Journal of Microbial World
Volume 14, No. 4, March 2022

Original Article

Comparison of xanthan biopolymer production in mutant strains of Xanthomonas citri sub sp. citri by using cheese whey

Roya Moravej[1], Mehrdad Azin[2], Seyed Mehdi Alavi[3]

[1] Department of Biology, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

[2] Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.

[3] Department of plant biotechnology, National institute of genetic engineering and biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Xanthan gum is produced by Xanthomonas bacteria. This gum is widely used in various industries. Random mutagenesis of xanthan-producing strains can increase xanthan production capacity several times. This study aimed to evaluate Xanthomonas mutant strains with high xanthan production capacity.

Materials & Methods: The native strain of *Xanthomonas citri* K37 was affected by nitrogenic acid mutagen and after initial screening, the mutant strains were selected based on the appearance and diameter of the colony formed on the c dye medium. Whey-based production medium was used to produce xanthan gum and then production indices such as beta-galactosidase activity, sugar consumption, production rate, and viscosity of xanthan gum were selected in selected mutant strains.

Results: A total of 8 mutant strains were selected among all treated colonies. Two high-yielding strains named R3 and R8 and two low-yielding strains called M2 and M6 were selected to evaluate the activity of beta-galactosidase enzyme and glucose consumption. Strain R3 increased viscosity and amount of xanthan compared to wild strain equivalent to 200 cp and 2 g / l, respectively, and mutant M6 lost the ability to produce xanthan.

Conclusion: From the native *Xanthomonas citri* K37 isolate, a new R3 strain was created during mutagenesis, which can be effective in low cost cheese whey as a xanthan-producing strain.

Keywords: Xanthan gum, *Xanthomonas citri*, cheese whey, mutagenesis, nitrous acid.

Received: 8 November 2021 Revised: 9 January 2022 Accepted: 21 February 2022

Correspondence to: Roya Moravej
Tel: +98 9122899961
E-mail: Microbiology.m@gmail.com

Journal of Microbial World 2022, 14(4): 6-16
DOI:10.30495/jmw.2021.690457

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال چهاردهم شماره چهارم (پیاپی ۴۹) زمستان ۱۴۰۰
صفحات ۱۶-۶

Original Article

مقایسه تولید بیوپلیمر زانتان در سویه‌های جهش‌یافته باکتری *زانتوموناس سیتری* زیرگونه سیتری با استفاده از آب پنیر

رویا مروج[1*]، مهرداد آذین[2]، سید مهدی علوی[3]

[1] گروه زیست شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران. [2] پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.
[3] پژوهشکده زیست فناوری گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: صمغ زانتان توسط باکتری زانتوموناس تولید می‌شود. این صمغ، کاربرد گسترده‌ای در صنایع مختلف دارد. جهش‌زایی تصادفی سویه‌های تولید کننده زانتان، می‌تواند قابلیت تولید زانتان را تا چندین برابر افزایش دهد. هدف از این مطالعه ارزیابی سویه‌های جهش یافته زانتوموناس با توان تولید بالای زانتان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: سویه بومی زانتوموناس سیتری K37 تحت تاثیر ماده جهش‌زای اسید نیترو قرار گرفت و پس از غربالگری اولیه سویه‌های جهش یافته بر اساس شکل ظاهری و قطر کلنی روی محیط جامد رنگی c، انتخاب شدند. از محیط تولید بر پایه آب پنیر به منظور تولید صمغ زانتان استفاده شد و سپس شاخص‌های تولید نظیر مقدار فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز، مصرف قند، میزان تولید و ویسکوزیته صمغ زانتان در سویه‌های جهش یافته انتخابی مقایسه شدند.

یافته‌ها: از بین کلنی‌های تیمار شده جمعا ۸ سویه جهش یافته شامل، دو سویه با تولید بالا به نام R3 و R8 و دوسویه با تولید کم تحت عنوان M2 و M6 برای ارزیابی فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز و مصرف قند انتخاب شدند. سویه R3 نسبت به سویه وحشی معادل ۲۰۰ سانتی پواز و ۲ گرم بر لیتر به ترتیب در ویسکوزیته و مقدار زانتان، افزایش نشان داد و جهش‌یافته M6 قابلیت تولید زانتان را از دست داد.

نتیجه‌گیری: از جدایه بومی زانتوموناس سیتری K37، طی جهش‌زایی سویه جدید R3 ایجاد شد که در محیط ارزان قیمت آب‌پنیر به عنوان یک سویه پر تولید زانتان می‌تواند کارا باشد.

واژگان کلیدی: صمغ زانتان، زانتوموناس سیتری، آب‌پنیر، جهش زایی، اسید نیترو.

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۸/۱۷ ویرایش مقاله: ۱۴۰۰/۱۰/۱۹ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۲

مقدمه

یکی از مهمترین کاربردهای بیوتکنولوژی تولید فرآورده‌های میکروبی از جمله تولید پلیمرهای زیستی نظیر دکستران، لوان، زانتان و غیره برای مصارف صنعتی می‌باشند (۱). زانتان یک هتروپلی‌ساکارید اسیدی است با وزن ملکولی بسیار بالا (حدود ۲ میلیون دالتون) که از واحدهای پنج قندی تکراری ساخته شده است که مشابه شکل گیری ساختار سلولز است. سه زنجیره قندی جانبی دارد که شامل دی- گلوکز، دی- مانوز و

*) آدرس برای مکاتبه: گروه زیست شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.
تلفن: ۰۹۱۲۲۸۹۹۹۶۱ پست الکترونیک: Microbiology.m@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

دی- گلوکرونیک اسید می‌باشد که به ساختار گلوکزی موجود در پیکر اصلی صمغ متصل می شود (۲). در بررسی‌های انجام شده مشخص است که باکتری‌های مولد شانکر مرکبات از جمله *زانتوموناس کمپستریس*، *زانتوموناس فوسکانس*، *زانتوموناس اگزونوپودیس* و *زانتوموناس سیتری* دارای اکثر ژن‌های تولید کننده زانتان هستند (۳).

