مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۵، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱

ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

جهش‌زایی توسط نیتروزوگوانیدین و اشعه ماوراء بنفش برای افزایش تولید کوآنزیم Q_{10} توسط *زیمومونـاس موبیلیس*

نوع مقاله: پژوهشی

فوزیه مقدمی[1*]، لیلا شکرزاده[2]

۱- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲- استادیار گروه زیست شناسی، موسسه آموزش عالی غیردولتی غیرانتفاعی شاندیز، مشهد، ایران

fmoghadami@pnu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۰۷، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۳۱

صفحه ۳۰-۱۵

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی افزایش تولید کوآنزیم Q_{10} توسط *زیمومونـاس موبیلیس* بر اثـر ایجـاد جهـش انجـام شد. جهت ایجاد جهش ابتدا با استفاده از نیتروزوگوانیدین و اشعه ماوراء بنفش منحنی زنـده‌مانی ترسـیم شـد. سـپس جهش با استفاده از غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر نیتروزوگوانیدین و زمان ۶۰ ثانیه قرارگیری در مقابـل اشـعه انجـام شـد. تشخیص سویه‌های جهش‌یافته از طریق قابلیت رشد در محیط حاوی ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر منـادیون انجـام شـد. سپس سویه‌های جهش‌یافته از لحاظ تولید کوآنزیم Q_{10} مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشـان داد کـه میـزان کـوآنزیم Q_{10} که توسط *زیمومونـاس موبیلیس* تولید شد ۸/۴ میلی‌گرم بر لیتر و وزن خشک سلولی آن ۳/۱ گرم بـر لیتـر بـود. از میان ۱۴۲ سویه جهش‌یافته، ۱۶ سویه به‌طور تصادفی انتخاب شدند. بیشـترین میـزان کـوآنزیم Q_{10} توسـط سـویه U7 تولید شد، ۱۱/۹ میلی‌گرم بر لیتر که ۱/۴ برابر بیش از سویه والد بود. طبق نتایج این پژوهش، می‌توان بیان کـرد کـه بـا القای جهش می‌توان در باکتری *زیمومونـاس موبیلیس*، سویه‌های جهش‌یافته‌ای را ایجاد کرد که قادر به تولیـد کـوآنزیم Q_{10} بیشتری نسبت به سویه والد باشند.

واژه‌های کلیدی: جهش، *زیمومونـاس*، کوآنزیم Q_{10}، ماوراء بنفش، نیتروزوگوانیدین.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

مقدمه

زیموموناس موبیلیس یک باکتری گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، غیر اسپورزا، تاژک‌دار قطبی و میله‌ای شکل است و تنها گونه‌ای است که در جنس *زیموموناس* یافت می‌شود. این باکتری بیشتر برای تولید اتانول مورد توجه است. به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد، این باکتری به‌عنوان یک گزینه بسیار امیدوارکننده برای تولید سوخت‌های زیستی از مواد اولیه تجدید پذیر شناخته شده است (Yang et al. 2016). در واقع، تولید اتانول سلولزی با استفاده از *زیموموناس موبیلیس* در حال حاضر در مقیاس تجاری اجرا شده است. تحمل این باکتری در برابر اتانول به دلیل ایجاد ساختارهای بیوفیلمی نیز قابل توجه است (Roger et al. 2007).

علاوه‌بر اتانول، این باکتری جهت تولید پلیمر لوان، سوربیتول، اسید گلوکونیک و ۲-۳ بوتاندیول نیز در صنعت مورد توجه است. به‌طور کلی *زیموموناس موبیلیس* به‌عنوان یک باکتری ایمن (GRAS) در نظر گرفته می‌شود (Penesar et al. 2006). *زیموموناس موبیلیس* فقط می‌تواند بر روی گلوکز، فروکتوز و ساکارز رشد کند. در زنجیره انتقال الکترون در این باکتری کوآنزیم Q_{10} وجود دارد که عمل انتقال الکترون‌ها به اکسیداز نهایی را انجام می‌دهد (Zheng et al. 2014). کوآنزیم Q یا یوبی‌کینون یک مولکول محلول در چربی است که در بخش آبگریز فسفولیپید دو لایه غشا قرار گرفته است. کوآنزیم Q از دو بخش عمده سر و دم ساخته شده است. سر، شامل یک هسته کوئینونی و دم، شامل زنجیره ایزوپرنوئیدی متشکل از چندین واحد ایزوپرن است. کوآنزیم Q دارای انواع مختلفی است که متأثر از تعداد واحدهای ایزوپرن در زنجیره ایزوپرونوئیدی است (Cluis et al. 2007).

کوآنزیم Q_{10} در ۱۹۵۷ همزمان توسط دو گروه تحقیقاتی کشف شد و با دو نام کوآنزیم Q_{10} و یوبی‌کینون نامگذاری شد. رایج ترین نوع کوآنزیم Q که در میتوکندری انسان نیز وجود دارد کوآنزیم Q_{10} است دارای ۱۰ ایزوپرن در زنجیره ایزوپرنوئیدی است. از اینرو میکروارگانیسم‌های حاوی کوآنزیم Q_{10} مورد توجه قرار گرفته‌اند (Choi et al. 2005). تولید کوآنزیم Q_{10} در حال حاضر به‌طور عمده به سه روش سنتز شیمیایی، سنتز نیمه شیمیایی (استخراج از گیاهان و اصلاح ساختار) و فرآیند تخمیر میکروبی انجام می‌شود ولی از آنجایی‌که این مولکول از پیچیدگی ساختاری خاصی برخوردار بوده و مسیر بیوسنتز آن نیز پیچیده است، هزینه سنتز شیمیایی و نیمه شیمیایی آن بالا است و از طرفی ایزومر نوری هم تولید می‌شود. بنابراین فرآیند تخمیر میکروبی به دلیل ارزانتر بودن و عدم تولید ایزومر نوری بیشتر مورد توجه است (Cluis et al. 2012). مطالعات

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

نشان داده است که باکتری‌ها هم می‌توانند منابع خوبی جهت تولید کوآنزیم Q_{10} باشند. مطالعات فراوانی بر روی طیف وسیعی از باکتری‌های مولد کوآنزیم Q_{10} جهت تولید هرچه بیشتر انجام گرفته است که برخی از آنها نیز برای تولید صنعتی امیدوارکننده بوده‌اند (Ndikubwimana et al. 2014).

ایجاد جهش شیمیایی در باکتری‌ها جهت افزایش تولید کوآنزیم Q_{10} یکی از راهکارهای موفق برای بهبود و توسعه سویه است. جهت ایجاد جهش در باکتری‌ها، روش‌های مختلفی تاکنون به کار رفته است؛ استفاده از اشعه ماوراءبنفش ، اشعه گاما، پرتوافکنی یون‌های کم انرژی با یون‌های نیتروژن و استفاده از مواد شیمیایی (Najafi et al. 2013). با کمک جهش در سویه‌های تولید کننده، تاکنون دستاوردهای خوبی به دست آمده است. به‌طوری‌که با کمک این روش، تولید کوآنزیم Q10 توسط برخی از باکتری‌ها تا چند برابر افزایش یافته است (Yuan et al. 2012).

