

افزایش تولید کوآنزیم Q₁₀ توسط *Gluconobacter oxydans* H621 از راه جهش شیمیایی و بررسی اثر جهش زایی نیتروزوگوانیدین با استفاده از روش سطح پاسخ

فوزیه مقدمی^{۱*}، مهدی کلانتری^۲

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲- گروه آمار، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

*نویسنده مسئول : صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۶۹۷

ایمیل: fmoghadami@pnu.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۹

دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۲

چکیده

ایجاد جهش در سویه‌های میکروبی برای افزایش تولید کوآنزیم Q₁₀ یکی از راهکارهای موفق برای توسعه سویه می‌باشد. از این رو در این پژوهش تولید کوآنزیم Q₁₀ به وسیله *Gluconobacter oxydans* H621 از راه ایجاد جهش شیمیایی با ماده نیتروزوگوانیدین با استفاده از روش سطح پاسخ بررسی شده است. برای ایجاد جهش از ماده نیتروزوگوانیدین در غلظت‌ها (۲/۷۹ - ۴/۲۱ میلی گرم بر میلی لیتر) و زمان‌های مختلف تیمار (۳۳/۱۲ - ۱۱/۸۹ دقیقه) استفاده شد که به وسیله یک طرح مرکب مرکزی طراحی شده بود. تشخیص سویه‌های جهش یافته از راه قابلیت رشد در محیط حاوی ۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر منادیون انجام گرفت. سپس سویه‌های جهش یافته از لحاظ تولید کوآنزیم Q₁₀ و وزن خشک سلولی بررسی شدند. نتایج نشان داد که در غلظت ۴ میلی گرم بر میلی لیتر از نیتروزوگوانیدین و بالاتر هیچ سویه جهش یافته‌ای حاصل نشد. بیشترین تعداد کلنی‌های جهش یافته در غلظت ۲/۷۹ میلی گرم بر میلی لیتر از نیتروزوگوانیدین و زمان تیمار ۲۲/۵ دقیقه به دست آمد. همین طور مشخص شد که غلظت نیتروزوگوانیدین بر جهش زایی مؤثر بود ولی زمان تیمار کردن تأثیر چندانی نداشت. سویه جهش یافته‌ای که قادر به تولید بیشترین مقدار کوآنزیم Q₁₀ بود، ۵/۲ میلی گرم بر لیتر تولید داشت که ۲/۲ برابر بیشتر از سویه والدینی بود. براساس نتایج این پژوهش، نتیجه‌گیری می‌شود که با القای جهش به وسیله نیتروزوگوانیدین می‌توان در سویه *Gluconobacter oxydans* H621 سویه‌های جهش یافته‌ای را ایجاد کرد که قادر به تولید کوآنزیم Q₁₀ بیشتری نسبت به سویه والدینی باشند.

کلیدواژگان: کوآنزیم Q₁₀، جهش، روش سطح پاسخ، نیتروزوگوانیدین، *Gluconobacter*

۱- مقدمه

کوانزیم Q10 تنها آنتی اکسیدان محلول در لیپیدها است که به وسیله انسان تولید می شود و تقریباً در همه غشاهای از غشای میتوکندری تا لیپوپروتئین های با چگالی بسیار کم یافت می شود. این مولکول می تواند از لیپوپروتئین ها و لیپیدها در برابر پراکسیداسیون و آسیب اکسیداتیو محافظت کند [۱]. کوانزیم Q10 در کنار آنتی اکسیدان های دیگری مانند ویتامین C و E، با رادیکال های آزاد تولید شده از واکنش های میتوکندریایی مقابله می کند. با توجه به عملکردهای بی شمار و اهمیت فیزیولوژیکی آن، جای تعجب نیست که کمبود کوانزیم Q10 می تواند منجر به بیماری های زیادی شود. کوانزیم Q10 در سایر فرایندهای فیزیولوژیکی، از جمله اکسیداسیون سولفید، تنظیم نفوذپذیری منافذ میتوکندری و انتقال پروتون ها و یون کلسیم از خلال غشاهای بیولوژیکی نقش دارد [۲]؛ [۳]. طیف وسیعی از کاربردها برای کوانزیم Q10 در صنایع دارویی و آرایشی سبب شده است که تمایل زیادی برای تولید آن در مقیاس انبوه وجود داشته باشد. در اواخر دهه ۱۹۵۰، فردریک کرین برای اولین بار توانست کوانزیم Q10 را از یک قلب گاو جدا کند. از آن زمان به بعد، تلاش های صنعتی برای تولید کوانزیم Q10 بر سه روش استخراج از بافت حیوانی، سنتز نیمه شیمیایی و تخمیر میکروبی استوار بوده است [۴]. در روش تخمیر میکروبی، تاکنون سویه های مختلفی سنجش و بررسی شده اند. مقدار تولید کوانزیم Q10 به وسیله سویه های وحشی به طور عمده چشمگیر نمی باشد. از این رو راهکارهایی مختلفی برای افزایش تولید کوانزیم Q10 به وسیله این میکروارگانیسم ها استفاده شده است [۵]. برخی از این راهکارها شامل ایجاد جهش در سویه های تولیدکننده، افزودن پیش سازهای مناسب به محیط کشت باکتری های تولیدکننده، مهندسی متابولیک و بیان ژن های تولیدکننده کوانزیم Q10 در باکتری های میزبان مانند *E.coli* و

در نهایت بهبود عملکرد تولید کوانزیم Q10 از راه بهبود شرایط رشد می باشد [۶].

