Archive of SID

جداسازی سویه‌ای جهش‌یافته از باکتری *Xanthomonas campestris* برای تولید زانتان با استفاده از آب پنیر بعنوان تنها سوبسترا

سیمین اشرف[۱]، محمدرضا صعودی[۱]، مجید صادقی‌زاده[۲]

۱. تهران، دانشگاه الزهرا (س)، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی

۲. تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت ۸۶/٤/۱۰ تاریخ پذیرش: ۸۷/۲/۳۱

چکیده

باکتری *Xanthomonas campestris* یک پلی ساکارید خارج سلولی محلول در آب به نام زانتان تولید می کند که کاربرد گسترده ای در صنایع غذایی، شیمیایی، نفت و دیگر صنایع دارد. این باکتری بدلیل پایین بودن سطح فعالیت β- گالاکتوزیداز قادر به مصرف لاکتوز نمی باشد. در نتیجه با رشد باکتری در محیط پایه لاکتوز از جمله آب پنیر، میزان ناچیزی زانتان تولید می شود. آب پنیر، بدلیل BOD بالای آن، دورریزی آن مشکلات عمده ای دارد. بنابراین، این مادهٔ زائد غنی از لاکتوز و پروتئین سوبسترای مناسبی برای فرایندهای تخمیر می باشد. در این پژوهش سویه‌ای جهش یافته‌ای از *Xanthomonas campestris* (سویهٔ NA1) با استفاده از جهش زایی توسط اسید نیترو جداسازی شد. فعالیت آنزیم β- گالاکتوزیداز کشت NA1 در شرایط بهینهٔ بدست آمده (pH= ۵/۵ و دمای $^{\circ}$C ۳۸)، در مقایسه با کشت نوع وحشی ۹/۵ برابر افزایش نشان داد. تولید صمغ زانتان توسط NA1 با استفاده از آب پنیر بعنوان تنها منبع کربن مورد مطالعه قرار گرفت. با استفاده ازطراحی آزمایش پلاکت – برمن (Plackett - Burman) وآنالیز آماری، درمیان ۷ پارامتر آزمایش شده، آب پنیر (بعنوان سوبسترای اصلی) و pH فاکتورهای اصلی مؤثر در تولید صمغ شناخته شدند. تولید صمغ در فرمانتور با استفاده از فاکتورهای مهم بدست آمده از مرحلهٔ بهینه سازی نیز مورد بررسی قرار گرفت. از سویهٔ جهش یافته ۱۰ $g\ l^{-1}$ زانتان با استفاده از آب پنیر بعنوان تنها منبع کربن بدست آمد.

واژه های کلیدی : آب پنیر، اسید نیترو، β- گالاکتوزیداز، زانتان، *Xanthomonas*، طرح آزمایشی پلاکت – برمن

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۸۸۰٤٤۰۵۳، پست الکترونیک:Email: msoudi@alzahra.ac.ir

مقدمه

صمغ زانتان یک پلی ساکارید میکروبی با اهمیت اقتصادی است که توسط باکتری گرم منفی *Xanthomonas campestris* تولید می شود. این صمغ خصوصیات رئولوژیکی ویژه ای دارد و در صنایع مختلف بعنوان عامل پایدار کننده، امولسیون کننده، سوسپانسیون کننده و قوام دهنده کاربرد های گسترده ای دارد. بدلیل سطح پایین فعالیت β- گالاکتوزیداز در *Xanthomonas campestris* ، این باکتری قادر به مصرف لاکتوز بعنوان تنها منبع کربن نیست. در نتیجه، با رشد آن در محیط دارای لاکتوز مقدار کمی زانتان و بیومس تولید می شود. براساس اطلاعات موجود، کاملاً مشخص است که *Xanthomonas campestris* دارای ژن β- گالاکتوزیداز بوده و برای اولین بار در سال ۱۹۷۹ آنزیم β- گالاکتوزیداز از B-1459 *Xanthomonas campestris* خالص سازی شد (۳). در سال ۱۹۹۵ ژن β- گالاکتوزیداز از *Xanthomonas axonopodis* pv*manihotis* کلون شد (۱۷). اخیراً سه ژن β- گالاکتوزیداز در *Xanthomonas campestris* pv *campestris* کلون و ترادف یابی شده است و حضور

www.SID.ir

Archive of SID

چهارمین ژن β- گالاکتوزیداز نیز پیشنهاد شده است (۱۹). آب پنیر، یک محصول فرعی صنایع لبنی است که دارای ٪۵-٤ لاکتوز، ٪۱-۰/۸ پروتئین و مقادیر اندکی اسید های آلی، نمک ها و ویتامین ها است. دفع آب پنیر بدلیل BOD بالای آن نیاز به پالایش دارد که وقت گیر و پر هزینه می باشد. بهمین دلیل و همچنین بدلیل محتوای لاکتوز زیاد آن، آب پنیر بعنوان سوبسترائی مناسب برای انواع تخمیر مورد توجه قرار گرفته است (۱). تا کنون برای ایجاد سویه هایی با توانایی تولید زانتان از لاکتوز تلاش های بسیاری صورت گرفته است. پلاسمید های بیان کنندهٔ β- گالاکتوزیداز طراحی شده و از راه هم یوغی به *Xanthomonas campestris* منتقل شده است. سویه حاصل قادر به مصرف آب پنیر برای تولید زانتان می باشند (۵،٤). در سال ۲۰۰۲ یک سویهٔ مصرف کنندهٔ لاکتوز از راه جهش زایی با اسید نیترو جداسازی شد. مقادیر زانتان تولیدی توسط سویهٔ جهش یافته در محیط پایه لاکتوز با مقادیر تولیدی در محیط بر پایه گلوکز قابل مقایسه بود (۲۰). به امید دستیابی به سویه‌های برتر در این پژوهش، امکان جدا سازی سویه‌های جهش یافتهٔ مصرف کنندهٔ لاکتوز *Xanthomonas campestris* b82 به منظور تولید زانتان به روش جهش زایی با اسید نیترو مورد بررسی قرار گرفت .

