



## Enhancement of Violacein Production in *Janthinobacterium lividum* via Adaptive Laboratory Evolution (ALE)

Norouz Bagoghli Sarbanlar<sup>1</sup>, Afrouzossadat Hosseini-Abari<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Received: 2025/10/26

Accepted: 2025/11/30

Online Published: 2025/11/30

### Abstract

Violacein is a water-insoluble purple pigment produced by several gram-negative bacteria, including *Janthinobacterium lividum*. This pigment exhibits a wide range of biological activities, including anticancer, bacteriostatic, antibiotic, antifungal, antiparasitic, and antiviral properties. However, due to its low production yield, industrial-scale production has not yet been achieved. The main aim of the present study was to apply the Adaptive Laboratory Evolution (ALE) approach based on the basic principles of Darwinian evolution to enhance violacein production in *J. lividum*. Initially, the effects of various concentrations of ampicillin on bacterial growth and violacein production were evaluated. Subsequently, ALE was performed through sequential transfer in Erlenmeyer flasks containing different concentrations of ampicillin (0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1 mg/mL). Twenty passages were conducted at each concentration, and the adapted strains were preserved in glycerol. After the final passage, cultures were transferred to agar plates containing ampicillin, and antibiotic-resistant colonies were selected for the next round. To investigate the effect of ampicillin on violacein and its precursor, the amino acid L-tryptophan (L-Trp), High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was employed. The results showed that violacein production increased significantly under sub-lethal concentrations of ampicillin; in the presence of 0.4 mg/mL of this antibiotic, violacein yield rose from 56 mg/L to approximately 132 mg/L. Through ALE, an evolved strain resistant to 1 mg/mL ampicillin was obtained, capable of producing 420 mg/L of violacein. Moreover, L-tryptophan production increased significantly compared to the control condition (from 0.62 µg/mL to 0.95 µg/mL). Overall, the results suggest that ampicillin may enhance violacein biosynthesis by stimulating the production of its precursor, L-tryptophan.

**Keywords:** Violacein, Adaptive Laboratory Evolution (ALE), L-tryptophan, *Janthinobacterium lividum*

**Cite this article:** Bagoghli Sarbanlar N, Hosseini-Abari A. Enhancement of violacein production in *Janthinobacterium lividum* via adaptive laboratory evolution (ALE). *Informatics in Biology, Health, and Food*. 2025;2(2):1-10.

**Copyright©:** The Authors. Published by Shandiz Institute of Higher Education

**Corresponding author:** Afrouzossadat Hosseini-Abari

**Email:** af.hosseini@sci.ui.ac.ir.



### افزایش تولید رنگدانه ویولاسئین در *جانثینوباکتریوم لیویدوم* از طریق تکامل آزمایشگاهی سازشی

نوروز بگ اوغلی ساربانلار<sup>۱</sup>، افروزالسادات حسینی ابری<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

دریافت: ۱۴۰۴/۸/۴ پذیرش: ۱۴۰۴/۹/۹ انتشار آنلاین: ۱۴۰۴/۹/۹

#### چکیده

ویولاسئین یک رنگدانه بنفش نامحلول در آب است که توسط چندین گونه از باکتری‌های گرم‌منفی از جمله *جانثینوباکتریوم لیویدوم* تولید می‌شود. این رنگدانه دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی از جمله خواص ضد سرطانی، باکتریواستاتیک و آنتی‌بیوتیکی، ضد قارچی، ضد انگلی و ضد ویروسی است. با این وجود، به دلیل بازده پایین تولید، هنوز به مرحله تولید صنعتی نرسیده است. هدف اصلی مطالعه حاضر، استفاده از رویکرد تکامل آزمایشگاهی سازشی (ALE) بر پایه اصول تکامل داروینی با هدف افزایش بازده تولید ویولاسئین در *جانثینوباکتریوم لیویدوم* بود. در ابتدا، اثر غلظت‌های مختلف آمپی‌سیلین بر تولید ویولاسئین و رشد باکتری بررسی شد. سپس با استفاده از روش پاساژ متوالی در فلاسک‌های ارلن مایر در حضور غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۵/۰، ۱۰/۶، ...، ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) آزمایش ALE انجام شد. در هر غلظت، ۲۰ پاساژ صورت گرفت. پس از ۲۰ پاساژ، باکتری به روی محیط کشت جامد حاوی آمپی‌سیلین منتقل شد و کلنی‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک برای انتقال به مرحله بعد انتخاب گردیدند. برای بررسی نحوه اثر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بر تولید رنگدانه ویولاسئین و پیش‌ساز آن یعنی اسید آمینه L-تریپتوفان (L-Trp) از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. نتایج نشان داد که در حضور ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین تولید ویولاسئین از ۵۶ میلی‌گرم بر لیتر به حدود ۱۳۲ میلی‌گرم بر لیتر افزایش یافت. با انجام ALE یک سویه تکامل یافته مقاوم در برابر ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آمپی‌سیلین بدست آمده که قادر به تولید ۴۲۰ میلی‌گرم بر لیتر از ویولاسئین بود. همچنین بررسی‌های بیشتر نشان داد که در حضور آمپی‌سیلین تولید اسید آمینه L-تریپتوفان به شکل معناداری نسبت به شرایط کنترل افزایش یافت (از ۰/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ۰/۹۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر). بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان گفت که آمپی‌سیلین می‌تواند از طریق تحریک تولید اسید آمینه L-تریپتوفان در افزایش تولید ویولاسئین نقش‌بازی کند.