ایجاد جهش در سویه ها برای افزایش تولید کوانزیم Q10 یکی از راه های موفق برای توسعه سویه جهت مقاصد صنعتی است. تشخیص سویه های جهش یافته ای که تولید کوانزیم Q10 در آنها افزایش یافته است، از راه های مختلفی انجام می گیرد. از آن جایی که کوانزیم Q10 جزئی از زنجیره تنفسی می باشد، افزودن مهارکننده های تنفس و یا مهارکننده های مسیر بیوستز کوانزیم Q10 می تواند از رشد باکتری جلوگیری کند. بنابراین باید سویه های جهش یافته ای را جستجو کرد که بتواند مقادیر بالاتری از کوانزیم Q10 را تولید کرده و در محیط کشت حاوی این مهارکننده ها رشد کند [۷].

در این پژوهش تولید کوانزیم Q10 در *Gluconobacter oxydans* H621 از راه ایجاد جهش شیمیایی با ماده نیتروزوگوانیدین با استفاده از روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت تا علاوه بر دستیابی به یک سویه جهش یافته که قادر به تولید مقادیر بیشتری از کوانزیم Q10 نسبت به سویه والدینی باشد، بتوان میزان تأثیر هر یک از عوامل مؤثر در ایجاد جهش شیمیایی (غلظت ماده جهش زا و زمان تیمار کردن) را مورد تحلیل آماری قرار داد.

۲- مواد و روش ها

میکروارگانیسم و محیط های کشت: باکتری استفاده شده در این پژوهش، *Gluconobacter oxydans* H621 از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی (PTCC) خریداری شد. این سویه بر محیط کشت GYC (گلوکز ۵۰ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۱۰ گرم بر لیتر، کربنات کلسیم ۳۰ گرم بر لیتر و آگار ۲۵ گرم بر لیتر) به مدت ۲-۳ ماه در دمای یخچال قابلیت نگهداری داشت و برای نگهداری طولانی مدت آن از دمای ۷۰- درجه سانتیگراد استفاده شد. محیط پیش کشت حاوی ۲۰ گرم بر لیتر

سوربیتول، ۳ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۳ گرم بر لیتر پپتون و محیط کشت تولید حاوی ۱۱۰ گرم بر لیتر سوربیتول، ۲۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۳۵ گرم بر لیتر پپتون، ۰/۵ گرم بر لیتر KH_2PO_4 و ۰/۵۵ گرم بر لیتر MgSO_4 بود [۸]. همه آزمایش‌ها در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت با pH ۶/۵ انجام شد. پس از تلقیح، فلاسک‌ها به مدت ۴۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۸۰ rpm در انکوباتور نگهداری شدند. کوآنزیم Q10 بعد از ۴۰ ساعت در آغاز فاز سکون استخراج شد.

بافر جهش‌زایی: ترکیب‌های بافر استفاده‌شده در این پژوهش با نام بافر جهش‌زایی به این صورت می‌باشد: ۱۲۵ میلی‌گرم KH_2PO_4 ، ۱۲۲ میلی‌گرم K_2HPO_4 ، ۴۲ میلی‌گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۶ میلی‌گرم $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۴۸ میلی‌گرم FeCl_3 ، ۰/۶ میلی‌گرم $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۲ میلی‌گرم $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۱۳۴ میلی‌گرم NH_4Cl و ۱ لیتر آب مقطر با pH برابر با ۶/۵ [۹].

جهش‌زایی: برای ایجاد جهش در سویه H621 از ماده جهش‌زای نیتروزوگوانیدین یا (N-methyl-) NTG ($\text{N}'\text{-nitro-N-nitrosoguanidine}$) استفاده شد. به این منظور ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت ۱۸ ساعته باکتری که در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد رشد کرده است، استفاده شد و با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از جداکردن رسوب سلولی، ۲ بار با بافر جهش‌زایی شستشو داده شد. پس از شستشو، باکتری‌ها با غلظت نیم مک فارلند در بافر جهش‌زایی، سوسپانسیون شدند. پس از تهیه سوسپانسیون باکتری، غلظت‌های مختلفی از نیتروزوگوانیدین در زمان‌های مختلف تأثیرگذاری براساس طرح مرکب مرکزی به روش سطح پاسخ استفاده شدند (جدول ۱). سپس واکنش به‌وسیله رقیق کردن سوسپانسیون به نسبت ۱:۱۰ با آب متوقف شد. بعد از این مرحله، ۲ بار شستشو با بافر جهش‌زایی انجام شد و در نهایت رسوب باکتری دوباره در بافر جهش‌زایی

سوسپانسیون شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون را به لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت پیش‌کشت که حاوی ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از منادیون بود، اضافه شد. لوله‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محتوای لوله‌ها به پلیت‌های GYC منتقل و کشت داده شد. بعد از ۷۲ ساعت، پلیت‌ها جهت رشد سویه‌های جهش‌یافته بررسی شدند. کلنیک‌هایی که قادر به رشد در پلیت‌ها بودند، به‌عنوان جهش‌یافته مناسب انتخاب شدند و تولید کوآنزیم Q10 در آنها بررسی شد [۹].

استخراج و سنجش کوآنزیم Q10: برای استخراج کوآنزیم Q10 نخست ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت ۴۰ ساعته production culture با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا سلول‌ها جدا شوند سپس با آب مقطر شستشو داده و ۴۵۰ میکرولیتر از محلول cell lytic B افزوده و نیم‌ساعت در دمای اتاق نگهداری شد تا سلول‌ها شکسته شوند. عمل استخراج در دو مرحله انجام شد. به این صورت که نخست ۹۰۰ میکرولیتر از حلال هگزان-۲ پروپانول با نسبت ۳-۵ به پلت حاصل از سانتریفیوژ افزوده و پس از ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ، بخش بالایی حاوی کوآنزیم Q10 به تیوب‌های تمیز منتقل شد. سپس تیوب‌ها در معرض هوای آزاد و دمای آزمایشگاه قرار داده شدند تا حلال‌ها بخار شده و پودر حاوی کوآنزیم Q10 باقی بماند. برای سنجش کوآنزیم Q10، پودر حاصل را در ۵۰۰ میکرولیتر اتانول HPLC grade حل کرده و ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC (Agilent 1120, USA) تزریق شد.

