

## افزایش تولید نایسین در بیوراکتور با کشت همزمان

### *Yarrowia lipolytica* و *Lactococcus lactis*

اعظم بختی<sup>۱</sup>، جواد حامدی<sup>۲\*</sup> و فاطمه یزدیان<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۲۷

تاریخ تصویب: ۹۷/۲/۹

#### چکیده

نایسین اولین نگهدارنده غذایی تایید شده FDA است که در مقیاس صنعتی توسط *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* تولید می‌شود. برای کاهش اثر منفی اسید لاکتیک تولید شده در متابولیسم *L. lactis* بر روی تولید نایسین، کشت توأم این باکتری با *Yarrowia lipolytica* استفاده شده است. در این پژوهش برای اولین بار *L. lactis* به همراه *Y. lipolytica* در تخمیر بسته با استفاده از بیوراکتور آزمایشگاهی در محیط بر پایه ملاس در دمای 30 °C pH 3 شش و هوادهی 15/0 vvm و دور همزن 100 rpm کشت داده شده‌اند. میزان تولید نایسین در این شرایط 920 IU/ml بوده است. همچنین در تخمیر همزمان دو سویه، میزان زیست توده و تولید نایسین به ترتیب 63 درصد و 78 درصد بیشتر از کشت خالص *L. lactis* است. به نظر می‌رسد عوامل دیگری از جمله فعالیت پروتئازی برون سلولی مخمر که باعث تسهیل دسترسی باکتری به منابع غذایی محیط کشت می‌شود، در این فرآیند موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: بیوراکتور، کشت همزمان، نایسین، *Yarrowia lipolytica* *Lactococcus lactis*

#### مقدمه

نگهدارنده‌ها ترکیباتی هستند که برای جلوگیری از فسادهای شیمیایی و میکربی مواد غذایی به کار می‌روند، که از آن جمله می‌توان به بنزوئیک‌اسید، نیتريت‌ها و نیترات‌ها اشاره کرد. با وجود استفاده گسترده از این ترکیبات، همیشه نگرانی‌هایی در مورد سرطان‌زایی این ترکیبات وجود دارد (Newman & Cragg 2012). باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک، مانند مثل نایسین، لاکتوکوکوسین و پدیوسین، در pH پایین فعالیت بیشتری دارند. در این شرایط، این باکتریوسین‌ها بسیار پایدار بوده و فعالیت زیستی خود را حتی پس از جوشاندن نیز حفظ می‌نمایند. این مواد می‌توانند به عنوان نگهدارنده‌های غذایی مورد استفاده قرار گیرند (Grabley & Thiericke 1999). نایسین یک پپتید ضدباکتریایی کوچک است و توسط باکتری *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*، از اعضای خانواده باکتری‌های لاکتیک اسید تولید می‌شود. این ترکیب ضد میکروبی به کلاس I از باکتریوسین‌ها تعلق دارد و نوعی لانتی‌بیوتیک است. لانتی‌بیوتیک‌ها ترکیبات ضد میکروبی

۱. مرکز پژوهشی فناوری‌ها و فرآورده‌های میکربی دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲. مرکز پژوهشی فناوری‌ها و فرآورده‌های میکربی دانشگاه تهران، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول (jhamedi@ut.ac.ir)

۳. دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

پپتیدی با وزن ملکولی زیر پنج کیلودالتون هستند و به خاطر وجود آمینواسیدهای غیرمعمول خود از جمله لانتیونین و بتا-متیل-لانتیونین و آمینواسیدهای دهیدراته معروف هستند (McAuliffe *et al.*, 2001). نایسین نخستین بار در سال ۱۹۲۸ جداسازی شده و بیش از ۵۰ سال است که به عنوان یک ماده نگهدارنده غذایی تجاری استفاده می‌شود. این ماده در اتحادیه اروپا (EU) با شماره E234 تأیید شده و سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) نیز آن را به عنوان ماده ایمن (GRAS) برای مصرف در پنیر مورد تأیید قرار داده است (McAuliffe *et al.*, 2001). این پپتید دارای توانمندی‌های کاربردی بسیار متنوع در صنایع مختلف می‌باشد. یکی از مهمترین کاربردهای نایسین، استفاده از آن به عنوان مهار کننده رشد باکتری کلسترییدیوم و ممانعت از فساد مواد لبنی از جمله پنیر است (Delves 2001). تولید نایسین وابسته به رشد باکتری مولد بوده و در دوره رشد نمایی به حداکثر میزان خود می‌رسد اما در فاز سکون تولید آن متوقف می‌شود (Simsek 2014). از جمله موارد کاهنده رشد باکتری های اسید لاکتیک، تجمع اسید لاکتیک در محیط است که در نهایت رشد باکتری *L. lactis* نیز پس از گذشت چند ساعت از شروع فرآیند تخمیر بسیار کاهش می‌یابد (Cook & Russell 1994). یکی از روش های مقابله با میزان اسید لاکتیک محیط روش کشت همزمان میکروارگانیسم ها است. به این منظور سویه انتخاب شده برای رشد همزمان در کنار سویه مولد نایسین، باید دارای شرایط خاصی باشد. از جمله این شرایط می توان به استفاده از اسید لاکتیک به عنوان منبع کربن و عدم استفاده از منبع کربن اصلی موجود در محیط کشت، عدم تولید ترکیبات مضر برای رشد سویه تولید کننده و همچنین عدم تجزیه محصول مورد نظر در شرایط تخمیر اشاره کرد (Bader *et al.*, 2010). بررسی های انجام شده در مورد کشت همزمان *L. lactis* و *Y. lipolytica* در فلاسک، نشان داده است، این روش می‌تواند سبب افزایش هرچه بیشتر میزان تولید نایسین نسبت به کشت خالص باکتری *L. lactis* شود، ولی در مورد کارآمدی آن در مقیاس‌های بالاتر، شرایط صنعتی و همچنین تولید در بیوراکتور گزارشی منتشر نشده است (Ariana & Hamedi 2017). هدف پژوهش کنونی ارزیابی امکان استفاده از کشت همزمان *L. lactis* و مخمر *Y. lipolytica* به منظور بررسی افزایش تولید نایسین در بیوراکتور در محیط تخمیر بر پایه ملاس و تعیین میزان اثر بخشی حضور مخمر *Y. lipolytica* در طول فرآیند تخمیر بوده است.