**کلمات کلیدی:** ویولاسئین، تکامل آزمایشگاهی سازشی، L-تریپتوفان، *جانثینوباکتریوم لیویدوم*

## مقدمه

ویولاسئین یک متابولیت ثانویه باکتریایی است که در باکتری‌هایی مانند کروموباکتریوم ویولاسئوم، جانتینوباکتریوم لیویدوم، کولیموناس، دوگانلا، میکروبولیفیر و سودوآلتروموناس گزارش شده است. وزن مولکولی این رنگدانه برابر ۳۳۴۳ گرم بر مول است. دمای ذوب این رنگدانه بیشتر از ۲۹۰ درجه سلسیوس است. طیف UV-Vis این رنگدانه در طول موج‌های ۲۵۸، ۳۷۲ و ۵۷۵ نانومتر بیشترین جذب را نشان می‌دهد (۱). سنتز رنگدانه ویولاسئین از تریپتوفان به عنوان پیش ماده شروع می‌شود و ژن‌های رمز کننده آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز آن روی اپرونی به نام vioABCDE قرار دارند. اولین آنزیم در این اپرون vioA است که اکسیداسیون تریپتوفان به ایندول-۳-پیرویک اسید ایمین (IPA) را از طریق احیاء کوفاکتور FAD کاتالیز می‌کند. در مرحله بعد IPA توسط vioB به دایمر IPA تبدیل می‌شود (۲). آنزیم vioE باعث تبدیل دایمر IPA به پروتودئوکسی ویولاسئینیک اسید (PVA) می‌شود. آنزیم vioC و واکنش اکسیداسیون خود به خودی باعث تبدیل PVA به دئوکسی ویولاسئینیک اسید و دئوکسی ویولاسئین می‌شود. در نهایت آنزیم vioC و vioD باعث تبدیل دئوکسی ویولاسئین به ویولاسئین می‌شوند (۳،۴). همچنین اکسیداسیون خود به خودی PVA می‌تواند به تولید پروتودئوکسی ویولاسئین (PVD) منجر شود.

ویولاسئین طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی از جمله ضد تومور بودن، پتانسیل فعالیت باکتریواستاتیک و آنتی‌بیوتیکی، ضد قارچی، ضد تک یاخته‌ای (انگل‌ها)، ضد سرطانی و خواص ضد ویروسی را دارد. ویولاسئین نه تنها می‌تواند به تنهایی به عنوان یک آنتی‌بیوتیک عمل کند، بلکه همچنین می‌تواند دارای اثر هم افزایی با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. علاوه بر این، ویولاسئین از اهمیت صنعتی بسیار بالایی برخوردار است و می‌تواند در لوازم آرایشی، نساجی، کشاورزی و اکتشاف دارو کاربرد داشته باشد (۵). جانتینوباکتریوم لیویدوم یکی از تولید کننده‌های اصلی رنگدانه ویولاسئین در طبیعت است. جانتینوباکتریوم لیویدوم یک باکتری گرم منفی، متحرک، میله‌ای شکل، کاملاً هوازی و شیمی ارگانوتروف است و معمولاً در دمای بهینه ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس رشد می‌کند. با این حال، سویه‌های سرمادوست آن می‌توانند در دمای ۴ درجه سلسیوس رشد کنند. این باکتری از شاخه پروتوباکتری و خانواده گز/لوباکتریاسه است. این باکتری معمولاً از میکروبیوتای خاک‌های جنگلی، یخچال‌های قطب جنوب و آب دریاچه‌ها و رودخانه‌ها جدا می‌شود. رنگ بنفش

نتیجه حضور ترکیب ویولاسئین است که در نتیجه فعالیت بیوشیمیایی این میکروارگانیسم در طول متابولیسم تولید می‌شود. تولید ویولاسئین پاسخ این میکروارگانیسم به تنش‌های محیطی است و به دفاع آن در برابر خطرات خارجی کمک می‌کند (۶،۷). گونه‌های جانتینوباکتریوم معمولاً غیر بیماری زا در نظر گرفته می‌شوند و مطالعات کمی مرتبط با بیماری‌زایی آنها گزارش شده است (۸).

اگرچه زیست‌شناسی مصنوعی توسعه سویه‌های میکروبی را از طریق چرخه طراحی-ساخت-تست و یادگیری به میزان قابل توجهی بهبود بخشیده است اما اصلاح و بهبود ویژگی‌های پیچیده، مانند تحمل تنش و سرعت رشد، به دلیل شبکه‌های متابولیکی و تنظیمی پیچیده دخیل در آن، دشوار است. بنابراین، سازگاری میکروبی هنوز به طور گسترده به عنوان یک رویکرد رایج برای بهبود عملکرد میکروب‌ها استفاده می‌شود. سازگاری میکروبی به دلیل اثربخشی و فراگیر بودن آن به طور گسترده برای افزایش عملکرد سویه‌های مهندسی شده استفاده می‌شود (۹-۱۱). یکی از ابزارهای مورد استفاده برای سازگاری میکروبی با اهداف زیست فناوریانه، تکامل آزمایشگاهی سازشی (ALE) است. تکامل آزمایشگاهی سازشی یک روش علمی بسیار مهم برای بررسی پدیده‌ی تکامل در یک سیستم آزمایشگاهی کنترل شده است. اساس روش‌های تکامل آزمایشگاهی ریشه در کارهای آنتوان لیون هوک، پاستور، رابرت کخ و بویژه چارلز داروین (نظریه‌ی انتخاب طبیعی) دارد (۱۲). در طول تکامل سازشی آزمایشگاهی یک میکروارگانیسم برای مدت زمان چند هفته تا چند سال تحت شرایط کاملاً معینی کشت داده می‌شود که امکان انتخاب فنوتیپ‌های بهبود یافته را فراهم می‌کند (۱۳). تأثیرگذاری بالای استراتژی‌های ALE در بهینه‌سازی سویه‌های تولید کننده ثابت شده است. بر خلاف استراتژی‌های دست‌ورزی تصادفی و دست‌ورزی هدفمند برخی از آنزیم‌های ویژه، ALE امکان بروز جهش‌های غیربصری در ژن‌های مختلف را به موازات هم فراهم می‌کند. بنابراین ALE یکی از گسترده‌ترین ابزارهای استفاده شده برای کاربردهای زیست فناوریانه، بهبود بازده محصول و کاهش هزینه‌ها در فرایندهای صنایع میکروبی است (۱۴). مهمترین مرحله در رویکرد ALE یافتن ماده یا شرایط تنش‌زا است که در مطالعه حاضر از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین برای این منظور استفاده شده است. زیرا بر اساس مطالعات پیشین، نشان داده شده است که این ماده در غلظت‌های تحت کشنده باعث افزایش تولید رنگدانه ویولاسئین به مقدار قابل توجهی می‌شود (۱۵،۱۶). همچنین در مطالعه پیشین خودمان نشان دادیم که این

