بررسی اثر استفاده از منابع کربنی بومی (آب پنیر، سبوس جودوسر، آرد برنج) در تولید تخمیری لایزین بوسیله *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم*

زهرا محمدزاده فریزهندی[۲،۱]، غزل لبیکی[۳،۲*]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی صنایع غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. مرکز تحقیقات علوم تغذیه و صنایع غذایی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳. گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

***نویسنده مسئول:** *labeiki@iaups.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۰۹

چکیده

لایزین جزو اسیدهای آمینه ضروری بوده که در بدن انسان ساخته نمی‌شود، اما با توجه به نیاز بدن به آن و همچنین کاربرد در بخش‌های مختلف حوزه سلامت، بهینه سازی و اقتصادی تر کردن فرآیند تولید آن حائز اهمیت می‌باشد. متداولترین روش تولید لایزین، تخمیر میکروبی بوده و ترکیبات مغذی محیط کشت تخمیر بر رشد میکروارگانیسم و تولید متابولیت میکروبی موثر می‌باشند. بر این اساس پژوهش فوق، با هدف بررسی اثر سوبستراهای مغذی بومی و ارزان قیمت، به عنوان تامین کننده اصلی انرژی میکروارگانیسم، بر رشد و محصول دهی سویه طراحی و انجام شده است. برای این منظور مقادیر مختلف($\frac{g}{lit}$) از سوبستراهای آب پنیر (۱۰۰، ۱۳۵،۱۷۰)، آرد برنج (۱۰۰، ۱۳۵ ،۱۷۰) و سبوس جو (۱۰۰، ۱۷۰، ۲۲۰) به طور جداگانه به محیط کشت تخمیر *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* افزوده شده و در ساعت‌های ۶۸ و ۱۱۶ تخمیر، شاخص‌های رشد مانند pH محیط، بیومس تولیدی، سرعت رشد ویژه میکروارگانیسم، مورفولوژی سویه و مقدار اسید آمینه تولید شده مورد سنجش قرار گرفته و با حالت شاهد (۱۰۰ $\frac{g}{lit}$ گلوکز) مقایسه شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که بیشترین مقدار لایزین تولیدی به ترتیب از محیط‌های حاوی ۱۳۵ $\frac{g}{lit}$ آب پنیر، ۱۷۰ $\frac{g}{lit}$ آرد برنج و ۲۲۰ $\frac{g}{lit}$ جو دو سر به دست آمده است. این نتایج بیان می‌دارند که ترکیبات مذکور، برای استفاده در فرآیندهای زیستی مناسب بوده و می‌توانند به‌عنوان منابع مغذی اصلی مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: آزم لایزین، محیط کشت تخمیر، *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم*، آب پنیر، سبوس جو دو سر و آرد برنج.

مقدمه

اسیدهای آمینه زیرواحدهای تشکیل دهنده پروتئین‌ها هستند که در ساختمان شیمیایی خود دارای یک کربن نامتقارن و ۴ گروه متصل به آن شامل گروه آمینی (NH_2)، گروه کربوکسیلیک اسید (COOH)، اتم هیدروژن و زنجیره جانبی R می‌باشند (Walsh, 2007 ; جمالزاده و همکاران، ۱۳۹۶).

با توجه به نوع ترکیب R، ۲۰ اسید آمینه متفاوت وجود دارد که در صنایع مختلفی نظیر غذا و دارو مورد استفاده قرار می‌گیرند (Murray, 2003) جدول شماره (۱) ۲۰ اسیدآمینه موجود را به تفکیک ضروری یا غیر ضروری بودن برای انسان‌ها نشان می‌دهد (Murray, 2003).

جدول۱- اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری

اسیدهای آمینه غیرضروری	اسیدهای آمینه ضروری
آلانین	آرژنین
آسپارژین	هیستیدین
آسپارتات	ایزولوسین
سیستئین	لوسین
گلوتامات	لیزین
گلوتامین	متیونین
گلایسین	فنیل آلانین
تیروزین	ترئونین
سرین	تریپتوفان
پرولین	والین

www.SID.ir

Archive of SID

اسیدهای آمینه به عنوان تشدید کننده عطر و طعم مواد غذایی، مکمل و بهبود دهنده کیفیت تغذیه ای خوراک انسان و دام و طیور، آنتی اکسیدان و شیرین کننده در صنعت غذا کاربرد داشته، همچنین در تخلیص پروتئین‌ها، تولید پپتیدها و برخی مصارف دارویی و صنعتی استفاده می‌شوند (مرتضوی و همکاران، ۱۳۷۶؛ حبیبی و همکاران، ۱۳۸۶؛ Arakawa et al., 2007).

برای تولید اسیدهای آمینه ۳ روش کلی وجود دارد که عبارتند از استخراج از پروتئین هیدرولیز شده، سنتز شیمیایی و سنتز میکروبی (مرتضوی و همکاران، ۱۳۷۶). در روش استخراج از پروتئین، جداسازی یک اسیدآمینه خاص از بین دامنه وسیعی از اسیدهای آمینه موجود در منبع پروتئینی، هزینه بر می‌باشد. در روش سنتز شیمیایی نیز اسیدهای آمینه بصورت مخلوطی از ایزومرهای L و D سنتز می‌شوند که مطلوب نمی‌باشد (موسوی نسب و همکاران، ۱۳۸۹)، اما در تولید به روش تخمیرمیکروبی، محصولات فعال نوری مورد نیاز برای واکنش‌های بیولوژیک بدن انسان (فرم L) تولید می‌شوند. لذا از میان ۳ روش مذکور روش سنتز میکروبی، مناسب‌تر و عملیاتی‌تر می‌باشد (مرتضوی و همکاران، ۱۳۷۶). از این‌رو در حال حاضر استخراج اسیدهای آمینه از محیط‌های کشت میکروبی یک صنعت اقتصادی با ارزش به حساب می‌آید (حبیبی و همکاران، ۱۳۸۶؛ Wei-Shou, 2018) به‌طوری‌که این مواد، پس از اتانول و آنتی بیوتیک‌ها، جایگاه سوم را در تولید جهانی محصول از طریق بیوتکنولوژی دارا هستند (Kjeldsen et al., 2009).

