

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 Q₁₀

توسط زیموموناس موبیلیس

نوع مقاله: پژوهشی

فوزیه مقدمی^{۱*}، لیلا شکرزاده^۲

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 Q₁₀ توسط زیموموناس موبیلیس بر اثر ایجاد جهش انجام شد. جهت ایجاد جهش ابتدا با استفاده از نیتروزوگوانیدین و اشعه ماوراء بنفش منحنی زنده‌مانی ترسیم شد. سپس جهش با استفاده از غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر نیتروزوگوانیدین و زمان ۶۰ ثانیه قرارگیری در مقابل اشعه انجام شد. تشخیص سویه‌های جهش‌یافته از طریق قابلیت رشد در محیط حاوی ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر منادیون انجام شد. سپس سویه‌های جهش‌یافته از لحاظ تولید کوآنزیم Q₁₀ مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که میزان کوآنزیم Q₁₀ که توسط زیموموناس موبیلیس تولید شد ۸/۴ میلی‌گرم بر لیتر و وزن خشک سلولی آن ۳/۱ گرم بر لیتر بود. از میان ۱۴۲ سویه جهش‌یافته، ۱۶ سویه به‌طور تصادفی انتخاب شدند. بیشترین میزان کوآنزیم Q₁₀ توسط سویه U7 تولید شد، ۱۱/۹ میلی‌گرم بر لیتر که ۱/۴ برابر بیش از سویه والد بود. طبق نتایج این پژوهش، می‌توان بیان کرد که با القای جهش می‌توان در باکتری زیموموناس موبیلیس، سویه‌های جهش‌یافته‌ای را ایجاد کرد که قادر به تولید کوآنزیم Q₁₀ بیشتری نسبت به سویه والد باشند.

واژه‌های کلیدی: جهش، زیموموناس، کوآنزیم Q₁₀، ماوراء بنفش، نیتروزوگوانیدین.

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 به عنوان 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).

علاوه بر اتانول، این باکتری جهت تولید پلیمر لوان، سوربیتول، اسید گلوکونیک و ۲-۳ بوتانیدیول نیز در صنعت مورد توجه است. به طور کلی *زیموموناس موبیلیس* به عنوان یک باکتری ایمن (GRAS) در نظر گرفته می‌شود (Penasar 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 ایزوپرنوئیدی 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 به طور عمده به سه روش سنتز شیمیایی، سنتز نیمه شیمیایی (استخراج از گیاهان و اصلاح ساختار) و فرآیند تخمیر میکروبی انجام می‌شود ولی از آنجایی که 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

"مقدمه و شکرزاده، جهش‌زایی توسط نیتروژوگوانیدین و اشعه ماوراء بنفش برای افزایش تولید کوآنزیم Q10..."

زیموموناس موبیلیس مورد ارزیابی قرار داد و سپس تولید کوآنزیم Q10، از طریق ایجاد جهش شیمیایی با استفاده از نیتروژوگوانیدین و ایجاد جهش فیزیکی با استفاده از اشعه ماوراء بنفش مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیزم و محیط‌های کشت

در این پژوهش از سویه استاندارد *Zymomonas Mobilis* PTCC 1718 خریداری شده از مرکز کلکسیون میکروارگانیزم‌های صنعتی استفاده شد. به عنوان 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 Q10 بعد از ۲۰ ساعت استخراج شد.

جهش‌زایی با نیتروژوگوانیدین

جهت ایجاد جهش از ماده جهش‌زای نیتروژوگوانیدین استفاده شد. به این منظور سلول‌های باکتری با غلظت نیم مک فارلند در ۱۰ میلی لیتر بافر جهش‌زایی (۱۲۵ میلی گرم پتاسیم

نشان داده است که باکتری‌ها هم می‌توانند منابع خوبی جهت تولید کوآنزیم Q10 باشند. مطالعات فراوانی بر روی طیف وسیعی از باکتری‌های مولد کوآنزیم Q10 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 Q10 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 ماوراء بنفش، 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 Q10 تاکنون توسط باکتری‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. ولی در مورد تولید کوآنزیم Q10 توسط باکتری *زیموموناس* پژوهش‌های اندکی موجود است (Jeya et al. 2010; Moghadami 2019). این پژوهش میزان تولید کوآنزیم Q10 را توسط

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 کوآنزیم Q₁₀ است. لوله‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. سپس ۱/۰ میلی‌لیتر از محتوای لوله‌ها به پلیت‌های نوترین آگار 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 Q₁₀ 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

دی هیدروژن فسفات، ۱۲۲ میلی‌گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۴۲ میلی‌گرم سولفات منیزیم 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 (گلکز 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.