مواد و روشها

میکروارگانیسم و محیط های کشت

یک سویهٔ بومی *Xanthomonas campestris*که قبلاً از خاک جداسازی شده بود، برای جهش‌زایی مورد استفاده قرار گرفت (۱۵).

محیط LB بعنوان محیط غیر اختصاصی استفاده شد. برای نگهداری سویهٔ بومی محیط YMA (٦) و برای نگهداری سویهٔ جهش‌یافته محیط XOL آگار، g l^{-1}، (K_2HPO_4 ، $MgCl_2.6H_2O$ ؛ ۱/۰ ، $(NH_4)_2SO_4$ ؛ ۰/۲ ، KH_2PO_4 ؛ ۰/۷ ، $FeSO_4.7H_2O$ ؛ ۰/۱ ، $MnCl_2$ ؛ ۰/۰۱ ، agar ؛ ۰/۰۰۱ ، ۱۵) دارای ۲٪ لاکتوز مورد استفاده قرار گرفت. جهت اندازه‌گیری سرعت رشد سلولی و فعالیت β- گالاکتوزیداز از محیط XOLN (محیط XOL به اضافهٔ ٪ ۰/۰٦۲۵عصارهٔ مخمر و ٪۰/۰٦۲۵ تریپتون) دارای ٪۰/٤ لاکتوز استفاده شد. منابع کربن پس از اتوکلاو به محیط افزوده شد(۲۰). برای ارزیابی مصرف لاکتوز، محیط رنگی C، g l^{-1}، ($NH_4H_2PO_4$ ، ۰/۵ ؛ K_2HPO_4 ، ۰/۵ ؛ $MgSO_4.7H_2O$ ، ۰/۲ ؛ NaCl ، ۵ ؛ yeast extrac ، ۱ ؛ carbon source (lactose) ، ۵ ؛ Bromocresol purple (1.5% alcoholic solution) ، ۰/۷ ml l^{-1} ؛ agar ، ۱۲) مورد استفاده قرار گرفت(۲) . جهت تولید صمغ در آزمایش های طرح پلاکت- برمن از ترکیبات محیط سنتتیک ارائه شده توسط Roseiro استفاده شد(۱٤).

جهش‌زایی و جداسازی سویهٔ جهش‌یافته

جهت جهش زایی با اسید نیترو از روش ارائه شده توسط Yang و همکاران استفاده شد(۲۰). جدایه ها بر روی محیط رنگی C دارای لاکتوز کشت داده شدند. با مصرف لاکتوز و تولید اسید، رنگ بنفش محیط به رنگ زرد تغییر یافت. همچنین سرعت رشد توسط اسپکتروفتومتر UV-VIS در OD ٦۲۰nm در فواصل زمانی ۳ ساعته در محیط XOLN دارای ٪۰/٤ لاکتوز اندازه‌گیری شد.

سنجش فعالیت آنزیم

فعالیت β- گالاکتوزیداز براساس روش ارائه شده توسط Yang و همکاران، که همان روش اصلاح شدهٔ Miller است، سنجش شد(۲۰). برای سنجش فعالیت آنزیم، سلول‌های بدست آمده ازنظم مرحله لگاریتمی در محیط مایع XOLN دارای ٪۰/٤ لاکتوز مورد استفاده قرار گرفت. شرایط بیرونی بهینه برای فعالیت آنزیم (pH و دما) تعیین شد. همچنین فعالیت آنزیم سویهٔ وحشی و جهش‌یافته اندازه گیری شد. یک واحد فعالیت β- گالاکتوزیداز

www.SID.ir

Archive of SID

مقداری آنزیم است که ۱ نانومول اورتو نیترو فنل (ONP) در دقیقه تولید کند.

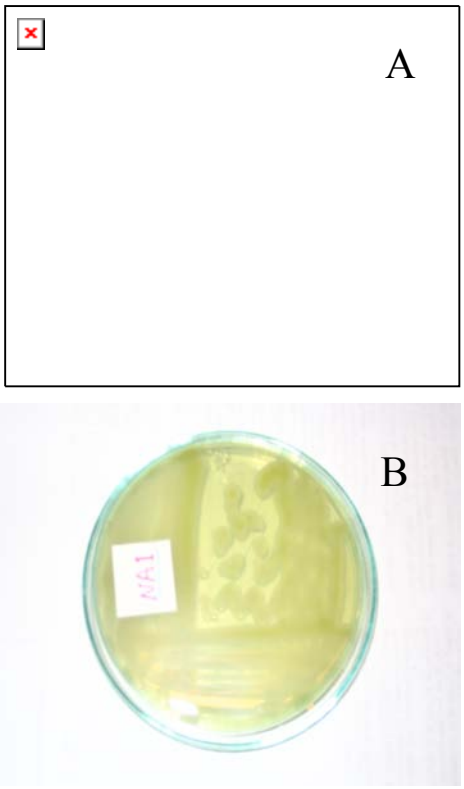
ارزیابی عوامل مؤثر

مقدار زانتان و بیومس بعنوان پارامتر های تولید اندازه گیری شد. حجم مشخصی از مایع کشت (دارای زانتان و بیومس) با استفاده از حلال آلی وکلرید کلسیم رسوب داده شد، سپس بعنوان محصول خام، در آون C60° خشک و وزن شد. محاسبه میزان زانتان و بیومس با تیمار حرارتی یک محلول مشخص زانتان (باز سازی شده از محصول خام) در دمای C ٦٠° و تیمار آنزیمی (U ۱۰۰۰ به ازای ۱ گرم زانتان) انجام شد. سپس صمغ با استفاده از حلال آلی ویژه، ایزوپروپانول و کلرید کلسیم از محلول تیمار شده استخراج شد. در نهایت رسوب حاصل خشک و توزین شد (۱۰، ۱۱).

