, N. D., Okumus, B., Potvin-Trottier, L., Sherratt, D. J., and Paulsson, J. (2016). Stochastic activation of a DNA damage response causes cell-to-cell mutation rate variation. *Science* 351, 1094–1097. Doi: 10.1126/science.aac9786
30. Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A., and Van Dijken, J. P. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the

- regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* 8, 501–517. Doi: 10.1002/yea.320080703
31. Xiao, Y., Bowen, C. H., Liu, D., and Zhang, F. (2016). Exploiting nongenetic cell-to-cell variation for enhanced biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* 12, 339–344. doi:10.1038/nchembio.2046
32. Zhang, H., Zeidler, A. F., Song, W., Puccia, C. M., Malc, E., Greenwell, P. W., et al. (2013). Gene copy-number variation in haploid and diploid strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 193, 785–801. doi:10.1534/genetics.112.146522