

## بررسی اثر استفاده از منابع کربنی بومی (آب پنیر، سبوس جودوسر، آرد برنج) در تولید تخمیری

## لایزین بوسیله کورینه باکتریوم گلوتامیکوم

زهرا محمدزاده فریزهندی<sup>۱</sup>، غزل لیبکی<sup>۲</sup>\*

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 پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۰۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۶/۰۹

## 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، ۱۷۰، ۱۳۵)، 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 ساعات‌های 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 ( $\frac{g}{lit}$  ۱۰۰) مقایسه شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که بیشترین مقدار لایزین تولیدی به ترتیب از محیط‌های حاوی  $\frac{g}{lit}$  ۱۳۵ آب پنیر،  $\frac{g}{lit}$  ۱۷۰ آرد برنج و  $\frac{g}{lit}$  ۲۲۰ جو دو سر به دست آمده است. این نتایج بیان می‌دارند که ترکیبات مذکور، برای استفاده در فرآیندهای زیستی مناسب بوده و می‌توانند به عنوان منابع مغذی اصلی مورد استفاده قرار گیرند.

**واژگان کلیدی:** آرم 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 اسید آمینه موجود را به تفکیک ضروری یا غیر ضروری بودن برای انسان‌ها نشان می‌دهد (Murray, 2003).

جدول ۱- اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری

اسیدهای آمینه ضروری	اسیدهای آمینه غیر ضروری
آرژنین	آلانین
هیستیدین	آسپارژین
ایزولوسین	آسپاراتات
لوسین	سیستئین
لیزین	گلوتامات
متیونین	گلوتامین
فنیل آلانین	گلايسين
ترئونین	تیروزین
تریپتوفان	سرین
والین	پرولین

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 شکل‌گیری 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، ۱۳۷۶؛ Kjeldsen et al., 2009; Ekwealor et al., 2005; کورینه باکتریوم گلوتامیکوم (Wei-Shou, 2018; Walsh, 2007; Moosavi-Nasab et al., 2007) 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 بالاخص 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.

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 تخمیر میکروبی، 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) به طوری که 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

سویه مولد لیزین کورینه باکتریوم گلوتامیکوم ۱۵۳۲ PTCC<sup>۱</sup> به صورت آمپول لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم های صنعتی ایران تهیه شد.

رشد و توسعه سویه

رشد مناسب و محصول دهی هر سویه مستلزم توجه به نیازهای آن میکروارگانیسم در هر مرحله از فرآیند رشد می باشد، به طوری که محیط هایی که جهت فعال سازی و استفاده میکروارگانیسم ها مورد استفاده قرار می گیرند 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 فرآیند تولید محصول بیولوژیکی، از شرایط عملیاتی و محیط های کشت متفاوتی برای رسیدن به بیشترین بازده استفاده شد. پس از بازکردن آمپول لیوفیلیزه در شرایط کاملا استریل، به منظور فعال سازی 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) قرار داده شده و پس از طی ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور (shin-Saeng, SKIR-601) با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و ایجاد کدورت ناشی از رشد، به اسلنت های مولر هینتون آگار (مرک) استریل (pH=7) منتقل شده، پس از ۵ روز گرما گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، کلنی های 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 کلنی های تشکیل شده در مرحله قبل به آن

تعدادی از این مطالعات سویه میکروبی تولید کننده لایزین را مورد بررسی قرار داده و با دستکاری های ژنتیکی، اصلاح سویه و مهندسی متابولیک سعی بر افزایش مقدار و کیفیت محصول میکروبی نموده اند (Kjeldsen et al., 2009) و در سایر پژوهش ها، شرایط تخمیر و عوامل موثر بر آن مورد بررسی و بهینه سازی قرار گرفته اند. 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 می کند (Hadj et al., 1998). براساس مطالعه ای در ایران، منبع کربنی آب پنیر نسبت به ملاس، رشد باکتریوم/نسیس را افزایش داده و محصول آن را نیز افزایش می دهد (موسوی نسب و همکاران، ۱۳۸۹).