## مواد و روش ها

### محیط‌های کشت

محیط پیش کشت با ترکیب کمپلکس (CM) شامل ساکاروز ۱۰ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۱۰ گرم بر لیتر، پپتون ۱۰ گرم بر لیتر، پتاسیم هیدروژن فسفات ۱۰ گرم بر لیتر، سدیم کلرید دو گرم بر لیتر و منیزیم سولفات ۰/۲ گرم بر لیتر برای تکثیر *L.*

*Y. lipolytica* و *lactis* به کار برده شد. محیط کشت TSB (Tryptic Soy Broth) به میزان ۳۰ گرم بر لیتر برای تکثیر و شمارش *L. lactis* مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت تخمیر برای تولید نایسین شامل ملاس چغندر قند (حاوی ۵۰ درصد ساکاروز) ۷۰ گرم بر لیتر، کنجاله سویا ۲۰ گرم بر لیتر، پتاسیم هیدروژن فسفات ۱۰ گرم بر لیتر، سدیم کلرید دو گرم بر لیتر و منیزیم سولفات ۰/۲ گرم بر لیتر است (Ariana & Hamed 2017).

### آنالیز فرآیند تولید

افزایش تولید نایسین در بیوراکتور با کشت همزمان *Lactococcus lactis* و *Yarrowia lipolytica* با استفاده از آزمون‌هایی که در ادامه ذکر می‌گردد، مورد بررسی قرار گرفت.

### شرایط تولید نایسین

تولید نایسین در فلاسک در شرایط بهینه تخمیر ناپیوسته، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، به مدت ۲۴ ساعت و با تلقیح اولیه هشت درصد برای باکتری *L. lactis* و مخمر *Y. lipolytica* انجام گرفت. مدت زمان لازم برای پیش کشت باکتری *L. lactis* و مخمر *Y. lipolytica* ۱۲ ساعت، دمای ۳۰ درجه سلسیوس و تلقیح اولیه به درون محیط پیش کشت برای هر دو میکروارگانیسم با جذب نوری (OD) ۰/۱ انجام گرفت. میزان دور همزن بهینه در فلاسک برای باکتری *L. lactis* و مخمر *Y. lipolytica* به ترتیب ۸۰ rpm و ۱۵۰ rpm در نظر گرفته شد (Ariana & Hamed 2017). همچنین شرایط تولید در بیوراکتور همزن دار ۱۰ لیتری از نظر دما، مدت زمان تخمیر و تلقیح اولیه برای باکتری *L. lactis* و مخمر *Y. lipolytica* مشابه فلاسک در نظر گرفته شده است. مدت زمان لازم برای پیش کشت باکتری *L. lactis* و مخمر *Y. lipolytica* ۱۲ ساعت، در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و با تلقیح اولیه هشت درصد به درون محیط تخمیر برای هر دو میکروارگانیسم صورت گرفت. به منظور تنظیم pH در حین فرآیند تخمیر در بیوراکتور، از تزریق سدیم هیدروکسید پنج نرمال به کمک پمپ پرستالتیک، استفاده شد. سویه تولیدکننده نایسین با نام *Lactococcus lactis sub sp. lactis* (PTCC 1336) از کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های صنعتی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و همچنین سویه *Yarrowia lipolytica* (ATCC 18942) IBRC-M 30168 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردید و با توجه به روش‌های معمول در دمای ۷۰- و ۲۰ درصد گلیسرول نگهداری شدند. برای بهبود عملکرد و نتایج، آزمایش‌ها سه بار تکرار شده‌اند.

### آماده سازی نمونه‌ی تخمیر

به منظور آماده سازی محیط کشت تخمیر برای سنجش زیستی فعالیت نایسین، به یک میلی لیتر از محیط تخمیر نه میلی

لیتر اسید کلریدریک ۰/۰۲ مولار افزوده شد. سپس نمونه به مدت پنج دقیقه در آب جوش قرار داده شده و پس از آن، نمونه حاصل برای تزریق در چاهک ها به انتشار در آگار استفاده گردید (Reunanen & Saris 2003).