جهت ارزیابی اهمیت pH اولیه و انواع ترکیبات غذایی (آب پنیر، لاکتوز، سوکروز، نمک‌ها، سیترات سدیم و فسفات) در تولید صمغ از طرح آزمایشی پلاکت – برمن استفاده شد که در آن ۷ عامل فرایند در ۱۲ آزمایش مورد بررسی قرار گرفت(١٦). آزمایش‌ها در فلاسک‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری دارای ۸۰ میلی‌لیتر محیط با دو بار تکرار انجام شد. برای سنجش اهمیت هر فاکتور فرایند ارزش P محاسبه و با استفاده از نرم افزار Minitab پردازش داده ها انجام شد. تولید صمغ توسط سویهٔ وحشی و جهش یافته با استفاده از فاکتورهای مؤثر تعیین شده در مرحلهٔ بهینه سازی در فلاسک‌های ml ۵۰۰ با دمای C ۲۸° و دور rpm ۱۵۰ صورت گرفت.

تولید صمغ در فرمانتور

جهت تهیه پیش کشت ۷ میلی‌لیتر محیط YMB از کشت باکتری بر روی پلیت XOL آگار دارای ٪۲ لاکتوز تلقیح و در C ۲۸° به مدت یک شب گرماگذاری شد. سپس از کشت YMB به میزان ۱۰٪ به محیط حاوی پودر آب پنیر (w/v) ۱٪ تلقیح و پس از گرماگذاری در rpm ۱۵۰ و C ۲۸° به میزان ۲۰٪ به محیط کشت فرمانتور (پودر آب پنیر به میزان g/l ۳۰ و pH ٦ تلقیح شد. تخمیر در فرمانتور ۲ لیتری (Bench- top (B-Braun در دمای C ۲۸° ، سرعت هوادهی vvm ۲ به مدت ۷۲ ساعت انجام شد. با افزایش ویسکوزیته، سرعت همزنی از rpm ۱۵۰ به rpm 200 افزایش یافت.



شکل ۱ : رشد سویه های وحشی و جهش یافته بر روی محیط رنگی
C . A : نوع وحشی ، B : جهش یافته.

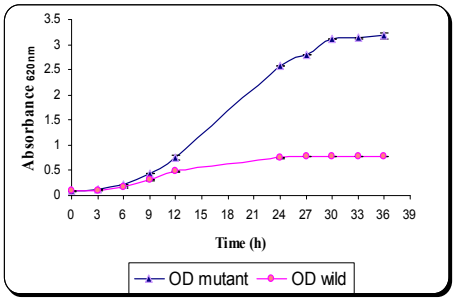
نتایج

روش تیمار با اسید نیترو، دقیقاً مطابق روش Yang و همکاران اجرا شد (۲۰) و نتیجه برای جداسازی جهش یافته ها موفقیت آمیز بود. پس از جهش‌زایی بااسید نیترو، کلنی های نسبتاًدرشت مصرف کننده لاکتوز در پلیت XOL آگار دارای ٪۲ لاکتوز جداسازی شد. قابلیت رشد در پاساژ های مکرر حفظ شد که نشانهٔ توانایی مصرف لاکتوز بعنوان تنها منبع کربن است. یکی از جدایه های مصرف