تولید کوآنزیم Q_{10} تاکنون توسط باکتری‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. ولی در مورد تولید کوآنزیم Q_{10} توسط باکتری *زیموموناس* پژوهش‌های اندکی موجود است (Jeya et al. 2010; Moghadami 2019). این پژوهش میزان تولید کوآنزیم Q_{10} را توسط *زیموموناس موبیلیس* مورد ارزیابی قرار داد و سپس تولید کوآنزیم Q_{10} ،از طریق ایجاد جهش شیمیایی با استفاده از نیتروزوگوانیدین و ایجاد جهش فیزیکی با استفاده از اشعه ماوراءبنفش مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم و محیط‌های کشت

در این پژوهش از سویه استاندارد *Zymomonas Mobilis* PTCC 1718 خریداری شده از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی استفاده شد.

به‌عنوان محیط پیش کشت و محیط کشت تولید، از RM براث حاوی ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۱۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۲ گرم بر لیتر پتاسیم دی هیدروژن فسفات با pH برابر ۸/۵ استفاده شد. پس از تلقیح، فلاسک‌ها به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه در انکوباتور نگهداری شدند (Todhanakasem et al. 2019). کوآنزیم Q_{10} بعد از ۲۰ ساعت استخراج شد.

جهش‌زایی با نیتروزوگوانیدین

جهت ایجاد جهش از ماده جهش‌زای نیتروزوگوانیدین استفاده شد. به این منظور سلول‌های باکتری با غلظت نیم مک فارلند در ۱۰ میلی‌لیتر بافر جهش‌زایی (۱۲۵ میلی‌گرم پتاسیم

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

دی هیدروژن فسفات، ۱۲۲ میلی‌گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۴۲ میلی‌گرم سولفات منیزیوم ۷ آب، ۶ میلی‌گرم کلرید کلسیم، ۴۸/۰ میلی‌گرم کلرید آهن، ۶/۰ میلی‌گرم کلرید منگنز، ۲/۰ میلی‌گرم مولیبدات سدیم، ۱۳۴ میلی‌گرم کلرید آمونیوم و ۱ لیتر آب مقطر با pH برابر با (۵/۶)، سوسپانسیون شدند. سپس غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر لیتر از نیتروزوگوانیدین به لوله حاوی سوسپانسیون اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. واکنش به وسیله رقیق کردن سوسپانسیون به نسبت ۱:۱۰ با آب متوقف شد. بعد از این مرحله، دو بار شستشو با بافر جهش انجام و در نهایت رسوب باکتری دوباره در ۱۰ میلی‌لیتر بافر جهش‌زایی، سوسپانسیون شد. ۱/۰ میلی‌لیتر از لوله‌ها به پلیت GYC (گلوکز ۵۰ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۱۰ گرم بر لیتر، کربنات کلسیم ۳۰ گرم بر لیتر و آگار ۲۵ گرم بر لیتر) منتقل شده و کشت چمنی داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۹۶ ساعت گرماگذاری شدند و برای رشد کلنی‌ها هر روز مورد بررسی قرار گرفتند. بعد از شمارش کلنی‌ها تعداد سلول‌های زنده بر حسب CFU/ml به دست آمد. قابل ذکر است که به دلیل غلظت بالای باکتری در سوسپانسیون‌ها، جهت شمارش دقیق از روش سری رقت یا رقت سازی استفاده شد.

غربالگری سویه‌های جهش‌یافته

پس از انجام جهش‌زایی با نیتروزوگوانیدین، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون به لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت پیش کشت که حاوی ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از منادیون بود، اضافه شد. منادیون آنالوگ ساختاری کوانزیم Q_{10} است. لوله‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. سپس ۱/۰ میلی‌لیتر از محتوای لوله‌ها به پلیت‌های نوترین اگار منتقل و کشت داده شد. بعد از ۷۲ ساعت، پلیت‌ها جهت رشد انواع جهش‌یافته مورد بررسی قرار گرفتند. کلنی‌هایی که قادر به رشد در پلیت‌ها بودند به‌عنوان جهش‌یافته مناسب انتخاب شدند و تولید کوآنزیم Q_{10} در آنها مورد بررسی قرار گرفت (Yoshida et al. 1998).

جهش‌زایی با اشعه ماوراء بنفش و غربالگری سویه‌های جهش‌یافته

جهت ایجاد جهش با استفاده از اشعه ماوراء بنفش، ۱/۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی باکتری با غلظت نیم مک فارلند بر روی پلیت‌های حاوی RM آگار حاوی ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از منادیون کشت داده شد. پلیت‌ها زیر لامپ اشعه ماوراء بنفش ۳۰ وات ساخت شرکت فیلیپس با طول موج ۲۸۰ نانومتر و در زمان‌های مختلف ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، و ۶۰ ثانیه با فاصله ۲۰ سانتی‌متری قرار داده شدند. پس از زمان‌های

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

تعیین شده درب پلیت‌ها گذاشته شد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. کلنی‌های تشکیل شده بر سطح پلیت‌ها، مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج و سنجش کوآنزیم Q_{10}

جهت استخراج کوآنزیم Q_{10} پس از جداسازی سلول‌ها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، ۴۵۰ میکرولیتر از محلول لیزکننده سلولی cell lytic B (سیگما-آلدریچ) افزوده شد. سپس ۹۰۰ میکرولیتر از حلال هگزان- ۲پروپانول با نسبت ۵-۳ به پلت حاصل از سانتریفوژ افزوده و پس از سانتریفوژ، بخش بالایی حاوی کوآنزیم Q_{10} به تیوب‌های تمیز منتقل شد. جهت سنجش کوآنزیم Q_{10}، از دستگاه HPLC (Agilent 1120, USA) استفاده شد. ستون مورد استفاده Thermo scientist C18 (250 mm× 4.5 mm× 5 µm) متصل شده به شناساگر ماوراءبنفش بود و فاز متحرک اتانول: متانول (۷۰: ۳۰) با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. کوآنزیم Q_{10} در طول موج ۲۷۵ نانومتر شناسایی شد.

منحنی استاندارد کوآنزیم Q_{10}

جهت رسم منحنی استاندارد یا منحنی کالیبراسیون کوآنزیم Q_{10} از کوآنزیم Q_{10} استاندارد استفاده شد که از شرکت Sigma Aldrich خریداری شد. مقدار ۸۰۰ میکروگرم از آن توزین شده و به آن ۱ میلی‌لیتر اتانول HPLC-grade افزوده شد. رقت این نمونه ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. پس از حل شدن کامل کوآنزیم Q_{10} در اتانول، رقت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر از آن تهیه شد و از هر رقت ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق شد. با استفاده از اعداد سطوح زیر پیک نسبت به رقت، منحنی استاندارد کوآنزیم Q10 رسم شد.

تعیین وزن خشک سلولی و ظرفیت ویژه تولید کوآنزیم Q_{10}

همزمان با استخراج کوآنزیم Q_{10}، یک میلی‌لیتر از محیط کشت را نیز جهت تعیین وزن خشک سلولی با سرعت دور در دقیقه ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ کرده تا سلول‌ها جدا شوند. پس از شستشو، سلول‌ها درون آون با دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند.