ستون استفاده‌شده Thermo scientist C18 با ابعاد (250 mm × 4.5 mm × 5 μm) متصل‌شده به دکتور UV 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 [۱۰]. برای ترسیم

منحنی استاندارد، نمونه کوآنزیم Q10 استاندارد نیز با شماره CAS ۳۰۳-۹۸-۰ و مخصوص HPLC با درجه خلوص بالای ۹۸ درصد از شرکت سیگما-آلدریچ خریداری و استفاده شد.

تعیین وزن خشک سلولی و ظرفیت ویژه کوآنزیم Q10: همزمان با استخراج کوآنزیم Q10، ۱ میلی لیتر از محیط کشت را نیز جهت تعیین وزن خشک سلولی با سرعت ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ کرده تا سلول‌ها جدا شوند. پس از شستشو، سلول‌ها درون آون با دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. ظرفیت ویژه تولید، مقدار کوآنزیم Q10 را در هر گرم از وزن خشک سلولی نشان می‌دهد. برای محاسبه ظرفیت ویژه کوآنزیم Q10 کافی است تا مقدار کوآنزیم Q10 را بر وزن خشک سلولی تقسیم کرد [۸].

آنالیز آماری: به منظور بررسی اثر جهش‌زایی نیتروزوگوانیدین، از روش سطح پاسخ (RSM) با طرح

مرکب مرکزی شامل دو عامل استفاده شد. این عوامل که به عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته می‌شوند، عبارتند از غلظت نیتروزوگوانیدین (NTG) و زمان تیمار کردن (Time). تعداد کلنی‌های شمارش شده (Colony Count) در پلیت‌های حاوی منادیون نیز به عنوان متغیر پاسخ در نظر گرفته شد. تمام تحلیل‌های آماری مربوط به RSM از جمله پیاده‌سازی طرح مرکب مرکزی و تحلیل واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار Minitab ویرایش ۱۷/۱ انجام شد [۱۱]. در جدول ۱، سطوح مختلف متغیرهای مستقل در طرح مرکب مرکزی نشان داده شده‌اند. جدول ۲ نیز داده‌های مربوط به ۱۳ آزمایش انجام شده به کمک طرح مرکب مرکزی را که برای تحلیل‌های آماری به کار برده شده است، نشان می‌دهد. لازم به ذکر است که تمام آزمون‌های آماری مربوط به ANOVA و ضرایب رگرسیونی در سطح ۰/۰۵ انجام شده است.

جدول ۱ سطوح مختلف متغیرهای مستقل در طرح مرکب مرکزی

سطوح					متغیرها
۱/۴۱۶۲۱	۱	۰	-۱	-۱/۴۱۶۲۱	
۴/۲۱	۴	۳/۵	۳	۲/۷۹	غلظت NTG (mg/mL)
۳۳/۱۲	۳۰	۲۲/۵	۱۵	۱۱/۸۹	زمان (دقیقه)

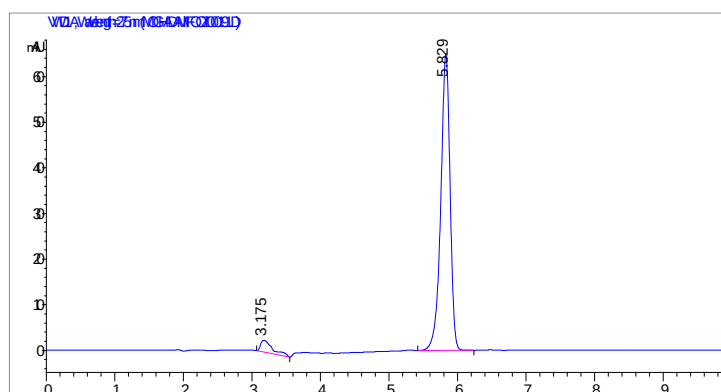
جدول ۲ مقادیر متغیرهای مستقل و پاسخ در طرح مرکب مرکزی

شماره اجرا	غلظت NTG (mg/mL)	زمان (دقیقه)	تعداد کلنی
۱	۳/۵	۲۲/۵	۸
۲	۳	۱۵	۲۰
۳	۳/۵	۲۲/۵	۱۰
۴	۳/۵	۲۲/۵	۱۱
۵	۴	۳۰	۰
۶	۳/۵	۲۲/۵	۵
۷	۳/۵	۳۳/۱۲	۸
۸	۳/۵	۲۲/۵	۹
۹	۴/۲۱	۲۲/۵	۰
۱۰	۳	۳۰	۲۳
۱۱	۳/۵	۱۱/۸۹	۱۲
۱۲	۲/۷۹	۲۲/۵	۳۱
۱۳	۴	۱۵	۰

۳- نتایج

سنجش کوآنزیم Q₁₀: تولید کوآنزیم Q₁₀ در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت با pH ۶/۵ و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۸۰ rpm انجام شد. سپس کوآنزیم Q₁₀ استخراج شد. پس از ترسیم منحنی استاندارد کوآنزیم Q₁₀، میزان تولید کوآنزیم Q₁₀ به‌وسیله سویه‌های جهش‌یافته به دست آمد. شناسایی

کوآنزیم Q₁₀ به‌وسیله دستگاه HPLC و در طول موج ۲۷۵ نانومتر انجام گرفت. شکل ۱ کروماتوگرام آنالیز HPLC برای کوآنزیم Q₁₀ استاندارد را نشان می‌دهد که از شرکت Sigma-Aldrich خریداری شد. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، پیک کوآنزیم Q₁₀ استاندارد در زمان بازداری ۵/۸ دقیقه ترسیم شده است.