لایزین، یکی از مهمترین اسیدهای آمینه با فرمول $C_6H_{14}ON_2$ و جرم مولی $(\frac{g}{mol})$۱۴۶،۱۹ بوده که در ساختمان شیمیایی خود دارای زنجیره جانبی $R = 4(CH_2) - NH_2$ می‌باشد. لایزین از دسته اسیدهای آمینه ضروری بوده، بدین معنی که برای بدن لازم و ضروری است، اما در بدن انسان و سایر پستانداران ساخته نشده و بایستی از طریق رژیم غذایی تأمین شود (موسوی نسب و همکاران، ۱۳۸۹ ;Murray, 2003). همچنین پروتئین‌های گیاهی نظیر ذرت و گندم و جو از نظراسیدهای آمینه ضروری مانند لایزین دارای فقر بوده، از اینرو لایزین می‌بایست برای بهبود خواص تغذیه ای به خوراک انسان، دام و طیور افزوده شود (Wei-Shou,2018; Kjeldsen et al., 2009; Hussain et al., 2015).

اولین قدم برای تولید صنعتی لایزین با روش میکروبی، در دهه ۱۹۵۰ در ژاپن و با استفاده از *میکروکوکوس گلوتامیکوم* انجام شد (Kjeldsen et al., 2009) و پس از آن با پیشرفت دانش بیوتکنولوژی و ورود آن به علم غذا و شکل گیری دانش میان رشته ای بیوتکنولوژی غذایی، امروزه فرآیند تخمیری میکروبی، اقتصادی ترین و بهترین روش برای تولید صنعتی لایزین می‌باشد (Wei-Shou,2018; مرتضوی و همکاران، ۱۳۷۶2009; Kjeldsen et al., Ekwealor et al., 2005). میکروارگانیسم‌هایی مانند *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* (Wei-Shou, 2018; Moosavi-Nasab et al., 2007 Walsh, 2007)، *بروی باکتریوم فلاووم* (Javed et al., 2011) *بروی باکتریوم لیننس* (موسوی نسب و همکاران، ۱۳۸۹)، *باسیلوس مگاتریوم* (Ekwealor et al., 2005) از تولید کننده‌های لایزین به روش تخمیری هستند، که در میان آن‌ها مورد اول به دلیل بازده بیشتر، تولید کننده اصلی و جهانی می‌باشد (Kjeldsen et al., 2009; Walsh, 2007).

فقر غذایی موجود در دنیا و بالاخصوص کشورهای در حال توسعه، نیاز به غنی‌سازی مواد غذایی را با اسیدهای آمینه ای نظیر لایزین ضروری می‌کند. از همین رو و با توجه به میزان مصرف بالای این اسید آمینه، پژوهش‌ها و مطالعات گسترده‌ای در جهت افزایش بازده تولید و کاهش قیمت تمام شده آن در ایران و جهان انجام شده است.

www.SID.ir

Arc JFM ID

تعدادی از این مطالعات سویه میکروبی تولید کننده لایزین را مورد بررسی قرار داده و با دستکاری‌های ژنتیکی، اصلاح سویه و مهندسی متابولیک سعی بر افزایش مقدار و کیفیت محصول میکروبی نموده‌اند (Kjeldsen et al., 2009) و در سایر پژوهش‌ها، شرایط تخمیر و عوامل موثر بر آن مورد بررسی و بهینه سازی قرار گرفته‌اند. بطور مثال مطالعات نشان داده است افزودن پنی سیلین به محیط کشت تخمیر *باسیلوس مگاتریوم*، رشد آن را تحریک و تولید لایزین را افزایش داده است (Ekwealor et al., 2005)، همچنین تخمیر حالت نیمه پیوسته، نسبت به حالت پیوسته، لایزین بیشتری را توسط *کورینه باکتریوم مگاتریوم* تولید می‌کند (Hadj et al., 1998). براساس مطالعه ای در ایران، منبع کربنی آب پنیر نسبت به ملاس، رشد *باکتریوم لنسیس* را افزایش داده و محصول آن را نیز افزایش می‌دهد (موسوی نسب و همکاران، ۱۳۸۹).

علیرغم مطالعات انجام شده لایزین مورد نیاز کشور کماکان از طریق واردات تأمین می‌شود، لذا با عنایت به اهمیت تولید داخلی این ماده و بومی سازی فرآیند تولید آن و همچنین اثر مهم ترکیبات و شرایط تخمیر بر تولید متابولیت میکروبی، در پژوهش حاضر اثر غلظت‌های مختلفی از چند منبع کربنی بومی ایران (پودر آب پنیر، سبوس جو دوسر، آرد برنج) که ارزان قیمت، فراوان و در دسترس هستند در محیط تخمیر *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* مورد بررسی قرار گرفته و با محیط کشت تخمیری شاهد مقایسه شده‌اند تا با بومی‌سازی و بهینه‌سازی فرآیند، گامی در راستای افزایش بازده تولید، کاهش هزینه ها و در نهایت خودکفایی کشور در این زمینه برداشته شود.

روش کار

تهیه سویه

سویه مولد لیزین *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* ۱۵۳۲ PTCC[1] به صورت آمپول لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران تهیه شد.

رشد و توسعه سویه

رشد مناسب و محصول‌دهی هر سویه مستلزم توجه به نیازهای آن میکروارگانیسم در هر مرحله از فرآیند رشد می‌باشد، به‌طوری‌که محیط‌هایی که جهت فعال‌سازی و استفاده میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند بایستی همه عناصر لازم برای رشد و سنتز ماده سلولی و تولید محصول متابولیکی را به خوبی دارا باشند (مرتضوی و همکاران، ۱۳۷۶). برای این منظور در هر مرحله از فرآیندِ تولید محصول بیولوژیکی، از شرایط عملیاتی و محیط‌های کشت متفاوتی برای رسیدن به بیشترین بازده استفاده شد. پس از بازکردن آمپول لیوفیلیزه در شرایط کاملا استریل، به منظور فعالسازی باکتری خشک شده انجمادی (شجاع الساداتی و همکاران، ۱۳۸۷)، محتویات درون آمپول در محیط نوترینت براث (مرک) استریل (Moosavi-Nasab et al.,2007; Hussain et al., 2015). pH= ۷، قرار داده شده و پس از طی ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور (shin-Saeng , SKIR -601) با سرعت ۱۸۰دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و ایجاد کدورت ناشی از رشد، به اسلنت‌های مولرهینتون آگار (مرک) استریل (pH =۷) منتقل شده، پس از ۵ روز گرما گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های سفید رنگ *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* بر روی سطح محیط کشت مشاهده شدند.