www.SID.ir

Archive of SID

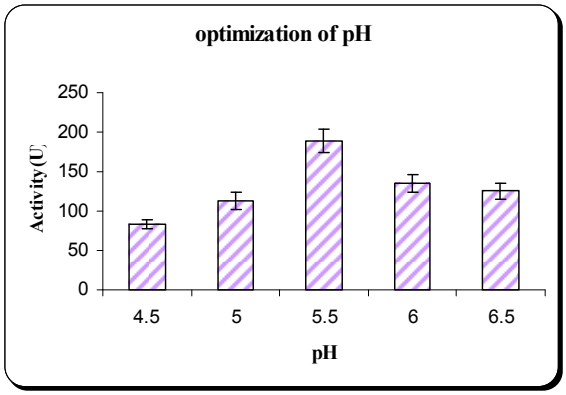
کنندهٔ لاکتوز جهت بررسی فراتر انتخاب شد (NA1). در مقایسه با سویهٔ وحشی، این سویه قادر به رشد و تولید اسید در محیط رنگی C دارای لاکتوز بعنوان تنها منبع کربن و تغییر رنگ محیط از بنفش به زرد بود(شکل ۱). منحنی رشد سویه های وحشی و NA1 در محیط XOLN دارای ۰/٤٪ لاکتوز در شکل (۲) نشان داده شده است. سویهٔ وحشی پس از ۲٤ ساعت به اواخر فاز لگاریتمی با جذب نوری ۰/۷۸ رسید، اما سویهٔ جهش یافته پس از ۳۰ ساعت به حداکثر جذب نوری ۳ رسید. این نشان می‌دهد که سویهٔ جهش یافته توانایی رشد بهتری در محیط پایه لاکتوز نسبت به سویهٔ وحشی را دارد. شرایط بهینهٔ فعالیت آنزیم β- گالاکتوزیداز NA1 بررسی شد و دما و pH بهینه، بترتیب C ˚۳۸ و ۵/۵ به دست آمد (شکل B و – A3). فعالیت آنزیمی نوع وحشی و NA1 در شرایط بهینه اندازه‌گیری و مقایسه شد. فعالیت آنزیمی NA1 ۹/۵ برابر بیشتر از نوع وحشی بود (۳۳٦/۱ U در مقابل ۳۵/٤ U) که این افزایش در فعالیت آنزیمی برای تامین رشد کافی می‌باشد. بمنظور تعیین عامل های مؤثر در افزایش تولید زانتان توسط سویهٔ NA1 در محیط آب پنیر، از طرح آزمایش پلاکت- برمن استفاده شد. طرح آزمایش و نتایج مربوط به تولید زانتان در هر آزمایش در جدول (۱) نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود حداکثر تولید زانتان $8/84\ g\ l^{-1}$ در آزمایش شمارهٔ ۷ (آب پنیر و اسید سیتریک هر دو در سطح بالا) می‌باشد. پس از بدست آوردن داده ها، نرم افزار Minitab و آنالیز آماری برای ارزیابی فاکتور های مؤثر به کار رفت. برای تعیین اهمیت عاملها، میزان احتمال (ارزش P) ۰/۰۵ > بعنوان نقطه حد در نظر گرفته شد. بنابراین عاملهای با ارزش P کمتر از ۰/۰۵ بعنوان عامل مؤثر با اثر مثبت در تولید و عاملهای دارای ارزش P بیشتر از ۰/۰۵ بعنوان عاملهای غیر مؤثر بر افزایش تولید می باشند. ارزش P در مطالعات پلاکت- برمن برای هر یک از عامل های کشت شامل آب پنیر، لاکتوز، سوکروز، نمک‌ها، اسید سیتریک، فسفات و pH بترتیب برابر ۰/۰۰۰، ۰/۲٤۳، ۰/۷۸۱، ۰/۵۰۵، ۰/۱۵۹، ۰/۰۹۳، ۰/۰۰۲ به دست آمد (جدول ۲). آب پنیر با ارزش P ۰/۰۰۰ و pH با ارزش P ۰/۰۰۲ دو فاکتوری هستند که دارای ارزش P >۰/۰۵ می باشند. همچنین منحنی اثر جداگانهٔ عامل های مختلف بر تولید زانتان و نمودار pareto عاملها در شکل (٤، ۵) نشان داده شده است. با افزایش غلظت سوکروز، نمک های معدنی وفسفات اثر منفی بر تولید صمغ مشاهده شد، اما افزودن سیترات و لاکتوز موجب افزایش نسبی در تولید زانتان گردید، که با توجه این تاثیر با ملاحظه ارزش P چندان قابل توجه نبود. افزودن آب پنیر و تنظیم pH٦ موجب افزایش قابل توجهی در تولید زانتان گردید. مقایسه‌ای از تولید زانتان توسط سویهٔ NA1 و b82 در فلاسک حاوی محیط پایه لاکتوز (آب پنیر با pH 6) در شکل(٦) نشان داده شده است. سویهٔ NA1 نسبت به سویهٔ وحشی میزان بالاتری از زانتان تولید کرده است ($9/1\ g\ l^{-1}$) تولید زانتان توسط NA1 در برابر $0/05\ g\ l^{-1}$ تولید توسط سویهٔ وحشی و $g\ l^{-1}$). تولید صمغ با در نظر گرفتن فاکتورهای مؤثر تعیین شده در مرحلهٔ بهینه‌سازی (آب پنیر ۳۰ g/l و pH ٦)، در فرمانتور مقیاس آزمایشگاهی انجام شد که صمغ زانتان وبیومس بترتیب $10\ g\ l^{-1}$ و $2/37\ g\ l^{-1}$ می باشد.

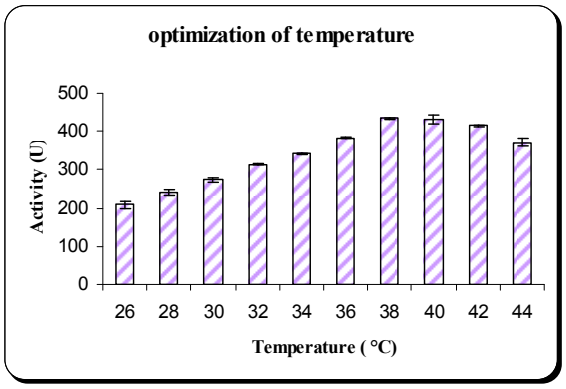


شکل ۲ : منحنی رشد سویه b82 (●) و NA1 (▲) در محیط XOLN دارای ۰/٤٪ لاکتوز

www.SID.ir

Archive of SID





شکل ۳: اثر تغییرات pH (A) و دما (B) برروی فعالیت آنزیم β- گالاکتوزیداز (آزمایشات در ۳ تکرار انجام شده است)