شکل ۱ کروماتوگرام آنالیز HPLC برای کوآنزیم Q₁₀ استاندارد. پیک موجود در زمان بازداری ۵/۸ دقیقه نشان‌دهنده کوآنزیم Q₁₀ است. کوآنزیم Q₁₀ استاندارد از شرکت Sigma-Aldrich با CAS number: 303-98-0 ($\geq 98\%$ - HPLC)

انتخاب جهش‌یافته مناسب: با انجام جهش با غلظت‌ها و زمان‌های مختلف تیمار بر سویه H621، درنهایت ۱۳۷ کلنی جهش‌یافته به دست آمد (جدول ۲). به دلیل تعداد زیاد کلنی‌های جهش‌یافته، امکان بررسی تولید کوآنزیم Q₁₀ در تک‌تک آنها وجود نداشت. از این رو ۲۰ سویه به‌صورت تصادفی انتخاب شدند و تولید کوآنزیم Q₁₀ به‌وسیله آنها سنجش شد. جدول ۳ میزان

کوآنزیم Q₁₀ و ظرفیت ویژه تولید کوآنزیم Q₁₀ تولیدشده به‌وسیله ۲۰ سویه جهش‌یافته انتخابی را نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول قابل مشاهده است، مقادیر کوآنزیم Q₁₀ تولیدشده به‌وسیله برخی از سویه‌های جهش‌یافته تفاوت چندانی با سویه والدینی نداشتند. بیشترین میزان کوآنزیم Q₁₀ به‌وسیله سویه M12 تولید شد که برابر با ۵/۲ میلی‌گرم بر لیتر بود.

جدول ۳ میزان کوآنزیم Q₁₀ و ظرفیت ویژه تولید کوآنزیم Q₁₀ تولیدشده به‌وسیله سویه‌های جهش‌یافته

ظرفیت ویژه تولید کوآنزیم Q ₁₀ (mg/gDCW)	کوآنزیم Q ₁₀ (mg/l)	سویه جهش‌یافته
۰/۵۰	۲/۳ ± ۰/۰۳	سویه H621
۰/۸۳	۴/۴ ± ۰/۰۲	M1
۰/۹۸	۴/۵ ± ۰/۱۲	M2
۰/۴۳	۲/۳ ± ۰/۰۲	M3

۰/۷۰	$\pm 3/3 \ 0/23$	M4
۰/۰۴	$1/5 \pm 0/03$	M5
۰/۶۵	$3/4 \pm 0/21$	M6
۰/۴۵	$2/7 \pm 0/04$	M7
۰/۰۴	$0/17 \pm 0/09$	M8
۰/۷۷	$4/3 \pm 0/02$	M9
۰/۴۶	$2/9 \pm 0/04$	M10
۰/۵۰	$2/7 \pm 0/08$	M11
۱/۲۱	$5/2 \pm 0/2$	M12
۰/۵۰	$2/7 \pm 0/1$	M13
۰/۵۷	$3/4 \pm 0/09$	M14
۰/۴۷	$3/0 \pm 0/04$	M15
۱/۱	$4/8 \pm 0/2$	M16
۰/۱۰	$0/29 \pm 0/2$	M17
۰/۰۴	$0/27 \pm 0/1$	M18
۰/۵۰	$2/7 \pm 0/03$	M19
۰/۵۴	$3/3 \pm 0/03$	M20

ها نشان دهنده ضرایب اثرهای خطی هستند. در مدل بالا b_{ij} ها و b_{ii} ها به ترتیب نشان دهنده ضرایب اثرهای توان دوم و ضرایب اثرهای متقابل هستند.

به منظور بررسی اثر جهش‌زایی نیتروزوگوانیدین با استفاده از روش سطح پاسخ، مدل رگرسیونی به دست آمد که در آن NTG و Colony Count به ترتیب نشان دهنده غلظت نیتروزوگوانیدین و تعداد کلنی است. براساس معادله به دست آمده زمان تیمار کردن بر جهش‌زایی بی تأثیر بوده و فقط غلظت نیتروزوگوانیدین مؤثر است:

$$\text{Colony Count} = 8/339 - 10/855 \text{ NTG} + 2/924 (\text{NTG})^2$$

در جدول ۴، نتایج مربوط به ANOVA مدل رگرسیونی با متغیر مستقل غلظت نیتروزوگوانیدین نشان داده شده است. با مقایسه P-Value با سطح معناداری ۰/۰۵ می‌توان نتیجه گرفت که اثر خطی و مربعی متغیر مستقل غلظت نیتروزوگوانیدین از نظر آماری معنادار

پایداری سویه‌های جهش یافته: همه ۲۰ سویه بررسی در فریزر -۷۰ درجه سانتیگراد ذخیره‌سازی شدند. پس از ذخیره‌سازی، تولید کوآنزیم Q10 به وسیله سویه M12 دوباره طی سه نسل بررسی شد. تولید کوآنزیم Q10 در سویه M12 بعد از نسل دوم به طور چشمگیری کاهش پیدا کرد و به ۳/۲ میلی گرم بر لیتر رسید.