### سنجش میزان ناپسین تولید شده

برای سنجش کیفی فعالیت ضد باکتریایی ناپسین، از روش انتشار در آگار استفاده شد. همچنین سویه (PTCC 1169) *Micrococcus luteus* که از کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های صنعتی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید، به عنوان سویه حساس به ناپسین استفاده شد. به محیط TSB که یک محیط مناسب برای رشد *M. luteus* محسوب می‌شود، ۰/۷۵ درصد آگار و یک درصد توپین ۲۰ اضافه شد و پس از آن، محیط تهیه شده استریل گردید. بعد از به تعادل رسیدن دما، محیط آماده شده با ۱ درصد از محیط کشت *M. luteus* که در ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شده و دارای جذب نوری (OD) ۰/۱ در ۶۰۰ نانومتر است مخلوط گردید و در نهایت به داخل پلیت‌ها منتقل شدند. پس از اینکه محیط موجود در پلیت‌ها حالت جامد به خود گرفت، حفره‌هایی با قطر ۵ میلی متر در آن‌ها ایجاد شده و سپس ۵۰ میکرولیتر از نمونه تخمیر در درون حفره ها ریخته شد. در هر پلیت چهار حفره ایجاد شد. در یکی از حفره‌ها برای تهیه نمونه شاهد، ۵۰ میلی لیتر از اسید کلریدریک ۰/۰۲ مولار ریخته و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه گذاشته شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شده و در نهایت قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری شد (Pongtharangkul & Demirci 2004).

### سنجش میزان زیست توده

برای تعیین میزان رشد میکروارگانیسم‌ها از روش شمارش تعداد سلول‌های زنده (Cloning Forming Unit-CFU) استفاده شده است (Budde & Rasch 2001). در این روش پس از رقت سازی محیط تخمیر، شمارش باکتری با تزریق یک میلی لیتر محیط رقیق شده، در پلیت‌های محتوی محیط TSB دارای ۱/۵ درصد آگار انجام شد. رقت مورد استفاده برای این پژوهش ۱۰<sup>-۶</sup> بوده با شمارش سلول‌های باکتری در فلاسک و بیوراکتور میزان رشد *L. lactis* ارزیابی و با یکدیگر مقایسه شد. برای شمارش سلول‌های *L. lactis* به محیط کشت TSB، ترکیب ضدقارچ بنومیل (۴۰۰ mg/l) اضافه شد تا مانع از رشد مخمر *Y. lipolytica* شود.

### سنجش میزان سوپسترای مصرف شده

برای سنجش میزان قند محیط، روش فنل سولفوریک اسید به کار برده شد. در این روش پنج میلی لیتر از محیط تخمیر به

فواصل زمانی سه ساعت نمونه برداری شده و در دور ۴۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می شود. سپس سوپرناتانت به اندازه ۰/۰۱ رقیق گردید. به منظور رنگبری به ازای هر پنج میلی لیتر محیط تخمیر ۰/۱ گرم از کرین فعال استفاده شده و در نهایت ورتکس می شود. پس از آن محیط آماده شده، در دور ۱۲۰۰۰ به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ گردید. به ۲۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت نمونه های به دست آمده، محلول فنول پنج درصد به مقدار ۰/۲ میلی لیتر و یک میلی لیتر سولفوریک اسید غلیظ اضافه می شود. محلول فوق ورتکس شده و بعد از گذشت ده دقیقه، نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در حمام بخار ۳۰- ۲۵ درجه قرار داده می شوند. در انتها جذب نمونه ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده می شود (Tafirishi et al., 2010).

### ویژگی های دستگاه بیوراکتور

بیوراکتور استفاده شده در این پژوهش دارای موتور، سنسور دما، سنسور آنتی فوم، سنسور Do (In pro 6850i/12/220) و سنسور pH (In pro 3253i/SG/225) است. چهار پمپ پریماتیک برای خوراک دهی، آنتی فوم، اسید و باز (برای تنظیم pH) و همچنین، سامانه نمونه گیری و تخلیه، دارای دو پروانه و سه بافل بوده است. سامانه تنظیم دمای فرمانتور، به کمک المنت های حرارتی و ورود آب سرد صورت گرفت. هوادهی به کمک پمپ مخلوط اکسیژن و هوا که به ورودی دستگاه کنترل فرمانتور متصل است، انجام می شود. برای جلوگیری از خروج رطوبت از محیط کشت، در مسیر هوای خروجی یک کندانسور قرار داده شده است.

### نتایج

بررسی تاثیر زمان تخمیر بر میزان رشد باکتری *L. lactis*، نایسین تولیدی و تغییرات pH در دو حالت کشت خالص

#### و همزمان در فلاسک

نتایج تاثیر زمان تخمیر بر میزان رشد سلولی *L. lactis* و نایسین تولید شده در دو حالت کشت خالص و توام با مخمر *Y. lipolytica* در جدول (۱) نشان داده شده است. همان گونه که مشاهده می شود، رشد باکتری در کشت خالص و همزمان در ۱۲ ساعت بیشتر از ۲۴ ساعت بوده است. همچنین میزان رشد باکتری در شرایط کشت همزمان ۱۷ درصد بیشتر از کشت خالص بوده است. تولید نایسین در هر دو حالت وابسته به رشد سویه مولد بوده و در شرایط کشت همزمان ۴۵ درصد بیشتر از کشت خالص است. روش شمارش زیست توده در تمام آزمایش ها براساس شمارش سلول های زنده با شمارش تعداد کلنی ها انجام شده است. بر این اساس با گذشت زمان، سلول ها به تدریج دچار مرگ سلولی می شوند و در انتهای فرآیند تخمیر از تعداد

آن‌ها کاسته می‌شود. در کشت خالص باکتری، در انتهای فرآیند تخمیر (۲۴ ساعت) تعداد سلول‌های فعال و در حال رشد کاهش یافته است.

