فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۱، بهار ۱۳۹۶، صفحه ۱۲۲- ۱۰۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۹ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۲۱

بهینه‌سازی تولید لیزین در باکتری *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* سویهٔ *ATCC15032* با روش رویه پاسخ

مهرناز حقی: دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران، mehrnazhaghi@yahoo.com
محمد پاژنگ *: دانشیار بیوشیمی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران، pazhang@azaruniv.ac.ir
علیرضا امانی قدیم: استادیار شیمی کاربردی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان. تبریز، ایران، a.r_amani@yahoo.com

چکیده

مقدمه: لیزین یکی از آمینواسیدهای ضروری است و در صنایع غذایی و دارویی اهمیت ویژه‌ای دارد. امروزه از روش های مختلفی برای افزایش تولید لیزین استفاده می‌شود که از مهم‌ترین آنها می‌توان به مهندسی ژنتیک و بهینه‌سازی محیط کشت اشاره کرد. یکی از روش‌های پرکاربرد در بهینه‌سازی محیط کشت، روش رویه پاسخ است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از باکتری وحشی *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* سویهٔ *ATCC15032* جهت تولید لیزین و از روش رویه پاسخ جهت افزایش تولید استفاده شد. پس از انتخاب محیط کشت M9 به‌عنوان محیط کشت پایه سعی شد تأثیر عامل‌هایی مانند منابع کربنی (گلوکز)، منابع نیتروژنی (آمونیوم‌سولفات) و متیونین بر تولید لیزین بررسی شود؛ سپس با استفاده از روش رویه پاسخ، محیط کشت و زمان گرماگذاری جهت تولید لیزین، بهینه شد.

نتایج: بررسی‌ها نشان داد، مقدار تولید لیزین در محیط کشت M9، ۰/۷ میلی‌گرم در لیتر است. نتایج روش رویه پاسخ نشان داد میزان تولید لیزین با محیط کشت پیشنهادی که حاوی گلوکز ۱۴درصد، آمونیوم سولفات ۵درصد به‌همراه متیونین ۵ میلی‌مولار بود در مدت‌زمان ۲/۵ روز گرماگذاری به ۰/۹۸ گرم در لیتر رسید. تجزیهٔ پارتو نشان داد از بین متغیرهای مورداستفاده، متیونین بیشترین تأثیر را در تولید لیزین داشت. درنهایت نتایج حاصل از گرانوله‌کردن نشان داد که شرایط بهینه جهت گرانوله‌کردن محیط کشت حاوی لیزین، با افزودن نشاسته، سولفات آمونیوم و کلرید سدیم در pH پایین و دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد حاصل می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج مشخص شد روش به‌کاررفته در این پژوهش باعث افزایش ۱۴۰۰برابری در تولید لیزین شد و متیونین احتمالاً ازطریق سوق‌دادن پیش‌سازهای متابولیسمی به مسیرهای متابولیسمی تولید لیزین، نقش مهمی در تولید لیزین داشت.

واژه‌های کلیدی: لیزین، *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* سویهٔ *ATCC15032*، محیط کشت M9، روش رویه پاسخ، گرانوله‌کردن.