تخمیر میکروبی

عملیات تخمیر میکروبی ناپیوسته طی دو مرحله برای *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* انجام شد. بدین ترتیب که ابتدا محیط کشت مرحله اول که مرحله پیش کشت یا پیش تخمیر نام دارد طبق موارد جدول ۲ تهیه شده، سپس از کلنی‌های تشکیل شده در مرحله قبل به آن

1- Persian Type Culture Collection

www.SID.ir

Archive of SID

اضافه شده (Moosavi-Nasab et al., 2007)، سپس فلاسک‌های پیش تخمیر به مدت ۱۸ ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. هدف از این مرحله، تهیه مایه تلقیح مناسب برای تخمیر بوده، برای این منظور ابتدا عدم آلودگی مایه تلقیح، با تهیه گسترش و رنگ آمیزی گِرَم از نمونه‌ها، بررسی شده، سپس برای سنجش رشد مناسب باکتری، دانسیته نوری نمونه‌ها با دستگاه نانودراپ (Thermo One) سنجیده شده و کدورت ایجاد شده به علت رشد باکتری در نمونه‌ها با کدورت نمونه شاهد (محیط کشت بدون باکتری) مقایسه شده است.

جدول۲- ترکیبات محیط پیش تخمیر(pH= ۷)

ماده	مقدار ($\frac{g}{lit}$)
گلوکز (قطران شیمی)	۲۰
پپتون (مرک)	۱۰
عصاره مخمر (مرک)	۱۰
نمک (قطران شیمی)	۲/۵
منیزیوم سولفات (مرک)	۰/۲۵
منگنز سولفات (سیگما)	۰/۱
پتاسیم دی هیدروژن فسفات (مرک)	۱
پتاسیم هیدروژن فسفات (مرک)	۱
بیوتین (سیگما)	۰/۰۱

در مرحله دوم فرآیند تخمیر میکروبی محیط کشت تخمیر با توجه به جدول ۳ تهیه شد (Moosavi-Nasab et al., 2007). لازم به ذکر است ترکیبات محیط کشت دو مرحله تخمیری، طوری بوده تا محرک تولید متابولیت اولیه لایزین باشند.

همان‌طور که از جداول ۲ و ۳ مشخص می‌باشد گلوکز، بیشترین مقدار منبع کربنی موجود برای میکروارگانیسم بوده، که با توجه به هدف این پژوهش، غلظت‌های مختلفی از ۳ منبع کربنی ارزان قیمت و بومی ایران (سبوس جودوسر، پودر آب پنیر و آردبرنج) انتخاب (جدول ۴) و جایگزین گلوکز در محیط کشت تخمیر شده و با حالت شاهد (محیط کشت حاوی گلوکز) مقایسه شده‌اند. طراحی غلظت منابع کربنی جایگزین گلوکز براساس آنالیز ترکیبی موجود در هر گرم از این مواد انجام شده است.

جدول۳- ترکیبات محیط تخمیر(pH= ۷)

ماده	مقدار ($\frac{g}{lit}$)
گلوکز (قطران شیمی)	۱۰۰
کلسیم کربنات(مرک)	۲۰
آمونیوم سولفات(مرک)	۴۶
اوره (سیگما)	۵
منیزیوم سولفات (مرک)	۲/۸
منگنز سولفات (سیگما)	۰/۰۱
پتاسیم دی هیدروژن فسفات (مرک)	۵
پتاسیم هیدروژن فسفات (مرک)	۵
بیوتین (سیگما)	۰/۱
لوسین(مرک)	۰/۴

جدول۴- تیمارهای مختلف منابع کربنی مورد استفاده در محیط کشت تخمیر

منبع کربنی	مقدار ($\frac{g}{lit}$)	نام گذاری تیمار
سبوس جودوسر (OAB)	۲۲۰	T_1
سبوس جودوسر	۱۷۰	T_2
سبوس جودسر	۱۰۰	T_3
پودر آب پنیر (پگاه)	۱۷۰	T_4
پودر آب پنیر	۱۳۵	T_5
پودر آب پنیر	۱۰۰	T_6
آردبرنج (ترخینه)	۱۷۰	T_7
آردبرنج	۱۳۵	T_8
آردبرنج	۱۰۰	T_9
گلوکز	۱۰۰	T_{10}

سنجش‌ها

در ساعت‌های ۶۸ و ۱۱۶ تخمیر، در شرایط استریل از فلاسک‌های تخمیر نمونه‌گیری شده، سپس نمونه‌ها از نظر مورفولوژی رشد میکروارگانیسم، وزن توده سلولی، pH، و لیزین تولید شده مورد بررسی قرار گرفته و با محیط شاهد (T_{10}) مقایسه شدند.

رشد سویه و مورفولوژی میکروارگانیسم از طریق تهیه گسترش میکروبی روی لام، رنگ آمیزی گرم و مشاهده آن زیر میکروسکوپ نوری (Nikon-YS2-T)، pH

www.SID.ir

ArcJFM ID

نمونه‌های تخمیری، با استفاده از PH متر رومیزی (laboratory Benchtop-AZ86502) انجام شد. مقدار بیومس (زیست توده) از نسبت وزن رسوب سلولی به وزن محیط نمونه تعیین شد. برای این منظور ابتدا وزن میکروتیوب خالی (A) و سپس میکروتیوپ حاوی ۱میلی لیتر محیط تخمیر (B) با استفاده از ترازو (Sartorius-ACCULAB-Vicon303)۰.۰۰۱ گرفته شد، سپس میکروتیوپ‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ (Sigma-3-30KHS) با ۴۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شده و پس از ایجاد دو فاز و دورریختن مایع رویی مجددا وزن شدند (C)، درصد بیومس در این روش طبق رابطه زیر بدست آمده است (لبیکی و همکاران، ۱۳۸۹).

رابطه ۱- $\text{درصد بیومس} = \frac{C-A}{B-A} \times 100 = \frac{\text{وزن رسوب}}{\text{وزن محیط}} \times 100$

بررسی کیفی تولید اسیدآمینه لایزین در نمونه‌های تخمیری با استفاده از تست نین هیدرین انجام گرفت (Hussain et al., 2015; Walsh, 2007; Mohammad et al., 2012). برای این منظور به ۱میلی‌لیتر از نمونه‌های تخمیری، ۱میلی لیتر معرف نین هیدرین (مرک) اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شدند. تغییر رنگ زرد محلول به رنگ بنفش بیانگر تولید اسید آمینه در نمونه تخمیری بوده است. لازم به ذکر است ترکیب گروه آمین و کربوکسی اسیدآمینه لایزین با نین هیدرین منجر به تشکیل کمپلکس بنفش رومان می‌شود (جمالزاده و همکاران، ۱۳۹۶). بررسی کمی تولید اسیدآمینه لایزین از نمونه‌های تخمیری به وسیله روش معتبر کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، با ستون C_{18} و فاز متحرک پتاسیم دی هیدروژن فسفات در طول موج ۲۱۴ نانومتر انجام گرفت (Qadir et al., 2015). (یک نمونه در شکل ۲ آورده شده است).