علیرغم مطالعات انجام شده لایزین مورد نیاز کشور کماکان از طریق واردات تأمین می شود، 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 غلظت های 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 شده اند تا با بومی سازی و بهینه سازی فرآیند، گامی در راستای افزایش بازده تولید، کاهش هزینه ها و در نهایت خودکفایی کشور در این زمینه برداشته شود.

## روش کار

تهیه سویه

گلوکز) مقایسه شده‌اند. طراحی غلظت منابع کربنی جایگزین گلوکز براساس آنالیز ترکیبی موجود در هر گرم از این مواد انجام شده است.

جدول ۳- ترکیبات محیط تخمیر (pH= ۷)

مقدار (g/l)	ماده
۱۰۰	گلوکز (قطران شیمی)
۲۰	کلسیم کربنات (مرک)
۴۶	آمونیم سولفات (مرک)
۵	اوره (سیگما)
۲/۸	منیزیم سولفات (مرک)
۰/۰۱	منگنز سولفات (سیگما)
۵	پتاسیم دی هیدروژن فسفات (مرک)
۵	پتاسیم هیدروژن فسفات (مرک)
۰/۱	بیوتین (سیگما)
۰/۴	لوسین (مرک)

جدول ۴- تیمارهای مختلف منابع کربنی مورد استفاده در محیط کشت تخمیر

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

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

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 گرم 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.

جدول ۲- ترکیبات محیط پیش تخمیر (pH= ۷)

مقدار (g/l)	ماده
۲۰	گلوکز (قطران شیمی)
۱۰	پپتون (مرک)
۱۰	عصاره مخمر (مرک)
۲/۵	نمک (قطران شیمی)
۰/۲۵	منیزیم سولفات (مرک)
۰/۱	منگنز سولفات (سیگما)
۱	پتاسیم دی هیدروژن فسفات (مرک)
۱	پتاسیم هیدروژن فسفات (مرک)
۰/۰۱	بیوتین (سیگما)

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

(جمالزاده و همکاران، ۱۳۹۶). بررسی کمی تولید اسیدآمینه لایزین از نمونه‌های تخمیری به وسیله روش معتبر کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، با ستون **C18** 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.

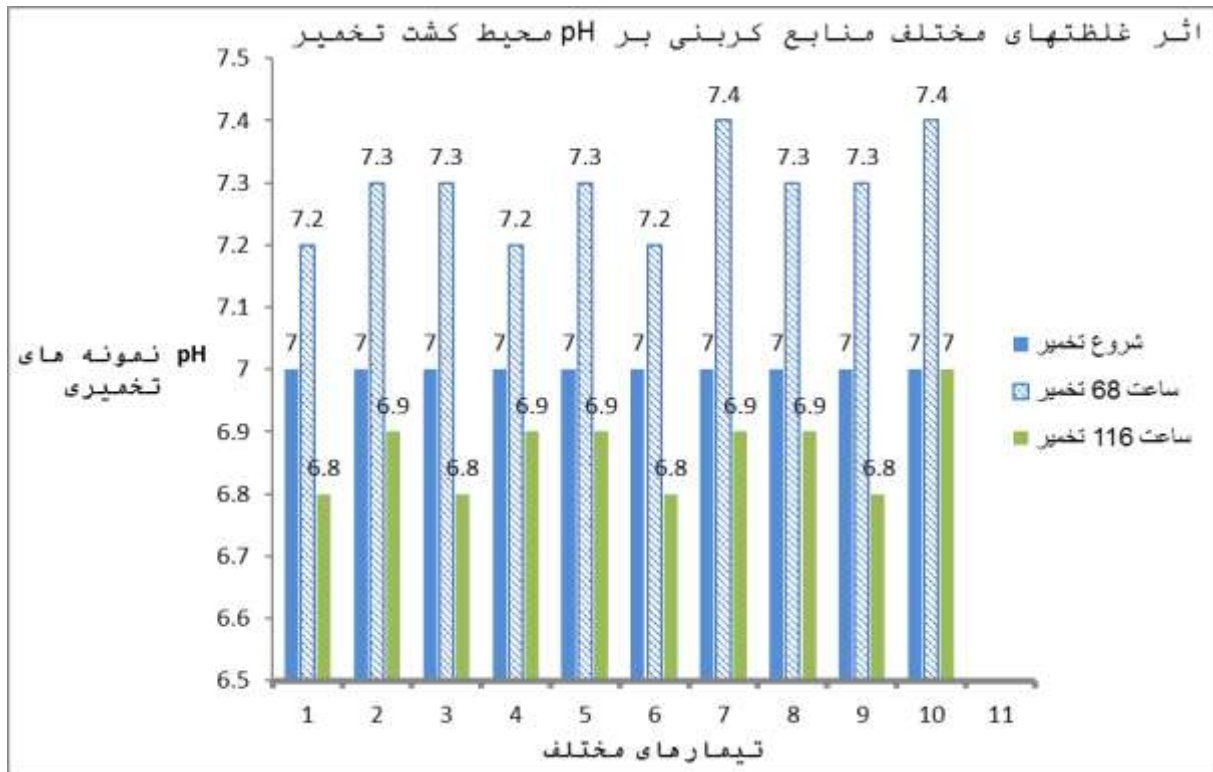
اثر غلظت‌های مختلف منابع کربنی بر pH محیط کشت تخمیر