این پلیمر میکروبی در صنایع غذایی، دارویی، کشاورزی، نساجی، نفت و پتروشیمی کاربرد گسترده‌ای دارد (۲). بنابراین دستیابی به سویه‌های مناسب تولید کننده بیوپلیمر زانتان، می‌تواند افق‌های تازه‌ای را برای تولید این فراورده میکروبی در داخل کشور باز کند.

با توجه به اینکه فرآیند تولید و استخراج زانتان بسیار پر هزینه است، استفاده از منابع ارزان قیمت نظیر پساب لبنی از جمله آب پنیر و همچنین کاربرد سویه‌هایی از زانتوموناس که بتواند قند لاکتوز را مصرف کند، موجب کاهش هزینه های تولید صمغ زانتان می‌گردد (٤). در صنایع لبنی پساب و خروجی آب پنیرشامل بقایای حل نشده قندها، پروتین‌ها، چربی‌ها و احتمالا افزودنی‌ها می‌باشد. پساب تولید شده دارای اکسیژن مورد نیاز زیستی یا BOD بالایی است. این میزان معادل ۰/۸-۲/۵ کیلوگرم در هر تن شیر است (۵). بعلاوه وجود مواد جامد معلق و جامد محلول نظیر فسفر و نیتروژن موجب افزایش آلودگی زیستی این پساب می‌گردد. بهترین روش برای کنترل و رفع آلودگی ناشی از برون ریز محصولات فرعی، استفاده بهینه از آب پنیر در فرآیندهای تولید فرآورده‌های میکروبی به عنوان سوبسترای فرآیندهای تخمیری می‌باشد (٦). آب پنیر با محتوای لاکتوزی بالا نیز می‌تواند گزینه مناسبی برای استفاده به عنوان سوبسترای تولید محصولات ارزشمندی مانند زانتان نیز باشد. برای دستیابی به این هدف، می‌بایست سویه‌هایی از باکتری زانتوموناس در اختیارداشت که قادر به مصرف لاکتوز باشند (۷).

به دلیل میزان بیان پایین و در برخی از موارد نقص آنزیم بتاگالاکتوزیداز درباکتری‌های جنس زانتوموناس، استفاده از لاکتوز به عنوان منبع کربن در محیط‌های کشت امکان‌پذیر نمی باشد (۸). لذا، دستیابی به سویه‌های لاکتوز مثبت طبیعی یا دست ورزی ژنتیکی سویه‌های تجاری برای احصاء قابلیت رشد در محیط‌های لاکتوزی و بهره‌مندی از ضایعات صنایع غذایی (مثل آب پنیر) در تولید زانتان می‌تواند از نظراقتصادی دارای مزیت نسبی مطلوبی باشد. تلاش برای به کارگیری سویه‌های باکتریایی زانتوموناس با قابلیت مصرف لاکتوز همچنان ادامه دارد و اخیرا چند سویه بومی از باکتری *زانتوموناس سیتری* از مرکبات منطقه جنوب ایران جدا شده که قادر به تولید صمغ زانتان در محیط واجد لاکتوز می‌باشند. دستکاری ژنتیکی این سویه بومی با استفاده از مواد موتاژن شیمیایی مانند اسید نیترو می‌تواند گام موثری را در جهت بهبود کیفیت و افزایش تولید زانتان بردارد. اسید نیترو از جهش‌زاهای قوی است که با تاثیر مستقیم روی ساختار DNA، موجب د-آمیناسیون بازهای آدنین، گوانین و سیتوزین مربوطه می‌شود (۹).

بر این اساس هدف از انجام این مطالعه تولید زانتان با استفاده از سویه بومی *زانتوموناس سیتری* سویه K37 در محیط آب پنیر بود. سپس با استفاده از روش القایی جهش‌زایی با اسید نیترو، سویه‌های جهش یافته انتخاب و از نظر تولید زانتان و تغییرات حین فرآیند تخمیر با سویه وحشی وسویه صنعتی مقایسه و ارزیابی شدند.

مواد و روش‌ها

الف) کشت و نگهداری میکروارگانیسم: سویه بومی باکتری *زانتوموناس سیتری* با کد شناسایی NIGEB- K37 از پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه شد. یک لوپ باکتری در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع عصاره مخمرحاوی لاکتوز (YL broth) تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ٢٤ ساعت کشت داده شد. پس از سانتریوفوژ رسوب سلولی با ۲۰٪ گلیسرول مخلوط و در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید. برای هربار استفاده در تحقیق، باکتری فریز شده به پلیت‌ها یا لوله‌های کشت شیبدار حاوی محیط YL agar تلقیح و به مدت ۱۸ تا ٢٤ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید (۱۰).

ب) تهیه محیط تولید بر پایه آب پنیر: برای تهیه محیط آب پنیر، از پودر آب‌پنیر کارخانه‌های پگاه تهران به‌عنوان منبع کربن استفاده شد. برای ممانعت از اخلال در تولید زانتان می‌بایست پروتین‌های موجود در آب پنیر حذف شود، با استفاده از روش تیمار حرارتی (دمای ۶۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه) پروتین‌های آب‌پنیر ترسیب و فیلتر شد وپس از سانتریفوژ از محیط نیمه شفاف رویی به‌عنوان محیط پایه آب‌پنیر استفاده شد (۱۱و۱۲). محیط کشت با افزودن یک لیتر آب‌پنیر تیمار شده و ۲/۲ گرم بر لیتر پودر خیسانده ذرت به‌عنوان منبع نیتروژنی آلی ارزان قیمت به همراه محلول نمکی با ترکیبات مذکور بر اساس گرم بر لیتر ساخته شد (جدول ۱). پس از تلقیح پیش کشت (۷ درصد حجمی)، محیط تولید برای مدت ۵ شبانه‌روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس با دور ۱۸۰ rpm گرمخانه‌گذاری شد (۲ و۱۳).