مایع رویی مایع تخمیر گزارش شد. از قانون بیرلامبرت (معادله ۱) برای محاسبه غلظت ویولاسئین استفاده شد (۶).

$$A = \epsilon bc \quad (1)$$

در این معادله A میزان جذب نمونه‌های ویولاسئین،  $\epsilon$  ضریب خاموشی رنگدانه ویولاسئین ( $10^4 \text{ L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ )، b طول مسیر نور، و C غلظت ویولاسئین است.

### بررسی تولید ویولاسئین در حضور آمپی‌سیلین

به منظور بررسی تأثیر آمپی‌سیلین بر تولید رنگدانه ویولاسئین این آنتی‌بیوتیک در محلول NaOH ۲ مولار حل شده و ورتکس گردید. سپس pH محلول با استفاده از HCl ۶ مولار روی ۷ تنظیم شد. محلول آمپی‌سیلین تهیه شده توسط فیلترهای 0/22 میکرومتر فیلتر شد. برای بررسی اثر این آنتی‌بیوتیک بر تولید ویولاسئین، غلظت‌های مختلف آمپی‌سیلین (۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به محیط تخمیر اضافه شد. نوترینت براث حاوی گلیسرول (۱ درصد) به عنوان محیط تخمیر استفاده و تخمیر در فلاسک‌های ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط انجام شد. فلاسک‌ها تلقیح شده و در دمای ۲۳ درجه سلسیوس به مدت ۹۶ ساعت در rpm ۱۵۰ گرم‌گذاری شدند. همه تست‌ها سه بار تکرار شدند.

### تکامل آزمایشگاهی سازشی

فرایند انجام آزمایش سازگاری میکروبی در شکل ۱ به صورت شماتیک نشان داده شده است. سازگاری میکروبی در حضور غلظت‌های مختلف آمپی‌سیلین (۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹، ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) انجام شد. ۲۰ پاساژ در هر غلظت انجام شد. پس از ۲۰ پاساژ، از سویه‌های سازگار شده گلیسرول استوک تهیه شد. آزمایش سازگاری با استفاده از فلاسک‌های ۲۵ میلی‌لیتری حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث حاوی غلظت‌های مختلف آمپی‌سیلین انجام شد. فلاسک‌ها در دمای ۲۳ درجه سلسیوس و با سرعت rpm ۱۵۰ گرم‌گذاری شدند. چگالی نوری ۰/۵ به عنوان OD آستانه انتخاب شد. هنگامی که OD600 به ۵/۰ رسید، ۱۰۰ میکرولیتر از مایع تخمیر برداشته شده و به یک فلاسک تازه منتقل شد. پس از ۲۰ پاساژ، ۱۰۰ میکرولیتر از مایع تخمیر به روی یک پلیت آگاردار حاوی آمپی‌سیلین منتقل شده و به صورت چمنی کشت داده شد و کلنی‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک برای انتقال به دور بعدی انتخاب شدند.

آنتی‌بیوتیک می‌تواند باعث افزایش بیان برخی از ژن‌های دخیل در بیوسنتز ویولاسئین (مانند vioA) شود (۱۷). بنابراین، هدف اصلی مطالعه حاضر استفاده از رویکرد ALE برای افزایش مقاومت جانتینوباکتریوم لیویدوم در برابر غلظت‌های بالای آمپی‌سیلین است. با این هدف که بتوان در حضور غلظت‌های بالاتر این آنتی‌بیوتیک تولید رنگدانه ویولاسئین را بیشتر افزایش داد.

