استفاده از پرتوتابی گاما جهت افزایش تولید لایزین در باکتری کورینه *باکتریوم گلوتامیکوم*

شورنگ، پروین * (۱) – صادقی، علی اصغر (۲)– معتمدی سده، فرحناز (۱) – حلاجیان ، محمدطاهر (۱)
[۱]پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای؛ [۲] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

چکیده: به منظور افزایش تولید لیزین در باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* از دزهای ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ گری پرتو گاما جهت پرتوتابی استفاده شد. جمعیت باکتری بعد از ۲۴ ساعت تخمیر با استفاده از نمودار استاندارد log CFU/ml در برابر دانسیته نوری تعیین شد. با استفاده از شاخص تولید به ازای تراکم باکتری، نمونه‌هایی که دارای شاخص بیشتر (دز ۲۰۰ گری) نسبت به شاهد بود انتخاب و در فرمنتور ۱۰ لیتری Fermentec مدل XP50 با حجم کاری ۷ لیتر با استفاده از محیط کشت تجاری بر پایه ملاس و گلوتن کشت داده شد و مقدار تولید در باکتری پرتوتابی شده و شاهد بررسی شد. طبق نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، سویه موتانت در مدت ۳ روز قادر به تولید ۳۱/۹۷ گرم در لیتر لیزین بود درحالی‌که سویه وحشی در همین مدت ۹/۸۹ گرم در لیتر لیزین تولیدکرد.

واژگان کلیدی: ***کورینه باکتریوم گلوتامیکوم*، اسید آمینه لیزین، پرتو گاما**

The use of gamma irradiation to increase lysine production in *Corynebacterium glutamicum*

Parvin Shawrang*[1], Ali Asghar Sadeghi[2], Farahnaz Motamedi sede[1], Mohammad Taher Hallajian[1]
1. Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Iran;
2. Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract: In order to increase the lysine production in *Corynebacterium glutamicum*, bacteria samples were exposed to gamma rays at dose of zero, 100, 200 and 300Gy. The population of bacteria after 24hours of fermentation was obtained using a standard curve log cfu/ml in the optical density. Using an index based on the division of lysine production(mg/ml)on log cfu/ml (lysine production rate per population), samples that had the higher index(obtained at dose of 200 Gy) as compared to the control were selected and cultured in 10-liter fermenter (Fermentec, model XP 50). In the culture volume of 7 liters, commercial culture medium based on molasses and gluten was used and the amount of produced irradiated bacteria compared to control was determined. The results of this study showed that the mutant strain in three days produced31.97g/l L-lysine while the wild type at the same time produced only 9.89 g/l L-lysine.