جدول ۱: محتویات محلول نمکی جهت ساختن محیط تولید زانتان.

ترکیبات	مقدار(گرم بر لیتر)
K_2HPO_4	0.7
KH_2PO_4	2.0
$(NH_4)_2SO_4$	0.1
$MgCl_2\ 6H_2O$	0.1
$FeSO_4\ 7H_2O$	0.01
$MnCl_2$	0.001

ج) جهش‌زایی با اسید نیترو: برای فرایند جهش‌زائی با اسید نیترو، ابتدا غلظت ۰/۲ مولار اسید نیترو استفاده شد. سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند نمونه باکتری تهیه و سانتریفوژ گردید و چند بار سلول‌ها شستشو و سپس با محلول اسید تیمار شدند در فواصل زمانی صفر تا ۶۰ دقیقه نمونه‌گیری برای تعیین منحنی مرگ باکتری در اثر اسید نیترو انجام شده و زمان مناسب تیمار برای فرایند جهش‌زائی بهینه شد. پس از تیمار با اسید نیترو، از نمونه رقت متوالی تهیه و کشت سطحی انجام شد و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از شمارش باکتری‌ها منحنی رشد باکتری در طی زمان رسم گردید و زمان بهینه جهش با در نظر گرفتن ضریب مرگ ۹۹/۹ درصد سلول‌ها تعیین شد. برای شاهد نیز از سوسپانسیون سویه والد بدون افزودن اسید نیترو استفاده شد (۱۴).

د) غربالگری اولیه سویه‌های جهش یافته بر اساس شکل و ظاهر کلنی: به‌منظور غربالگری باکتری‌های مصرف کننده لاکتوز و انتخاب جهش یافته‌ها از محیط رنگی C (C-dye) استفاده شد (۱۳). قابل ذکر است که تنها منبع قندی این محیط لاکتوز بوده و در صورت مصرف لاکتوز رنگ محیط از بنفش به زرد تغییر می‌یابد. شکل ظاهری و قطر کلنی و تغییر رنگ اطراف کلنی روی محیط به عنوان شاخص جهش در نظر گرفته شد. جهش یافته‌های مثبت (افزایش قطر کلنی) و جهش یافته‌های منفی (کاهش قطر کلنی) در این مرحله انتخاب شدند (۱۳).

ه) غربالگری دوم سویه‌های جهش یافته بر اساس میزان تولید زانتان: سویه‌های انتخابی از مرحله اول غربالگری، روی محیط مایع حاوی قند لاکتوز YL broth کشت داده و پس از رسیدن به کدورت مناسب (۰/۱=۶۰۰جذب نوری)به میزان ۱۰ درصد به محیط تولید واجد آب پنیر تلقیح شدند و به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و دورrpm ۱۸۰ گرمخانه‌گزاری شدند (۱۵). سپس ویسکوزیته، مقدار تولید زانتان و وزن خشک توده سلولی ارزیابی شد. سویه والد برای مقایسه به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

و) سنجش ویسکوزیته: برای اندازه‌گیری ویسکوزیته محیط در طی فرآیند تخمیر، از ویسکومتر دیجیتالی بروکفیلد استفاده شد (دامنه دمایی ۲۴-۲۶ درجه سلسیوس). نمونه‌ها بعد از هر نمونه گیری از روی شیکر خارج شدند و سپس ویسکوزیته محیط سنجش و ثبت گردید (۱۱).

ز) سنجش بیومس و مقدار زانتان: برای استخراج زانتان ،پس از هر بار نمونه‌گیری، نمونه‌ها رقیق‌شدند و توسط سانتریفیوژ یخچال دار، توده سلولی جدا شد و به محلول رویی اتانل٪ ۹۸ سرد اضافه شد تا محصول زانتان ترسیب شود (۲و۱۲). محصول برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه نگهداری و سپس توسط دستگاه فریز درایر (LYOVAC™ -GT 3) خشک شده و مقدار آن پس از توزین با ترازوی دیجیتال، به عنوان

وزن خشک زانتان ثبت شد (۱۶). همچنین توده سلولی جدا شده بعد از سه بار شستشو ،در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت یک شبانه روز خشک شده و وزن خشک بیومس نیز اندازه‌گیری شد (۱۲).

ح) سنجش فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز و بررسی مصرف قند لاکتوز در سویه های جهش یافته: در این مرحله به صورت همزمان و طی فرآیند تخمیر در فواصل زمانی ۲۴ ساعته از محیط تولید نمونه‌گیری شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز با روش طیف سنجی میلر و سوبسترای اورتو نیترو فنل گالاکتوپیرانوزید یا ONPG به عنوان جایگزین قند لاکتوز انجام شد (۱۷). همچنین برای اندازه‌گیری قند باقیمانده در محیط از روش میلر و معرف ۳ و ۵ دی نیتروسالسیلیک اسید (DNS) استفاده شد (۱۸). ابتدا، نمونه‌ها هیدرولیز اسیدی (در دمای ۶۰ به مدت ۱۰ دقیقه) شدند (۱۹) و سپس به روش DNS و با استفاده از منحنی استاندارد قند لاکتوز سنجش قند انجام شد.