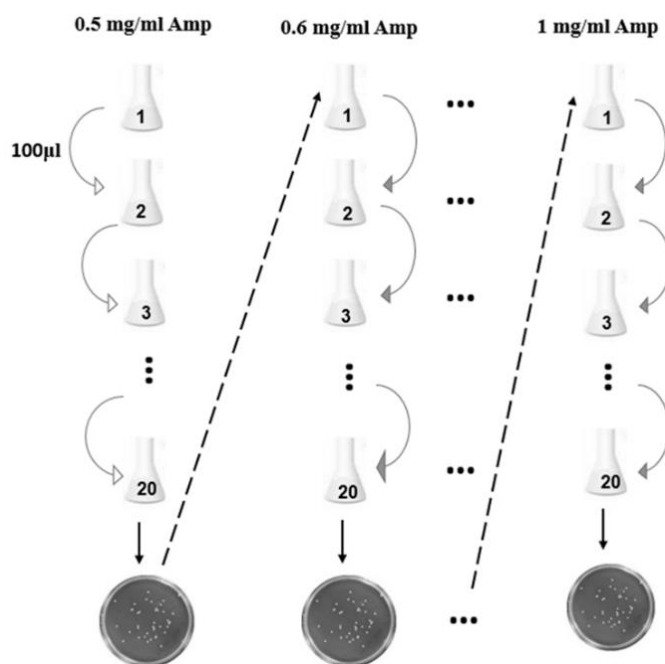
### مواد و روش‌ها

#### تهیه باکتری و تولید رنگدانه ویولاسئین

در این مطالعه از جانتینوباکتریوم لیویدوم DSM 1522 استفاده شد. این سویه از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران با شماره PTCC 1735 خریداری شده است. به منظور تولید رنگدانه ویولاسئین، ابتدا یک پیش‌کشت از جانتینوباکتریوم لیویدوم در یک فلاسک ارلن‌مایر ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث تهیه شد. فلاسک در دمای ۲۳ درجه سلسیوس در انکوباتور شیکردار با سرعت rpm ۱۵۰ به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. جهت تولید ویولاسئین، ۲ درصد (حجمی/حجمی) از محیط پیش‌کشت به عنوان مایه تلقیح به فلاسک‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث + یک درصد گلیسرول به همراه تیمارهای مختلف (که در ادامه به آنها اشاره می‌شود) اضافه گردید. در نهایت فلاسک‌ها در شرایطی مشابه با پیش‌کشت گرمخانه‌گذاری شدند.

#### استخراج و سنجش میزان ویولاسئین

برای استخراج ویولاسئین، محیط تخمیر با سرعت rpm ۶۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس حجم مساوی اتانول مطلق به رسوب باقیمانده اضافه و مخلوط شد. محلول به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از سیستم اولتراسونیک حمام‌دار سونیکیت شده و مجدداً با شرایط قبلی سانتریفیوژ گردید (۱۸). جذب مایع رویی در طول موج ۵۸۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (APEL، ژاپن) اندازه‌گیری شد. از آنجایی که طبق مطالعات قبلی بخش قابل توجهی از ویولاسئین تولید شده در مایع رویی بعد از اولین سانتریفیوژ باقی‌مانده و از دست می‌رود؛ مایع رویی محیط تخمیر در دمای ۴۰ درجه سلسیوس خشک شده و با همان مقدار اتانول مطلق مخلوط و جذب آن در طول موج ۵۸۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. بنابراین، غلظت نهایی ویولاسئین به صورت ویولاسئین به دست آمده از رسوب سلولی به علاوه ویولاسئین بازیابی شده از



شکل ۱. روند انجام تکامل آزمایشگاهی سازشی در حضور آمپی سیلین

Figure 1. Adaptive laboratory evolution in the presence Amp.

آنالیز آماری داده‌های با استفاده از نرم افزارهای SPSS و GraphPad prism انجام شد. همچنین آزمون‌های آماری One-way ANOVA و آزمون تعقیبی توکی برای آنالیز داده‌ها در این مطالعه استفاده شد.

### نتایج

#### تولید ویولاسئین در حضور آمپی سیلین

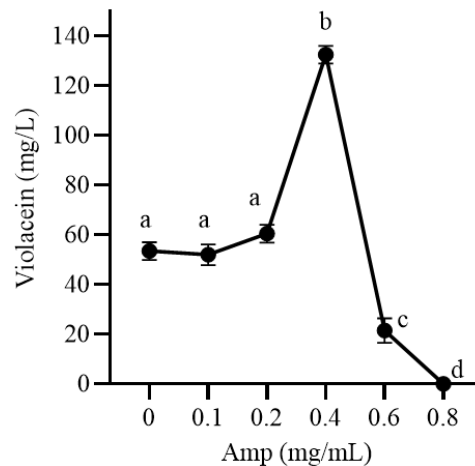
بر اساس آنچه که در شکل ۲ نشان داده شده است، افزایش غلظت آمپی سیلین در ابتدا با افزایش میزان رنگدانه همراه بود ولی در غلظت‌های بالاتر از غلظت تحت کشنده به دلیل کاهش رشد میکروارگانیسم منجر به کاهش چشمگیر در تولید رنگدانه شد. بطوریکه در حضور ۰/۴ میلی گرم بر میلی لیتر از این آنتی بیوتیک بیشترین مقدار رنگدانه (۱۳۲ میلی گرم بر لیتر) بدست آمد که نسبت به شرایط کنترل (نبود آنتی بیوتیک) دارای اختلاف معناداری بود ( $P < 0.001$ ). با این وجود، زمانی که غلظت آنتی بیوتیک به ۰/۶ میلی گرم بر میلی لیتر افزایش داده شد، به طور معنی داری ( $P < 0.001$ ) از میزان رنگدانه ویولاسئین تولید شده کاسته شد.