نتایج

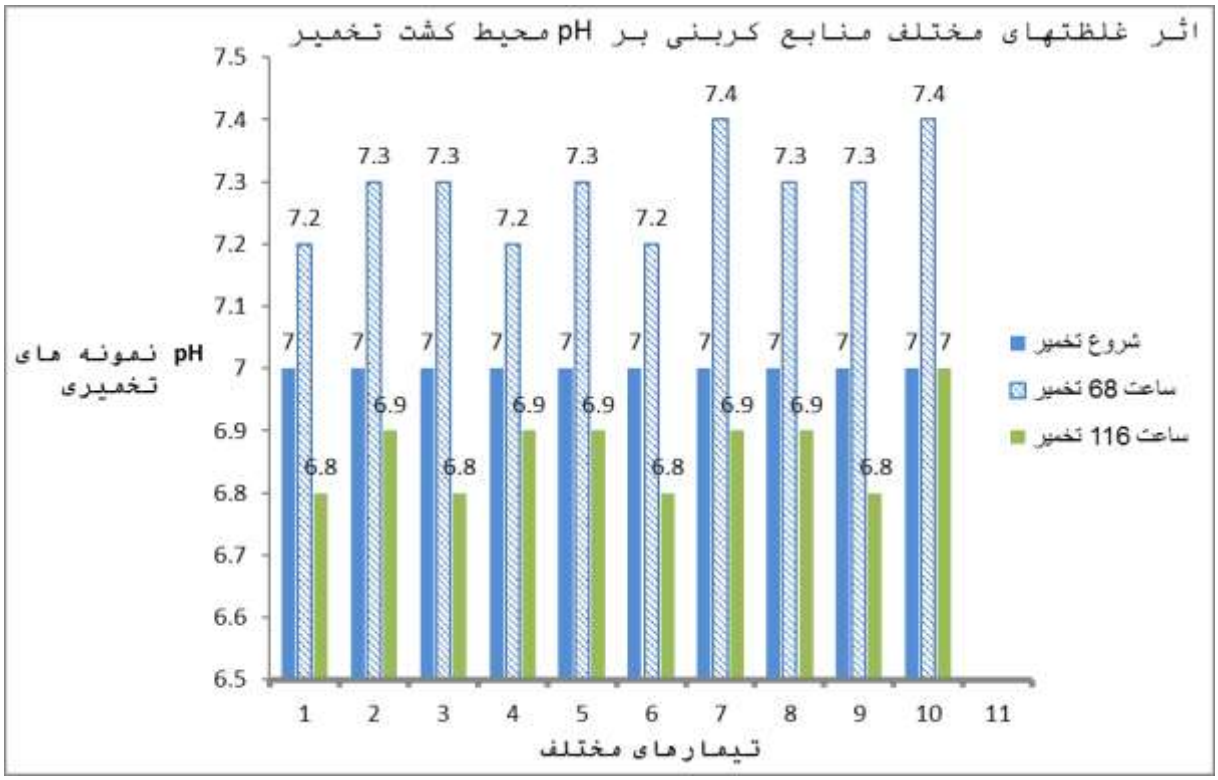
نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان داد که pH محیط کشت تخمیر، بیومس تولیدی و مقدار تولید اسید آمینه لایزین در طول فرآیند تخمیر و بر اساس نوع منبع کربنی مورد استفاده نسبت به شاهد، دارای تغییراتی بوده است که در نمودارهای ۱ تا ۳ نشان داده شده‌اند.

اثر غلظت‌های مختلف منابع کربنی بر pH محیط کشت تخمیر

pH محیط کشت تخمیر یکی از شاخصه‌های رشد باکتریایی است و بر اساس نتایج حاصله، مقدار آن در ابتدای تخمیر افزایش یافته که علت آن مصرف مواد غذایی محیط کشت و آزاد شدن مواد بازی می‌باشد. اسید آمینه لایزین نیز خاصیت بازی داشته و تولید آن در محیط کشت بر روی pH اثر افزایشی دارد. با ادامه فرآیند تخمیر بعلت ترشح مواد اسیدی ناشی از رشد میکروارگانیسم مقدار pH روند کاهشی در پیش گرفته است (لبیکی و همکاران، ۱۳۹۳؛ موسوی نسب و همکاران، ۱۳۸۹). نمودار ۱ تغییرات pH را برای غلظت‌های مختلف منابع کربنی نشان می‌دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