جدول ۱: تاثیر زمان تخمیر بر میزان رشد سلولی، نایسین تولیدی و pH در دو حالت کشت خالص و همزمان در فلاسک در محیط کشت تخمیر بر پایه ملاس

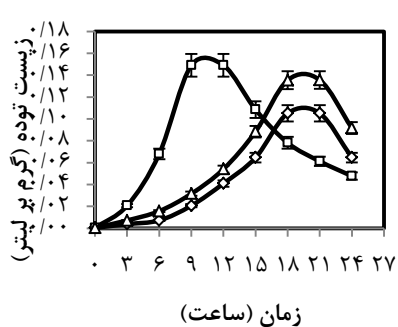
Nisin (IU/ml)	Biomass of <i>L. lactis</i> (g/l)	pH	Type of culture	Time(h)	Microorganism	Culture
210	0.07	4.7	CM	12	<i>L. lactis</i>	Pure culture
197	0.04	4.32	CM	24	<i>L. lactis</i>	Pure culture
304	0.08	4.43	CM	12	<i>L. lactis</i> and <i>Y. lipolytica</i>	Co- culture
289	0.05	4.78	CM	24	<i>L. lactis</i> and <i>Y. lipolytica</i>	Co- culture

CM: Complex Media, g/l: gram/litre, h: hour, IU/ml: International Unit/millilitre, *L.lactis*: *Lactococcus Lactis*, *Y. Lipolytica*: *Yarrowia Lipolytica*

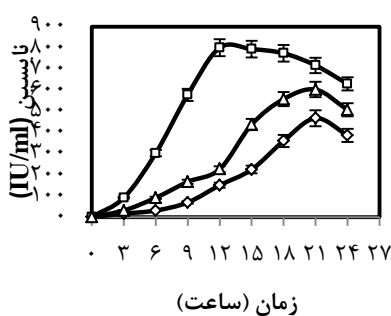
بهینه سازی میزان دور همزن و هوادهی در محیط کشت خالص باکتری *L. lactis* در بیوراکتور در شرایط pH کنترل شده

برای فرآیندهای تخمیر هوازی، هوادهی محیط کشت به طوری که میکروارگانیسیم‌ها مقدار اکسیژن لازم را جهت رشد دریافت نمایند، یکی از اصلی‌ترین و مهم‌ترین اهداف است. برای رسیدن به این مهم در بیوراکتورهای با همزن مکانیکی، همزدن محیط کشت موجب انتقال اکسیژن به میکروارگانیسیم می‌شود. دور همزن از طریق تأثیر روی پارامترهای انتقال در فرمانتور نقش بسیار مهمی در تولید نایسین توسط *L. lactis* دارد. نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان می‌دهد، افزایش میزان دورهمزن در بیوراکتور تا ۱۰۰ rpm، اثر مثبت و بیش از آن بر روی رشد باکتری و تولید نایسین اثر منفی داشته است. بنابراین rpm ۱۰۰ به عنوان بهترین دور همزن در نظر گرفته شده است. میزان تولید در دور بهینه rpm ۱۰۰ به ترتیب ۴۱ درصد و ۲۵ درصد بیشتر از دور rpm ۵۰ و rpm ۱۵۰ بوده است. از سوی دیگر نتایج بررسی اثر میزان هوادهی بر تولید نایسین نشان می‌دهد (شکل ۱)، که افزایش هوادهی تا ۰/۱۵ vvm سبب افزایش تولید نایسین و پس از آن سبب کاهش تولید محصول شده است. میزان تولید نایسین در شرایط هوادهی بهینه به ترتیب ۳۹ درصد و ۲۲ درصد بیشتر از شرایط بدون هوادهی و vvm ۰/۳ بوده است. در شرایط بهینه از نظر دور همزن (۱۰۰ rpm) و میزان هوادهی (۰/۱۵ vvm) مقدار نایسین تولید شده و رشد سلولی به ترتیب ۸۰۰ IU و ۰/۱۵ g/l گزارش شده است (شکل ۱). طبق پژوهش‌های قبلی، در طول فرآیند تخمیر pH بهینه محیط شش در نظر گرفته شده است (Tafrihi et al., 2010).

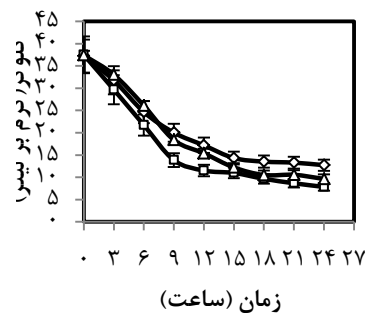
(الف)