### بررسی تغییرات در تولید تریپتوفان در حضور

#### آنتی بیوتیک

برای بررسی تأثیر آمپی سیلین بر تولید اسید آمینه L-تریپتوفان به عنوان پیش ساز اصلی رنگدانه ویولاسئین از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا جانتینوباکتریوم لیویدوم مطابق بخش‌های قبلی در حضور آنتی-بیوتیک، کشت داده شد. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۳ درجه سلسیوس، مایع تخمیر سانتریفیوژ شده و از مایع رویی آن برای تعیین میزان L-تریپتوفان استفاده شد. برای انجام این آزمایش از دستگاه HPLC Knauer (Berlin, Germany) مجهز به یک دتکتور Knauer, Azura UVD 2.1L UV استفاده شد. همچنین از ستون C-18 ( $4/6 \times 100$  mm) با اندازه ذرات ۵ میکرون استفاده شد. متانول با گرید HPLC و محلول ۰/۰۵ مولار  $KH_2PO_4$  با نسبت ۳۰:۷۰ به عنوان فاز متحرک استفاده شد. سرعت جریان و طول موج تشخیصی به ترتیب ۱/۲ میلی لیتر/دقیقه و ۱/۲ mL/min و ۲۲۰ نانومتر بود. قبل از استفاده، تمام معرف‌ها و نمونه‌ها از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شدند.

### آنالیزهای آماری



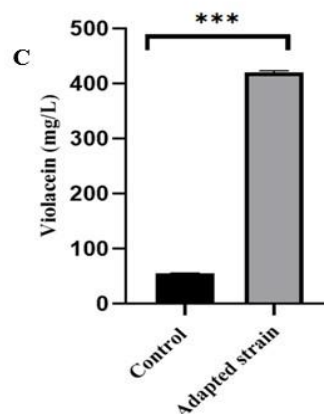
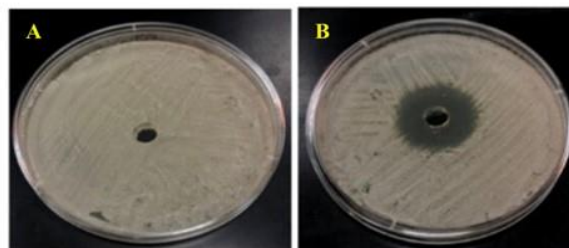
شکل ۲. تولید ویولاستین در حضور غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک ویولاستین. حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنادار بر اساس آزمون توکی است ( $P < 0/001$ ).

Figure 2. Violacein production in the presence of different concentrations of ampicillin (Amp). Different letters indicate statistically significant differences based on Tukey's test ( $P < 0.001$ ).

(JV-10) در حضور ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از این آنتی‌بیوتیک بررسی شد. نتایج نشان داد که تحت این شرایط تولید رنگدانه ویولاستین در این سویه به ۴۲۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش پیدا کرد.

### تولید ویولاستین توسط سویه تکامل یافته

بعد از آداپتاسیون میکروبی و بدست آوردن سویه‌ی باکتریایی سازگار شده به غلظت‌های بالای آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (شکل ۳) تولید رنگدانه ویولاستین توسط سویه سازگار شده نهایی



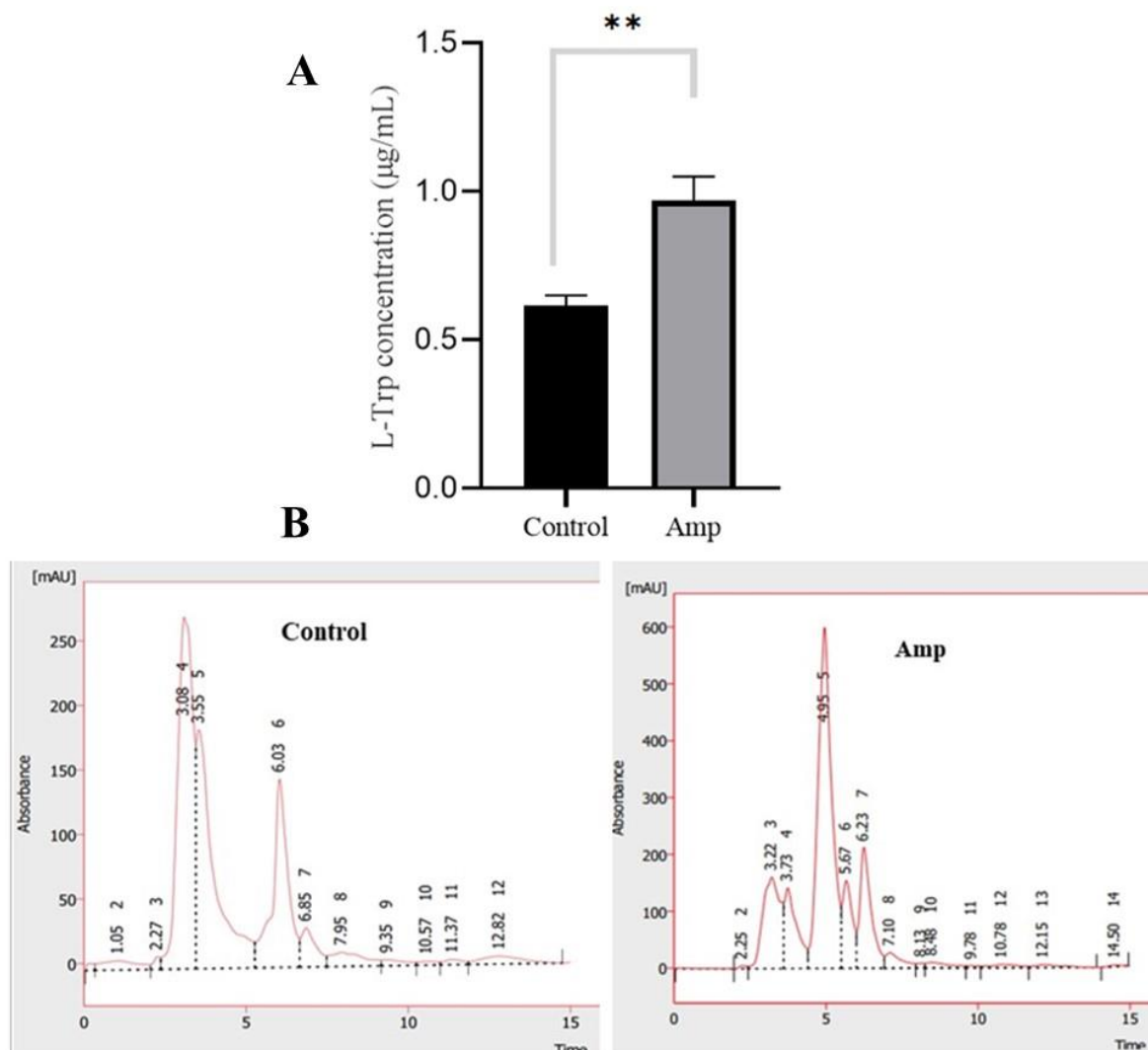
شکل ۳. مقایسه هاله عدم رشد سویه سازگار شده جانتینوباکتریوم لیویدوم (A) و سویه وحشی جانتینوباکتریوم لیویدوم (B) در حضور ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (C). مقایسه تولید ویولاستین توسط جانتینوباکتریوم لیویدوم تکامل یافته در حضور ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آمپی‌سیلین با سویه وحشی در عدم حضور آنتی‌بیوتیک (\*\*\*) ( $P < 0.001$ ).