ظرفیت ویژه تولید کوآنزیم Q_{10}

ظرفیت ویژه تولید، مقدار کوآنزیم Q_{10} را در هر گرم از وزن خشک سلولی نشان می‌دهد. در واقع، ظرفیت ویژه کوآنزیم Q_{10} از تقسیم مقدار کوآنزیم Q_{10} بر وزن خشک سلولی به دست می‌آید.

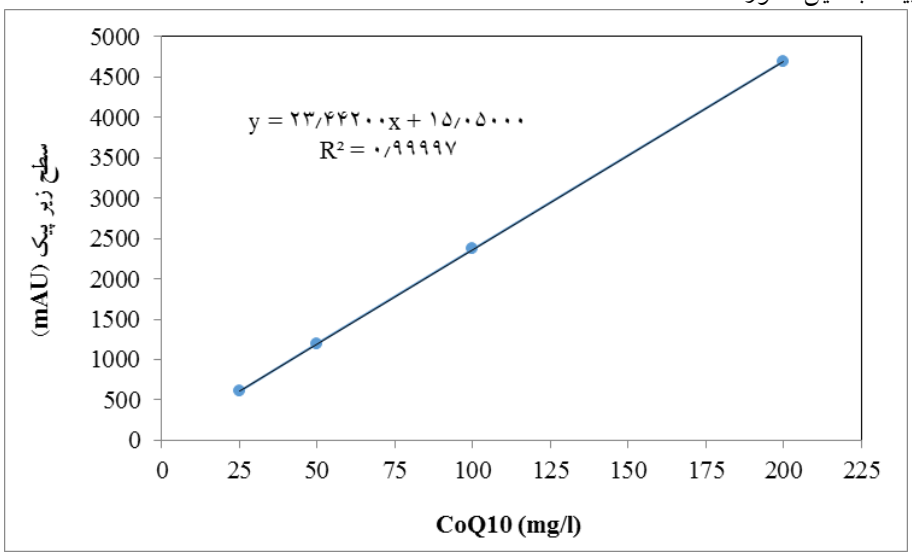
نتایج

منحنی استاندارد کوآنزیم Q_{10} در آنالیز HPLC: با استفاده از اعداد سطوح زیر پیک نسبت به غلظت کوآنزیم Q_{10}، منحنی استاندارد کوآنزیم Q_{10} رسم شد (شکل ۱).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

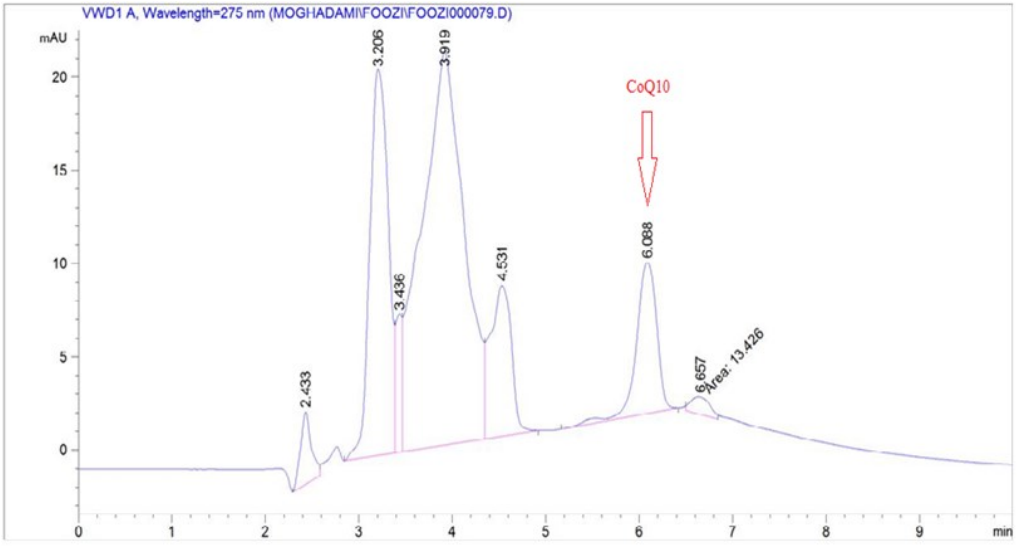
معادلـه سـطح کـوآنزیم Q_{10} (mg/l) نسـبت بـه $y = 23.44x + 15.05$

سطح زیر پیک به این صورت است:



شکل ۱- منحنی استاندارد کوآنزیم Q_{10} در آنالیز HPLC

سنجش کوآنزیم Q_{10}: شناسایی کوآنزیم Q_{10} به وسیله دستگاه HPLC و در طول موج ۲۷۵ نانومتر انجام شد. شکل ۲ کروماتوگرام آنالیز HPLC برای کـوآنزیم Q_{10} تولیـد شـده توسـط *زیمومونـاس موبیلیس* را نشان می‌دهد. همانطوری‌که در شـکل مشـاهده می‌شـود پیـک کـوآنزیم Q_{10} در زمـان بازداری ۶ دقیقه ترسیم شده است.

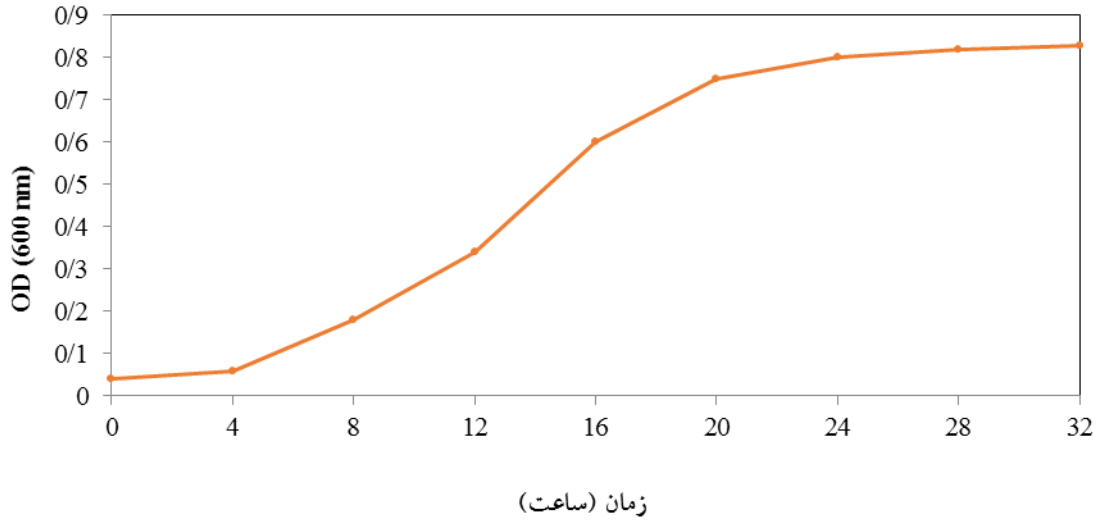


شکل ۲- کروماتوگرام آنالیز HPLC برای کوآنزیم Q_{10} تولید شده در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و pH= ۵/۸ توسط *زیمومونـاس موبیلیس*. پیک موجود در زمان بازداری ۶ دقیقه نشان‌دهنده کوآنزیم Q_{10} است.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

تولید کوآنزیم Q_{10} در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت با pH برابر ۵/۸ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. کوآنزیم Q_{10} بعد از ۲۰ ساعت در ابتدای فاز سکون استخراج شد. پس از ترسیم منحنی استاندارد کوآنزیم Q_{10}، میزان تولید کوآنزیم Q_{10} توسط *زیموموناس موبیلیس* به دست آمد.