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.

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 میکروتیوب حاوی ۱ میلی لیتر محیط تخمیر (B) با استفاده از ترازو ۰.۰۰۱ (Sartorius-ACCULAB-Vicon303) گرفته شد، سپس میکروتیوب‌ها 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 روپی مجدداً وزن شدند (C)، درصد بیومس در این روش طبق رابطه زیر بدست آمده است (لبیکی و همکاران، ۱۳۸۹).

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

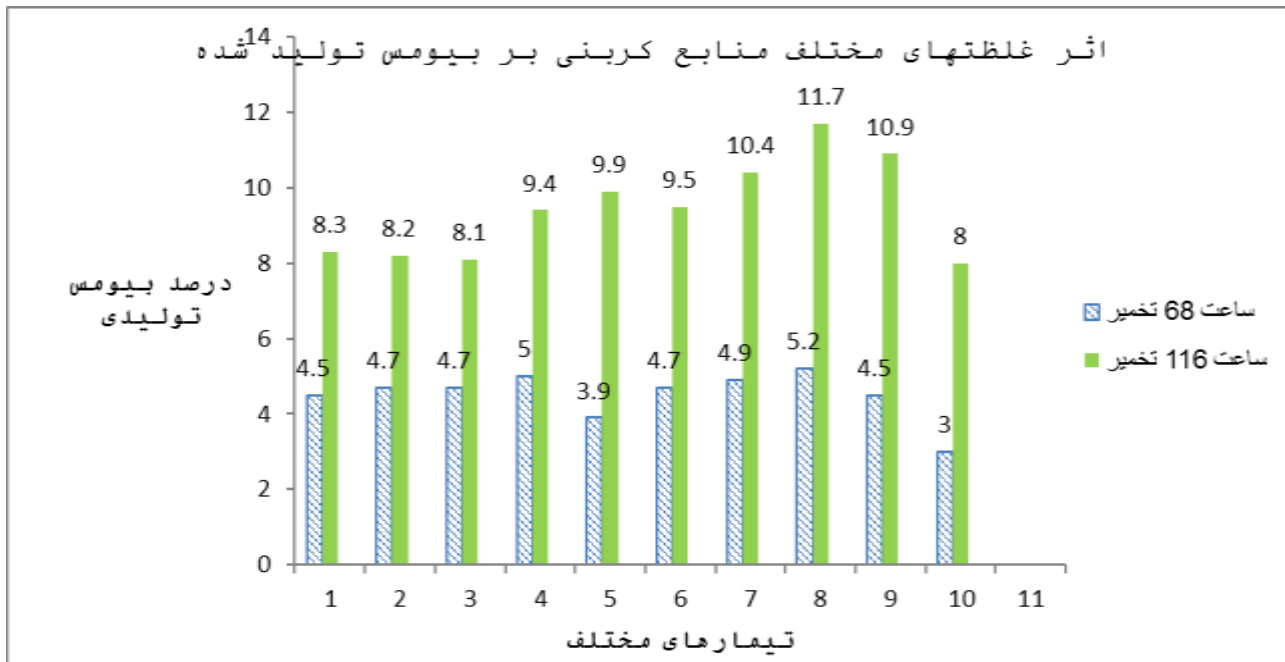
بررسی کیفی تولید اسیدآمینه لایزین در نمونه‌های تخمیری با استفاده از تست نین هیدرین انجام گرفت (Hussain et al., 2015; Walsh, 2007; Mohammad et al., 2012). برای این منظور به ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های تخمیری، ۱ میلی لیتر معرف نین هیدرین (مرک) اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در بن ماری جوش قرار داده شدند. تغییر 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