آنالیز آماری: برای بررسی آماری اثر غلظت نیتروزوگوانیدین و زمان تیمار بر جهش‌زایی در سویه H621، از روش آماری سطح پاسخ استفاده شد. پس از انجام ۱۳ آزمایش، ۱۳۷ کلنی جهش یافته به دست آمد که برای ۳ آزمایش هیچ کلنی به دست نیامد (جدول ۲). مدل رگرسیونی به کاررفته در RSM به صورت زیر است:

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ii} X_i^2 + \sum_i \sum_j b_{ij} X_i X_j$$

وقتی که Y متغیر پاسخ بوده و X_i ها متغیرهای مستقل یا همان عوامل هستند. b_0 جمله ثابت بوده و b_i

هستند ($P\text{-value} > 0.05$). بنابراین عامل غلظت نیتروزوگوانیدین در تعداد کلنی‌ها تأثیرگذار است. لازم به ذکر است که مقدار ضریب تعیین تعدیل یافته مدل رگرسیونی برابر با ۹۵/۱۷ درصد است و نشان‌دهنده قدرت بالای آن در مدل‌سازی و برازش داده‌ها است.

جدول ۴ جدول ANOVA با متغیر مستقل نیتروزوگوانیدین

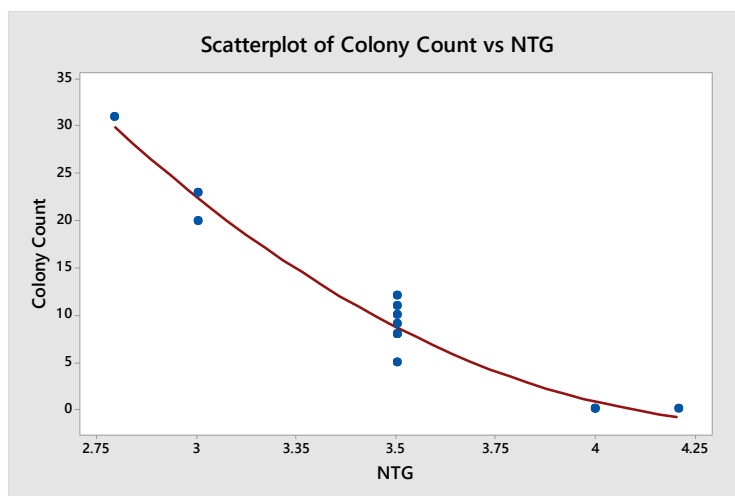
منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات تصحیح شده	میانگین مربعات تصحیح شده	F-Value	P-Value
مدل	۲	۱۰۳/۱۶	۵۱/۵۸۲	۱۱۹/۲۴	۰/۰۰۰
خطی	۱	۹۴۲/۶۶	۹۴۲/۶۶۲	۲۲۴/۰۹	۰/۰۰۰
NTG	۱	۹۴۲/۶۶	۹۴۲/۶۶۲	۲۲۴/۰۹	۰/۰۰۰
مربعی	۱	۶۰/۵	۶۰/۵۰۳	۱۴/۳۸	۰/۰۰۴
(NTG) ^۲	۱	۶۰/۵	۶۰/۵۰۳	۱۴/۳۸	۰/۰۰۴
خطا	۱۰	۴۲/۰۷	۴/۲۰۷		
عدم برازش	۶	۲۰/۸۷	۳/۴۷۸	۰/۶۶	۰/۶۹۳
خطای خالص	۴	۲۱/۲	۵/۳		
کل	۱۲	۱۰۴۵/۲۳			

می‌شود. این موضوع در شکل ۲ به وضوح قابل رؤیت است. در این شکل، نمودار پراکنش تعداد کلنی در مقابل غلظت نیتروزوگوانیدین به همراه منحنی مربوط به مدل رگرسیونی رسم شده است. شکل ۳ اثر همزمان غلظت نیتروزوگوانیدین و زمان‌های مختلف تیمار بر تعداد کلنی‌های حاصل را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، اثر متقابل غلظت نیتروزوگوانیدین و زمان‌های مختلف تیمار، از نظر آماری معنادار نیستند؛ یعنی عامل زمان در تعداد کلنی‌ها بی‌تأثیر می‌باشد.

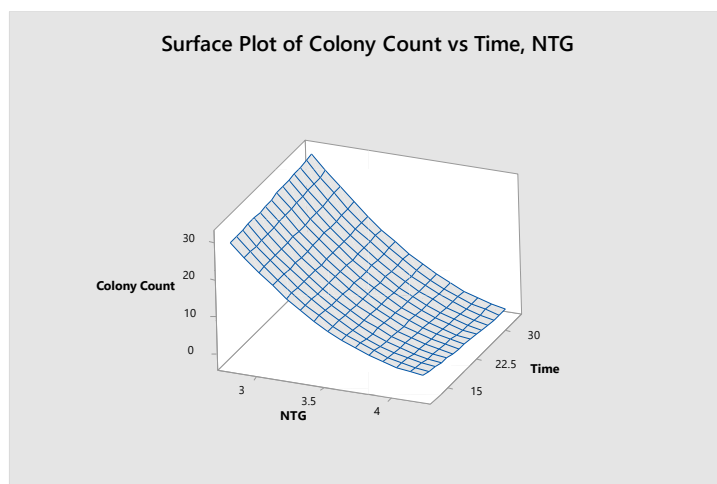
در جدول ۵ مقدار برآورد ضرایب مدل رگرسیونی، به همراه T-Value و P-Value نشان داده شده است. مقادیر P-Value این جدول نیز تأیید می‌کند که همه ضرایب مدل رگرسیونی از نظر آماری معنادار هستند ($P\text{-value} < 0.05$). نکته قابل توجه در مدل رگرسیونی این است که ضریب نیتروزوگوانیدین منفی بوده ولی ضریب توان دوم این متغیر، مثبت است. این به آن معنا است که با افزایش غلظت نیتروزوگوانیدین، تعداد کلنی کاهش پیدا می‌کند ولی شدت این کاهش ثابت نبوده و به تدریج کم