میزان کوآنزیم Q_{10} که توسط *زیموموناس موبیلیس* تولید شد ۸/۴ میلی‌گرم بر لیتر و وزن خشک سلولی ۳/۱ گرم بر لیتر بود. در نتیجه ظرفیت ویژه تولید ۲/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک به دست آمد. تولید کوآنزیم Q_{10} توسط *زیموموناس موبیلیس* (۸/۴ میلی‌گرم بر لیتر) به‌عنوان مقدار تولید شده توسط سویه والد، جهت مقایسه مقدار تولید توسط سویه‌های جهش‌یافته استفاده شد. *زیموموناس موبیلیس* در محیط کشت تولید، در مدت ۲۰ ساعت به فاز سکون رسید (شکل ۳) ازاینرو، ۲۰ ساعت پس از تلقیح، کوآنزیم Q_{10} استخراج شد.

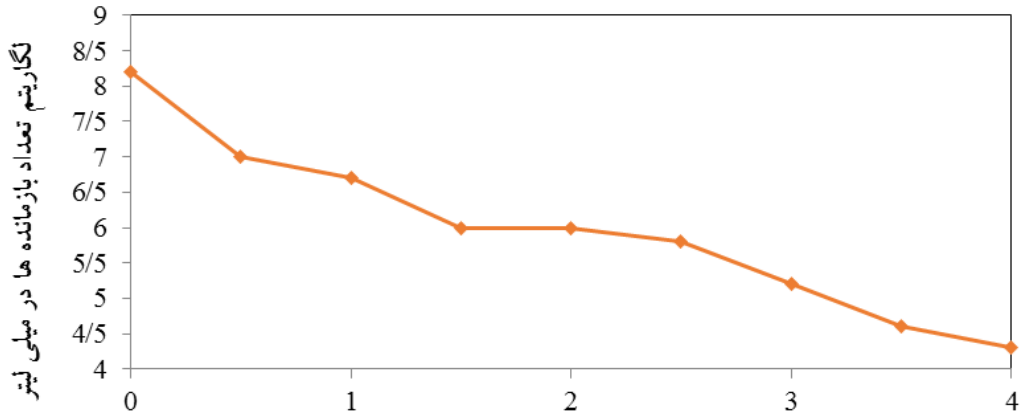


شکل ۳- منحنی رشد *زیموموناس موبیلیس* در فلاسک ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی گلوکز به‌عنوان منبع کربن و عصاره مخمر به‌عنوان منبع نیتروژن. pH اولیه محیط برابر ۵/۸، دمای گرماگذاری ۳۰ درجه سلسیوس و طول مدت کشت ۴۰ ساعت.

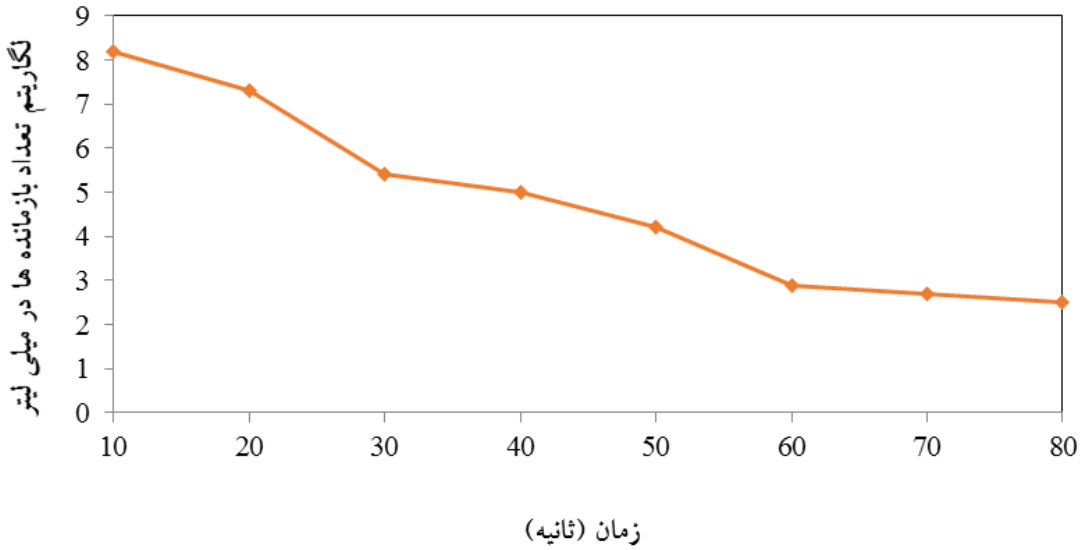
منحنی زنده‌مانی زیموموناس موبیلیس: برای ایجاد جهش در ابتدا منحنی زنده‌مانی *زیموموناس موبیلیس* رسم شد. روند زنده‌مانی یا به عبارت دیگر، روند مرگ و میر *زیموموناس موبیلیس* در شکل ۴ و ۵ به ترتیب در مقابل غلظت‌های مختلف نیتروزوگوانیدین و زمان‌های مختلف اشعه ماورابنفش دیده می‌شود. همانطوری‌که در شکل‌ها قابل مشاهده است، ۹۹/۹۹ درصد باکتری‌ها در حضور غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نیتروزوگوانیدین و قرار گرفتن در مقابل اشعه

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

ماورابنفش در مدت زمان ۶۰ ثانیه از بین می‌روند. بنـابراین غلظـت ۳ میلی‌گـرم بـر میلی‌لیتـر از نیتروزوگوانیدین و مدت زمان ۶۰ ثانیه در مقابـل اشعه ماورابنفش برای انجام جهش انتخاب شد.