"مقدمه و شکرزاده، جهش‌زایی توسط نیتروژوگوانیدین و اشعه ماوراء بنفش برای افزایش تولید کوآنزیم Q10..."

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

استخراج و سنجش کوآنزیم Q10

جهت استخراج کوآنزیم Q10 پس از جداسازی سلول‌ها با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، ۴۵۰ میکرولیتر از محلول لیزکننده سلولی cell lytic B (سیگما-آلدریج) افزوده شد. سپس ۹۰۰ میکرولیتر از حلال هگزان-۲ پروپانول با نسبت ۳-۵ به پلت حاصل از سانتریفوژ افزوده و پس از سانتریفوژ، بخش بالایی حاوی کوآنزیم Q10 به تیوب‌های تمیز منتقل شد. جهت سنجش کوآنزیم Q10، 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 ماوراء بنفش بود و فاز متحرک اتانول: متانول (۷۰:۳۰) با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. کوآنزیم Q10 در طول موج ۲۷۵ نانومتر شناسایی شد.

منحنی استاندارد کوآنزیم Q10

جهت رسم منحنی استاندارد یا منحنی کالیبراسیون کوآنزیم Q10 از کوآنزیم Q10 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 Q10 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 Q10

همزمان با استخراج کوآنزیم Q10، 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 Q10

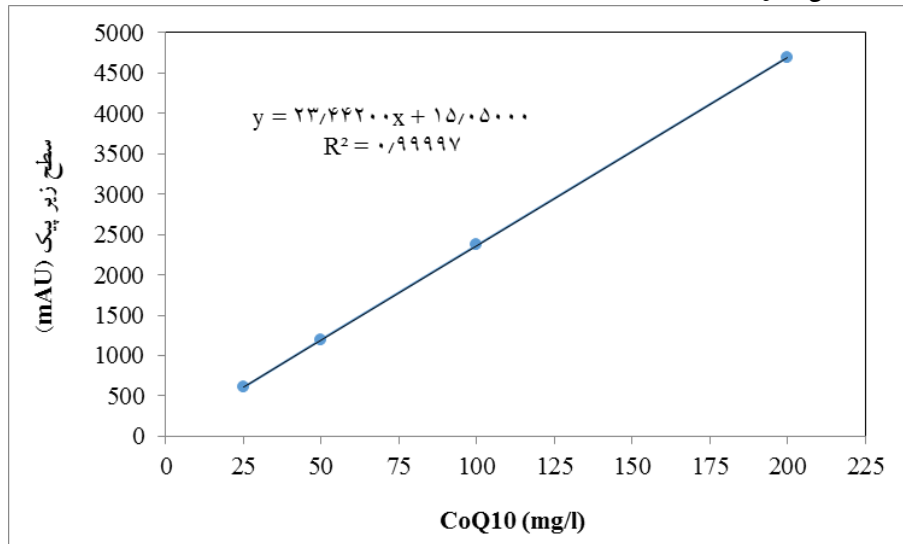
ظرفیت ویژه تولید، مقدار کوآنزیم Q10 را در هر گرم از وزن خشک سلولی نشان می‌دهد. در واقع، ظرفیت ویژه کوآنزیم Q10 از تقسیم مقدار کوآنزیم Q10 بر وزن خشک سلولی به دست می‌آید.

نتایج

منحنی استاندارد کوآنزیم Q10 در آنالیز HPLC: با استفاده از اعداد سطوح زیر پیک نسبت به غلظت کوآنزیم Q10، منحنی استاندارد کوآنزیم Q10 رسم شد (شکل ۱).