۵۰ rpm ◊، ۱۰۰ rpm ◻، ۱۵۰ rpm Δ

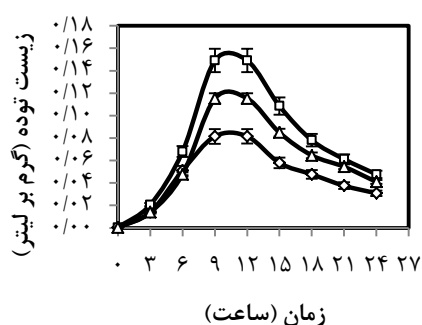


۵۰ rpm ◊، ۱۰۰ rpm ◻، ۱۵۰ rpm Δ

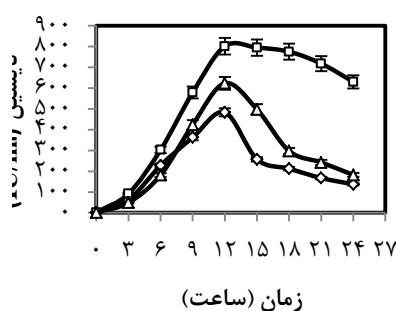


۵۰ rpm ◊، ۱۰۰ rpm ◻، ۱۵۰ rpm Δ

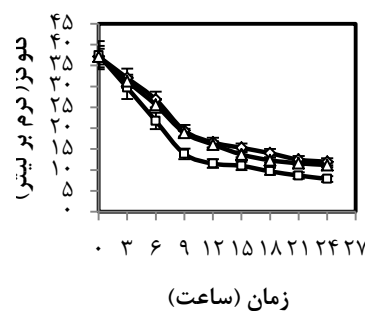
(ب)



۰ vvm ◊، ۰,۱۵ vvm ◻، ۰,۳ vvm Δ



۰ vvm ◊، ۰,۱۵ vvm ◻، ۰,۳ vvm Δ



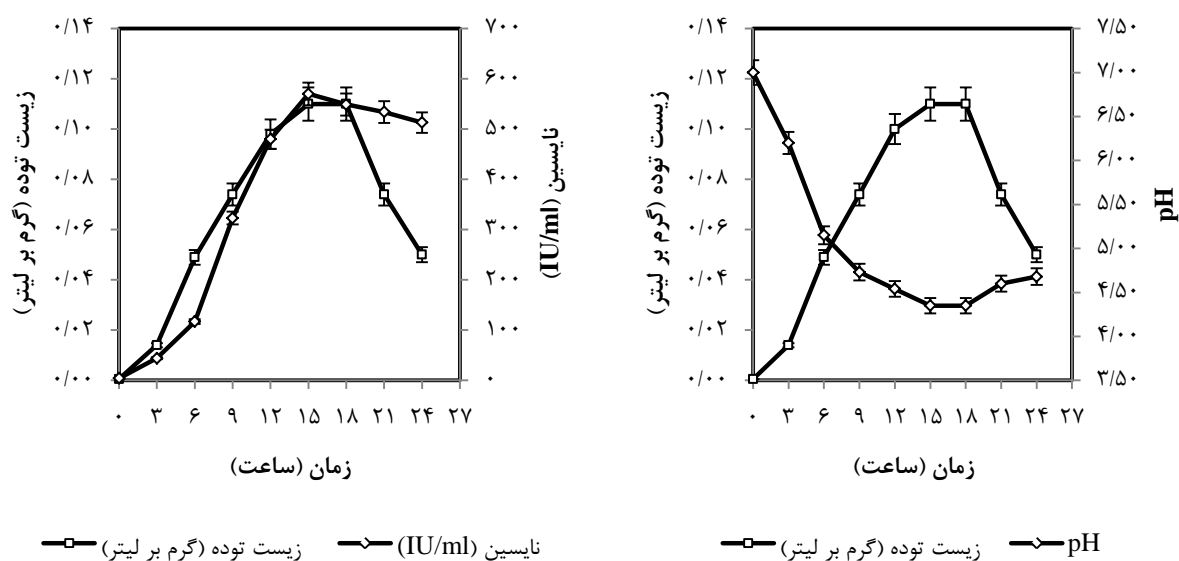
۰ vvm ◊، ۰,۱۵ vvm ◻، ۰,۳ vvm Δ

شکل ۱: اثر دورهای مختلف همزن (الف) و میزان هوادهی (ب) بر رشد سلولی، تولید نایسین و گلوکز مصرفی *L. lactis* در بیوراکتور در شرایط کنترل شده

بررسی میزان رشد سلولی، نایسین تولیدی در کشت همزمان در بیوراکتور در شرایط pH کنترل نشده

نتایج کشت همزمان *L. lactis* و مخمر *Y. lipolytica* در بیوراکتور در شرایط pH کنترل نشده در شکل (۲) نشان داده شده است. همان گونه که ملاحظه می شود، میزان تولید نایسین در مقایسه با فلاسک در کشت همزمان (جدول ۱) ۶۳ درصد افزایش یافته است که ناشی از بهبود شرایط همزن (۱۰۰ rpm) و میزان هوادهی (۰/۱۵ vvm) در بیوراکتور است. میزان رشد سلولی در بیوراکتور در این شرایط ۳۶ درصد افزایش یافته است. در کشت خالص در بیوراکتور در شرایط کنترل pH با توجه به افزایش اسید لاکتیک در محیط، رشد سوبیه پس از ۱۲ ساعت متوقف شده است (شکل ۱) اما زمان لازم برای رسیدن به حداکثر

میزان تولید در فرمانتور در کشت همزمان و بدون کنترل pH ۱۵ ساعت بوده است و مقدار بهره‌وری در این شرایط ۴۷/۵ IU/h ارزیابی شد. افزایش هفت درصد در میزان اسیدیته محیط در این شرایط در مقایسه با کشت همزمان در فلاسک (جدول ۱) موجب شده که باکتری تولید کننده نایسین مدت زمان بیشتری را در فاز لگاریتمی بماند و از آنجایی که نایسین در این فاز تولید می‌شود، بنابراین موجب افزایش بیشتر تولید نایسین شده است.