شکل ۴- منحنی زنده‌مانی *زیمومونـاس موبیلیس* در حضور غلظت‌های مختلف نیتروزوگوانیدین در مدت ۳۰ دقیقه

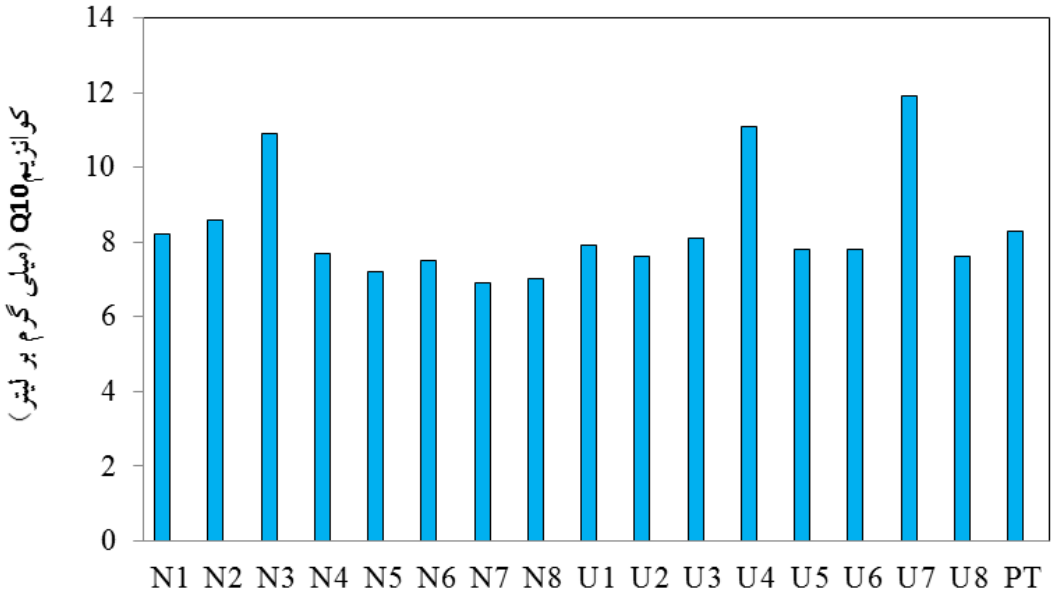


شکل ۵- منحنی زنده‌مانی *زیمومونـاس موبیلیس* در اثر اشعه ماوراءبنفش

انتخاب جهش‌یافته مناسب: با انجام جهـش بـا غلظت ۳ میلی‌گرم از نیتروزوگوانیدین و قرارگیری به مدت ۶۰ ثانیه در مقابـل اشـعه مـاورابنفش بـر روی *زیمومونـاس موبیلیس*، ۱۴۲ کلنی جهش‌یافته شامل ۹۹ کلنی در اثر تابش اشعه ماورابنفش و ۴۳ کلنی بر اثر تیمار با نیتروزوگوانیدین به دست آمد. به دلیل تعداد زیاد کلنی‌هـای جهش‌یافتـه، امکـان بررسی تولید کوآنزیم Q_{10} در تک تک آنها وجـود

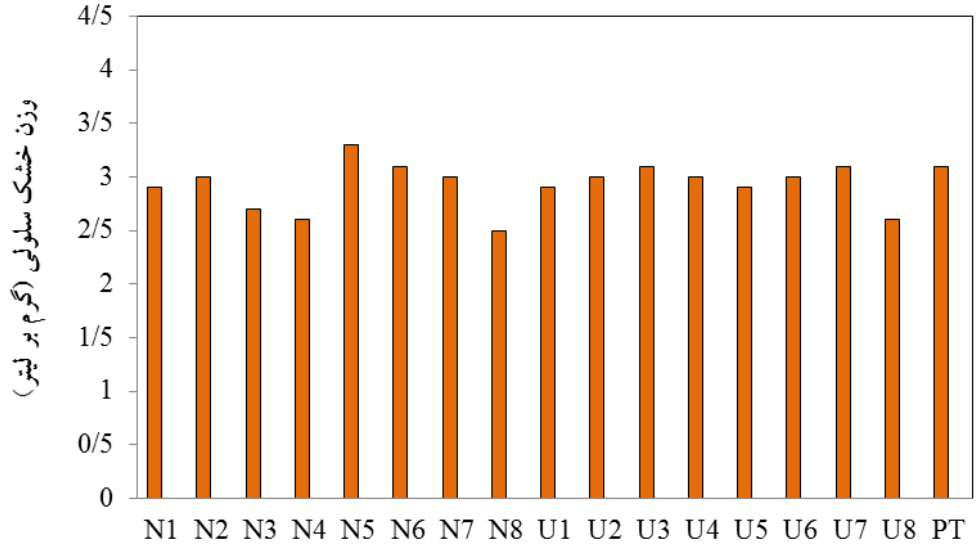
[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

نداشت. از اینرو ۱۶ سویه به‌صورت تصادفی انتخاب شدند. ۸ سویه جهش‌یافته بر اثر تیمار با نیتروزوگوانیدین که N1 تا N8 و ۸ سویه جهش‌یافته بر اثر تابش اشعه ماوراء بنفش که U1 تا U8 نام گرفتند. سپس تولید کوآنزیم Q_{10} و وزن خشک سلولی توسط آنها سنجیده شد. شکل ۵ میزان کوآنزیم Q_{10} تولید شده توسط ۱۶ سویه جهش‌یافته و شکل ۶ وزن خشک سلولی سویه‌های جهش‌یافته را نشان می‌دهند. همانطوری‌که در شکل ۵ قابل مشاهده است مقادیر کوآنزیم Q_{10} تولید شده توسط سویه‌های جهش‌یافته تفاوت چندانی با سویه والد ندارند و فقط ۳ سویه قادر به تولید مقدار بیشتری از کوآنزیم Q_{10} نسبت به سویه والد بودند (سویه‌های N3، U4 و U7). بیشترین میزان کوآنزیم Q_{10} توسط سویه U7 تولید شد که برابر با ۱۱/۹ میلی‌گرم بر لیتر بود. وزن خشک سلولی در همه سویه‌ها کم و بیش برابر با سویه والد بود. تنها سویه N5 بیشتر از سایرین قادر به تولید ۳/۳ گرم در لیتر وزن خشک سلولی بود. شکل ۷ ظرفیت ویژه تولید کوآنزیم Q_{10} توسط سویه‌های جهش‌یافته را نشان می‌دهد. با توجه به شکل بیشترین ظرفیت تولید در سویه‌های N3، U4 و U7 قابل مشاهده است.

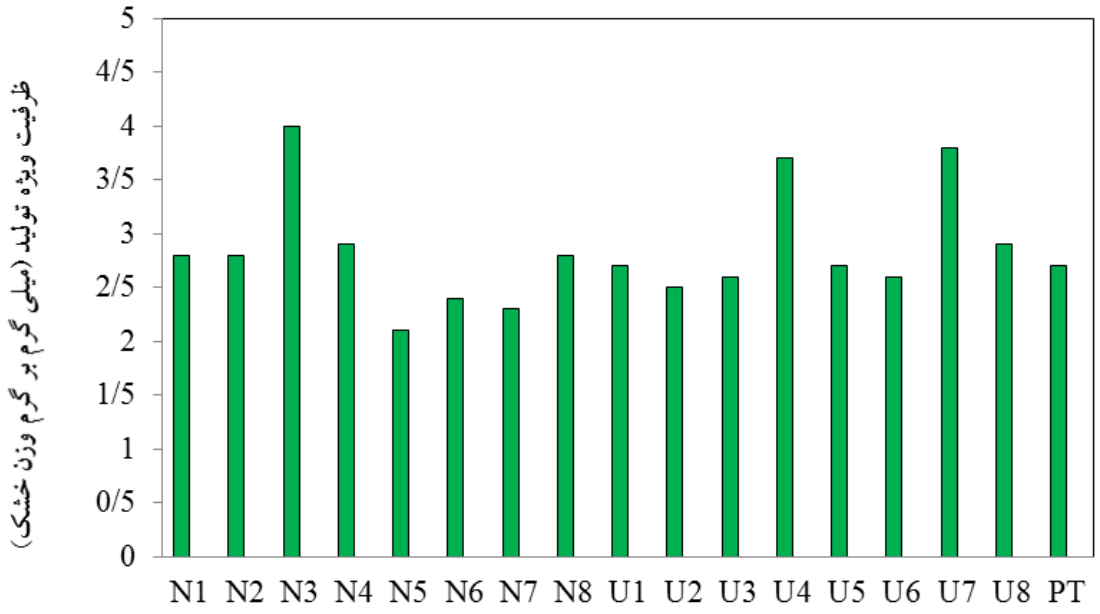


شکل ۵- میزان کوآنزیم Q10 تولید شده توسط سویه‌های جهش‌یافته. جهش‌یافته‌های N1 تا N8 بر اثر تیمار با نیتروزوگوانیدین و U1 تا U8 بر اثر تابش اشعه ماوراء بنفش ایجاد شدند. PT سویه والد.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]