بحث

تاکنون، برای بدست آوردن سویه‌های بهبود یافته *Xanthomonas campestris* از راه جهش‌زایی تلاش‌های بسیاری صورت گرفته است. اثرات جهش بر ساختار و تولید زانتان می‌تواند بسیار گسترده باشد، به گونه‌ای که جهش یافته هائی از این باکتری جدا شده، که ساختار اسکلتی زانتان در آنها تغییر یافته است. بعنوان مثال، جدا شدن جهش یافته‌ای از این باکتری است که زانتان آن بجای واحدهای تکرار شوندهٔ پنتامری، دارای ساختار تری ساکاریدی متشکل از گلوکز و مانوز است که نوعی سلولز با گروههای جانشینی محسوب می‌شود (۱۸). برای جداسازی جهش یافته های با تولید بیشتر و ویسکوزیتهٔ بالاتر بکارگیری معیارهای مستقیم گاه دشوار است. برخی پژوهشگران روش‌های غیر مستقیم را بکار برده‌اند و افزایش قطر هیدرولیز نشاسته را در محیط‌های کشت واجد این پلی‌ساکارید معیار جداسازی سویه‌های مولد نظیر سویهٔ M11 قرار داده اند (۱۲). از دیگر معیارهای گزینش غیر مستقیم جهش یافته ها مقاومت آنها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها است (۱۳). افزایش تولید زانتان با استفاده از اتیل متان سولفونات بعنوان عامل جهش‌زا (۹) و افزایش فعالیت β- گالاکتوزیداز توسط اسید نیترو (۲۰) از مثال‌های شاخص در گزینش مستقیم می‌باشند. جداسازی جهش یافته های مصرف کنندهٔ لاکتوز نیز با معیار مستقیم امکان پذیر است.

جدول ۱ : طراحی دوازده اجرایی پلاکت – برمن مورد استفاده در مطالعه ی هفت عامل در تولید زانتان

آزمایش	آب پنیر	لاکتوز	سوکروز	نمک ها (سولفات آهن و منیزیم)	اسید سیتریک	فسفات	pH	زانتان g/l	بیومس g/l
۱	−۱	−۱	−۱	+۱	−۱	−۱	+۱	۰/۶۱	۰/۱۷
۲	−۱	−۱	+۱	−۱	−۱	+۱	−۱	۰/۹۵	۰/۲۹
۳	−۱	−۱	+۱	−۱	+۱	+۱	+۱	۱/۲۳	۰/۴۳
٤	−۱	+۱	−۱	−۱	+۱	−۱	+۱	۰/۸۲	۰/۳۳
۵	−۱	+۱	−۱	+۱	+۱	+۱	−۱	۷/۲۳	۱/۹٤
٦	−۱	+۱	+۱	+۱	−۱	−۱	−۱	۲/٦٦	۱/۳۷
۷	+۱	−۱	−۱	−۱	+۱	−۱	−۱	۸ /۸٤	۲/۲۸
۸	+۱	−۱	−۱	+۱	−۱	+۱	+۱	۱/۸۵	۱/۰۱
۹	+۱	−۱	+۱	+۱	+۱	−۱	−۱	۸/۵	۳/۲۲
۱۰	+۱	+۱	−۱	−۱	−۱	+۱	−۱	٦/٦۳	۳/۱٦

www.SID.ir

Archive of SID

۱۱	+۱	+۱	+۱	−۱	−۱	−۱	+۱	−۱	۸/۵۸	۳/۵٦
۱۲	+۱	+۱	+۱	+۱	+۱	+۱	+۱	+۱	۲/۵٦	۳/٤۳

سطح پایین (−۱) و بالای (+۱) عامل ها، $g\ l^{-1}$ پودر آب پنیر (۰ ، ۳۰)، لاکتوز (۰ ، ۲۰)، سوکروز(۰ ، ۲۰)، محلول نمکی (۰ ، ۳/۲)، اسید سیتریک (۰ ، ۲/۷)، فسفات(۰ ، ۵)، pH، (٦،۷). آزمایشات در دو تکرار انجام شده است.

جدول ۲: جدول آنالیز حاصل از Minitab

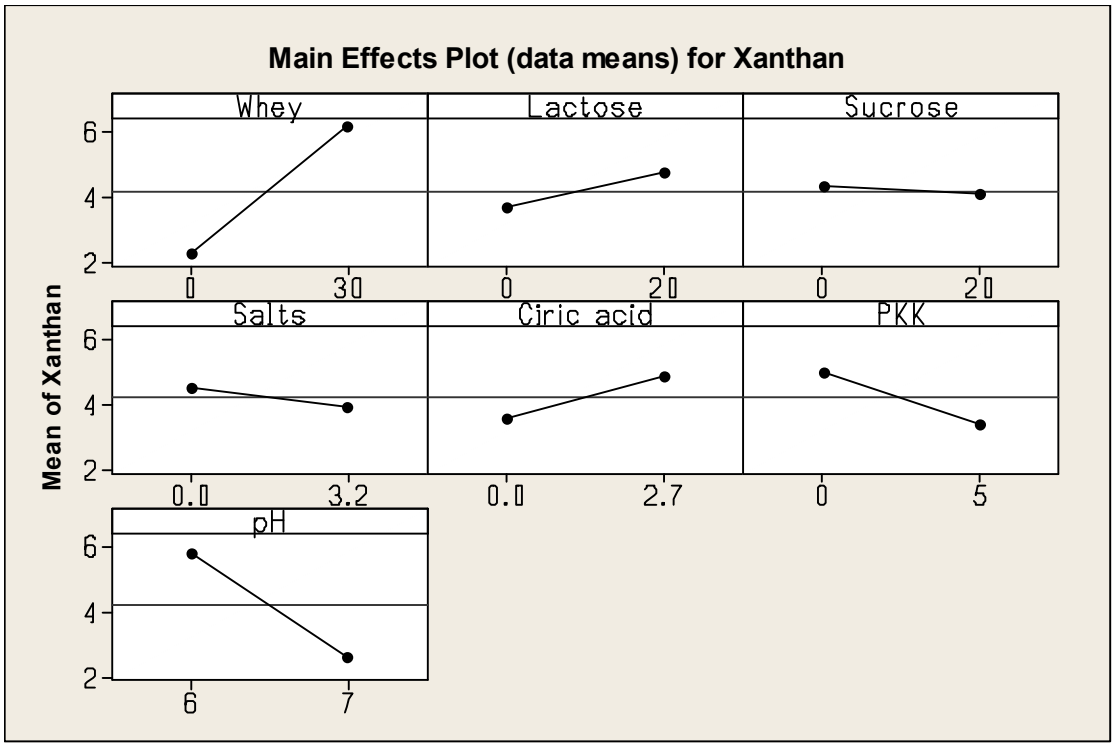
Factorial Fit: xanthan versus whey; lactose; ...