معادله سطح کوآنزیم Q₁₀ (mg/l) نسبت به $y = 23.44x + 15.05$

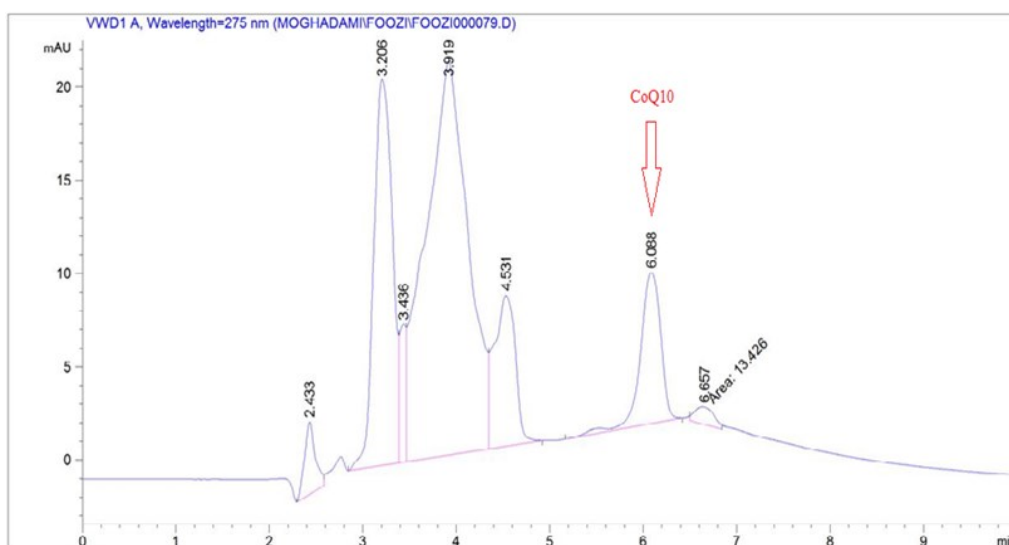
سطح زیر پیک به این صورت است:



شکل ۱- منحنی استاندارد کوآنزیم Q₁₀ در آنالیز HPLC

موبیلیس را نشان می‌دهد. همانطوری که در شکل مشاهده می‌شود پیک کوآنزیم Q₁₀ در زمان بازداری ۶ دقیقه ترسیم شده است.

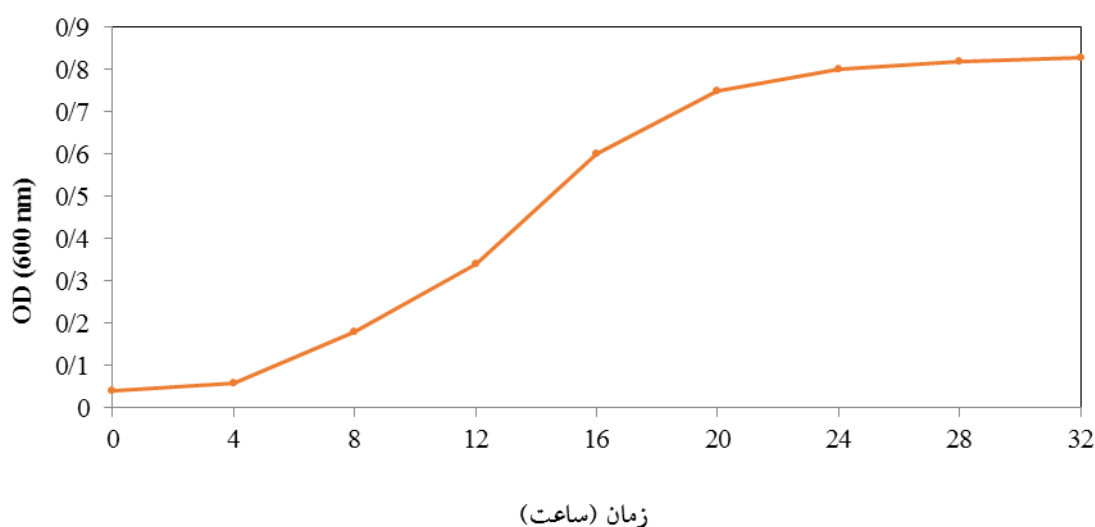
سنجش کوآنزیم Q₁₀: شناسایی کوآنزیم Q₁₀ به وسیله دستگاه HPLC و در طول موج ۲۷۵ نانومتر انجام شد. شکل ۲ کروماتوگرام آنالیز HPLC برای کوآنزیم Q₁₀ تولید شده توسط زیموناس



شکل ۲- کروماتوگرام آنالیز HPLC برای کوآنزیم Q₁₀ تولید شده در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و pH = ۵/۸ توسط زیموناس موبیلیس. پیک موجود در زمان بازداری ۶ دقیقه نشان‌دهنده کوآنزیم Q₁₀ است.

"مقدمه و شکرزاده، جهش‌زایی توسط نیتروزوگوانیدین و اشعه ماوراء بنفش برای افزایش تولید کوآنزیم Q10..."