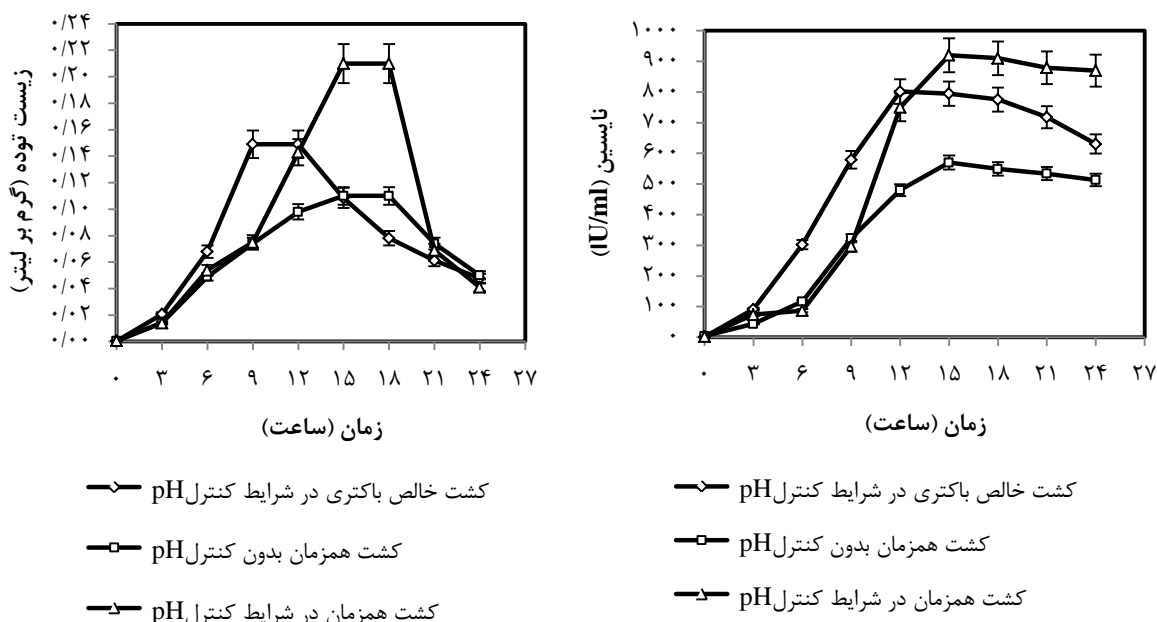


شکل ۲: بررسی رشد سلولی، نایسین تولیدی و تغییرات pH در کشت همزمان در بیوراکتور

### بررسی میزان رشد سلولی و تولید نایسین در کشت همزمان در بیوراکتور با کنترل pH

نتایج میزان رشد سلولی و نایسین در بیوراکتور در شرایطی که pH محیط کشت در طول فرآیند بر روی شش تنظیم شده است، در شکل (۳) نشان داده شده است. در این شرایط حداکثر تولید نایسین در ۱۵ ساعت به دست آمده که میزان رشد سلولی و تولید محصول در مقایسه با شرایط مشابه و بدون کنترل pH به ترتیب ۱/۹ و ۱/۶ برابر افزایش یافته است. همچنین میزان بهره‌وری (Productivity) یا میزان تولید محصول به زمان در کشت همزمان در شرایط pH کنترل شده در بیوراکتور ۶۱/۳۳ IU/h به دست آمده است. مقایسه میزان بهره‌وری تخمیر در بیوراکتور در شرایط کنترل pH و بدون کنترل pH نشان می‌دهد اگرچه در شرایط کشت همزمان با pH کنترل شده زمان دستیابی به حداکثر محصول سه ساعت افزایش یافته، ولی با توجه به افزایش غلظت تولید نایسین، میزان بهره‌وری نسبت به شرایط مشابه و بدون کنترل pH ۲۹ درصد افزایش داشته است.





شکل ۳: مقایسه بیشترین میزان رشد سلولی و تولید نایسین در کشت خالص و همزمان در بیوراکتور

## بحث

افزایش تولید فرآورده‌های میکروبی از جمله چالش‌های مهم پژوهش‌ها در زیست فناوری است که در زمینه‌های مختلف از جمله سویه، محیط کشت، شرایط تولید و سیستم‌های تولید حائز اهمیت است. روشی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت و تاثیر قابل توجهی را در رشد باکتری تولید کننده نایسین به همراه داشت، روش کشت همزمان میکروارگانیسم‌ها برای دستیابی به افزایش میزان تولید نایسین است. کشت همزمان دو یا چند میکروارگانیسم از جمله مفاهیم قدیمی است که در دهه اخیر باز تعریف شده و در موارد متعددی به کار گرفته شده است. نکته مهم در تعریف دوباره کشت همزمان، تفاوت گذاشتن با کشت مخلوط است که قبل از تکنیک کشت خالص استفاده می‌شد. مهمترین تفاوت کشت همزمان با کشت مخلوط شناخته شده بودن میکروارگانیسم و انتخاب دقیق آن بر حسب نیاز فرآیند در کشت همزمان است، در صورتی که در کشت مخلوط، ترکیبی از میکروارگانیسم‌ها که از قبل در محیط کشت وجود داشته‌اند و یا در طول فرآیند از محیط وارد شده‌اند، در تولید اثر مفید یا مضر خود را ایفا می‌کنند. در همین رابطه لازم است تاکید شود، میکروارگانیسم انتخاب شده که برای کشت همزمان باکتری *L. lactis* انتخاب می‌شود باید دارای خصوصیات ویژه ای باشد که از جمله آن می‌توان به توانایی بالای رشد در شرایط سخت محیطی مانند pH پایین، استفاده از اسید لاکتیک به عنوان منبع کربن و عدم استفاده از ساکاروز موجود در محیط کشت باشد. همچنین این میکروارگانیسم باید ایمن و بدون خطر باشد و در عین حال موجب تجزیه نایسین نشود. با توجه به مطالب ذکر شده در مورد خصوصیات میکروارگانیسم مورد نظر برای کشت همزمان، مخمر *Y. lipolytica* برای کشت