Figure 3. Comparison of resistance of the evolved *J. lividum* (A) and the wild type *J. lividum* (B) against 1 mg/mL of Amp. (C) Comparison of violacein production by the evolved *J. lividum* in the presence of 1 mg/mL of Amp with violacein production by the wild type *J. lividum* in the absence of Amp (\*\*\*) ( $P < 0.001$ ).

رنگدانه ویولاسئین با استفاده از روش HPLC بررسی شد. همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، در حضور آمپی سیلین، تولید این اسید آمینه از حدود ۰/۶۲ میکروگرم بر میلی لیتر به حدود ۰/۹۵ میکروگرم بر میلی لیتر افزایش یافت که از نظر آماری معنادار بود ( $P < 0.01$ ).

### بررسی تغییرات در میزان تولید L-تریپتوفان

ویولاسئین توسط جانتینوباکتریوم برای بررسی چگونگی اثر آمپی سیلین بر تولید رنگدانه ویولاسئین، تاثیر این آنتی بیوتیک بر میزان تولید اسید آمینه L-تریپتوفان به عنوان پیش ساز اصلی



شکل ۴. مقایسه میزان تولید اسید آمینه L-تریپتوفان در حضور آمپی سیلین و شرایط کنترل (\*\*  $P < 0/01$ ). (A). کروماتوگرام HPLC در شرایط کنترل و در حضور آمپی سیلین (B).

Figure 4. Alteration in the production of L-tryp in the presence of Amp compared to the control condition (A) (\*\* $P < 0/01$ ). HPLC chromatograms under the control condition and in the presence of Amp (B).

### بحث

تولید ویولاسئین در جانتینوباکتریوم لیویدوم را تا ۳۶ درصد افزایش می دهد (۱۹). پانتلا و همکاران نیز بیان کردند که حضور این آنتی بیوتیک در محیط تخمیر جانتینوباکتریوم لیویدوم مقدار ویولاسئین را حدود ۳ برابر افزایش داد (۶). همچنین، اثرات القایی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که غلظت های تحت کشنده آمپی سیلین باعث افزایش تولید ویولاسئین می شود. اثر القایی آمپی سیلین بر تولید ویولاسئین در مطالعات قبلی اثبات شده است. کانلی و همکاران نشان دادند که تنش ناشی از آمپی سیلین

RNA می‌تواند به روشن شدن اساس مولکولی این تغییرات کمک کند. سوبیه‌ی مقاوم به آمپی‌سیلین که با روش ALE ایجاد شد، در حضور ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آمپی‌سیلین تولید ویولاسئین را تا ۸ برابر افزایش داد. این افزایش در مقدار تولید رنگدانه قابل تلاش‌های قبلی انجام شده برای افزایش تولید این رنگدانه قابل مقایسه است. جدول ۱ مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعات پیشین را نمایش می‌دهد. نکته حائز اهمیت این است که سنجش غلظت ویولاسئین با استفاده از اسپکتروفتومتر رایج‌ترین روش در مطالعات قبلی است و برای این منظور چند ضریب خاموشی مختلف گزارش شده است (۱۰/۹۵۵، ۷۳/۴، ۵۶/۰۱، L.g-1.cm-1). بسته به اینکه از کدام یک از ضرایب خاموشی برای محاسبه غلظت ویولاسئین استفاده شود، نتایج می‌تواند تا ۶۸۰ درصد اختلاف داشته باشد. چوبی و همکاران در بررسی خود نشان دادند که عدد ۱۰/۹۵۵ قابل اعتماد نیست و بهترین گزینه استفاده از عدد خاموشی ۵۶/۰۱ است (۲۰) که در بیشتر مطالعات از جمله مطالعه حاضر مورد استفاده قرار می‌گیرد. به دلیل اختلاف در ضریب خاموشی استفاده شده مقایسه‌ی مستقیم نتایج مطالعات مشابه دشوار است. به همین دلیل، نتایج جدول ۱ بر اساس ضریب ۵۶/۰۱ نرمال‌سازی شده‌اند. همچنین لازم به ذکر است که در اینجا تنها مطالعاتی که در کشت بچ (ناپیوسته) انجام شده‌اند مورد مقایسه قرار گرفته‌اند.