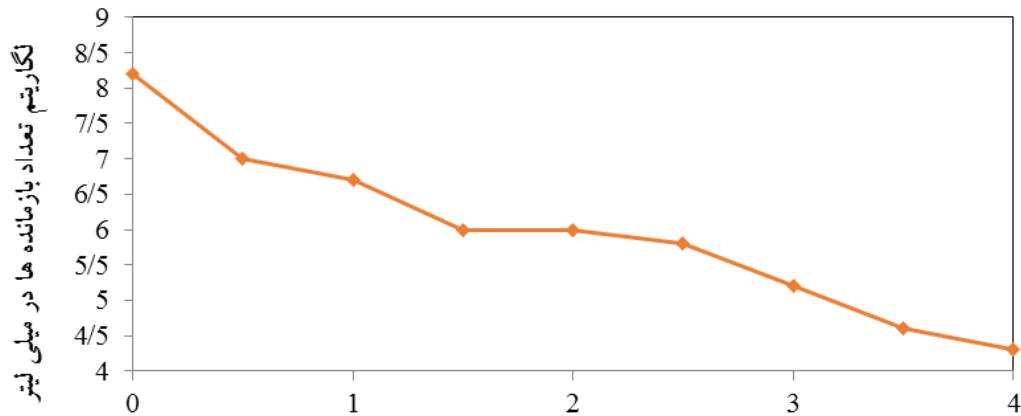
تولید کوآنزیم Q10 در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت با pH برابر ۵/۸ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. کوآنزیم Q10 بعد از ۲۰ ساعت در ابتدای فاز سکون استخراج شد. پس از ترسیم منحنی استاندارد کوآنزیم Q10، میزان تولید کوآنزیم Q10 توسط زی‌موموناس موبیلیس به دست آمد. میزان کوآنزیم Q10 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 Q10 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) از اینرو، ۲۰ ساعت پس از تلقیح، کوآنزیم Q10 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.

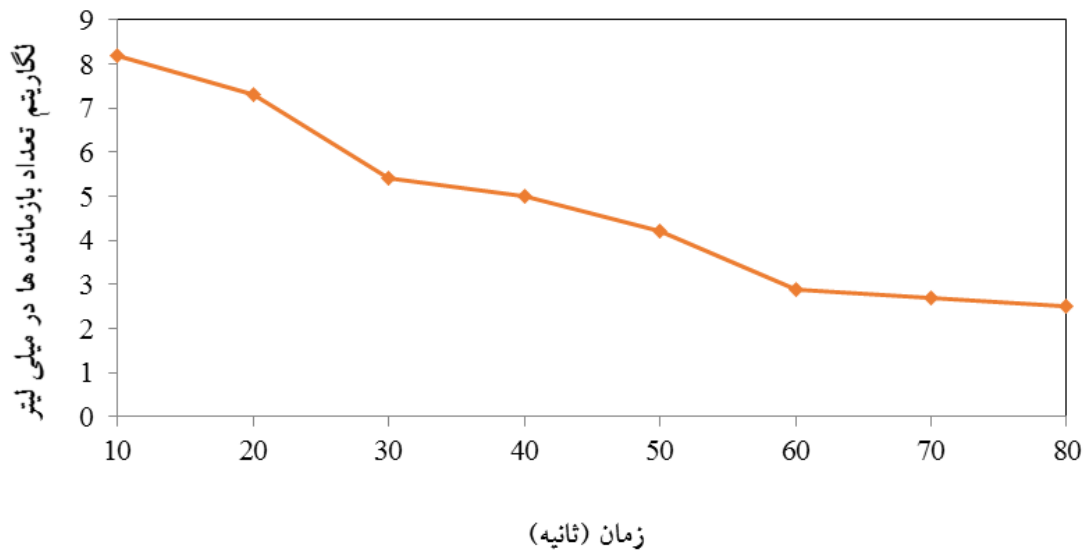
منحنی زنده‌مانی زی‌موموناس موبیلیس: برای ایجاد جهش در ابتدا منحنی زنده‌مانی زی‌موموناس موبیلیس رسم شد. روند زنده‌مانی یا به عبارت دیگر، روند مرگ و میر زی‌موموناس موبیلیس در شکل ۴ و ۵ به ترتیب در مقابل غلظت‌های مختلف نیتروزوگوانیدین و زمان‌های مختلف اشعه ماورابنفش دیده می‌شود. همانطوری‌که در شکل‌ها قابل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

ماورابنفش در مدت زمان ۶۰ ثانیه از بین می‌روند. نیتروژوگوانیدین و مدت زمان ۶۰ ثانیه در مقابل
بنابراین غلظت ۳ میلی گرم بر میلی لیتر از اشعه ماورابنفش برای انجام جهش انتخاب شد.