Keywords: ***Corynebacterium glutamicum*, lysine, gamma ray**

مقدمه

لیزین یکی از اسیدهای آمینه ضروری است که به دلیل کاربرد فراوان آن در صنایع مختلف مورد توجه روزافزون قرار گرفته است و منجر به گسترش تحقیقات برای تولید صنعتی این اسیدآمینه شده است. طیف وسیعی از موجودات زنده اعم از میکروارگانیسم ها و ارگانیسم های پر سلولی، لیزین مورد نیاز خود را تولید می نمایند. باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم*[1] به‌طور گسترده‌ای برای تولید لیزین در مقیاس صنعتی استفاده می شود. به‌منظور افزایش تولید لیزین در این باکتری، از ایجاد جهش و گزینش سویه‌های مناسب استفاده شده است. ویت کین و همکاران [۱] نشان دادند که از پرتوتابی می توان برای ایجاد جهش و تغییر ژنوم باکتری استفاده کرد. آذین و همکاران [۲] از پرتو فرابنفش برای افزایش تولید لیزین در باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* استفاده کردند و برای تعیین مناسب‌ترین دز جهش‌زایی مطالعه‌ای انجام دادند. پرتو گاما نیز از جمله پرتوهای موتاژن است که برای جهش‌زایی در بسیاری از مطالعات استفاده شده است [۳، ۴، ۵]. مطالعه حاضر با هدف ایجاد جهش و افزایش تولید لیزین در سویه وحشی *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* با استفاده از پرتوتابی گاما انجام شد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی باکتری جهت انجام پرتوتابی: سویه خالص باکتری *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* به شماره PTCC 1532 از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران (سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، مجتمع تحقیقاتی عصر انقلاب) به صورت لیوفیلیزه تهیه گردید و پس از فعال سازی در محیط TSB، ویال هایی با ۳۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه‌داری شد. از نمونه ویال های ذخیره شده برای تلقیح ارلن مایر ۵۰۰ میلی لیتر حاوی ۲۰۰ میلی لیتر از محیط کشت TSB استریل استفاده گردید و ۲ درصد از حجم محیط کشت TSB، مایه تلقیح (نمونه کشت ذخیره) به آن اضافه گردید و سپس در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت و سرعت همزدن ۱۵۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری گردید. بعد از زمان فوق محیط کشت حاوی سلول‌های باکتری در داخل ویال‌های شیشه‌ای کوچک تقسیم گردیدند (۵ میلی لیتر به ازای هر ویال) و مقدار ۳۰ درصد گلیسرول به آنها اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردیدند. سپس نمونه های فوق از فریزر به دستگاه پرتوتابی گاما انتقال داده شدند و با دُزهای ۰، ۱۰۰، ۲۰۰و ۳۰۰ گری پرتوتابی شدند. به ازای هر دز پرتوتابی ۳ ویال استفاده گردید و یک ویال بعنوان کنترل پرتوتابی نشده استفاده گردید. بعد از پرتوتابی نمونه ها جهت اندازه گیری تعداد سلول های باکتری (CFU/ml) به آزمایشگاه انتقال داده شدند.

اندازه‌گیری جمعیت باکتریایی: برای اندازه‌گیری جمعیت باکتریایی در نمونه‌های پرتوتابی شده از روش شمارش صفحه‌ای استاندارد (Standard Plate Count) استفاده گردید. برای انجام این آزمون از محیط رقت سازی (حاوی پپتون واتر در غلظت ۹ گرم در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر) و محیط کشت Nutrient agar استفاده شد. محیط کشت Nutrient agar بعد از آماده سازی و استریل کردن در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه تا دمای ۵۰ درجه سانتیگراد خنک گردیدند و در داخل پلیت های یکبار مصرف استریل تقسیم گردیدند. محیط رقت سازی نیز به میزان ۴/۵ میلی لیتر در داخل

[1] *Corynebacterium glutamicum*

لوله های آزمایش تقسیم گردیدند. سپس بعد از استریل کردن آنها، ۰/۵ میلی لیتر از نمونه های پرتوتابی شده و یا نمونه شاهد به داخل ۴/۵ میلی لیتر از محیط رقت سازی انتقال داده شد تا رقت ۱:۱۰ را فراهم کند. سپس برای تهیه رقت های ۱:۱۰۰ (یا ۲-۱۰) ، ۱:۱۰۰۰ (یا ۳-۱۰) و ۴-۱۰ تا ۷-۱۰، بصورت پی در پی از رقت قبلی ۰/۵ میلی لیتر به ۴/۵ میلی لیتر از محیط رقیق سازی انتقال داده شد و لوله ها در قبل از هر انتقال کاملاً مخلوط می گردیدند. بعد از تهیه رقت های ۱-۱۰ تا ۷-۱۰ به میزان ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت به سطح محیط جامد Nutrient agar انتقال داده شد و بوسیله میله خمیده استریل بر روی سطح آگار پخش گردید. سپس پلیت های حاصل بصورت برعکس در گرمخانه ۳۰ درجه سانتی گراد برای مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری گردیدند. بعد از زمان فوق تعداد کلنی های قابل شمارش (بین ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی در هر پلیت) شمارش و تعداد باکتری بصورت تعداد شمارش شده ضربدر عکس رقت بیان شد. برای انجام آزمایشات از ۲ تکرار و رقت های مختلف استفاده گردید.