آنتی‌بیوتیک‌ها بر رنگدانه‌های میکروبی دیگر در مطالعات دیگران نیز گزارش شده است. برای مثال، یالچین و همکاران نشان دادند که جلبک *Fremyella diplosiphon* تحت تأثیر کانامایسین و تتراسایکلین مقدار بیشتری رنگدانه تولید می‌کند (۲۰). علاوه بر این، حضور آمپی‌سیلین در محیط کشت کلرلا سوروکینیا باعث افزایش محتوای کلروفیل شد، ولی تولید کاروتنوئید را مهار کرد (۲۱). این مشاهدات نشان می‌دهد که آنتی‌بیوتیک‌ها به‌ویژه آمپی‌سیلین اثرات قابل توجهی بر فرآیندهای متابولیکی میکروارگانیسم‌ها دارند، اگرچه سازوکارهای دقیق آن‌ها هنوز مشخص نیست. با این حال، یانگ و همکاران پیشنهاد کردند که غلظت‌های تحت‌بازدارنده‌ی آمپی‌سیلین، توان متابولیسم تنفسی باکتری را افزایش می‌دهد (۲۲). به این منظور، در مطالعه حاضر اثر این آنتی‌بیوتیک بر تولید L-تریپتوفان به عنوان پیش‌ساز اصلی رنگدانه ویولاسئین بررسی شد و نتایج نشان داد که در حضور این آنتی‌بیوتیک تولید L-تریپتوفان در *Jantiniobacterium* از ۶۲/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ۹۵/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش پیدا می‌کند. بنابراین احتمالاً بتوان این اثر القایی بر تولید اسید آمینه L-تریپتوفان را به عنوان مکانیسم عمل اصلی آمپی‌سیلین در افزایش تولید رنگدانه ویولاسئین پیشنهاد کرد. با این وجود، انجام مطالعات مولکولی با استفاده از روش‌هایی مانند Real-time PCR و مطالعات ترانسکریپتومیکیس مانند توالی‌یابی

جدول ۱. مقایسه میزان تولید ویولاسئین در مطالعات مختلف.

Table 1. comparison of violacein production in different studies.

Method	Extinction coefficient (L.g <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	Medium /fermentation method	Bacterial strain	Normalized Violacein titer (gr/l)	Ref.
Microbial adaptation and Amp	56/01	NB + 1% glycerol/batch	<i>J. lividum</i>	0/42	Present study
Isolation of new strain	73/4	NB/batch	<i>Duganella violaceinigr</i> str. NI28	0/0236	(23)
Formic acid treatment	10/955	NB + L-tryptophan/batch	<i>Chromobacterium violaceum</i>	0/2	(24)
Modification of culture medium	-	Sugarcane bagasse + 10% L-tryptophan/batch	<i>Chromobacterium violaceum</i>	0/82	(25)
Genetic manipulation	-	BHIS/batch	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	0/629	(26)
Optimization of culture condition	56/01	NB/batch	<i>J. lividum</i>	0/125	(19)

## نتیجه گیری

میکروارگانسیم‌های مهندسی ژنتیک شده (GMMOs) می‌تواند به‌عنوان روشی کارآمد و ایمن برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گیرد.

## تقدیر و تشکر

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه اصفهان انجام شده است.

نتایج حاصل در مطالعه حاضر برای نخستین بار اثر آمپی‌سیلین بر تولید L-تریپتوفان به عنوان پیش‌ساز رنگدانه ویولاسئین بررسی شد و نشان داده شد که القای افزایش تولید این اسیدآمین می‌تواند به عنوان مکانیسم عمل آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین در افزایش تولید ویولاسئین در نظر گرفته شود. از طرف دیگر با انجام ALE مقدار تولید ویولاسئین به طرز قابل توجهی افزایش یافت که با در نظر گرفتن دیگر جنبه‌های مثبت این رویکرد مانند مقرون به صرفه بودن و عدم محدودیت آن تحت قوانین مربوط به