غلظت نیتروژوگوانیدین (میلی گرم بر میلی لیتر)

شکل ۴- منحنی زنده مانی زیموموناس موبیلیس در حضور غلظت های مختلف نیتروژوگوانیدین در مدت ۳۰ دقیقه



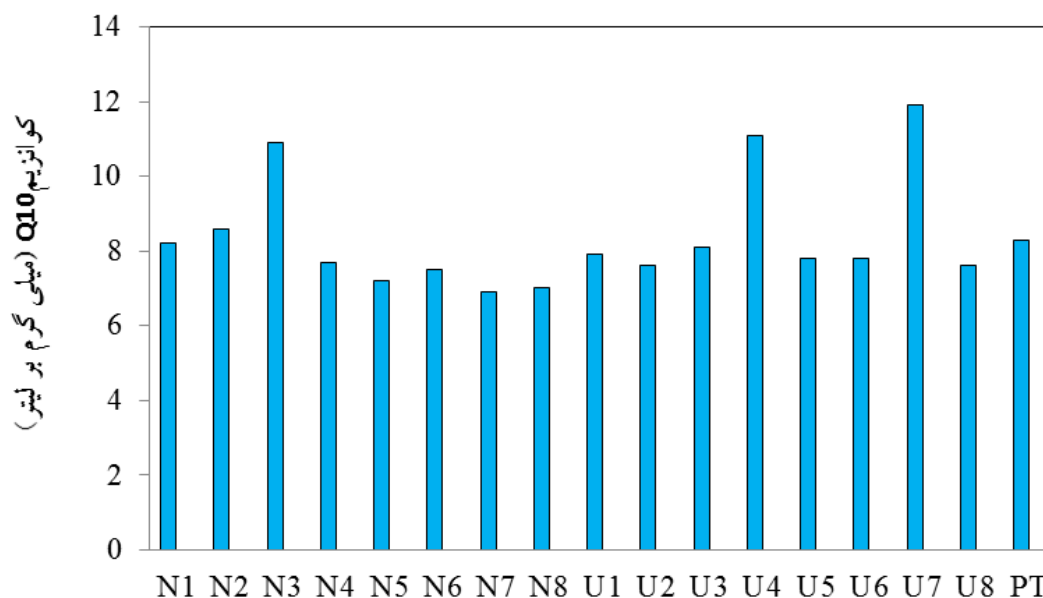
شکل ۵- منحنی زنده مانی زیموموناس موبیلیس در اثر اشعه ماوراءبنفش

انتخاب جهش یافته مناسب: با انجام جهش با شامل ۹۹ کلنی در اثر تابش اشعه ماورابنفش و ۴۳
غلظت ۳ میلی گرم از نیتروژوگوانیدین و قرارگیری کلنی بر اثر تیمار با نیتروژوگوانیدین به دست آمد.
به مدت ۶۰ ثانیه در مقابل اشعه ماورابنفش بر به دلیل تعداد زیاد کلنی های جهش یافته، امکان
روی زیموموناس موبیلیس، ۱۴۲ کلنی جهش یافته بررسی تولید کوآنزیم Q₁₀ در تک تک آنها وجود

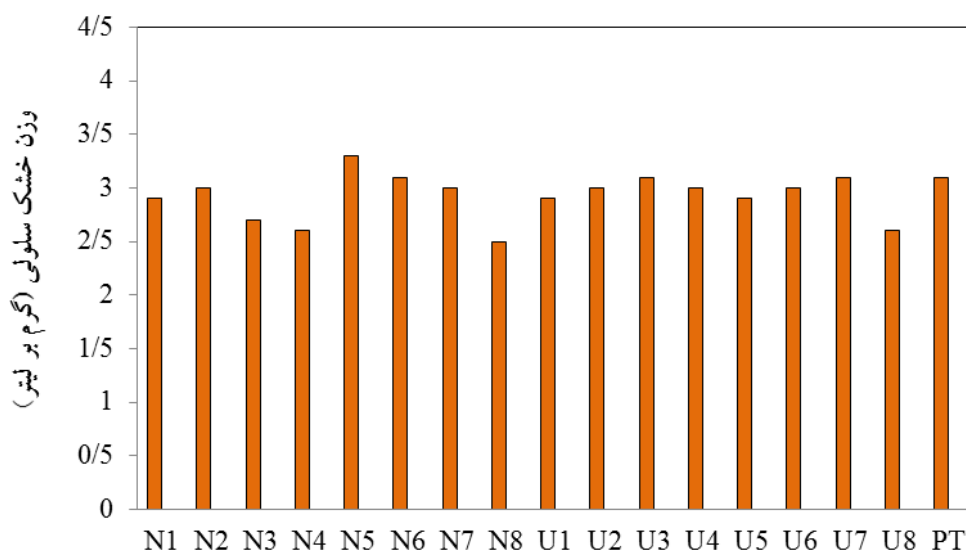
"مقدمه و شکرزاده، جهش‌زایی توسط نیتروزوگوانیدین و اشعه ماوراء بنفش برای افزایش تولید کوآنزیم Q10..."