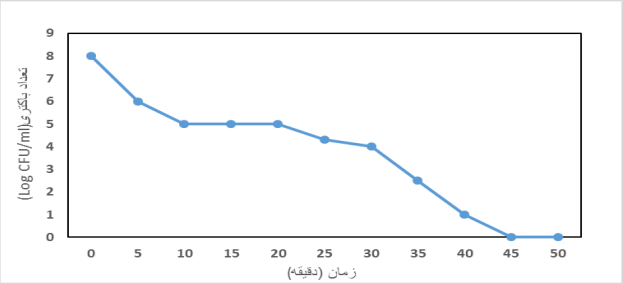
ط) تعیین پایداری جهش در سویه‌های جهش یافته: اگر چه سویه جهش‌یافته مقادیر متفاوتی ازمحصول را تولید می‌کند اما اینکه آیا این جهش در سویه جهش یافته پایدار است یا خیر، بایستی با تست پایداری جهش سنجیده شود. به همین منظور ۱۰ نسل کشت پی در پی از سویه‌های جهش یافته مثبت و منفی روی محیط مخمر پپتون لاکتوز آگار (YPLA) انجام شد و سپس میزان تولید زانتان و ویسکوزیته در نسل اول و دهم سنجیده و با مقدار زانتان تولید شده در سویه وحشی مورد مقایسه قرار گرفت (۱۴).

یافته‌ها

الف) نتایج غربالگری اولیه سویه های جهش یافته: بر طبق دستورالعمل جهش‌زایی با اسید نیترو، با استفاده از محلول اسید نیترو با غلظت ۰/۲ مولار در زمان‌های ۵ تا ۵۰ دقیقه جهش‌زایی صورت گرفت. با توجه به شکل ۱، منحنی مرگ سلول‌های *زانتوموناس سیتری* سویه K37 در اثر تیمار با اسید نیترو زمان بهینه جهش‌زایی ۳۰ دقیقه به دست آمد که طی آن ۹/۹۹ درصد سلول‌ها از بین رفتند (شکل ۱) در غربالگری اولیه بر اساس شکل ظاهری و قطر کلنی و شدت زرد شدن محیط رنگی C، هشت سویه جهش یافته بدست آمد که اسامی آن‌ها در جدول ۲ مشخص شده است. (شکل ۲).

ب) نتایج غربالگری دوم سویه های جهش یافته بر اساس میزان تولید زانتان: در مرحله دوم غربالگری، بر مبنای ویسکوزیته، مقدار زانتان و توده سلولی سویه‌های جهش‌یافته و والد با یکدیگر مقایسه شده‌اند (جدول ۳). بنابراین با توجه به نتایج حاصل از مرحله اول و دوم غربالگری، دو سویه جهش‌یافته مثبت به نام R3 و R8 و دو سویه جهش یافته منفی با عنوان M2 و M6 از بین سایر موتانت‌ها، انتخاب شدند.

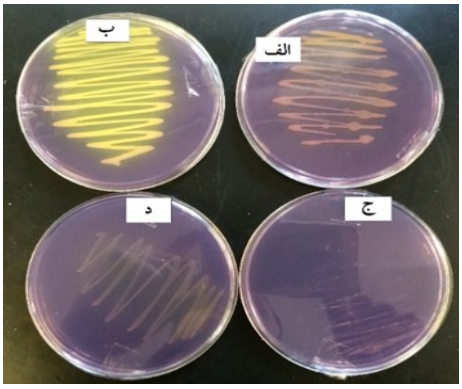
ج) سنجش مقدار زانتان، بیومس و ویسکوزیته: ظاهر کلنی این جهش یافته‌ها و سویه والد روی محیط YPLA در شکل ۳ نشان داده شده است. با توجه به این که صمغ زانتان اگزوپلی‌ساکارید است می‌توان از روی موکوئیدی بودن کلنی نیز تا حدودی به افزایش تولید صمغ توسط سویه مورد نظر نیز پی برد. مقدار توده سلولی اندازه گیری شده در همه موارد ناچیز بود.



شکل ۱: منحنی مرگ سلولی باکتری در اثر تیمار با اسید نیترو.

جدول ۲: غربالگری اولیه سویه‌های جهش‌یافته و مقایسه آن با سویه وحشی *X. citri*K37.

سویه جهش‌یافته	قطر کلنی(میلی‌متر)	شکل ظاهری کلنی	تغییر رنگ C-dye
M1	۴/۳	موکوئیدی	+
M2	۳/۶	خشک	–
R3	۵/۶	موکوئیدی	++++
M4	۴/۵	موکوئیدی	++
M5	۴/۷	موکوئیدی	++
M6	۳/۴	خشک	–
M7	۴/۵	موکوئیدی	++
R8	۵/۴	موکوئیدی	+++
سویه وحشی	۴/۱	موکوئیدی	+

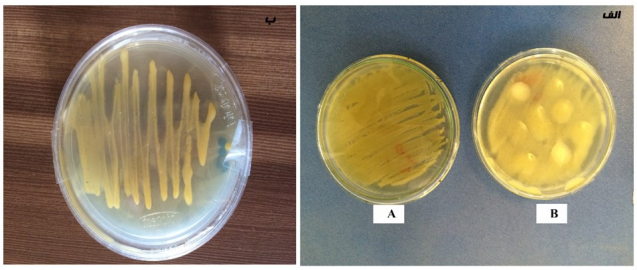


شکل ۲: جداسازی جهش یافته‌ها روی محیط C-dye، پلیت الف) سویه وحشی K37، پلیت ب) سویه جهش یافته مثبت (R3)، پلیت‌های ج و د) جهش یافته‌های منفی، تغییر رنگ محیط از بنفش به زرد نشان‌دهنده مصرف لاکتوز است.

جدول ۳: مقایسه سویه‌های جهش یافته در محیط تولید بر پایه آب پنیر.