جدول ۵ برآورد ضرایب رگرسیونی

مؤلفه	ضریب	خطای معیار ضریب	T-Value	P-Value
ثابت	۸/۷۳۹	۰/۷۴۱	۱۱/۸	۰/۰۰۰
NTG	-۱۰/۸۵۵	۰/۷۲۵	-۱۴/۹۷	۰/۰۰۰
(NTG) ^۲	۲/۹۲۴	۰/۷۷۱	۳/۷۹	۰/۰۰۴



شکل ۲. نمودار پراکنش تعداد کلنی در مقابل غلظت نیتروزوگوانیدین به همراه منحنی رگرسیون



شکل ۳. نمودار اثر همزمان غلظت نیتروزوگوانیدین و زمان های مختلف تیمار بر تعداد کلنی های حاصل

۴- بحث

با اتم‌های آهن [۱۵؛ ۱۶]، پرتوافکنی یون‌های کم‌انرژی با یون‌های نیتروژن [۱۷] و جهش شیمیایی [۹؛ ۱۸]. در ایجاد جهش در باکتری‌ها برای افزایش تولید کوآنزیم Q₁₀ در اغلب موارد از ماده نیتروزوگوانیدین استفاده شده است [۱۹؛ ۲۰]. این ماده جزء عوامل الکيله‌کننده محسوب می‌شود که جهش‌های نقطه‌ای ایجاد می‌کند و با انتقال گروه متیل بر بازهای مختلف سبب جفت‌شدن اشتباهی بازها با یکدیگر می‌شود [۲۱]. این ماده در جهش سويه‌های *Gluconobacter* نیز برای افزایش تولید دی هیدروکسی استن [۲۲]، تارتاریک اسید [۲۳] و

یکی از راهکارهای موفق برای توسعه سويه جهت مقاصد صنعتی جهش‌زایی در آنها می‌باشد. هنوز مشخص نشده است که چرا سويه‌های جهش‌یافته قادرند کوآنزیم Q₁₀ بیشتری تولید کنند، زیرا ۲۲ ژن در مسیر تولید کوآنزیم Q₁₀ به‌وسیله باکتری‌ها وجود دارد و معلوم نیست که جهش‌ها روی کدام یک از ژن‌ها تأثیر می‌گذارند [۱۲]. برای جهش‌زایی در باکتری‌ها به‌منظور افزایش تولید کوآنزیم Q₁₀، روش‌های مختلفی تاکنون به کار رفته است، مانند استفاده از اشعه UV [۱۳]، اشعه گاما [۱۴]، بمباران

آسکوربیک اسید [۱۵] استفاده شده است. از این رو در این پژوهش نیز برای ایجاد جهش شیمیایی در سویه H621 جهت افزایش تولید کوآنزیم Q₁₀ از نیتروزوگوانیدین استفاده شد. برای تشخیص سویه‌های جهش‌یافته مناسب نیز از منادیون (ویتامین K₃) که آنالوگ کوآنزیم Q₁₀ است، استفاده شد. این ماده می‌تواند جایگزین کوآنزیم Q₁₀ در غشای باکتری شده و عمل تنفس را بلوکه کند. از این رو کلنی‌های رشد کرده در محیط منادیون معمولاً جهش‌هایی را حاصل کرده‌اند که توانایی تولید کوآنزیم Q₁₀ را بیش از سویه والدینی در آنها به وجود آورده است [۹؛ ۱۸].

مشخص شده است که شرایط تیمار کردن اثر عمده‌ای بر جهش‌زایی دارد. فاکتورهایی از قبیل pH، ترکیب بافر، غلظت ماده جهش‌زا، زمان تیمار کردن و مرحله رشدی میکروارگانیسم ممکن است تأثیر زیادی بر بازده این فرایند داشته باشد [۲۴]. از این رو در این پژوهش تولید کوآنزیم Q₁₀ به وسیله سویه H621 از راه ایجاد جهش شیمیایی با ماده نیتروزوگوانیدین با استفاده از روش سطح پاسخ بررسی شد تا علاوه بر دستیابی به یک سویه جهش‌یافته (که قادر به تولید مقادیر بیشتری از کوآنزیم Q₁₀ نسبت به سویه والدینی باشد) بتوان میزان تأثیر عوامل مؤثر در ایجاد جهش شیمیایی، یعنی غلظت ماده جهش‌زا و زمان تیمار کردن را مورد تحلیل آماری قرار داد. در بررسی اثر نیتروزوگوانیدین بر جهش‌زایی سویه H621، معادله رگرسیونی به دست آمده نشان داد که استفاده از غلظت‌های مختلف نیتروزوگوانیدین بر جهش‌زایی یا تعداد کلنی‌های جهش‌یافته که قادرند در محیط کشت حاوی منادیون رشد کنند، تأثیر چشمگیری دارد. اما استفاده از زمان‌های مختلف تیمار کردن بر جهش‌زایی بی‌تأثیر بود.