Estimated Effects and Coefficients for xanthan (coded units)

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		4.203	0.4461	9.42	0.000
whey	3.910	1.955	0.4461	4.38	0.000
lactose	1.083	0.541	0.4461	1.21	0.243
sucrose	-0.252	-0.126	0.4461	-0.28	0.781
salts	-0.608	-0.304	0.4461	-0.68	0.505
citric acid	1.318	0.659	0.4461	1.48	0.159
pkk	-1.593	-0.797	0.4461	-1.79	0.093
pH	-3.196	-1.598	0.4461	-3.58	0.002

S = 2.18552 PRESS = 171.954

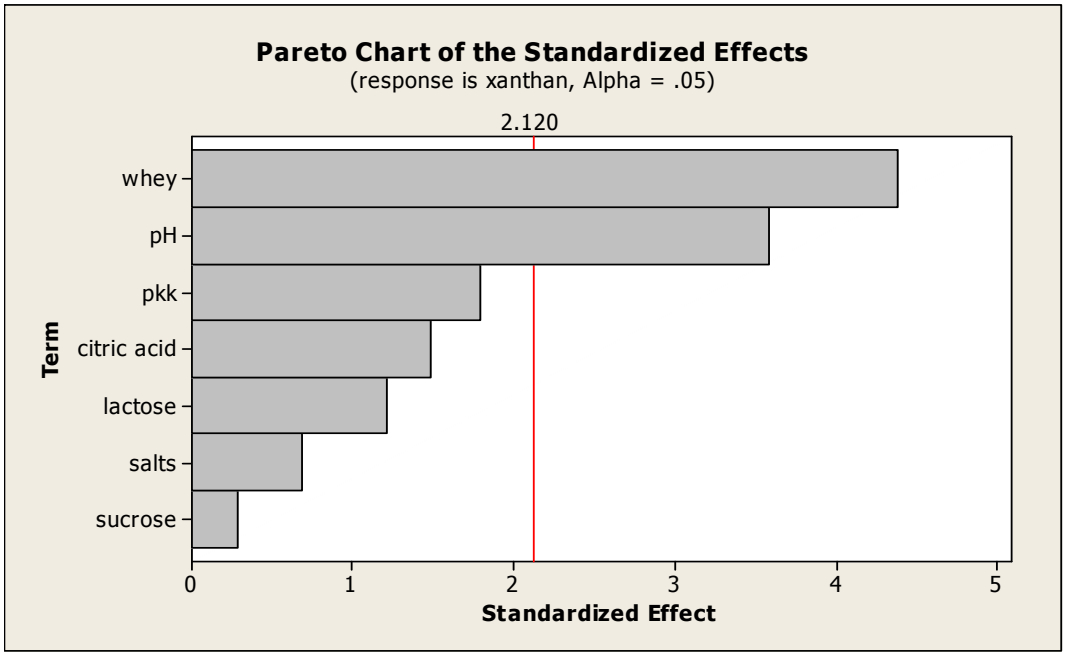
R-Sq = 71.13% R-Sq(pred) = 35.04% R-Sq(adj) = 58.50%



شکل ٤: نمودار اثر عامل های موثر بر تولید زانتان از آب پنیر

www.SID.ir

Archive of SID



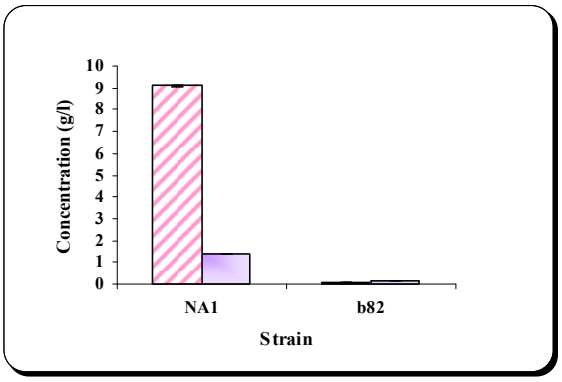
شکل۵: نمودار pareto اثر عامل ها بر تولید زانتان