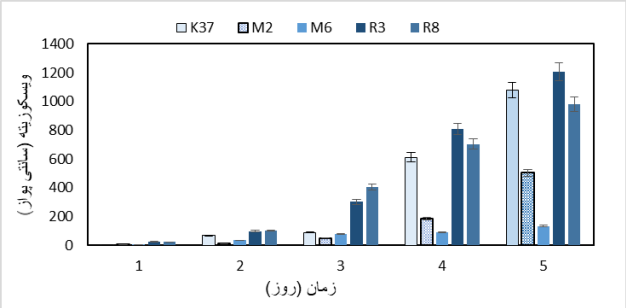
سویه جهش‌یافته	ویسکوزیته (سانتی پواز)	مقدار زانتان (٪)	توده سلولی (٪)
M1	۱۸۰۸/۵±۵۸	۱/۱۰۵±۰/۱	۰/۰۵±۰/۰۰٤
M2	۳۰۷±۲٤	۰/٤±۰/۰٤	۰/۰۸±۰/۰۲
R3	۲۱۱٦±۲۱	۱/٦۷۵±۰/۲	۰/۰٤±۰/۰۱
M4	۱۸٤۲±۵۵	۱/۲۹۵±۰/۰۷	۰/۰٤±۰/۰۲
M5	۱۷۸۰±٤۹	۱/۰۱۵±۰/۰۷	۰/۰۸±۰/۰۳
M6	۱۰۸/۵±۲٦	۰/۲۸±۰/۰۲	۰/۱٤۵±۰/۰۳
M7	۱۱۰٤/۵±۵۷	۱/۰٦۵±۰/۱	۰/۰۱±۰/۰۰۹
R8	۲۰۵۱/۵±۹٦	۱/۷۳۵±۰/۱	۰/۰٤±۰/۰۱
سویه وحشی	۱۷٦۰±۵۸	۱/٤٤±۰/۱٦	۰/۰۵±۰/۰۱

± نشاندهنده انحراف معیار سه تکرار می‌باشد.

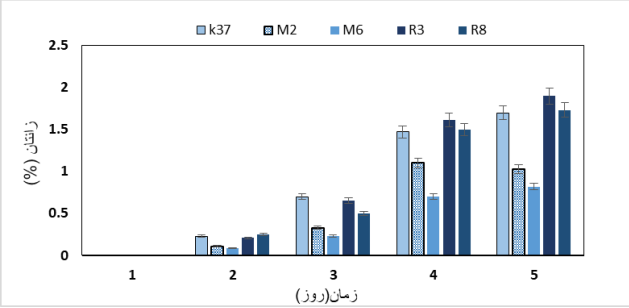


شکل ۳: **الف)** مقایسه کلنی جهش یافته‌ها روی محیط YPLA، پلیت A: سویه M6 پلیت B: سویه R3، ب) سویه وحشی روی محیط YPLA.

در بین سویه‌های جهش‌یافته، بیشترین مقدار ویسکوزیته به مربوط به سویه R3 و بود که نسبت به سویه وحشی معادل ۲۰۰ سانتی پواز ویسکوزیته افزایش داشت و کمترین ویسکوزیته در پایان فرآیند مربوط به سویه جهش‌یافته M6 بود (شکل ٤). همچنین مقدار زانتان حاصل از سویه R3 پس از ۱۲۰ ساعت معادل ۱۹ گرم بر لیتر و کمترین میزان صمغ مربوط به سویه M6 و برابر با ۸g/l بدست آمد (شکل ۵).



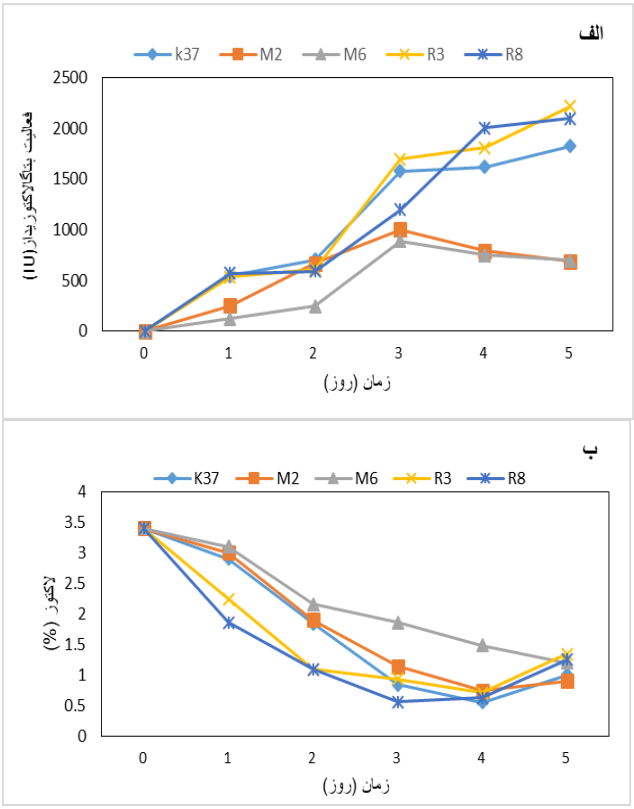
شکل ٤: مقایسه ویسکوزیته در سویه‌های جهش‌یافته و وحشی در فواصل زمانی ۲٤ ساعته درمحیط تولید بر پایه آب پنیر.



شکل ۵: مقایسه مقدار زانتان در سویه‌های جهش‌یافته و وحشی در فواصل زمانی ۲٤ ساعته درمحیط تولید بر پایه آب پنیر.