کشت باکتری در فرمنتور: تولید لیزین با استفاده از ملاس و گلوتن مایع در فرمنتور ۱۰ لیتری Fermentec مدل XP 50 ساخت کشور کره با حجم کاری ۷ لیتر انجام شد. از باکتری‌هایی که در مرحله آزمایشگاهی تولید لیزین بیشتری داشتند (دز ۲۰۰ گری) به همراه باکتری پرتوتابی نشده (شاهد) برای کشت در فرمنتور استفاده شد. قبل از تلقیح باکتری به فرمنتور ابتدا ۳۵۰ میلی‌لیتر محیط پیش کشت تهیه و پس از استریل کردن در اتوکلاو (۱۵ دقیقه، ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد) برای فعال کردن و افزایش جمعیت باکتری باکتری قبل از فرایند تولید استفاده شد. بعد از تلقیح باکتری مورد نظر به محیط پیش کشت، در دمای ۳۰ درجه و دور ۱۰۰ شیکر به‌مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شد [۲]. پس از تکثیر باکتری به محیط کشت اصلی منتقل شد.

قبل از شروع کار با فرمنتور ابتدا بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید لیزین شامل غلظت سوبسترا، دما و مدت انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور به‌دست آوردن پیک تولید در سوش‌های وحشی و موتانت انکوباسیون محیط کشت در زمان-های مختلف ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت و دماهای مختلف ۲۸ تا ۳۲ درجه انجام و طبق نتایج به‌دست آمده، دمای ۲۹ درجه، pH ۷/۲ ، دور همزن ۲۵۰ تا ۴۰۰ دور در دقیقه و اکسیژن نامحلول ۴۰ درصد برای دستگاه فرمنتور تعریف و به‌مدت ۷۲ ساعت روشن بود. در حین کار دستگاه برای تنظیم pH و کف داخل فرمنتور به‌طور خودکار از مخازن متصل به محفظه فرمنتور استفاده می-کرد.

اندازه‌گیری مقدار لیزین تولید شده: بعد از ۷۲ ساعت تخمیر، جهت اندازه‌گیری لیزین نمونه‌گیری شد. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰۰۰ دور در دقیقه دو بار سانتریفیوژ و پس از جدا شدن مواد جامد و سلول‌ها، محلول بالایی برای تعیین مقدار لیزین استفاده شد. برای اندازه‌گیری اسید آمینه لیزین در محیط کشت فرمنتور از دستگاه HPLC و روش Pico Tag [۶] استفاده شد.

تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها: آزمایش کشت در فرمنتور و بهینه سازی شرایط تولید و نتایج آزمایشات مربوط به اندازه-گیری لیزین در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. تیمارها شامل سویه‌های وحشی و موتانت حاصل از پرتوتابی تعداد تکرار ۴ بود. مدل آماری مورد استفاده در این پژوهش به‌صورت $Yij= \mu + Ti + eij$ بود. در این مدل Yij مقدار هر مشاهده، μ میانگین صفت مورد مطالعه، Ti اثر نوع سویه و eij خطای آزمایشی است. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در این مطالعه با

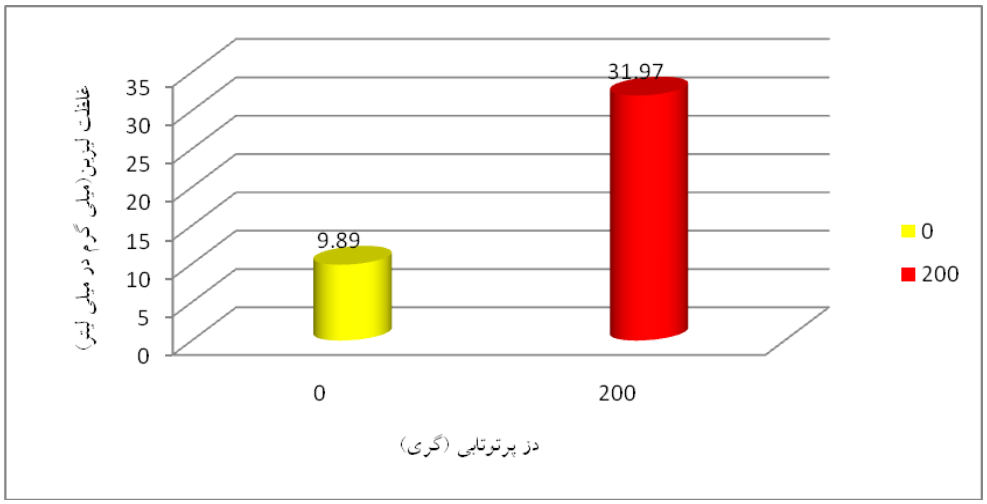
استفاده از نسخه ۶/۱۲ بسته نرم افزاری SAS ، Proc GLM صورت گرفت [۷]. پس از تجزیه واریانس، میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