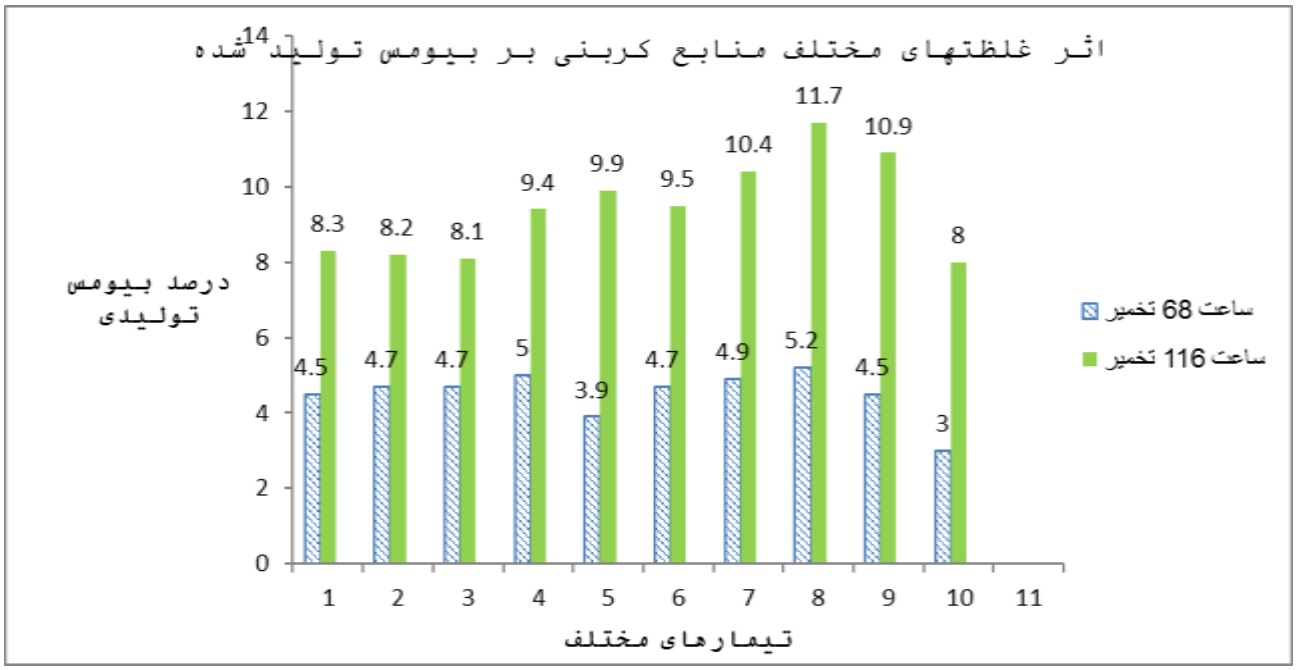


نمودار ۱- تغییرات pH محیط کشت تخمیر بر اساس تیمارهای مختلف

اثر غلظت‌های مختلف منابع کربنی بر درصد بیومس تولید شده

توده سلولی ناشی از رشد میکروارگانیسم در طول دوره تخمیر دارای تغییراتی بوده که در نمودار ۲ نشان داده شده است. علت این تغییر افزایشی را می‌توان به وضعیت رشد باکتری و منحنی رشد میکروارگانیسم‌ها در واحد زمان مرتبط دانست به اینصورت که باکتری ابتدا در فاز تاخیری رشد (فاز lag) و در حال سازگاری با شرایط و محیط کشت بوده است (مرحله پیش تخمیر). دراین مرحله تعداد میکروارگانیسم‌ها در واحد زمان تغییر چندانی نداشته و لذا بیومس تقریبا ثابت است. پس از ورود میکروارگانیسم به فاز لگاریتمی رشد (فاز log)، سرعت رشد تصاعدی افزایش یافته و تعداد میکروارگانیسم (بیومس) در واحد زمان افزایش یافته است (مرحله تخمیر). در این مرحله از رشد، متابولیت‌های اولیه مانند اسیدهای آمینه تشکیل می‌شوند که برای رشد میکروارگانیسم‌ها ضروری می‌باشند (شجاع الساداتی و همکاران، ۱۳۸۷؛ مرتضوی و همکاران، ۱۳۷۶).

www.SID.ir



نمودار ۲- تغییرات درصد بیومس در مرحله تخمیر بر اساس تیمارهای مختلف

در مرحله رشد لگاریتمی میکروارگانیسم‌ها، بین پارامترهای بیومس (x) و مدت زمان واکنش بیوشیمیایی تخمیر (t) ارتباطی وجود دارد (رابطه ۳ و۲). لازم به ذکر است در این رابطه μ سرعت رشد ویژه میکروارگانیسم بوده که در صنعت تخمیر اهمیت زیادی داشته و به نوع میکروارگانیسم و شرایط تخمیر وابسته می‌باشد (مرتضوی و همکاران، ۱۳۷۶).

رابطه ۲- $\frac{dx}{dt} = \mu . x$

پس از انتگرالگیری از رابطه ۲، رابطه ۳ حاصل می‌شود.

$$\int_{x_0}^{x_1} \frac{dx}{x} = \int_0^t \mu . dt$$

رابطه ۳ $ln\frac{x_1}{x_0} = \mu . t$

نتایج این پژوهش نیز نشان داد که سرعت رشد ویژه برای *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* در فرآیند تولید لایزین دارای مقدار (حدودی) ۰.۰۱ $\frac{1}{\text{ساعت}}$ می‌باشد. جدول ۵ مقادیر μ را برای تیمارهای مختلف این پژوهش نشان می‌دهد.

جدول ۵- مقادیر سرعت رشد ویژه *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* در تیمارهای مختلف ($\frac{1}{\text{ساعت}}$)

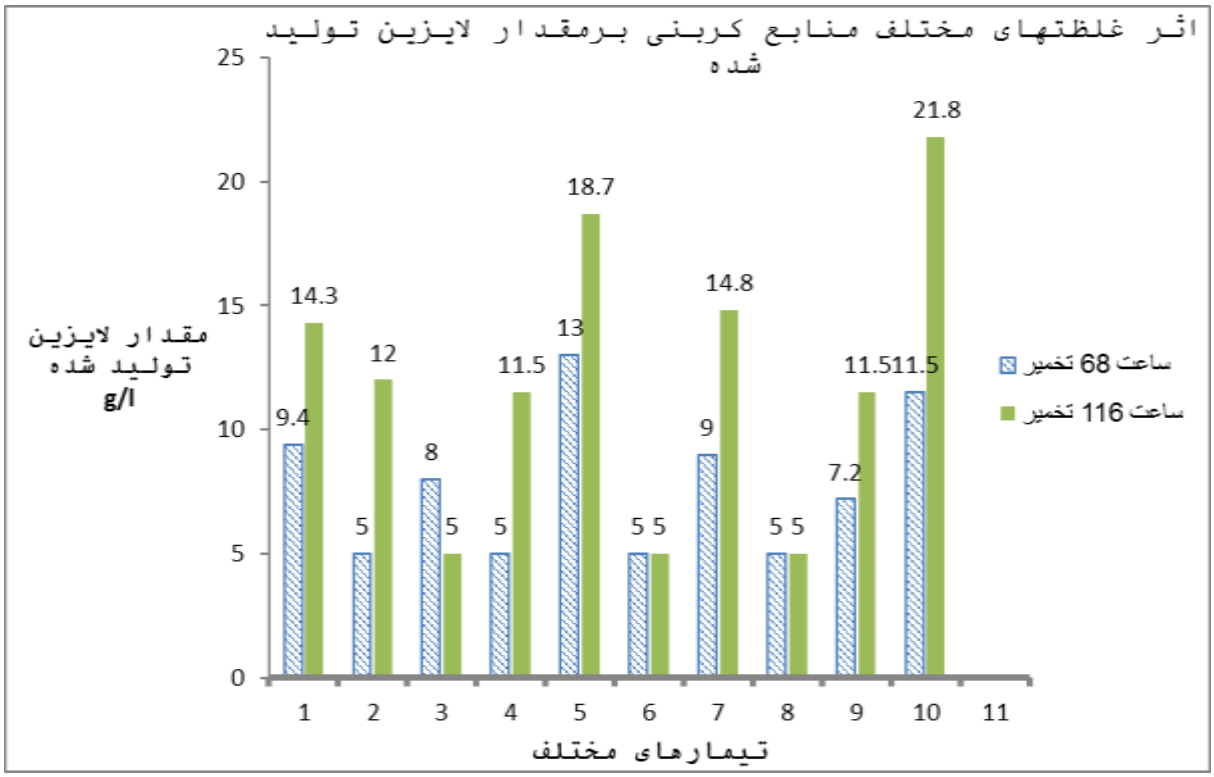
نام گذاری تیمار	سرعت رشد ویژه
T_1	۰.۰۱۲۷
T_2	۰.۰۱۱۵
T_3	۰.۰۱۱۳
T_4	۰.۰۱۳۱
T_5	۰.۰۱۹۴
T_6	۰.۰۱۴۶
T_7	۰.۰۱۵۶
T_8	۰.۰۱۶۸
T_9	۰.۰۱۸۴
T_{10}	۰.۰۲۰۴