به همراه باکتری *L. lactis* مورد بررسی قرار گرفته است (Ariana & Hamed 2017). مخمر *Y. lipolytica* توانایی رشد در pH بین دو تا ده را دارا بوده و می تواند از اسید لاکتیک به عنوان منبع کربن استفاده نماید و همچنین به دلیل فقدان آنزیم اینورتاز قادر به استفاده از ساکاروز نمی باشد. این خصوصیات مخمر *Y. lipolytica* موجب می شود که برای کشت همزمان باکتری *L. lactis* مناسب باشد. در یکی از پژوهش‌های انجام شده، برای کشت همزمان باکتری *L. lactis*، تولید نایسین از این پژوهش‌ها از مخمر *Saccharomyces* به عنوان میکروارگانیسم همراه با باکتری *L. lactis* استفاده شده و آب پنیر (Whey) به عنوان منبع کربن انتخاب شده است. این کشت همزمان باکتری و مخمر، افزایش قابل توجهی را در تولید نایسین داشته است (Liu et al., 2006). در یک پژوهش دیگر از رشد همزمان مخمر *Kluyveromyces* به همراه باکتری *L. lactis* و منبع کربن مالتوز استفاده شده است (Shimizu et al., 1999). ولی تولید نایسین با مالتوز چندان اقتصادی به نظر نمی‌رسد. همانگونه که قبلاً گفته شد آریانا و حامدی *L. lactis* و *Y. lipolytica* را برای تولید نایسین در محیط بر پایه ملاس به صورت همزمان کشت دادند و افزایش تولید نایسین در کشت همزمان در مقایسه با کشت خالص گزارش کردند (Ariana & Hamed 2017). اما همه این پژوهش‌ها در فلاسک انجام شده که توانایی‌های محدودی از نظر فرآیندهای تخمیری دارد و در آن نمی توان pH را کنترل کرد. نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان می دهد در کشت همزمان پس از ۲۴ ساعت میزان کلنی های باکتری افزایش قابل توجهی نسبت به روش کشت خالص داشته‌اند، زیرا در روش کشت همزمان، تجمع کمتری از اسید لاکتیک ایجاد شده که سبب تداوم رشد باکتری در طی فرآیند تخمیر می شود. نقش مخمر در ساعات ابتدایی تخمیر بسیار آشکار است و نشان از برهمکنش بسیار مناسب هر دو میکروارگانیسم در محیط تخمیر دارد. در شرایط کشت همزمان در بیوراکتور در شرایط کنترل pH تولید نایسین حدود چهار برابر افزایش یافته است که نسبت به شرایط کشت خالص در فلاسک بسیار قابل توجه است. از سوی دیگر مقایسه کشت همزمان باکتری و مخمر در بیوراکتور در دو شرایط با کنترل pH و بدون کنترل pH نشان می‌دهد در شرایط عدم کنترل pH، به دلیل فعالیت باکتری و تولید اسید لاکتیک، pH اولیه از هفت به ۴/۳ در ساعت ۱۵ کاهش یافته است که سپس با فعالیت مخمر و مصرف لاکتیک اسید این pH در ساعت ۲۴ به ۴/۷ افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد اثر مثبت *Y. lipolytica* در فرآیند تولید نایسین دلایل دیگری نیز داشته باشد، زیرا وقتی این مخمر و *L. lactis* در کشت همزمان و در شرایط کنترل pH کشت داده شده اند، تولید نایسین ۱/۹ برابر کشت همزمان در شرایط بدون کنترل pH بوده است و میزان بهروری محصول به مقدار قابل توجهی افزایش یافته است. به عنوان مثال *Y. lipolytica* فعالیت پروتئازی بالایی دارد و به نظر می‌رسد مخمر به این ترتیب بتواند سبب تسهیل دسترسی به سوبسترا، برای باکتری *L. lactis* گردد که این امر می‌تواند باعث افزایش رشد و تولید محصول توسط باکتری شود (Pokora et al., 2017).