نداشت. از اینرو ۱۶ سویه به صورت 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 Q10 و وزن خشک سلولی توسط آنها سنجیده شد. شکل ۵ میزان کوآنزیم Q10 تولید شده توسط ۱۶ سویه جهش‌یافته و شکل ۶ وزن خشک سلولی سویه‌های جهش‌یافته را نشان می‌دهند. همانطوری که در شکل ۵ قابل مشاهده است مقادیر کوآنزیم Q10 تولید شده توسط سویه‌های جهش‌یافته تفاوت چندانی با سویه والد

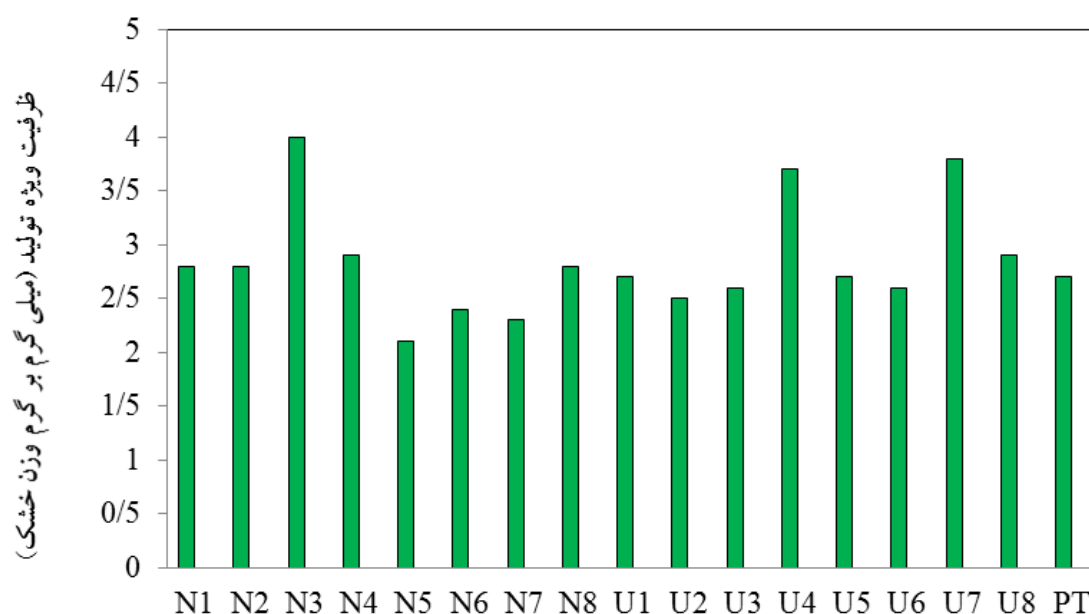
نداشتند و فقط ۳ سویه قادر به تولید مقدار بیشتری از کوآنزیم Q10 نسبت به سویه والد بودند (سویه‌های N3، U4 و U7). بیشترین میزان کوآنزیم Q10 توسط سویه U7 تولید شد که برابر با ۱۱/۹ میلی گرم بر لیتر بود. وزن خشک سلولی در همه سویه‌ها کم و بیش برابر با سویه والد بود. تنها سویه N5 بیشتر از سایرین قادر به تولید ۳/۳ گرم در لیتر وزن خشک سلولی بود. شکل ۷ ظرفیت ویژه تولید کوآنزیم Q10 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.



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



شکل ۷- ظرفیت ویژه تولید کوآنزیم Q10 توسط سویه‌های جهش‌یافته. جهش‌یافته‌های N1 تا N8 بر اثر تیمار با نیتروژوگوانیدین و U1 تا U8 بر اثر تابش اشعه ماوراء بنفش ایجاد شدند. PT سویه والد.

مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ۱۰ بار تجدید کشت متوالی، میزان کوآنزیم Q10 در سویه‌های مذکور بدون هیچ تغییری کماکان ادامه داشت. از اینرو پایداری هر سه سویه جهش‌یافته تایید شد.

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

"مقدمه و شکرزاده، جهش‌زایی توسط نیتروژوگوانیدین و اشعه ماوراء بنفش برای افزایش تولید کوآنزیم Q10..."