شکل ۶- میزان وزن خشک سلولی تولید شده توسط سویه‌های جهش‌یافته. جهش‌یافته‌های N1 تا N8 بر اثر تیمار با نیتروزوگوانیدین و U1 تا U8 بر اثر تابش اشعه ماوراء بنفش ایجاد شدند. PT سویه والد.



شکل ۷- ظرفیت ویژه تولید کوآنزیم Q_{10} توسط سویه‌های جهش‌یافته. جهش‌یافته‌های N1 تا N8 بر اثر تیمار با نیتروزوگوانیدین و U1 تا U8 بر اثر تابش اشعه ماوراء بنفش ایجاد شدند. PT سویه والد.

پایداری سویه‌های جهش‌یافته: همه ۱۶ سویه جهش‌یافته در فریزر ۳۰- درجه سلسیوس ذخیره‌سازی شدند. پس از ذخیره‌سازی، سویه‌های N3، U4 و U7 دوباره جهت تولید کوآنزیم Q10 مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ۱۰ بار تجدید کشت متوالی، میزان کوآنزیم Q_{10} در سویه‌های مذکور بدون هیچ تغییری کماکان ادامه داشت. از اینرو پایداری هر سه سویه جهش‌یافته تایید شد.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

بحث و نتیجه‌گیری

زیمومونـاس موبیلیس یک باکتری منحصر به فرد در دنیای میکروبی است. اگرچه این باکتری بیشتر برای تولید اتانول مورد توجه قرار گرفته ولی قادر به تولید برخی محصولات دیگر نظیر پلیمر لـوان، سوربیتول، اسید گلوکونیک و ۲-۳ بوتاندیول نیـز اسـت. تـاکنون تـلاش‌هـای بسـیاری بـرای تجاری‌سازی کاربرد این محصـولات انجـام شـده اسـت. علـی‌رغـم ایـن تلاش‌هـا، هـیچ یـک از فرآیندهای استفاده از این بـاکتری تجـاری نشـده است. پژوهشگران تلاش‌هـای مختلفـی را تـاکنون برای بهبـود رانـدمان ایـن بـاکتری بـا اسـتفاده از تکنیک‌های مختلف مانند تکنیک‌های بهبود ژنتیکی با تاکید ویژه بر جهش‌زایـی و فنـاوری دی.ان.ای نوترکیب انجام داده‌انـد (Hu et al. 2023; Wang et al. 2018).

در یـک پـژوهش بـا القـای جهـش در بـاکتری *زیمومونـاس مـوبیلیس* توانسـتند سـویه‌های جهش‌یافته‌ای را به دست آورند که قادر به استفاده همزمان از گلوکز و گزیلوز با راندمان بالا بودنـد. در حـالی‌کـه سـویه‌های بـومی می‌تواننـد فقـط از گلوکز استفاده کنند، آنهـا فاقـد مسـیر متـابولیکی بـرای متابولیسـم گزیلـوز هسـتند (Sarkar et al. 2020). در پژوهش دیگری بـرای افـزایش تحمـل اسیدیته بالا، در *زیمومونـاس موبیلیس*، جهش انجام شد و پژوهشگران توانستند سویه‌هایی تولید کنند کـه قـادر بـه رشـد در pH کمتـر از ۳ بودنـد در حـالی‌کـه سـویه‌هـای دسـتکاری نشـده فقـط در محدوده pH با ۷/۵-۳/۵ رشد می‌کننـد (Yang et al. 2020).

در پژوهشی دیگر پژوهشگران بـا جهـش‌زایـی، سویه‌هایی را به دست آوردند که قادر بـه تخمیـر گزیلوز و آرابینوز به‌طور مشـترک بودنـد و تولیـد اتانول در آنها با سـرعت و بـازده بـالاتری انجـام پـذیرفت (Dunn et al. 2015). اسـتفاده از روش جهش‌زایی جهت تولید سویه‌های سازگار با دمای بالا نیز موثر بـوده اسـت به‌طوریکـه پژوهشـگران توانسـتند بـا القـای جهـش، تحمـل حراتـی را در *زیمومونـاس موبیلیس* بالا ببرند به‌طوری‌که قادر به رشد در دمای ۳۹ درجه سلسیوس باشد (Hayashi et al. 2011). برای ایجاد جهش در باکتری‌هـا بـه منظـور افـزایش تولیـد کـوآنزیم Q_{10} تـاکنون روش‌های مختلفی از قبیل، استفاده از اشعه ماوراء بـنفش، اشـعه گامـا، بمبـاران بـا اتـم‌هـای آهـن، پرتوافکنی یون‌های کم انرژی با یون‌های نیتـروژن و جهش شیمیایی با موادی نظیر نیتروزوگوانیدین، اسید نیتروز و اتیل سولفات به کار رفته است (Xu et al. 2004; Yuan et al. 2012; Bing et al. 2006).

در ایجاد جهـش شـیمیایی در باکتری‌هـا جهـت افزایش تولید کوآنزیم Q_{10} در اغلب موارد از ماده نیتروزوگوانیدین استفاده شده اسـت (Zou et al.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

2019). این ماده جزء عوامل الکیله کننده محسوب می‌شود که جهش‌های نقطه ای ایجاد می‌کند و می‌تواند گروه متیل را به روی بازهای مختلف گوانین، سیتوزین، آدنین و تیمین انتقال داده و سبب جفت شدن اشتباهی بازها با یکدیگر شود (Najafi et al. 2013). اشعه ماوراءبنفش باعث ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو در مولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و آنزیم‌ها می‌شود. اشعه ماوراء بنفش باعث ایجاد رادیکال‌های سمی اکسیژن شده و باعث تغییر در ساختار دی.ان.اِ به‌صورت جهش و دایمر تیمین می‌شود (Qi et al. 2014).