در بین جهش‌یافته‌های حاصل، سویه M12 بیشترین مقدار تولید کوآنزیم Q₁₀ را داشت. این جهش‌یافته قادر به تولید ۵/۲ میلی گرم بر لیتر کوآنزیم Q₁₀ بود. تولید

کوآنزیم Q₁₀ در این جهش‌یافته، ۲/۲ برابر بیش از سویه والدینی بود. اگرچه جهش در این سویه سبب افزایش تولید کوآنزیم Q₁₀ شد ولی تولید آن در مقایسه با سویه‌های جهش‌یافته‌ای که در پژوهش‌های دیگر به دست آمده است، بسیار اندک است. بیشترین مقدار کوآنزیم Q₁₀ که تاکنون از راه جهش به دست آمده است، برابر با ۷۷۰ میلی گرم بر لیتر است که به وسیله سویه جهش‌یافته‌ای از *A.tumefaciens* تولید شده است. این بازده بر اثر بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری از جمله منبع کربن و نیتروژن و پتانسیل اکسید و احیا در فرماتور fed-batch با حجم ۸۰ هزار لیتر بعد از ۱۵۰ ساعت به دست آمد [۲۵؛ ۲۶]. جهش‌یافته دیگری با نام *R.sphaeroides* KY4113 قادر است ۳۵۰ میلی گرم بر لیتر در شرایط هوادهی محدود، کوآنزیم Q₁₀ تولید کند که ۲/۸ برابر سویه والدینی می‌باشد. این سویه قدرت تولید رنگدانه‌های خود را که جزء آنتی‌اکسیدان‌های آن محسوب می‌شود، از دست داده و از این رو با افزایش تولید کوآنزیم Q₁₀ کمبود رنگدانه‌ها را جبران می‌کند [۲۷]. سویه *A.tumefaciens* ATCC4452 در زمان تولید کوآنزیم Q₁₀ مقادیر زیادی پلی‌ساکارید خارج سلولی تولید می‌کرد که سبب افزایش ویسکوزیته محیط کشت شده و در نهایت بر عملیات استخراج تأثیر منفی می‌گذاشت. جهش‌یافته‌هایی از این سویه به دست آمد که در حدود ۳-۶ برابر کمتر محیط کشت خود را ویسکوز می‌کردند و سبب افزایش استخراج کوآنزیم Q₁₀ می‌شدند [۱۲]. جهش‌یافته دیگری از *A.tumefaciens* KA-3085 که M37 نام دارد و جهش‌یافته مقاوم به L-آتیونین می‌باشد، قادر است ۱۸۰ میلی گرم بر لیتر کوآنزیم Q₁₀، یعنی ۱/۸ برابر سویه والدینی تولید کند [۹]. جدول ۶ مقایسه میزان کوآنزیم Q₁₀ تولید شده به وسیله سویه‌های جهش‌یافته در دیگر مطالعه‌ها و پژوهش حاضر را نشان می‌دهد.

کوآنزیم Q₁₀ در سویه M12 در این پژوهش بعد از ۲ نسل کاهش پیدا کرد. به نظر می‌آید که ازدست‌دادن قدرت تولید کوآنزیم Q₁₀، با عمل واریشن (vriation) در این سویه مرتبط باشد که در جنس *Gluconobacter* به‌وفور دیده می‌شود.

از موارد دیگری که در مورد سویه‌های جهش‌یافته اهمیت دارد، پایداربودن سویه جهش‌یافته حاصل است. در پژوهشی که Yuan و همکارانش انجام دادند، سویه جهش‌یافته‌ای از *A.tumefaciens* که قادر به تولید ۱/۵ برابر کوآنزیم Q₁₀ بیشتر نسبت به سویه والدینی بود، بعد از ۱۰ نسل همچنان تولید ثابتی داشت [۱۸]. قدرت تولید

جدول ۶ میزان کوآنزیم Q₁₀ تولیدشده به‌وسیله سویه‌های جهش‌یافته در مطالعه‌های دیگر و پژوهش حاضر

سویه جهش‌یافته	کوآنزیم Q ₁₀ (mg/l)	ظرفیت ویژه تولید (mg/l DCW)	چند برابر	رفرنس
<i>R.spheroides</i> KY-8598	۷۷۰	۱۴/۵	-	Sakato 1992
<i>A.tumefaciens</i> KCCM 10413	۴۵۸	۸/۵	-	Ha 2007
<i>R.spheroides</i> Co-22-11	۳۴۶	۸/۷	۲/۶	Yoshida 1998
<i>A.tumefaciens</i> AU-55	۱۸۵	۵	۲	Yoshida 1998
<i>A.tumefaciens</i> M-37	۱۸۰	۴/۵	۱/۸	Yoshida 1998
<i>A.tumefaciens</i> KY-8593	۷۵	-	۱/۲	Kuratsu 1985
<i>G.oxydans</i> H621-M12	۵/۲	۱/۲	۲/۲	پژوهش حاضر

Cell Fact (2017) 16:39. DOI 10.1186/s12934-017-0646-4

[5] Kapoor P, Kapoor Kh (2013) Coenzyme Q10-a novel molecule. JIASM 14(1): 37-45

[6] Choi JH, Ryu YW, Seo JH (2005) Biotechnological production and applications of coenzyme Q₁₀. Appl Microbiol Biotechnol 68:9-15. Doi: 10.1007/s00253-005-1946-x

[7] Cluis CP, Pinel D, Martin VJ (2012) The Production of coenzyme Q₁₀ in microorganisms. Subcell Biochem 64:303-26. doi: 10.1007/978-94-007-5055-5_15.

[8] Moghadami F (2020) The Effect of Pepper Extract on Coenzyme Q₁₀ Production by *Gluconobacter japonicus* FM10. Modares J Biotechnol. Accepted

[9] Yoshida H, Kotani Y, Ochiai K, Araki K (1998) Production of ubiquinone-10 using bacteria. J General and Appl Microbiol 44 (1): 19-26

[10] Cluis CP, Ekins A, Narcross L, Jiang H, Gold ND, Burja AM, Martin VJJ (2011) Identification of bottlenecks in *E.coli*

سپاسگزاری: با سپاس فراوان از گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی دانشگاه الزهرا درخصوص امکانات مرتبط با دستگاه HPLC.