بحث و نتیجه‌گیری

زیموموناس 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 لوان، سوربیتول، اسید گلوکونیک و ۲-۳ بوتانیدیول نیز است. تاکنون تلاش‌های بسیاری برای تجاری‌سازی کاربرد این محصولات انجام شده است. علی‌رغم این تلاش‌ها، هیچ یک از فرآیندهای استفاده از این باکتری تجاری نشده است. پژوهشگران تلاش‌های مختلفی را تاکنون برای بهبود راندمان این باکتری با استفاده از تکنیک‌های مختلف مانند تکنیک‌های بهبود ژنتیکی با تاکید ویژه بر جهش‌زایی و فناوری دی.ان.ای نو ترکیب انجام داده‌اند (Hu et al. 2023; Wang et al. 2018).

در یک پژوهش با القای جهش در باکتری زیموموناس موبیلیس توانستند سویه‌های جهش‌یافته‌ای را به دست آورند که قادر به استفاده همزمان از گلوکز و گزیلوز با راندمان بالا بودند. در حالی‌که سویه‌های بومی می‌توانند فقط از گلوکز استفاده کنند، آنها فاقد مسیر متابولیکی برای متابولیسم گزیلوز هستند (Sarkar et al. 2020). در پژوهش دیگری برای افزایش تحمل اسیدیته بالا، در زیموموناس موبیلیس، جهش انجام شد و پژوهشگران توانستند سویه‌هایی تولید کنند

که قادر به رشد در pH کمتر از ۳ بودند در حالی‌که سویه‌های دستکاری نشده فقط در محدوده pH با ۳/۵-۷/۵ رشد می‌کنند (Yang et al. 2020).

در پژوهشی دیگر پژوهشگران با جهش‌زایی، سویه‌هایی را به دست آوردند که قادر به تخمیر گزیلوز و آرابینوز به‌طور مشترک بودند و تولید اتانول در آنها با سرعت و بازده بالاتری انجام پذیرفت (Dunn et al. 2015). استفاده از روش جهش‌زایی جهت تولید سویه‌های سازگار با دمای بالا نیز موثر بوده است به‌طوری‌که پژوهشگران توانستند با القای جهش، تحمل حرارتی را در زیموموناس موبیلیس بالا ببرند به‌طوری‌که قادر به رشد در دمای ۳۹ درجه سلسیوس باشد (Hayashi et al. 2011). برای ایجاد جهش در باکتری‌ها به منظور افزایش تولید کوآنزیم Q10 تاکنون روش‌های مختلفی از قبیل، استفاده از اشعه ماوراء بنفش، اشعه گاما، بمباران با اتم‌های آهن، پرتوافکنی یون‌های کم انرژی با یون‌های نیتروژن و جهش شیمیایی با موادی نظیر نیتروژوگوانیدین، اسید نیتروز و اتیل سولفات به کار رفته است (Xu et al. 2004; Yuan et al. 2012; Bing et al. 2006).

در ایجاد جهش شیمیایی در باکتری‌ها جهت افزایش تولید کوآنزیم Q10 در اغلب موارد از ماده نیتروژوگوانیدین استفاده شده است (Zou et al.

منادیون هستند، مقادیر بیشتری از کوآنزیم Q10 را تولید می کنند (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 جهش یافته به دست آمد که به دلیل تعداد زیاد کلنی های جهش یافته، امکان بررسی تولید کوآنزیم Q10 در تک تک آنها وجود نداشت. از اینرو ۱۶ سویه به صورت تصادفی انتخاب شدند که از بین آنها فقط ۳ سویه قادر به تولید مقدار بیشتری از کوآنزیم Q10 نسبت به سویه والد بودند. بیشترین میزان کوآنزیم Q10 توسط سویه U7 تولید شد که برابر با ۱۱/۹ میلی گرم بر لیتر بود که ۱/۴ برابر بیش از سویه والد بود. این سویه ظرفیت تولید معادل ۳/۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک را داشت. افزایش تولید سویه U7 در مقایسه با سویه های جهش یافته ای 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 جهش یافته ای به دست آمد که قادر به تولید ۲/۳ برابر بیش از سویه والد کوآنزیم Q10 بود (Moghadami et al. 2022). جهش یافته ای از باکتری *اگروباکتریوم تومفسینس* بیشترین مقدار کوآنزیم Q10 را تاکنون توانسته است تولید کند یعنی معادل ۷۷۰ میلی گرم بر لیتر (Sakato et al.

2019). این ماده جزء عوامل الکیله کننده محسوب می شود که جهش های نقطه ای ایجاد می کند و می تواند 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 ماوراء بنفش باعث ایجاد آسیب های اکسیداتیو در مولکول های زیستی مانند پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک و آنزیم ها می شود. اشعه ماوراء بنفش باعث ایجاد رادیکال های سمی اکسیژن شده و باعث تغییر در ساختار دی.ان.ا. به صورت جهش و دایمر تیمین می شود (Qi et al. 2014).