اثر غلظت‌های مختلف منابع کربنی بر مقدار لایزین تولید شده

ترکیبات محیط کشت نقش مهمی در تولید متابولیت‌های میکروبی ایفا می‌کنند و در این میان، منابع کربنی به علت اینکه تامین کننده اصلی انرژی هستند، نقش بسزایی در این زمینه دارند. اثر نوع و غلظت‌های مختلف سوبستراهای کربنی بر تولید محصول میکروبی در نمودار ۳ آورده شده است.

www.SID.ir

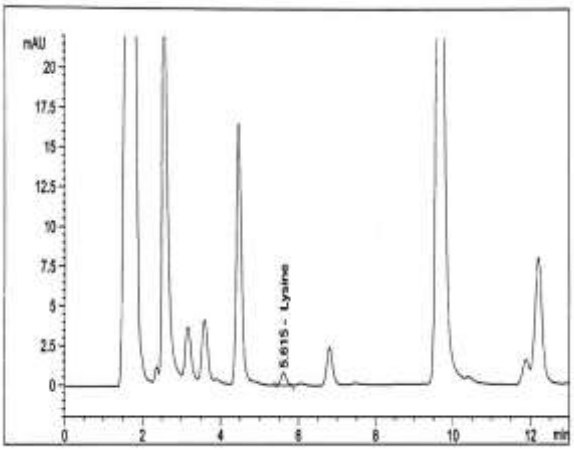
Archive of SID



نمودار ۳- تغییرات مقدار اسید آمینه تولید شده* در مرحله تخمیر بر اساس تیمارهای مختلف

*(لازم به ذکر است در مواردی که میزان لایزین موجود در براث کمتر از ۵ $\frac{g}{lit}$ است، دستگاه HPLC مورد استفاده، قادر به خواندن عدد دقیق آن نبوده و در نمودار به جای این موارد، ۵ گذاشته شده است.)

بر اساس نتایج به دست آمده، مقدار لایزین تولید شده در نمونه‌ها با افزایش زمان تخمیر، افزایش معنی داری داشته است و در همه نمونه‌ها محصول بیشینه در ساعت ۱۱۶ تخمیر بدست آمده است. بیشترین میزان لایزین تولید شده در بین تیمارهای استفاده شده به ترتیب مربوط به محیط کشت حاوی ۱۰۰گلوکز در ساعت ۱۱۶ و محیط حاوی ۱۳۵ گرم آب پنیر در ساعت ۱۱۶ می‌باشد.



شکل ۲- نمودار HPLC برای سنجش لایزین موجود در نمونه T_{10} در ساعت ۱۱۶ تخمیر

بحث

ترکیبات محیط کشت از جمله فاکتورهای مهم در یک فرآیند تخمیری می‌باشند که بر روی رشد میکروارگانیسم، بازده تولید محصول و هزینه‌های تمام شده فرآیند مؤثرند. محیط‌های کشتی که در پژوهش-های تحقیقاتی و در مقیاس آزمایشگاهی استفاده می-شوند، معمولاً مواد شیمیایی خالص و معینی هستند، اما در تخمیرهای صنعتی و تولیدِ مقیاس بالا، اغلب به دلایل اقتصادی، سوبستراهایی مورد استفاده قرار می-

www.SID.ir

Archive of SID

گیرند که ضایعات یا محصولات جانبی سایر صنایع بوده (مرتضوی و همکاران، ۱۳۷۶)، علاوه بر داشتن خواص مغذی مورد نیاز برای سویه و داشتن بازده بالای تولید، ارزان قیمت، فراوان و در دسترس نیز باشند. حمل و نقل آسان، عدم ایجاد محصولات ناخواسته، سهولت عملیات نظیر همزدن و هوادهی، بومی منطقه یا کشور بودن نیز از جمله سایر عواملی است که در انتخاب سوبستراها در تخمیر صنعتی مورد توجه قرار می‌گیرد (شجاع الساداتی و همکاران، ۱۳۸۷).