۵- منابع

[1] Mu F, Luo M, Fu Y, Zhang X, Yu P, Zu Y. Synthesis of the key intermediate of coenzyme Q₁₀. Molecules. 2011; 16:4097–103

[2] Kobori Y, Ota S, Sato R, Yagi H, Soh S, Arai G, Okada H. Antioxidant cosupplementation therapy with vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q₁₀ in patients with oligoasthenozoospermia. Arch Ital Urol Androl. 2014; 86:1–4

[3] Bogeski I, Gulaboski R, Kappl R, Mirceski V, Stefova M, Petreska J, Hoth M. Calcium binding and transport by coenzyme Q. J Am Chem Soc. 2011;133:9293–303.

[4] Sean Qiu En Lee, Tsu Soo Tan, Makoto Kawamukai Ee Sin Chen. Cellular factories for coenzyme Q₁₀ production. Lee et al. Microb

- Components on the Formation of Coenzyme Q Homologs by *Pseudomonas* N842 and Mutants. Agric. BioI. Chem. 45 (10): 2175-2182
- [20] Kuratsu Y, Sakurai M, Hagino H. Inuzuka K (1984) Productivity and Colony Morphology Associated with Coenzyme Q10 Production by *Agrobacterium* Species. Agric. BioI. Chem. 48 (8): 1997-2002
- [21] Najafi M, Pezeshki P (2013) Bacterial Mutation; Types, Mechanisms and Mutant Detection Methods: a Review. European Sci J 4(4):628-638
- [22] Ma L, Lu W, Xia Z, Wen J (2010) Enhancement of dihydroxyacetone production by mutant of *Gluconobacter oxydans*. Biochem Eng J 49: 61-67
- [23] Kotera U, Umehara K, Kodama T (1972) Isolation method of highly tartaric acid producing mutants of *Gluconobacter suboxydans*. Agr Biol Chem 36(8) : 1307-1313
- [24] Crueger W, Crueger A (1990). Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology. Mortazavi A, Karimi M. Ferdowsi university press. 1376, pp:43-45
- [25] 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
- [26] Ha SJ, Kim SY, Seo JH, Oh DK, Lee JK (2007) Optimization of culture conditions and scale-up to pilot and plant scales for Coenzyme Q10 production by *Agrobacterium tumefaciens*. Appl Microbiol Biotechnol 74:974-980
- [27] Kien NB, Kong IS, Lee MG, Kim JK (2010) Coenzyme Q10 production in a 150-l reactor by a mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides*. J Ind Microbiol Biotechnol 37(5):521-9.
- engineered for the production of CoQ10. Metabol Engin 13:733-744
- [11] Minitab 18 Statistical Software (2017). [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc. (www.minitab.com).
- [12] Ndikubwimana JD, Lee BH (2014) Enhanced production techniques, properties and uses of Coenzyme Q10. Biotechnol Lett. DOI:10.1007/s10529-014-1587-1
- [13] 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
- [14] Najafi N, Hosseini R, Ahmadi A (2011) Impact of gamma rays on the *Phaffia rhodozyma* genome revealed by RAPD-PCR. Iranian J Microbiol 3(4) 216-221
- [15] 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
- [16] Bing Y, An X, Wan Zh, Wei Zh, Jun W (2006) Accumulation of 2-Keto-L-Gulonate at 33°C by a Thermotolerant *Gluconobacter Oxydans* Mutant Obtained by Ion Beam Implantation. Plasma Sci. Technol. 8 237
- [17] 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
- [18] 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. doi:10.1155/2012/607329
- [19] Natori Y, Nagasaki T (1981) Enhancement of Coenzyme Q10 Accumulation by Mutation and Effects of Medium

Improvement of the coenzyme Q₁₀ production by *Gluconobacter oxydans* H621 through chemical mutation and evaluation of the mutagenesis of nitrosoguanidine using the response surface methodology

Foozieh Moghadami^{1*}, Mahdi Kalantari²

1. Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

2. Department of Statistics, Payame Noor University, Tehran, Iran

*Corresponding Author: fmoghadami@pnu.ac.ir

Receipt: 2021/03/02

Accepted: 2021/09/20

Abstract

Mutation in microbial strains to increase coenzyme Q₁₀ production is one of the successful strategies for strain development. Therefore, in this study, the production of coenzyme Q₁₀ by *Gluconobacter oxydans* H621 was investigated through chemical mutation with nitrosoguanidine using the response surface methodology. Nitrosoguanidine was used to induce mutations at different concentrations (2.79 - 4.21 mg/mL) and treatment times (11.89 – 33.12 minutes), which was designed by a central composite design. The detection of mutant strains was investigated through their ability to grow in medium containing 160 µg/mL of menadione. The mutant strains were then examined for coenzyme Q₁₀ and dry cell weight production. The results showed that no mutant strains were obtained at a concentration of 4 mg/ml and above. The highest number of mutant colonies was obtained at a concentration of 2.79 mg/mL of nitrosoguanidine and treatment time of 22.5 minutes. It was also found that the concentration of nitrosoguanidine was effective on mutagenesis but the treatment time had a little effect. The mutant strain that was able to produce the highest amount of coenzyme Q₁₀ produced 5.2 mg/L, which was twice as much as the parent strain. According to the results of this study, it is concluded that by inducing mutation using nitrosoguanidine, mutant strains can be generated in *Gluconobacter oxydans* H621 that are able to produce more coenzyme Q₁₀ than the parent strain.

Keywords: Coenzyme Q₁₀, Mutation, response surface methodology, Nitrosoguanidine, *Gluconobacter*