جهت تشخیص جهش یافته مناسب نیز از ماده ای که مشابه کوآنزیم Q10 است یعنی منادیون استفاده شد. منادیون که ویتامین K3 نیز خوانده می شود یک نفتوکوئینون محلول در چربی است. این ماده فقط دارای سر کوئینونی است و دنباله ایزوپروپونوئیدی را ندارد. منادیون فعالیت زیستی نداشته و در سلول های پستانداران به عنوان پیش ساز ویتامین K عمل می کند و می تواند به ویتامین K تبدیل شود. در باکتری ها از آنجایی که این ماده مشابه کوآنزیم Q10 است می تواند جایگزین آن در غشا باکتری شده و عمل تنفس را بلوکه کند سلول جهت مبارزه با این مشکل، تولید کوآنزیم Q10 را افزایش می دهد. از اینرو جهش یافته هایی که قادر به رشد در محیط کشت حاوی

"مقدمه و شکرزاده، جهش‌زایی توسط نیتروژوگوانیدین و اشعه ماوراء بنفش برای افزایش تولید کوآنزیم Q10..."

آن از تولید کوآنزیم Q10 توسط سویه اصلی نیز کمتر شد. به نظر می‌آید که از دست دادن قدرت تولید کوآنزیم Q10 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 Q10، 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 Q10 در سویه‌های جهش‌یافته بدون هیچ تغییری کماکان ادامه داشت.

تولید کوآنزیم Q10 توسط سویه‌های طبیعی که تاکنون مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، از ۳۰ تا ۱۳۰ میلی گرم در لیتر متغیر است (Cluis et al. 2007). تولید کوآنزیم Q10 توسط زیموناس موبیلیس که در این پژوهش انجام گرفت (۸/۴ میلی گرم بر لیتر) در مقایسه با سویه‌های مورد مطالعه در سایر پژوهش‌ها ناچیز بود. در این پژوهش تولید کوآنزیم Q10 توسط سویه‌های زیموناس با استفاده از راهکار جهش‌زایی، بهبود یافت و به ۱۱/۹ میلی گرم در لیتر رسید. در واقع راندمان تولید ۱/۴ برابر افزایش یافت. میزان زیست‌توده کم در باکتری زیموناس از مشکلات استفاده از این سویه‌ها برای تولید کوآنزیم Q10 است.

1997). جهش‌یافته دیگری از باکتری رودواسپریلیوم /سفرئیدس که فاقد توانایی تولید کارتنوئید بوده، قادر است ۳۵۰ میلی گرم بر لیتر در شرایط هوادهی محدود، کوآنزیم Q10 تولید کند که ۲/۸ برابر سویه والد است (Ndikubwimana et al. 2014). جهش‌یافته دیگری از باکتری /اگروباکتریوم تومفسینس قادر به تولید ۴۵۸ میلی گرم بر لیتر کوآنزیم Q10 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 Q10 اثر گذاشته و آن را کم می‌کند. با استفاده از جهش این مشکل مرتفع شد به‌طوری‌که بعضی از جهش‌یافته‌ها ۳-۶ برابر کاهش ویسکوزیته داشتند (Tokdar et al. 2013). جهش‌یافته مقاوم به L-اتونین از باکتری /اگروباکتریوم تومفسینس قادر است ۱۸۰ میلی گرم بر لیتر کوآنزیم Q10 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 Q10 در جهش‌یافته‌هایی از گلوکونوباکتر /اکسیدانس، بعد از ۲ نسل کاهش یافت و تولید کوآنزیم Q10 توسط

زیست توده تولیدی توسط باکتری *زیموموناس* در
کوانزیم Q₁₀ استفاده کرد، می توان میزان
مقایسه با سایر باکتری ها اندک است. اگر بتوان
زیست توده پایین و راندمان کم تولید کوانزیم Q₁₀
ضایعات زیست توده در صنعت تولید بیوسوخت و
توسط سویه های *زیموموناس* را جبران کرد.
اتانول توسط سویه های *زیموموناس* را برای تولید

References

فهرست منابع

- 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

"مقدمه و شکرزاده، جهش‌زایی توسط نیتروژوگوانیدین و اشعه ماوراء بنفش برای افزایش تولید کوآنزیم Q10..."

- 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-aeration 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.

Mutagenesis by Nitrosoguanidine and UV to Increase Coenzyme Q₁₀ Production by *Zymomonas mobilis*

Foozieh Moghadami^{1*} and Leila Shokrzadeh²

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 Q₁₀ production. The results showed that the amount of coenzyme Q₁₀ 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 Q₁₀ 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 Q₁₀, Nitrosoguanidine, UV.