تولید باکتریوسین‌ها توسط باکتری های اسید لاکتیک همراه با رشد این میکروارگانیسم‌ها انجام می‌شود. همچنین نشان

داده شده است که پدیده کروم سنسینگ و حدواسط‌های مولکولی در تولید باکتریوسین‌ها نقش دارند. در مورد باکتری‌های اسید لاکتیک، پپتیدهای القا کننده نقش مهمی را به عنوان مولکول‌های کروم سنسینگ ایفا می‌کنند. مکانیسم دیگر القا تولید باکتریوسین در باکتری‌های اسید لاکتیک، اثر مثبت خود باکتریوسین است. اثر مثبت نایسین در تولید این ترکیب، مکانیسم‌های مولکولی و رسپتورهای مربوطه در *L. lactis* گزارش شده است (Chanos & Mygind, 2016).

در برخی از موارد، رشد همزمان سبب کاهش رشد میکروارگانیزم مولد محصول شده و مولکول‌های حدواسط تولید شده توسط میکروارگانیزم کمکی سبب کاهش تولید و ترشح باکتریوسین شده‌است یا ممکن است میکروارگانیزم کمکی خود به باکتریوسین تولیدی حساس باشد و در شرایط تخمیر از بین برود، در این صورت کشت همزمان نمی‌تواند سبب افزایش تولید شود. در هر صورت مخمر *Y. lipolytica* نسبت به نایسین تولیدی مقاوم بوده و این تاثیر منفی را نداشته است (Kuipers et al., 1998). برای درک مکانیسم دقیق افزایش تولید محصول در کشت همزمان باکتری *L. lactis* و مخمر *Y. lipolytica* نیاز به پژوهش‌های فراتر با استفاده از فنون مدرن مانند پروتئومیکس و ژنومیکس است.

## نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد شرایط کشت همزمان در بیوراکتور در pH شش در مقایسه با کشت خالص باکتری در فلاسک می‌تواند میزان رشد سلولی و تولید نایسین را به ترتیب ۶۳ درصد و ۷۸ درصد افزایش دهد. یکی از مزیت‌های استفاده از کشت همزمان برای تولید بیشتر نایسین، مصرف اسید موجود در محیط و ایجاد شرایط مناسب از لحاظ اسیدیته، برای باکتری تولید کننده نایسین است. کاهش pH محیط، منجر به کاهش رشد باکتری و در نتیجه کاهش بازدهی تولید نایسین را به همراه خواهد داشت. علاوه بر آن، توانایی بالای مخمر *Y. lipolytica* در تولید آنزیم‌های پروتئازی، می‌تواند سبب تسهیل دسترسی باکتری *L. lactis* به سوبسترای موجود در محیط تخمیر و افزایش تولید نایسین شود. همچنین شاید این مخمر سبب تولید پپتیدهای محرک تولید در *L. lactis* شده باشد.

## منابع

- Ariana, M. and Hamed, J. (2017) Enhanced production of nisin by co-culture of *Lactococcus lactis* sub sp. *lactis* and *Yarrowia lipolytica* in molasses based medium. *Journal of Biotechnology*. 256: 21-26
- Bader, J., Mast-Gerlach, E. Popovic, M. K. Bajpai, R. and Stahl, U. (2010). Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*. 109: 371-387
- Budde, B. B. and M. Rasch. (2001). A comparative study on the use of flow cytometry and colony forming units for assessment of the antibacterial effect of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*. 63: 65-

72

- Chanos, P. and Mygind, T. (2016). Co-culture-inducible bacteriocin production in lactic acid bacteria. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 100: 4297-4308
- Cook, G. M. and Russell, J.B. (1994). The effect of extracellular pH and lactic acid on pH homeostasis in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus bovis*. *Current Microbiology*. 28: 165-168
- Delves-Broughto, J. (1990). Nisin and its application as a food preservative. *International Journal of Dairy Technology*. 43: 73-76
- Grabley, S. and Thiericke, R. (1999). Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. In *Thermal Biosensors, Bioactivity, Bioaffinity*. Springer Berlin Heidelberg. 101-154
- Kuipers, O. P., de Ruyter, P. G. Kleerebezem, M. and de Vos, W. M. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. 64: 15-21
- Liu, C., Hu, B. Liu, Y. and Chen, S. (2006). Stimulation of nisin production from whey by a mixed culture of *Lactococcus lactis* & *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 131: 751-761
- McAuliffe, O., Ross, R. P and Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*. 25: 285-308
- Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*. 75: 311-335
- Pokora, M., Zambrowicz, A. Zablocka, A. Dąbrowska, A. Szoltysik, M. Babij, K. and Chrzanowska, J. (2017). The use of serine protease from *Yarrowia lipolytica* yeast in the production of biopeptides from denatured egg white proteins. *Acta Biochimica Polonica*. 64
- Pongtharangkul, T. and A. Demirci (2004). Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65: 268-27
- Reunanen, J. and Saris, P. (2003). Microplate bioassay for nisin in foods, based on nisin-induced green fluorescent protein fluorescence. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 4214-4218
- Tafreshi, S. Y. H., Mirdamadi, S. Norouzian, D. Khatami, S. and Sardari, S. (2010). Optimization of non-nutritional factors for a cost-effective enhancement of nisin production using orthogonal array method. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2: 267-273
- Shimizu, H., Mizuguchi, T. Tanaka, E. and Shioya, S. (1999). Nisin Production by a Mixed-Culture System Consisting of *Lactococcus lactis* & *Kluyveromyces marxianus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 3134-3141
- Simsek, Ö. (2014). Nisin production in a chitin-including continuous fermentation system with *Lactococcus lactis* displaying a cell wall chitin-binding domain. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*. 41: 535-543.