جهت تشخیص جهش‌یافته مناسب نیز از ماده‌ای که مشابه کوآنزیم Q_{10} است یعنی منادیون استفاده شد. منادیون که ویتامین K3 نیز خوانده می‌شود یک نفتوکوئینون محلول در چربی است. این ماده فقط دارای سر کوئینونی است و دنباله ایزوپرونوئیدی را ندارد. منادیون فعالیت زیستی نداشته و در سلول‌های پستانداران به‌عنوان پیش‌ساز ویتامین K عمل می‌کند و می‌تواند به ویتامین K تبدیل شود. در باکتری‌ها از آنجایی‌که این ماده مشابه کوآنزیم Q_{10} است می‌تواند جایگزین آن در غشا باکتری شده و عمل تنفس را بلوکه کند سلول جهت مبارزه با این مشکل، تولید کوآنزیم Q10 را افزایش می‌دهد. از اینرو جهش یافته‌هایی که قادر به رشد در محیط کشت حاوی منادیون هستند، مقادیر بیشتری از کوآنزیم Q10 را تولید می‌کنند (Yuan et al. 2012).

در این پژوهش با استفاده از نیتروزوگوانیدین و اشعه ماوراء بنفش، عمل جهش زایی انجام شد و در پایان ۱۴۲ کلنی جهش‌یافته به دست آمد که به دلیل تعداد زیاد کلنی‌های جهش‌یافته، امکان بررسی تولید کوآنزیم Q_{10} در تک تک آنها وجود نداشت. از اینرو ۱۶ سویه به‌صورت تصادفی انتخاب شدند که از بین آنها فقط ۳ سویه قادر به تولید مقدار بیشتری از کوآنزیم Q_{10} نسبت به سویه والد بودند. بیشترین میزان کوآنزیم Q_{10} توسط سویه U7 تولید شد که برابر با ۱۱/۹ میلی‌گرم بر لیتر بود که ۱/۴ برابر بیش از سویه والد بود. این سویه ظرفیت تولید معادل ۳/۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک را داشت. افزایش تولید سویه U7 در مقایسه با سویه‌های جهش‌یافته‌ای که در پژوهش قبلی ما به دست آمد است کمتر است. در پژوهش قبلی، القای جهش با استفاده از نیتروزوگوانیدین بر روی باکتری *گلوکونوباکتر اکسیدانس* انجام گرفت. سویه جهش‌یافته‌ای به دست آمد که قادر به تولید ۲/۳ برابر بیش از سویه والد کوآنزیم Q_{10} بود (Moghadami et al. 2022). جهش‌یافته‌ای از باکتری *اگروباکتریوم تومفسینس* بیشترین مقدار کوآنزیم Q_{10} را تاکنون توانسته است تولید کند یعنی معادل ۷۷۰ میلی‌گرم بر لیتر (Sakato et al.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

1997). جهش‌یافته دیگری از باکتری *رودواسپریلیوم اسفروئیدس* که فاقد توانایی تولید کارتنوئید بوده، قادر است ۳۵۰ میلی‌گرم بر لیتر در شرایط هوادهی محدود، کوآنزیم Q_{10} تولید کند که ۲/۸ برابر سویه والد است (Ndikubwimana et al. 2014). جهش‌یافته دیگری از باکتری *اگروباکتریوم تومفسینس* قادر به تولید ۴۵۸ میلی‌گرم بر لیتر کوآنزیم Q_{10} است (Kim et al. 2015). سویه‌های *اگروباکتریوم تومفسینس* به دلیل پلی‌ساکاریدهای که تولید می‌کنند محیط کشت را ویسکوز می‌کند. این ویسکوزیته عملیات استخراج را سخت و بر بازده تولید کوآنزیم Q_{10} اثر گذاشته و آن را کم می‌کند. با استفاده از جهش این مشکل مرتفع شد به‌طوری‌که بعضی از جهش‌یافته‌ها ۶-۳ برابر کاهش ویسکوزیته داشتند (Tokdar et al. 2013). جهش‌یافته مقاوم به L-اتیونین از باکتری *اگروباکتریوم تومفسینس* قادر است ۱۸۰ میلی‌گرم بر لیتر کوآنزیم Q_{10} یعنی ۱/۸ برابر سویه والد تولید کند (Yoshida et al. 1998).

پایداری سویه جهش‌یافته در حفظ قابلیت به دست آمده از موارد مهمی است که در مورد سویه‌های جهش‌یافته دارای اهمیت است. در پژوهشی، قدرت تولید کوآنزیم Q_{10} در جهش‌یافته‌هایی از *گلوکونوباکتر اکسیدانس*، بعد از ۲ نسل کاهش یافت و تولید کوآنزیم Q_{10} توسط آن از تولید کوآنزیم Q_{10} توسط سویه اصلی نیز کمتر شد. به نظر می آید که از دست دادن قدرت تولید کوآنزیم Q_{10} در باکتری *گلوکونوباکتر اکسیدانس* با ایجاد تنوع ژنتیکی در آن سویه مرتبط باشد (Moghadami et al. 2022). در پژوهش دیگری سویه جهش‌یافته‌ای از *اگروباکتریوم تومفسینس* که قادر به تولید کوآنزیم Q_{10}، دو برابر بیشتر نسبت به سویه والد بود، بعد از ۱۰ نسل همچنان تولید ثابتی داشت (Yuan et al. 2012). در این پژوهش نیز پس از ۱۰ بار تجدید کشت متوالی، میزان کوآنزیم Q_{10} در سویه‌های جهش‌یافته بدون هیچ تغییری کماکان ادامه داشت.

تولید کوآنزیم Q_{10} توسط سویه‌های طبیعی که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، از ۳۰ تا ۱۳۰ میلی‌گرم در لیتر متغیر است (Cluis et al. 2007). تولید کوآنزیم Q_{10} توسط *زیمومونا‌س موبیلیس* که در این پژوهش انجام گرفت (۸/۴ میلی‌گرم بر لیتر) در مقایسه با سویه‌های مورد مطالعه در سایر پژوهش‌ها ناچیز بود. در این پژوهش تولید کوآنزیم Q_{10} توسط سویه‌های *زیمومونا‌س* با استفاده از راهکار جهش زایی، بهبود یافت و به ۱۱/۹ میلی‌گرم در لیتر رسید. در واقع راندمان تولید ۱/۴ برابر افزایش یافت. میزان زیست‌توده کم در باکتری *زیمومونا‌س* از مشکلات استفاده از این سویه‌ها برای تولید کوآنزیم Q_{10} است.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

زیست‌توده تولیدی توسط باکتری *زیمومونـاس* در مقایسه با سایر باکتری‌ها اندک اسـت. اگـر بتـوان ضایعات زیست‌توده در صنعت تولید بیوسوخت و اتانول توسط سویه‌های زیمومونـاس را برای تولید کـوآنزیم Q_{10} اسـتفاده کـرد، می‌تـوان میـزان زیست‌توده پایین و راندمان کم تولید کوآنزیم Q_{10} توسط سویه‌های *زیمومونـاس* را جبران کرد.

فهرست منابع

References

Bing Y, An X, Wan Z, Wei Z, Jun W, Jianming Y, Zengliang Y. 2006. Accumulation of 2-keto-L-gulonate at 33 C by a thermotolerant *Gluconobacter oxydans* mutant obtained by ion beam implantation. Plasma Science and Technology. 8:237.

Choi JH, Ryu YW, Seo JH. 2005. Biotechnological production and applications of coenzyme Q10. Appl Microbiol Biotechnol. 68:9-15 .