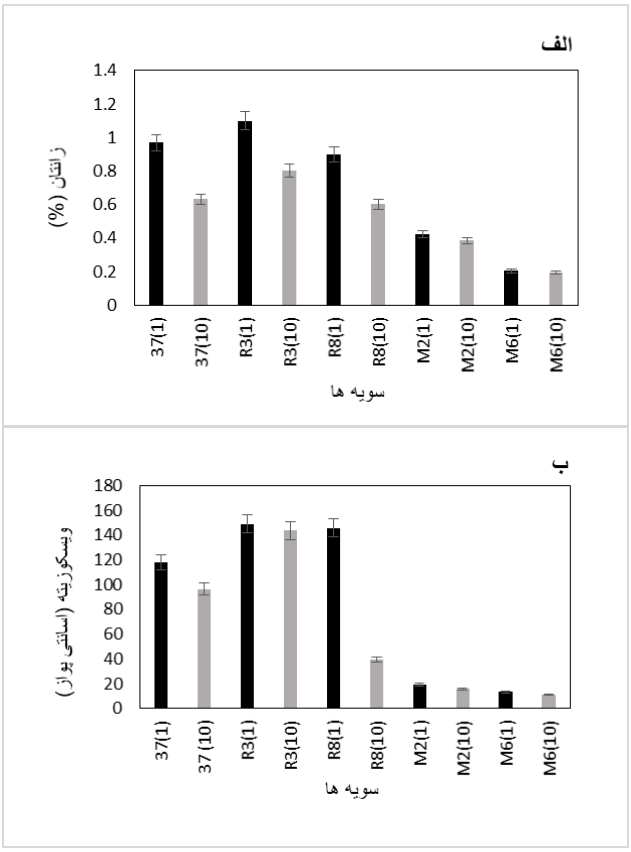
د) سنجش فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز و بررسی مصرف قند لاکتوز: با توجه به شکل ٦، فعالیت آنزیم بتا گالاکتوزیداز از ٤۸ ساعت بعد از شروع فرآیند افزایش و از روز سوم به بعد فعالیت آنزیم در اکثر سویه‌ها ثابت ماند. در سویه‌های جهش یافته مثبت R3 و R8 این روند افزایشی به صورت جزئی تا ۱۲۰ ساعت نیز ادامه یافت.

در مقایسه، سویه‌های M2 و M6 فعالیت آنزیم کمتر بوده و بیشترین فعالیت به ترتیب معادل ۱۰۰۲/٤ IU/ ml و ۸۹۰/۳ به دست آمد. در رابطه با مصرف قند نیز مشخص شد بیشترین مصرف لاکتوز توسط سویه‌ها طی همان ساعات اولیه روی می‌دهد و از روز دوم به بعد به تقریبا این مصرف یکنواخت می‌شود. سویه جهش‌یافته مثبت R8 نسبت به بقیه سویه‌ها از قابلیت بیشتری برخوردار بود.



شکل ۶: (الف) مقایسه فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در سویه‌های جهش‌یافته و وحشی در فواصل زمانی ۲۴ ساعته درمحیط تولید بر پایه آب پنیر (ب) مقایسه مصرف لاکتوز در سویه‌های جهش‌یافته و وحشی در فواصل زمانی ۲۴ ساعته درمحیط تولید بر پایه آب پنیر.

ه) تعیین پایداری جهش: به منظور بررسی پایداری جهش در سویه‌های جهش‌یافته، مقایسه نسل اول و دهم این سویه‌ها از نظر تولید زانتان و ویسکوزیته در محیط آب پنیر بعد از ۱۲۰ ساعت از شروع فرآیند تولید صورت گرفت. شکل الف-۷ نشان می‌دهد که بعد از ده نسل، تولید زانتان در سویه‌های جهش‌یافته R3 و R8 کاهش چشمگیری نیافته بود و تنها اختلاف با نسل اول بین ۰/۲۵-۰/۵۰ درصد به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر متغیر بود. این اختلاف بین نسل اول و دهم سویه وحشی K37 نیز مشهود است. در سویه‌های M2 و M6 تفاوت معنی داری بین نسل اول و دهم از نظر زانتان تولید شده مشاهده نشد. همچنین، ویسکوزیته نسل دهم و یکم سویه‌ها نیز تفاوت واضحی نشان نداد و بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که جهش ایجاد شده پایدار بوده و تولید زانتان در سویه‌های جهش‌یافته حفظ شده است (شکل ب-۷).



شکل ۷: (الف) مقایسه تولید زانتان در نسل اول و دهم سویه‌های جهش یافته و والد (ب) مقایسه ویسکوزیته در نسل اول و نسل دهم جهش یافته‌ها و والد (رنگ روشن نسل دهم و رنگ تیره نسل اول را نشان می‌دهد).

بحث

در این تحقیق با استفاده از عامل جهش‌زای اسید نیترو و جهش‌زایی بر روی باکتری *زانتوموناس سیتری* سویه K37 سویه‌های جدیدی به دست آمد که از نظر تولید زانتان با سویه وحشی مقایسه شدند. مقدار زانتان و ویسکوزیته درسویه موتان R3 به ترتیب حدود ۱۵و ۱۲ درصد نسبت به سویه والد افزایش داشت و در سویه موتان M6، ۸۷ درصد ویسکوزیته و ۵۷ درصد مقدار زانتان کاهش نشان داد. محققین در تلاش‌اند تا با روش‌های جهش‌زائی تصادفی نظیر پرتو دهی با اشعه ماورا بنفش یا استفاده از ترکیبات شیمیائی جهش زا، سویه‌های صنعتی مناسب را برای تولید محصولات میکروبی نظیر بیوپلیمرها تولید کنند (۹) به عنوان مثال کردساپ و همکاران در سال ۲۰۱۱ با استفاده از عامل موتاژن اتیل متیل

سولفانات بر روی باکتری *زانتوموناس کمپستریس* توانستند تولید زانتان را در سویه جهش یافته ۱/۳برابر افزایش دهند (۲۰). همچنین مبروک و همکاران در سال ۲۰۱۳ زانتوموناس کمپستریس را با عامل جهش‌زای آکریدین نارنجی تحت تاثیر قرار دادند و سویه موتانی با عنوان XC5 ایجاد شد که ۱۵/٦ درصد افزایش در تولید زانتان نسبت به سویه والد نشان داد (۲۱).

اکثر تحقیقات با هدفمندی موتاسیون در راستای افزایش تولید زانتان بر روی باکتری *زانتوموناس کمپستریس* صورت گرفته است، لذا در رابطه با مقایسه جهش‌زایی روی باکتری *زانتوموناس سیتری* با پژوهش حاضر اطلاعاتی در دسترس نیست.