از بین ترکیبات محیط کشت، کربوهیدرات‌ها مهمترین منبع تولید کننده انرژی در صنایع تخمیری هستند و به دلایل اقتصادی استفاده از منبعی نظیر گلوکز خالص و یا ساکارز به ندرت روی می‌دهد (مرتضوی و همکاران، ۱۳۷۶). بهمین علت جستجو برای یافتن سوبستراهایی که جایگزین مناسبی برای منابع گران قیمت کربنی در محیط‌های کشت باشند کماکان مورد توجه پژوهشگران و محققان قرار دارد (Hamedi et al., 2004). در همین راستا، در این پژوهش سه منبع کربنی بومی و ارزان قیمت انتخاب شده و با توجه به کاربرد و اهمیت لایزین در صنایع مختلف و نیاز به اقتصادی تر کردن فرایند تولید این اسید آمینه ضروری، از این منابع در محیط کشت سویه مولد لایزین استفاده شده است. از جمله پژوهش‌هایی که در همین رابطه انجام شده است و نتایج آن‌ها هم‌راستا با نتیجه پژوهش حاضر می‌باشد می‌توان به تحقیق موسوی نسب و همکاران اشاره کرد که نشان دادند ملاس و آب پنیر منابع مغذی و مناسبی برای رشد *باکتریوم لینسس* در فرآیند تولید لایزین می‌باشند و بوسیله آن‌ها می‌توان تولید محصول میکروبی را افزایش داد (موسوی نسب و همکاران، ۱۳۸۹). همچنین در پژوهشی دیگر استفاده از غلظت-های مختلف پودرآب پنیر به‌عنوان منبع مغذی، منجر به افزایش رشد سویه *ساکاروپلی اسپورا اریترا* و بهینه سازی تولید محصول تخمیری اریترومایسین شده است (فیروز بخت و همکاران، ۱۳۹۴). نتایج پژوهشی دیگر نشان داده است افزودن سبوس جو و سبوس برنج اثر پری بیوتیکی بر زنده مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ماست کم چرب دارد (حشمتی و همکاران، ۱۳۹۵). تاثیر وجود غلظت‌های مختلف پودر آب پنیر بر رشد و زنده مانی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در شیر اسیدوفیلوس نیز مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج نشان داده است پودر آب پنیر به دلیل وجود لاکتوز و پروتئین محلول در آب، ترکیب مناسبی برای تولید شیر پروبیوتیک *اسیدوفیلوس* می‌باشد (طاهریان و همکاران، ۱۳۹۴).

آب پنیر محصول جانبی فرآیند تولید پنیر بوده که بعلت داشتن قند و پروتئین بالا و قیمت پایین، در فرآیندهای زیستی کاربرد زیادی دارد. آب پنیر مورد استفاده دراین پژوهش دارای ۷۰ لاکتوز، ۱۳.۵ پروتئین، ۵ رطوبت، ۲ چربی ($\frac{g}{100g}$) بوده و نتایج نشان داد استفاده از این ماده مغذی اثر مثبتی بر رشد *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* و تولید لایزین دارد. سبوس جوی دو سر از محصولات جانبی غلات بوده و بعلت داشتن پروتئین، نشاسته و فیبر بالا و همچنین قیمت اندک، کاربرد وسیعی در صنایع غذایی داشته و سوبسترای مناسبی برای میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. آنالیز ترکیبی سبوس جوی دو سر مورد استفاده در این پژوهش شامل ۵۸.۷ کربوهیدرات، ۱۳.۵ پروتئین، ۱۰ فیبر، ($\frac{g}{100g}$) است. آرد برنج نیز از آسیاب کردن دانه‌های برنج شکسته به‌دست می‌آید و با توجه به بومی بودن برنج در ایران و همچنین خواص مناسب این ماده به-عنوان منبع کربنی، گزینهٔ انتخابی به‌عنوان سوبسترا می‌باشد. آرد برنج مورد استفاده در این پژوهش دارای ۷۳.۹ کربوهیدرات، ۹.۳ پروتئین و ۱.۱ چربی ($\frac{g}{100g}$) می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان داد استفاده از غلظت-های مختلف سوبستراهایی نظیر آب پنیر، سبوس جوی دو سر و آرد برنج، بجای گلوکز خالص در محیط کشت *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* منجر به رشد این باکتری

www.SID.ir

Archive of SID

شده و محصول‌دهی مناسبی برای آن ایجاد می‌کنند. با توجه به قیمت ارزان و حجم بالای وجود این منابع کربنی در ایران و اثر مثبتی که در تولید متابولیت میکروبی نشان داده‌اند، می‌توان آن‌ها را به‌عنوان جایگزینی مناسب و اقتصادی برای گلوکز در صنعت تخمیر قلمداد کرد.

پیشنهادات

- امکان‌سنجی استفاده همزمان از دو یا چند باکتری مولد لایزین به منظور بررسی هم‌افزایی و افزایش محصول تولیدی نهایی

- بهینه‌سازی همزمان فاکتورهای مؤثر با سطوح متنوع در تخمیر *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* به‌روش طراحی آزمایش (روش سطح پاسخ)

- مهندسی متابولیک سویه *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* با رویکرد بیوانفورماتیک و مدل‌سازی ریاضی

نتیجه گیری کلی

نوع و مقدار ترکیبات محیط کشت به‌خصوص منابع کربنی نقش مهمی در رشد میکروارگانیسم و پیشرفت واکنش بیولوژیکی دارند. از این‌رو طراحی محیط‌های کشت مورد استفاده در فرآیندهای صنعتی میکروبی و انتخاب منبع کربنی مناسب، مغذی، ارزان قیمت و بومی برای دستیابی به بازده بالا و قیمت تمام شده پایین، امری حائز اهمیت می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان‌دهنده این است که سوبستراهای انتخابی آب پنیر، سبوس جو و آرد برنج، بعلت وجود مواد مغذی و قیمت مناسب برای رشد *کورینه باکتریوم گلوتامیکوم* و تولید متابولیت میکروبی لایزین مناسب بوده و از میان آن‌ها آب پنیر بیشترین میزان تولید لایزین را به خود اختصاص داده است.

منابع

۱. جمالزاده، لیلا.، سلیمی، میشا. ۱۳۹۶. آزمایشگاه بیوشیمی. چاپ اول، انتشارات آینده دانش، صفحات ۱۰۲-۹۶.

۲. پری، جانسون-گرین. ۱۳۸۶. مقدمه ای بر بیوتکنولوژی مواد غذایی. ترجمه: حبیبی نجفی، محمدباقر.، سالاری، امیر.، ریاضی، علیرضا. چاپ اول، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات ۳۰۰-۲۸۶.

۳. شمتی، علی.، حسنی، صابر.، ساری، عباسعلی.، کرمی، مصطفی. ۱۳۹۵. .بررسی اثر پری بیوتیکی سبوس جو و برنج بر روی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ماست کم چرب. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، سال یازدهم، شماره ۲، صفحات ۱۱۲-۱۰۵.

۴. شجاع الساداتی، سید عباس.، اسدالهی، محمدعلی. ۱۳۸۷. بیوتکنولوژی صنعتی. چاپ دوم، مرکز نشر آثار علمی دانشگاه تربیت مدرس، صفحات ۷۷-۲۲.

۵. طاهریان، امیر.، صادقی ماهونک، علیرضا.، میرزایی، حبیب الله.، اعلمی، مهران.، صادقی، علیرضا. ۱۳۹۴. تاثیر پودر آب پنیر بر رشد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در شیراسیدوفیلوس بازساخته. فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، سال سوم، شماره ۹، صفحات ۵۷-۴۳.