Cluis CP, Burja AM, Martin VJJ. 2007. Current prospects for the production of coenzyme Q10 in microbes. Trends Biotechnol. 25:514-21 .

Cluis CP, Pinel D, Martin VJ. 2012. The Production of coenzyme Q10 in microorganisms. Subcell Biochem. 64:303-26 .

Dunn KL and Rao CV. 2015. High-throughput sequencing reveals adaptation-induced mutations in pentose-fermenting strains of *Zymomonas mobilis*. Biotechnology and Bioengineering. 112: 2228-40.

Hayashi T, Furuta Y, Furukawa K. 2011. Respiration-deficient mutants of *Zymomonas mobilis* show improved growth and ethanol fermentation under aerobic and high temperature conditions. Journal of Bioscience and Bioengineering. 111: 414-9.

Hu M, Bao W, Peng Q, Hu W, Yang X, Xiang Y, Yan X, Li M, Xu P, He Q, Yang S. 2023. Metabolic engineering of *Zymomonas mobilis* for co-production of D-lactic acid and ethanol using waste feedstocks of molasses and corncob residue hydrolysate. Front Bioeng Biotechnol. 21(11): 1135484.

Jeya M, Moon HJ, Lee JL, Kim IW, Lee JK. 2010. Current state of coenzyme Q10 production and its application. Appl Microbiol Biotechnol. 85: 1653-1663 .

Kim TS, Yoo JH, Kim SY, Pan CH, Kalia VC, Kang YC, Lee JK. 2015. Screening and characterization of an *Agrobacterium tumefaciens* mutant strain producing high level of coenzyme Q10. Process Biochemistry. 50: 33-9.

Moghadami F, Fooladi J, Hosseini R. 2019. Introducing a thermotolerant *Gluconobacter japonicus* strain, potentially useful for coenzyme Q10 production. Folia Microbiol. 64(4): 471-479. doi: 10.1007/s12223-018-0666-4.

Moghadami F and Kalantari M. 2022. Increasing the coenzyme Q10 production by *Gluconobacter oxydans* H621 by chemical mutation and studying the mutagenesis of nitrosoguanidine using the response surface methodology. JMBS. 13: 15-26 .

Najafi M and Pezeshki P. 2013. Bacterial mutation; types, mechanisms and mutant detection methods: a Review. European Sci J. 4: 628-638

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

Ndikubwimana JD and Lee BH. 2014. Enhanced production techniques, properties and uses of Coenzyme Q10. Biotechnol Lett. 36: 1917-26.

Panesar PS, Marwaha SS, Kennedy JF. 2006. *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology. 81: 623-35.

Qi Zh, Wang W, Yang H, Xia X, Yu X. 2014. Mutation of *Acetobacter pasteurianus* by UV irradiation under acidic stress for high-acidity vinegar fermentation. Int J Food Sci Technol. 49: 468–476

Rogers PL, Jeon YJ, Lee KJ, Lawford HG. 2007. *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. Biofuels. 263-88.

Sakato K, Tanaka H, Shibata S, Kuratsu Y. 1992. Agitation-aeriation studies on coenzyme Q10 production using *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Biotechnol Appl Biochem. 16: 19-22

Sarkar P, Mukherjee M, Goswami G, Das D. 2020. Adaptive laboratory evolution induced novel mutations in *Zymomonas mobilis* ATCC ZW658: a potential platform for co-utilization of glucose and xylose. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 47: 329-41.

Todhanakasem T, Salangsing OL, Koomphongse P, Kaewket S, Kanokratana P, Champreda V. 2019. *Zymomonas mobilis* Biofilm reactor for ethanol production using rice straw hydrolysate under continuous and repeated batch processes. Front Microbiol. 10: 1777.

Tokdar P, Wani A, Kumar P, Ranadive P, George S. 2013. Process and strain development for reduction of broth viscosity with improved yield in coenzyme Q10 fermentation by *Agrobacterium tumefaciens* ATCC 4452. Ferment Technol. 2(1).

Wang X, He Q, Yang Y, Wang J, Haning K, Hu Y, Wu B, He M, Zhang Y, Bao J, Contreras L, Yang Sh. 2018. Advances and prospects in metabolic engineering of *Zymomonas mobilis*. Metabolic engin. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.001

Xu A, Yao J, Yu L, Lv S, Wang J, Yan B, Yu Z. 2004. Mutation of Gluconobacter oxydans and *Bacillus megaterium* in a two-step process of L-ascorbic acid manufacture by ion beam. J Appl Microbiol. 96: 1317–1323

Yang Q, Yang Y, Tang Y, Wang X, Chen Y, Shen W, Zhan Y, Gao J, Wu B, He M, Chen S. 2020. Development and characterization of acidic-pH-tolerant mutants of *Zymomonas mobilis* through adaptation and next-generation sequencing-based genome resequencing and RNA-Seq. Biotechnology for Biofuels. 13: 1-7.

Yang S, Fei Q, Zhang Y, Contreras LM, Utturkar SM, Brown SD, Himmel ME, Zhang M. 2016. *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemicals. Microbial Biotechnology. 9: 699-717.

Yuan Y, Tian Y, Yue T. 2012. Improvement of coenzyme Q10 Production: mutagenesis induced by high hydrostatic pressure treatment and optimization of fermentation conditions. J Biomed Biotechnol. 2.

Zeng Y, Zhao S, Yang S, Ding SY. 2014. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. Current opinion in biotechnology. 27: 38-45.

Zou RS, Li S, Zhang LL, Zhang C, Han YJ, Gao G, Sun X, Gong X. 2019. Mutagenesis of *Rhodobacter sphaeroides* using atmospheric and room temperature plasma treatment for efficient production of coenzyme Q10. Journal of Bioscience and Bioengineering. 127: 698-702.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]

Mutagenesis by Nitrosoguanidine and UV to Increase Coenzyme Q_{10} Production by *Zymomonas mobilis*

Foozieh Moghadami[1*] and Leila Shokrzadeh[2]

1- Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Biology, Shandiz Institute of Higher Education, Mashhad, Iran.

fmoghadami@pnu.ac.ir

Abstract

The present study investigated the increase of coenzyme Q10 production by the mutation in *Zymomonas mobilis*. For mutagenesis, the survival curve was first drawn using nitrosoguanidine and UV. Then the mutation was performed using a concentration of 3 mg/l of nitrosoguanidine and the UV exposure time of 60 seconds. Mutants were screened through their ability to grow in a medium containing 160 µg/ml menadione. Then the mutants were examined for coenzyme Q_{10} production. The results showed that the amount of coenzyme Q_{10} produced by *Zymomonas mobilis* was 8.4 mg/l and its dry cell weight was 1.3 g/l. Among 142 mutants, 16 strains were randomly selected. The highest amount of coenzyme Q_{10} was produced by the U7 strain, 11.9 mg/L, which was 1.4 times more than the parent strain. According to the results of this study, it could be concluded that the mutants can produce more coenzyme Q10 than the parent strain.

Keywords: Mutation, *Zymomonas*, Coenzyme Q_{10}, Nitrosoguanidine, UV.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-07-11]