به منظور دسترسی به یک سویه جهش یافته مطلوب، بهینه کردن شرایط جهش‌زائی با ماده جهش‌زا در الویت قرار دارد. شرایط جهش‌زایی تاثیر زیادی در ایجاد جهش یافته‌های مطلوب دارد. لذا پس از انتخاب نوع جهش زا باید شرایط بهینه جهش‌زایی متناسب با سویه تعیین شود (۲۲). مقدار عامل جهش‌زا و زمان تیمار دو عامل اصلی‌اند که قبل از هر عامل دیگری باید بهینه شوند. اگر مقدار جهش‌زا و زمان تیمار کم باشد تعداد کمی از سویه‌های وحشی جهش می‌یابند و بر عکس اگر این دو عامل بیش از حد اعمال شوند احتمال وقوع جهش‌های مرگبار و نیز چندین جهش همزمان دریک مکان افزایش خواهد یافت که در هر دو حالت تعداد جهش یافته‌ها کاهش می‌یابد(۱٤و۲۳). در مطالعه حاضر زمان بهینه برای جهش‌زایی ۳۰ دقیقه به دست آمد که این با مطالعه اشرف و همکاران مطابقت دارد (۱٤). در بسیاری از تحقیقات معیار انتخاب سویه موتان بر اساس تغییراتی است که در ساختار مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی میکروارگانیسم ایجاد می‌شود. برای جداسازی جهش یافته‌های با تولید بیشتر و ویسکوزیتهٔ بالاتر به کارگیری معیارهای مستقیم گاه دشوار است (۲۳و۲٤). برخی پژوهشگران روش‌های غیر مستقیم را به کار برده‌اند و افزایش قطر هیدرولیز نشاسته را در محیط‌های کشت واجد این پلی ساکارید معیار جداسازی سویه‌های مولد نظیر سویهٔ M11 قرار داده‌اند (۲٤). از دیگر معیارهای انتخاب غیرمستقیم جهش یافته‌ها مقاومت به آنتی‌بیوتیک است. به عنوان مثال موتان‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و استرپتومایسین در باکتری *زانتوموناس کمپستریس* با قابلیت تولید زانتان بالا گزارش شده است (۲٤) در مقابل انتخاب سویه‌های پر تولید زانتان و همچنین غربالگری سویه‌هایی با قابلیت فعالیت بالای آنزیم بتاگالاکتوزیداز از مثال‌های شاخص در گزینش مستقیم هستند. در این تحقیق هم از روش مستقیم و هم غیرمستقیم برای غربالگری جهش یافته‌ها استفاده شد. تغییر در ظاهر، قطر کلنی و تولید زانتان و همچنین مقدار فعالیت آنزیم نسبت به سویه والد مورد ارزیابی قرار گرفت.

از طرفی با توجه به افزایش فعالیت آنزیم در سویه‌های R3 و R8 نسبت به سویه وحشی K37 می‌توان اینگونه استنباط کرد که بالا بودن سطح فعالیت آنزیم به دلیل تیمار با اسید نیترو و القا جهش نقطه‌ای صورت گرفته است. مصرف لاکتوز در این باکتری طی چند مرحله صورت می‌گیرد و در راستای این فعالیت کارآمدی سیستم جذب نیز ضرورت دارد (۲۵). واقعیت این است که سویه‌های R3 و R8 سطح بالاتر آنزیم را تولید نکرده‌اند بلکه این سویه‌ها قادرند در حضور لاکتوز به عنوان منبع کربن رشد بهتری داشته باشند و این به دلیل فعالیت بیشتر آنزیم در حضور لاکتوز است حتی اگر منابع دیگری نیز در دسترس باشد. همچنین کاهش قابل توجه (حدود دو برابر) فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در سویه جهش‌یافته منفی M6 در مقایسه با سویه وحشی در محیط آب‌پنیر تایید کننده یافته‌های فوق می‌باشد. این نتیجه نظر یانگ را تایید می‌کند که ژن بتاگالاکتوزیداز در سویه وحشی باکتری *زانتوموناس* وجود دارد و به دلیل فقدان عوامل فشار انتخابی در محیط طبیعی خاک و گیاه غیر فعال شده است (۲٦). هر چند سویه‌های نوترکیب *زانتوموناس* (سویه‌هایی که ژن بتاگالاکتوزیداز باکتری *اشیریشیاکلی* در آن‌ها القا شده است قادرند ژن بتاگالاکتوزیداز را بیان کرده و نسبت به سویه وحشی ٤۰ الی ۲۰۰ برابر بیشتر آنزیم تولید کنند (۲٦)، اما سویه‌های جهش‌یافته تصادفی R3 و R8 حاصل از این پژوهش وهمچنین سویه‌های موتان *Xc* L17

یانگ و همکاران در سال ۲۰۰۲ و AN1 حاصل از تحقیق اشرف و همکاران در سال ۲۰۰۸ که با استفاده از موتاسیون با اسید نیترو از باکتری *زانتوموناس کمپستریس* حاصل شدند از چند جهت نسبت به سویه‌های نوترکیب برتری دارند، اول اینکه افزایش ۱/۵ الی ۲ برابر افزایش فعالیت بتا گالاکتوزیداز برای تامین رشد باکتری کافی است و همین مقدار کم و در عین حال کافی آنزیم موجب ذخیره انرژی و مصرف آن در جهت تولید زانتان می‌شود. در حالی که در سویه‌های نوترکیب، تولید آنزیم بخش قابل توجهی از انرژی را که باید صرف تولید زانتان شود، مصرف می‌کنند. دوم اینکه، برای بهبود سویه تداخل هیچ DNA خارجی و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک شرکت نداشته و نگرانی در مورد انتقال ژن‌های مقاومت وجود نخواهد داشت (۱۲). همچنین معرفی سویه‌های بومی جدید با قابلیت تولید زانتان در محیط کشت ارزان قیمت نظیر آب پنیر در مقیاس صنعتی می‌توانند موثر باشند. مروج و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که برخی سویه‌های بومی *زانتوموناس سیتری* به صورت طبیعی قادر به مصرف قند لاکتوز بوده و در مقایسه با سویه‌های صنعتی *زانتوموناس کمپستریس* می‌توانند در محیط کشت بر پایه آب پنیر مقادیر قابل توجهی زانتان تولید کنند (۲۷).