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

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).

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). در این مرحله تعداد میکروارگانیسم‌ها در واحد زمان تغییر چندانی نداشته و لذا بیومس تقریباً ثابت است. پس از



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

جدول ۵- مقادیر سرعت رشد ویژه کورینه باکتریوم گلوتامیکوم

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.

در مرحله رشد لگاریتمی میکروارگانیزم‌ها، بین پارامترهای بیومس ( $x$ ) و مدت زمان واکنش بیوشیمیایی تخمیر ( $t$ ) ارتباطی وجود دارد (رابطه ۳ و ۲). لازم به ذکر است در این رابطه  $\mu$  سرعت رشد ویژه میکروارگانیزم بوده که در صنعت تخمیر اهمیت زیادی داشته و به نوع میکروارگانیزم و شرایط تخمیر وابسته می‌باشد (مرتضوی و همکاران، ۱۳۷۶).

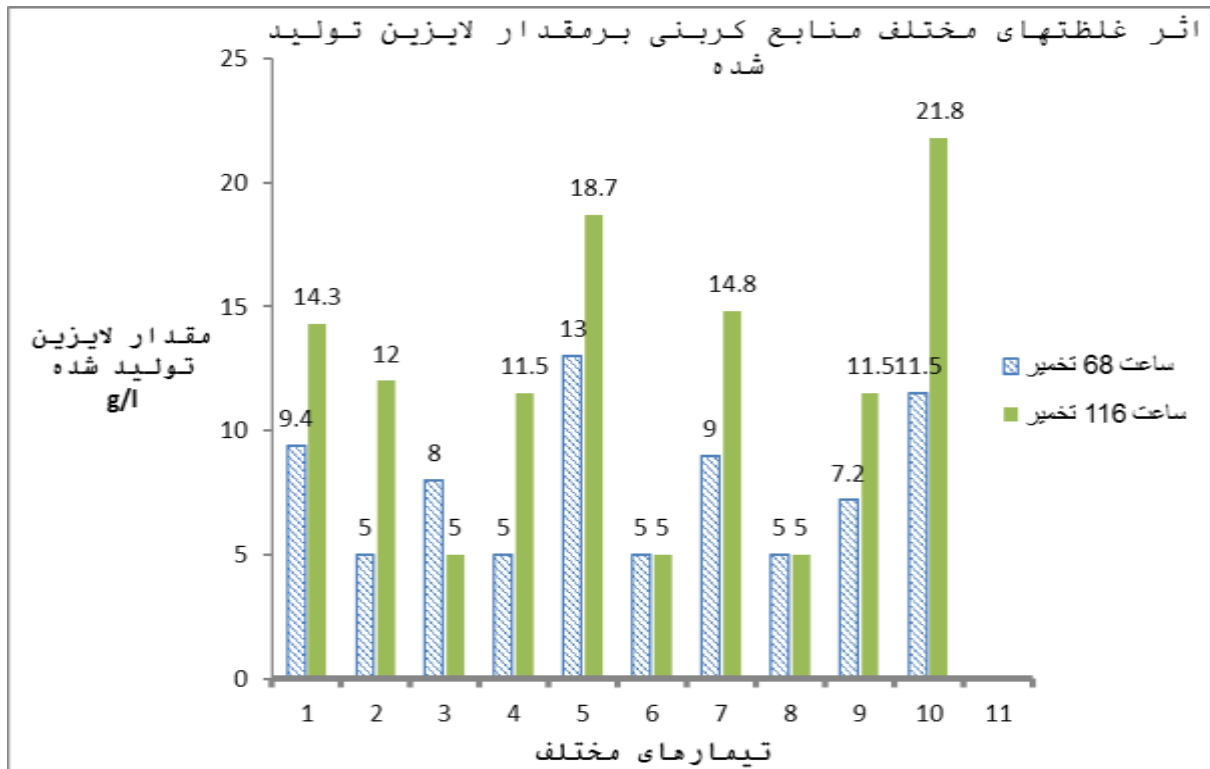
$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x \quad \text{رابطه ۲-}$$