۶. فیروزبخت، مریم.، اکبرزاده کلاهی، سعید.، لبیکی، غزل.، عطار، حسین. ۱۳۹۴. بهنیه سازی منبع نیتروژنی مناسب به منظور تولید اریترومایسین توسط سویه *ساکارولپلی اسپورا اریترا*. مجله دنیای میکروب‌ها، سال هشتم، شماره سوم. صفحات ۲۳۰-۲۲۱.

۷. لبیکی، غزل.، عطار، حسین.، حیدری نسب، امیر.، رضایت، سیدمهدی.، رشیدی، علیمراد. ۱۳۹۳. افزایش بازده تولید تخمیری اریترومایسین با استفاده از نانوذرات اکسید آهن. مجله پژوهش‌های کاربردی در شیمی (JARC)، سال هشتم، شماره ۱، صفحات ۶۷-۷۸.

۸. لبیکی، غزل.، عطار، حسین.، حامدی، جواد. ۱۳۸۹. بررسی فرآیند تولید اریترومایسین توسط باکتری *ساکارولپلی اسپورا اریترا* به روش تخمیر بسته در غلظت‌های مختلف آرد سویا. مجله مهندسی شیمی ایران (شماره ویژه پیشرفت در زیست فناوری)، سال نهم، شماره ۵۰، صفحات ۱۵-۲۱.

www.SID.ir

۹. ولف، کروگر و آنالیز، کروگر. ۱۳۷۶. بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی صنعتی. ترجمه: مرتضوی، علی.، کریمی، مهدی.، کدخدایی، رسول.، رحیمی یزدی، سعید، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات ۱۱۴-۳۶۰.

۱۰. موسوی نسب، مرضیه.، داراب زاده، نازنین. ۱۳۸۹. تولید میکروبی لیزین با استفاده از آب پنیر و ملاس. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران.جلد ۶، شماره۲، صفحات ۱۰۴-۱۰۰.

11. Arakawa, T., Tsumoto, K., Kita, Y., Chang, B. 2007. Biotechnology application of amino acid in protein purification and formulation.Amino acid. 33(4): 587-605.

12. Ekwealor, I.A., Obeta, J.A. 2005.Studies on lysine production by *Bacillus Megaterium*. Afr. J. Biotechnol. 4 (7) : 633-638.

13. Hadj Sassi, A., Fauvart, L., Dechamps, A.M. 1998. Fed-Batch production of lysine by *corynebacterium glutamicum.* Biochem. Eng. J.1: 85-90.

14. Hamedi, J., Malekzadeh, A., Saghafinia, A.E. 2004. Enhancing of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* with common and uncommon oils. J ind Microbiol Biotechnol. 31: 447-456.

15. Hussain, A., Mukhtar, H., Haq, I,U. 2015. Optimization of fermentation medium for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. Pak. J. Bot. 47: 345-349.

16. Javed, A., Jamil, A, Rezaei-Zarchi, S. 2011. Optimization and hyper-expressed production of lysine through chemical mutagenesis of *Brevibacterium flavum* by N-nitroso-N-ethylurea. Afr J Microbiol Res, 5(29): 5230-5238.

17. Kjeldsen, K.R. and Nielsen, J. 2009. Optimization of an industrial L-lysine producing *Corynebacterium glutamicum* strain. Technical University of Denmark, pp.14-18.

18. Mohammad, A., Moheman, A., El-Desoky, G.E. 2012. Amino acid and vitamin determinations by TLC/HPTLC: review of the current state, Cent. Eur. J. Chem. 10(3) : 731-750.

19. Moosavi-Nasab, M., Ansari, S., Montazer, Z. 2007. Fermentative production of lysine by *Corynebacterium glutamicum* from different carbon sources. Iran Agric Res: IAR. 25(2): 99-106.

20. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. 2003. Harper's Illustrated biochemistry. McGraw-Hill, 26th edition, pp.14-241.

21. Qadir, M.A., Ahmed, M., Hussain,W.A., Tahir, M.S. 2015. Development and Validation of New HPLC Method for Simultaneous Estimation of L-Lysine Hydrochloride and L-Carnitine-L-Tartrate in Pharmaceutical Dosage Form. Indian J Pharm Sci. 77(4):434-438.

22. Walsh, G. 2007. Pharmaceutical Biotechnology Concepts and Applications. John Wiley & Sons, Ltd. pp.13-202.

23. Wei-Shou, H. 2018. Engineering Principles in Biotechnology, John Wiley & Sons, Ltd. pp. 2-334.

www.SID.ir

Archive of SID

The Effect of Using Native Carbon Sources (Whey, Oat bran, Rice Flour) in the Fermentative Production of Lysine by *Corynebacterium glutamicum*

Mohammadzadeh Ferizhandi Z[1,2], Labbeiki GH[3*]

1. MSc Student of Food Sciences and Technology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Nutrition and Food Sciences Research Center, Islamic Azad University, Medical Sciences Tehran, Tehran, Iran.
3. Department of Food Sciences and Technology, Faculty of Pharmacy, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

***Corresponding author:** *labeiki@iaups.ac.ir*

Received: 31 August 2018 Accepted: 30 November 2018

Abstract

Lysine is an essential amino acid that is not synthesized in the human body, but due to the body's need and its application in different parts of the health area, it is important to optimize and economize the production process. The most commonly used lysine production method is microbial fermentation and the nutrient composition of the fermentation media is effective on the microorganism growth and the production of microbial metabolite. Accordingly, the aim of this study was to investigate the effect of native and inexpensive nutritional substrates, as the main supplier of energy for microorganism, on the growth and productivity of strains. For this purpose, different amounts (g/lit) of whey (100, 135, 170), rice flour (100, 135,170) and oat bran (100, 170, 220) were separately added to culture of *Corynebacterium glutamicum*, and at 68 and 116 fermentation time, growth indices such as pH of the environment, production biomass, specific growth rate of microorganism, strain morphology and amount of produced amino acid were measured and compared with control (100 g/lit glucose). The results showed that the highest amount of lysine produced was obtained in media containing 135 g/lit whey, 170 g/lit rice flour and 220 g/lit oat bran. These results indicate that these compounds are suitable for use in biological processes and can be used as the main nutrient source.

Keywords: Lysine, Fermentation Culture Media, *Corynebacterium glutamicum*, Whey, Oat Bran and Rice Flour.

www.SID.ir