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که سویه جهش یافته R3 باکتری *زانتوموناس سیتری* K37 نسبت به سویه وحشی، سویه مناسبی جهت تولید زانتان در محیط واجد آب‌پنیر می‌باشد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله پژوهشی کلیه نکات اخلاقی اعم از سرقت ادبی، عدم انتشار دوگانه و تحریف داده‌ها را رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین محترم پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری برای در اختیار قرار دادن امکانات این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Donot F. Fontana A. Baccou JC. Galindo S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohydr Polym. 2012; 87: 951-962.
2. Garcia-Ochoa F. Santos VE. Casas JA. Gomez E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. Biotechnol Adv. 2000; 18(7): 549–579.
3. Hauben L. Vauterin L. Swings J. and Moore ER. Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all Xanthomonas species. Int J sys bacteriol. 1997; 47(2):328–335.
4. Fu JF. Tseng YH. Construction of lactose-utilizing Xanthomonas campestris and production of xanthan gum from whey. Appl Environ Microb.1990; 56: 919-923.
5. Miller GD. Handbook of Dairy Foods and Nutrition. 3rd ed. CRC Press; 2006.
6. Wiley AS. Cultures of Milk: The Biology and Meaning of Dairy Products in the United States and India. 1st ed. Massachusetts: Harvard University Press; 2014.

7. Siso MG. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. Bioresour Technol. 1996; 57: 1-11.
8. Walsh PM. Haas MJ. Somkuti GA. Genetic construction of lactose-utilizing Xanthomonas campestris. Appl Environ Microb.1984; 47(2): 253.
9. Jeeva S. Selva Mohan T. Palavesam A. Isolation and mutagenesis of Xanthomonas sp. Selection of strains with enhanced xanthan production. AARJMD. 2014; 1(24):272-282.
10. Palaniraj A. and Jayaraman V. Production, recovery and applications of xanthan gum by Xanthomonas campestris. J food engineer. 2011; 106:1-11.
11. Niknezhad SV. Asadollahi MA. Zamani A. Biria D and Doostmohamadi M. Optimization of xanthan gum production using cheese whey and response surface methodology. Food Sci Biotechnol. 2015; 24(2): 453-460.
12. Ashraf S. Soudi MR. Sadeghizadeh M. Xanthomonas of a novel mutated strain of Xanthomonas campestris for xanthan production using whey as the sole substrate. Afric J Microbiol. 2008; 3(11): 438 – 442.
13. Ramezani A. Jafari M. Goodarzi T. Alavi SM. Salmanian AH. Azin M. Lactose consuming strains of Xanthomonas citri subsp. citri (Xcc) insight into the emergence of natural field resources for xanthan gum production. World J Microbiol Biotechnol. 2014; 30(5):1511-1517.
14. Ghazi SH. Azin M. Akhavan Sepahi A. Over production of xylanase from Bacillus mojavensis by classical mutagenesis. Biol J Micro. 2014; 11:21-36.
15. Silva MF. Fornari RCG. Mazutti M de Oliveira D. Padilha FF. Cichoski AJ. Cansian RL. Di Luccio M. Treichel H. 2009. Production and characterization of xantham gum by Xanthomonas campestris using cheese whey as sole carbon source. J Food Engin. 90: 119-123.
16. da Silva JA. Cardoso LG. de Jesus Assis D. Gomes JVP. Oliveira MBPP. de Souza OC. et al. Xanthan Gum Production by Xanthomonas campestris pv. campestris IBSBF 1866 and 1867 from Lignocellulose Agro industrial Wastes. Appl Biochem Biotechnol. 2018; 1-14.
17. Miller JH. Experiments in Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1972.
18. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chemist. 1959; 31: 426-428.
19. Coughlin JR. Nickerson TA. Acid-Catalyzed Hydrolysis of Lactose in Whey and Aqueous Solutions. J dairy sci. 1977; 58 (2):169-174.
20. Kerdsup P. Tantratian S. Sanguandeekul R. Imjongjirak C. Xanthan production by mutant strain of Xanthomonas campestris TISTR 840 in Raw Cassava Starch Medium. Food Biopro Technol.2011; 4:1459–1462.
21. Mabrouk MEM. El Ahwany AMD Beliah MMB. Sabri SA. Xanthan production by a novel mutant strain of Xanthomonas campestris: Application of statistical design for optimization of process parameters. Life sci J. 2013; 10(1):1660-1667.

22. Thein A. Prathuangwong S. Novel strains of Xanthomonas oryzae pv. oryzae UV mutated induce systemic resistance in rice against bacterial leaf blight disease. Kasersart J. 2010; 44: 1026-43.

23. Kamal F. Mehrgan H. Mazaheri Assadi M. and Mortazavi SA. Mutagenesis of Xanthomonas campestris and Selection of Strains with Enhanced Xanthan Production. Iran biomed J. 2003; 7 (3):91-98.

24. Rodriguez H. Aguilar L. and Lao M. Variations in xanthan production by antibiotic-resistant mutants of Xanthomonas campestris. Appl microbiol biotechnol.1997; 48(5):.626–629.

25. Thorne L. Tansey L. Pollock TJ. Direct utilization of lactose in clarified cheese whey for xanthan gum synthesis by Xanthomonas campestris. J Indust Microbial Biotechnol. 1988; 3(5), 321–32.

26. Yang TC. Wu GH. Tseng YH. Isolation of a Xanthomonas campestris strain with elevated beta -galactosidase activity for direct use of lactose in xanthan gum production. Lett appl Microbiol. 2002; 35(5):375–379.

27. Moravej R. Alavi SM. Azin M. and Salmanian AH. Production and physicochemical characterization of xanthan gum by native lactose consuming isolates of Xanthomonas citri subsp. citri. Ukr. Bichem. J. 2020; 92(1):92-102.