## References

- Tuli HS, Chaudhary P, Beniwal V, Sharma AK. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *J Food Sci Technol*. 2015;52:4669–78. DOI: 10.1007/s13197-014-1601-6
- Füller JJ, Röpke R, Krausze J, Rennhack KE, Daniel NP, Blankenfeldt W, et al. Biosynthesis of violacein, structure and function of l-Tryptophan oxidase VioA from *Chromobacterium violaceum*. *J Biol Chem*. 2016;291(38):20068–84. DOI: 10.1074/jbc.M116.741561
- Ran T, Gao M, Wei Q, He J, Tang L, Wang W, et al. Expression, crystallization and preliminary crystallographic data analysis of VioD, a hydroxylase in the violacein-biosynthesis pathway. *Struct Biol Cryst Commun*. 2015;71(2):149–52. DOI: 10.1107/S2053230X14027617
- Hirano S, Asamizu S, Onaka H, Shiro Y, Nagano S. Crystal structure of VioE, a key player in the construction of the molecular skeleton of violacein. *J Biol Chem*. 2008;283(10):6459–66. DOI: 10.1074/jbc.M708109200
- Ahmed A, Ahmad A, Li R, Waleed A-A, Fatima M, Mushtaq BS, et al. Recent advances in synthetic, industrial and biological applications of violacein and its heterologous production. *J Microbiol Biotechnol*. 2021;31(11):1465. DOI: 10.4014/jmb.2107.07045
- Pantanella F, Berlutti F, Passariello C, Sarli S, Morea C, Schippa S. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *J Appl Microbiol*. 2007;102(4):992–9. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.03155.x
- Schloss PD, Allen HK, Klimowicz AK, Mlot C, Gross JA, Savengsuksa S, et al. Psychrotrophic strain of *Janthinobacterium lividum* from a cold Alaskan soil produces prodigiosin. *DNA Cell Biol*. 2010;29(9):533–41. Doi: 10.1089/dna.2010.1020
- Oh WT, Giri SS, Yun S, Kim HJ, Kim SG, Kim SW, et al. *Janthinobacterium lividum* as an emerging pathogenic bacterium affecting rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fisheries in Korea. *Pathogens*. 2019;8(3):146. DOI: 10.3390/pathogens8030146
- Tan Y-S, Zhang R-K, Liu Z-H, Li B-Z, Yuan Y-J. Microbial adaptation to enhance stress tolerance. *Front Microbiol*. 2022;13:888746. DOI: 10.3389/fmicb.2022.888746
- Huang X-J, Du H, Deng X-L, Chen Y-H, Xiang L, Li Y-W, et al. New insights into the evolution of bacterial community during the domestication of phthalate-degrading consortium. *J Clean Prod*. 2021;303:127064. DOI: 10.1016/j.jclepro.2021.127064
- Sandberg TE, Salazar MJ, Weng LL, Palsson BO, Feist AM. The emergence of adaptive laboratory evolution as an efficient tool for biological discovery and industrial biotechnology. *Metab Eng*. 2019; DOI: 10.1016/j.ymben.2019.08.004
- Fernandes T, Osório C, Sousa MJ, Franco-Duarte R. Contributions of adaptive laboratory evolution towards the enhancement of the biotechnological potential of non-conventional yeast species. *J Fungi*. 2023;9(2):186. DOI: 10.3390/jof9020186
- Dragosits M, Mattanovich D. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology. *Microb Cell Fact [Internet]*. 2013;12(1):1. Available from: Microbial Cell Factories DOI: 10.1186/1475-2859-12-64
- Liu ZL. Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006 Nov;73(1):27–36. DOI: 10.1007/s00253-006-0567-3
- Choi SY, Lim S, Yoon K, Lee JI, Mitchell RJ. Biotechnological activities and applications of bacterial pigments violacein and prodigiosin. *J Biol Eng*. 2021;15(1):1–16. DOI: 10.1186/s13036-021-00262-9
- Zhang Q, Yang J, Mou L, Jiang Y, Barriuso J, Guo F, et al. A comprehensive review on violacein production by microbial fermentation. *BioDesign Res*. 2025;100043. DOI: 10.3390/antiox11050849
- Bagoghli N, Hosseini-Abari A. Improvement of violacein production using abiotic stresses and microbial adaptation. *World J Microbiol Biotechnol*. 2024;40(5):1–14. DOI: 10.1007/s11274-024-03966-4

18. Huang D, Li S, Xia M, Wen J, Jia X. Genome-scale metabolic network guided engineering of *Streptomyces tsukubaensis* for FK506 production improvement. *Microb Cell Fact.* 2013;12:1–18. DOI: 10.1186/1475-2859-12-52
19. Kanelli M, Mandic M, Kalakona M, Vasilakos S, Kekos D, Nikodinovic-Runic J, et al. Microbial production of violacein and process optimization for dyeing polyamide fabrics with acquired antimicrobial properties. *Front Microbiol.* 2018;9:1495. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01495
20. Yalcin YS, Aydin B, Chen H, Gichuki S, Sittler V. Lipid production and cellular changes in *Fremyella diplosiphon* exposed to nanoscale zerovalent iron nanoparticles and ampicillin. *Microb Cell Fact.* 2023;22(1):108. DOI: 10.1186/s12934-023-02113-2
21. Wang W, Sheng Y. Ampicillin used in aseptic processing influences the production of pigments and fatty acids in *Chlorella sorokiniana*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2021;37:1–15. DOI: 10.1007/s11274-020-02985-1
22. Yang G, Hou T, Lin A, Xia X, Quan X, Chen Z, et al. Sub-inhibitory concentrations of ampicillin affect microbial Fe (III) oxide reduction. *J Hazard Mater.* 2023;451:131131. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2023.131131
23. Choi SY, Kim S, Lyuck S, Kim SB, Mitchell RJ. High-level production of violacein by the newly isolated *Duganella violaceinigra* str. NI28 and its impact on *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep.* 2015;5(1):15598. DOI: 10.1038/srep15598
24. Cheng K-C, Hsiao H-C, Hou Y-C, Hsieh C-W, Hsu H-Y, Chen H-Y, et al. Improvement in violacein production by utilizing formic acid to induce quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *Antioxidants.* 2022;11(5):849. DOI: 10.3390/antiox11050849
25. Ahmad WA, Yusof NZ, Nordin N, Zakaria ZA, Rezali MF. Production and characterization of violacein by locally isolated *Chromobacterium violaceum* grown in agricultural wastes. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;167:1220–34. DOI: 10.1007/s12010-012-9553-7
26. Sun H, Zhao D, Xiong B, Zhang C, Bi C. Engineering *Corynebacterium glutamicum* for violacein hyper production. *Microb Cell Fact.* 2016;15:1–9. DOI: 10.1186/s12934-016-0545-0