در این پژوهش، فعالیت ژن β- گالاکتوزیداز سویهٔ جهش یافتهٔ NA1 (که از یک سویهٔ وحشی بومی *Xanthomonas campestris* بدست آمد) پس از جهش زایی با اسید نیترو افزایش یافت. این نتیجه همچنان نظر Yang را تایید می کند که ژن β- گالاکتوزیداز در سویه های وحشی *Xanthomonas campestris* وجود دارد و بدلیل نبود عامل های فشار انتخابی در محیط های خاک و گیاه غیر فعال شده است (۲۰). سویه های نوترکیب شده برای بیان بالای β- گالاکتوزیداز، نسبت به سویهٔ وحشی ٤٠ تا ۲۰۰ برابر بیشتر آنزیم تولید می کنند (۵، ٤). با این حال سویه های جهش یافته مانند NA1 و Xc17L (۲۰) نسبت به چنین سویه هایی به جهات مختلف برتری دارند. اول اینکه، افزایش متوسط ۵/ ۹ مرتبه در فعالیت β- گالاکتوزیداز برای تامین رشد کافی می‌باشد و سطح پایین اما کافی آنزیم بدلیل ذخیرهٔ انرژی برای تولید زانتان یک مزیت محسوب می‌شود. در حالی که در سویه های 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 یا ژن مقاومت به آنتی بیوتیک شرکت ندارد، بنابراین از نگرانی ایجاد یک ارگانیسم اصلاح شدهٔ ژنی و ترس از گسترش یک ژن مقاومت آنتی بیوتیکی اجتناب خواهد شد. از بررسی فعالیت بهینهٔ آنزیم در سویهٔ جهش یافتهٔ NA1 نتایج قابل مقایسه‌ای با سویهٔ جهش یافتهٔ Xc 17L (۲۰) و سویهٔ وحشی Xc B-1459 (۳) بدست آمد. دمای بهینهٔ فعالیت β- گالاکتوزیداز NA1 (C ۳۸°) متفاوت از سویه Xc 17L (C ۲۸°) بود، اما pH بهینهٔ مشابهی در هر دو مشاهده شد (۵/۵). شایان ذکر است که تولید زانتان در غالب سویه ها در دمای C ۳۰°- ۲٤ صورت می گیرد، اما رشد می تواند تا دمای C ۳۷° ادامه یابد. در مورد Xc B-1459، pH بهینهٔ فعالیت آنزیمی ۵/۸-۵/۵ و دمای بهینه C ° ۳۷-۳۲ گزارش شده است. فعالیت آنزیم Xc 17L نسبت به سویهٔ وحشی، Xc 17، ۳/۵ برابر افزایش دارد، اما فعالیت آنزیمی NA1 نسبت به نوع وحشی b82، ۹/۵ برابر بیشتر می باشد. با توجه به توانایی سویهٔ NA1 در مصرف لاکتوز، انتخاب آب پنیر بدلیل ارزان بودن این فراوردهٔ غنی و نیز حل مشکلات دفع پساب، بعنوان سوبسترای تولید زانتان می تواند بسیار مناسب باشد. بنابراین در مرحلهٔ بعد امکان تولید زانتان بر روی آب پنیر مورد بررسی قرار گرفت. مطالعهٔ قبلی ما نشان داد که آب پنیر دارای پپتون می تواند برای تکثیر

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌های *Xanthomonas campestris* به کار رفته و جهت تهیهٔ پیش کشت جایگزین YMB گردد(۱۵). جهت بهینه سازی محیط تولید، زمانیکه با بیش از ۵ متغیر روبرو هستیم، روش کاربردی طراحی آزمایش پیشنهاد می شود. طراحی پلاکت – برمن برای شناسایی عامل‌های اصلی و مهم مداخله کننده درتخمیر به کار رفت. البته این روش نمی تواند بر هم کنش بین عوامل را بررسی کند ولی برای شروع فرایند بهینه سازی مناسب به نظر می رسد (۸). پس از طرح بلوک های تصادفی، انجام آزمایش و آنالیز داده‌ها مشخص شد که تراکم آب پنیر و pH محیط کمترین میزان احتمال (ارزش) را نشان می‌دهند و بعبارت دیگر مهمترین عامل مؤثر بر تولید زانتان از آب پنیر می باشد. تاثیر میزان آب پنیر می تواند با این حقیقت توضیح داده شود که وقتی مقادیر بیشتری از منبع کربن قابل تخمیر در اختیار *Xanthomonas campestris* باشد، بازده بیشتری خواهد داشت. در این باره، منابع نیتروژن همراه قند از جمله پروتئین‌های آب پنیر اثرات نامطلوبی تحمیل کرده و بعنوان فاکتور محدود کننده عمل می کنند که این امر بدلیل ممانعت از ایجاد نسبت کافی C/Nمی باشد. ولی کنترل دیگر شرایط می تواند به حفظ توازن C/N کمک کند. اثر مثبت pH اسیدی بدلیل محدودهٔ بهینهٔ pH آنزیم β-گالاکتوزیداز است. باکتری *Xanthomonas campestris* در محیط دارای گلوکز در حدود $g\ l^{-1}$ ۳۰-۱۰زانتان و $g\ l^{-1}$ ۱۰-۱ بیومس تولید می کند(۷) و از طرفی در سال ۲۰۰۲ Yang و همکاران نشان دادند که سویهٔ جهش یافته Xc 17L در محیط دارای لاکتوز $g\ l^{-1}$ ۱/۸۵۲ زانتان تولید می کند(۲۰). این در حالی است که تولید زانتان توسط سویهٔ جهش یافته جدا شده (NA1) در این پژوهش، با استفاده از آب پنیر بعنوان تنها منبع کربن $g\ l^{-1}$ ۹/۱ در فلاسک و حدود $g\ l^{-1}$ ۱۰ در فرمانتور است. بنابراین استفاده از سویهٔ جهش یافته NA1 جهت تولید زانتان با استفاده از سوبسترای ارزان قیمت آب پنیر امیدوار کننده است.