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

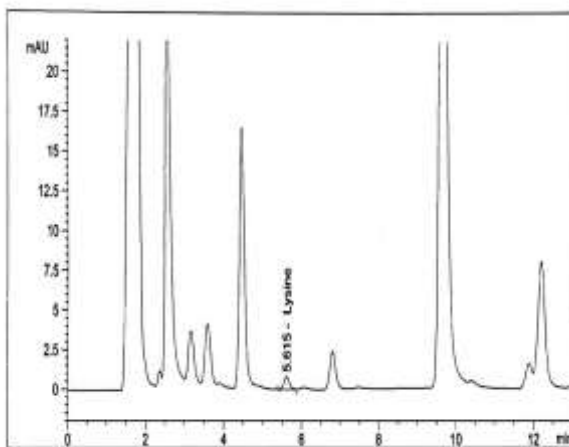
$$\int_{x_0}^{x_1} \frac{dx}{x} = \int_0^t \mu \cdot dt$$

$$\ln \frac{x_1}{x_0} = \mu \cdot t \quad \text{رابطه ۳}$$

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  $\mu$  را برای تیمارهای مختلف این پژوهش نشان می‌دهد.



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 برات کمتر از  $\frac{5}{lit}$  است، دستگاه HPLC مورد استفاده، قادر به خواندن عدد دقیق آن نبوده و در نمودار به جای این موارد، ۵ گذاشته شده است.)



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

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 ۱۰۰ گلوکز در ساعت ۱۱۶ و محیط حاوی ۱۳۵ گرم آب پنیر در ساعت ۱۱۶ می‌باشد.

#### بحث

های تحقیقاتی و در مقیاس آزمایشگاهی استفاده می‌شوند، معمولاً مواد شیمیایی خالص و معینی هستند، اما در تخمیرهای صنعتی و تولید مقیاس بالا، اغلب به دلایل اقتصادی، سوبستراهایی مورد استفاده قرار می‌-

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-



نشان داده است افزودن سبوس جو و سبوس برنج اثر پری بیوتیکی بر زنده ماندن لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس در ماست کم چرب دارد (حشمتی و همکاران، ۱۳۹۵). تاثیر وجود غلظت‌های مختلف پودر آب پنیر بر رشد و زنده ماندن 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 بعلاوه داشتن قند و پروتئین بالا و قیمت پایین، در فرآیندهای زیستی کاربرد زیادی دارد. آب پنیر مورد استفاده در این 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 بعلاوه 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 به دست می‌آید و با توجه به بومی بودن برنج در ایران و همچنین خواص مناسب این ماده به عنوان منبع کربنی، گزینه انتخابی به عنوان 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 غلظت‌های 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

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 (شجاع‌الساداتی 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). به همین 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 فرآیند 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 غلظت‌های مختلف پودر آب پنیر به عنوان 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

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، لیبکی، غزل، عطار، حسین. ۱۳۹۴. بهینه سازی منبع نیتروژنی مناسب به منظور تولید اریتروماپسین توسط سویه ساکاروپلی اسپورا اریترا. مجله دنیای میکروب‌ها، سال هشتم، شماره سوم. صفحات ۲۳۰-۲۲۱.

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

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

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 به روش 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، لایلا، سلیمی، میثا. ۱۳۹۶. آزمایشگاه بیوشیمی. چاپ اول، انتشارات آینده دانش، صفحات ۹۶-۱۰۲.

- 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.
9. 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، شماره ۲، 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. Hamed, 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-

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

Mohammadzadeh Ferizhandi Z<sup>1,2</sup>, Labbeiki GH<sup>3\*</sup>

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](mailto: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.