دز مورد نظر در این مطالعه دزی است که سبب حداکثر تولید به ازای جمعیت باکتری شود؛ که در این مطالعه دز ۲۰۰ گری نتیجه بخش بود. طبق نتایج به‌دست آمده، بیشترین میانگین لیزین تولید شده ۳۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مربوط به باکتری پرتوتابی شده با دز ۲۰۰ گری بود که به‌عنوان موتانت در مقابل سویه وحشی با تولید ۱۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر جهت انجام آزمایشات بعدی انتخاب شد.

مقدار تولید لیزین با استفاده از محیط کشت برپایه ملاس (فراورده‌های فرعی کارخانه قند) و گلوتن مایع (فراورده‌های فرعی کارخانه تولید نشاسته) به مراتب پایین تر از محیط کشت آزمایشگاهی، در باکتری وحشی ۹/۸۹ گرم در لیتر و در باکتری موتانت ایجاد شده با دز ۲۰۰ گری پرتو گاما، ۳۱/۹۷ گرم در لیتر بود.

مشابه با نتایج این مطالعه، ناکایاما و همکاران [۸] به سویه موتانتی از *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* دست یافتند که در محیطی حاوی ملاس در ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای ۴ روز در pH ۷/۵ با همزن هوایی محیط کشت، ۳۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ال-لیزین تولید کرد.



شکل ۱: میانگین غلظت اسیدآمینه لیزین تولید شده در فرمنتور به‌وسیله باکتری وحشی و موتانت

نتیجه گیری

سویه موتانت حاصل از پرتوتابی با دز ۲۰۰ گری، در مدت ۳ روز قادر به تولید ۳۱/۹۷ گرم در لیتر لیزین بود درحالی‌که سویه وحشی در همین مدت ۹/۸۹ گرم در لیتر لیزین تولیدکرد.

مراجع

Witkin, E. M. “Post-irradiation metabolism and the timing of ultraviolet-induced Mutations in bacteria”. Proc. 10th int. Coragr. Genet. 1, 280. (1959).

آذین، م.، ک. حقیقی، م. کرباسی. ۱۳۸۰. ایجاد سویه‌های برتر مولد لیزین با استفاده از روش موتاسیون توسط اشعه UV و انتخاب آنها. گزارش طرح پژوهشی. پژوهشکده بیوتکنولوژی. سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران.

Bridges, B. A. “Protection of Pseudomonas sp. against gamma radiation by dimethyl sulphoxide”. Int. J. radiation BWZ. 5, 101. (1962).

Majumder, L., M.I. Khalil, M.K. Munshi, M.K. Alam, H.O. Rashid and N. Alam “Gamma-Ray Induced Mutants 14/20 and 79/20 of Aspergillus niger Increases Citric Acid Production from Molasses and Pumpkin”. African Journal of Basic & Applied Sciences 1 (1-2): 26-30, (2009).

Kenneth R. Tindall,' Judith Stein and Franklin Hutchinson “Changes in DNA Base Sequence Induced by Gamma-Ray Mutagenesis of Lambda Phage and Prophage”. Genetics 118: 551-560 (1988).

Heinrikson, R. L. and S.C. Meredith. “Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate”. Analytical Biochemistry, 136 (1), 65-74, (1984).

SAS Institute Inc., “Statistical Analysis System (SAS) User's Guide”, SAS Institute, Cary, NC, USA. (1985).

Nakayama K. “Lysine and diaminopimelic acid, In: The microbial production of amino acids”. Yamada K, Kinoshita S, Tsunoda T, Aida K, Kodansha, Tokyo (eds). pp. 372-380. (1972).