شکل ٦: مقایسهٔ پارامترهای تولید(زانتان و بیومس) در سویه های جهش یافتهٔ NA1 و سویهٔ وحشی b82 در محیط آب پنیر

منابع

1. Ahmed, I. and Morris, D., 1991. Alcohol fuels from whey: novel commercial uses for a waste product. Free Hand Press, Washington, DC.
2. Bergey' s manual of systematic bacteriology, 1986. Edited by Krieg, N. R. Williams & Wilkins. Vol 1, page 206.
3. Frank, J.F. and Somkuti,G.A., 1979. General properties of beta- galactosidase of *Xanthomonas campestris*. Applied and Environmental Microbiology, 38: 554-556.
4. Fu, J.F. and Tseng, Y.H., 1990. Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. Applied and Environmental Microbiology, 56: 919-923.
5. Fu, J.F., Chang, R.Y. and Tseng,Y.H., 1992. Construction of stable lactose-utilizing Xanthomonas campestris by chromosomal integration of cloned Lac genes using filamentous phage ϕLf DNA. Applied Microbiology and Biotechnology, 37: 225-229.
6. Galindo, E., Salcedo,G., Ramirez,M.E., 1994. Preservation of *Xanthomonas campestris* on agar slopes: effects on xanthan production. Applied Microbiology and Biotechnology, 40: 634-637.
7. Garcia-Ochoa, F., Santos,V.E., Casas,J.A., Gomez, E., 2000. Xanthan gum: production , recovery, and properties. Biotechnology Advances, 18: 549-579.

www.SID.ir

Archive of SID

8. Greasham, R. and Inamine, E., 1986. Nutritional improvement of processes. Manual of industrial microbiology and biotechnology. Edited by A.L. Demain and N.A. Solomon. American Society for Microbiology, Washington, pp: 41-48.

9. Kamal, F., Mehrgan,H., Mazaheri Assadi,M., Mortazavi, S.A., 2003. Mutagenesis of Xanthomonas campestris and selection of strains with enhanced xanthan production. Iranian Biomedical Journal, 7 (3): 91-98.

10. Murofushi, K., Homma, T., Nagura, Sh., Armentrout, R., 1998. Process for preparation of purified xanthan gum. US patent, 5705368.

11. Murofushi, K., Homma, T., Nagura, Sh., Armentrout, R., 1999. Process of purifying xanthan gum using an alkaline protease and lysozyme. US patent, 5994107.

12. Rodriguez, H., Aguilar, L., 1997. Detection of *Xanthomonas campestris* mutants with increased xanthan production. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 18: 232-234.

13. Rodriguez, H., Aguilar, L., Lao, M., 1997. Variations in xanthan production by antibiotic-resistant mutants of *Xanthomonas campestris*. Applied Microbiology and Biotechnology, 48: 626-629.

14. Roseiro, J.C., Esgalhado, M.E., Amaral-Callaco, M.T. and Emery, A.N., 1992. Medium development for Xanthan production. Process Biochemistry, 27: 167-175.

15. Soudi, M.R., Ebrahimi,M., Sharyat Panahi, S., 2006. Xanthan gum production using whey for preculture preparation. Modern multidisciplinary applied microbiology. Edited by A. Mendez-Vilas. WILEY-VCH, Weiheim, pp: 265-268.

16. Strobel, R. J. and Sullivan, G. R., 1999. Experimental design for improvement of fermentations. Manual of industrial microbiology and biotechnology, 2nd edition. Edited by A. L. Demain and G. E. Davies, ASM press. pp: 80-93.

17. Taron, C.H., Benner,J.S., Hornstra, L.J. and Guthrie,E.P., 1995. A novel β- galactosidase gene isolated from the bacterium Xanthomonas campestris exhibits strong homology to several eukaryotic β- galactosidase. Glycobiology, 5: 603-610.

18. Vojnov, A.A., Bassi, D.E., Daniels, M.J., Dankert, M.A., 2002. Biosynthesis of a substituted cellulose from a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. Carbohydrate Research, 337: 315-326.

19. Yang, T.C., Hu, R.M., Hsiao, Y. M., Weng, Sh. F., Tseng, Y. H., 2003. Molecular genetic analysis of potential β- galactosidase genes in Xanthomonas campestris. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 6: 145-154.

20. Yang, T.C., Wu, G.H. and Tseng, Y.H., 2002. Isolation of a Xanthomonas campestris strain with elevated β- galactosidase activity for direct use of lactose in xanthan gum production. Letters in Applied Microbiology, 35: 375-379.

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation of a novel mutated strain of *Xanthomonas campestris* for xanthan production using whey as the sole substrate

[1]Ashraf, S., [*1]Soudi, M.R., [2]Sadeghizadeh., M.

1- Microbiology Dept., Faculty of Science, Alzahra University, Tehran, I. R. of IRAN.

2- Biology Dept., Faculty of Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I. R. of IRAN

Abstract

Xanthomonas campestris produces a water- soluble extracellular polysaccharide, xanthan gum, which is extensively applied in food and other industries. This bacterium is not able to utilize lactose due to low levels of β- galactosidase activity or absence of the enzyme. Consequently very little xanthan is produced when the bacterium grows in lactose- based media such as whey. Whey poses a major waste disposal problem due to its high BOD. Therefore, this waste is a suitable substrate for conducting fermentation processes. In this study, a mutant strain was isolated from a plenty of *Xanthomonas campestris* cells exposed to nitrous acid mutagenesis (NA1). Environmental conditions were optimized and maximum activity of the β-galactosidase enzyme obtained at pH 5.5 and 38°C. Also, the β-galactosidase activity in NA1 cultures was increased 9.5 folds, comparing to that of the wild type cultures (336.1 U vs. 35.4 U). Xanthan gum production by NA1 using whey as carbon source was also studied. By using experimental design (Plackett-Burman) and statistical analysis, among seven parameters tested, we found that whey, as the main substrate, and pH were the first factors affecting gum production. Gum production using significant factors was carried out in a lab-scale fermentor and 10 g l^{-1} xanthan was obtained.

Key words: β-galactosidase, Nitrous acid, Plackett-Burman experimental design, whey, xanthan, *Xanthomonas*.

www.SID.ir