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

اسیدآمینه‌ها از پیش‌سازهای اصلی سازندهٔ پروتئین‌ها هستند و کاربردهای فراوانی در تهیهٔ غذای انسان و دام، لوازم آرایشی، سنتز مواد شیمیایی و تولید داروها دارند. یکی از مهم‌ترین و پراستفاده‌ترین اسیدآمینه‌ها در صنایع غذایی و داروی، لیزین است (۱). سالانه بیش از یک میلیون تن اسیدآمینه مثل لیزین و متیونین به‌عنوان افزاودنی های مواد غذایی تولید می‌شود (۲). از باکتری‌های شاخص در تولید لیزین، *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* است. این باکتری گرم‌مثبت، غیربیماری‌زا، غیرمتحرک، هوازی و دارای رشد سریع است که توانایی تولید اسپور را ندارد و معمولاً کلنی زرد کم‌رنگ تولید می‌کند (۳). از مزایای این باکتری نسبت به سایر میکروارگانسیم‌ها در تولید لیزین، می‌توان به این موارد اشاره کرد: استفاده از دو مسیر متابولیسمی سوکسینیلاز و دهیدروژناز (در سایر باکتری‌ها تنها ازطریق یکی از دو مسیر ذکرشده تولید لیزین صورت می‌گیرد) (۲ و ۳)، توانایی انتقال لیزین تولیدی به بیرون از باکتری (۳) و توانایی استفاده از محدودهٔ وسیعی از منابع کربنی جهت تولید لیزین (۳). جهت افزایش تولید لیزین در سویهٔ وحشی از روش‌های مختلفی همچون مهندسی ژنتیک و یا بهینه‌سازی محیط کشت استفاده می‌شود. در مهندسی ژنتیک می‌توان با دستکاری ژن مربوط به برخی از آنزیم‌های مهم در سنتز لیزین مانند آنزیم آسپارتوکیناز که به‌صورت مستقیم در تولید لیزین دخیل است، میزان تولید لیزین را افزایش داد (۴). اسیدآمینهٔ لیزین بر آنزیم آسپارتوکیناز تأثیر منفی دارد و افزایش غلظت آن باعث مهار این آنزیم می‌شود (۴). ایجاد تغییر ژنتیکی در این آنزیم به‌گونه‌ای که نسبت به افزایش غلظت لیزین حساس نباشد می‌تواند گام مثبتی درجهت افزایش تولید لیزین باشد (۴). روش دیگر، بهینه سازی محیط کشت جهت افزایش تولید لیزین است که با ایجاد تغییر در شرایط فیزیکی مانند هوادهی، pH، دما و شرایط محیطی انجام می‌شود. از شرایط محیطی می‌توان به تغییر منابع کربنی و نیتروژنی و افزودن یک سری مواد به محیط کشت مانند متیونین و بیوتین اشاره کرد (۵). امروزه برای بررسی تأثیر هم‌زمان چندین عامل بر یک عامل خاص مانند تولید لیزین و گزینش بهترین شرایط با حداکثر تولید، از روش‌های مدل‌سازی ریاضی مانند روش رویه پاسخ[1] استفاده می‌شود (۶ و ۷). در روش رویه پاسخ از فنون ریاضی و آماری سودمند جهت یافتن ترکیبی از متغیرهای مستقل برای رسیدن به شرایط بهینه همچنین بررسی تأثیر هم‌زمان این متغیرهای مستقل استفاده می‌شود. در روش رویه پاسخ ممکن است در مدل و تخمین به‌کاررفته خطا وجود داشته باشد. با این حال این روش نسبت به روش‌های دیگر دقت بالایی دارد و می تواند یک مسئلهٔ پیچیده را به یک مسئلهٔ ساده‌تر تبدیل کند، حساسیت پاسخ در برابر هر عامل را مشخص کند و با کاهش چشمگیر تعداد آزمایش‌ها باعث صرفه‌جویی در وقت و هزینه شود (۵ و ۶). روش رویه پاسخ معمولاً به دو روش طراحی ترکیب مرکزی[2](CCD) و باکس-بنکن[3] انجام می‌پذیرد. در طرح CCD ماتریس پیشنهادشده جهت انجام آزمایش‌ها از سه بخش مجزا تشکیل شده است:

الف) بخش اول آزمایش‌ها شامل یک طرح فاکتوریل کامل 2^k است که در آن k تعداد عامل‌های مؤثر بر فرآیند است.

ب) بخش دوم آزمایش‌ها شامل نقاط مرکزی[4] است که در آن تمام عامل‌ها در سطوح میانی یا صفر خود هستند و معمولاً بیش از یکب ار تکرار می‌شوند تا ارتوگونالیتی[5] ماتریس حفظ شود.

ج) بخش سوم شامل نقاط محوری[۶] است که به منظور دوران‌پذیرکردن طرح آزمایش‌ها در نظر گرفته می‌شوند. دوران‌پذیربودن بدین معنا است که میزان دقت طرح در تخمین پاسخ در تمام جهات برابر است (۵ و ۸).

در سال ۲۰۰۲ از روش رویه پاسخ و با استفاده از عواملی همچون گلوکز (۱۴درصد)، عصارهٔ ماهی، برخی نمک‌ها و بیوتین به‌عنوان افزاینده، سعی در بهینه سازی تولید لیزین کردند (۹). پس از آن در سال ۲۰۰۸ نیز با استفاده از روش رویه پاسخ و گونهٔ جهش‌یافتهٔ *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* سویهٔ *AEC-2* در محیط کشت حاوی گلوکز، سولفات آمونیوم و تغییر برخی از فاکورهای فیزیکی مثل دما و pH، سعی شد در طی دو مرحله تولید لیزین بهینه‌سازی شود (۱۰).

در این پژوهش پس از انتخاب یک محیط کشت پایه براساس محیط M9 سعی شد تا با بررسی فاکتورهای دخیل در تولید لیزین، عامل‌های مؤثر در تولید لیزین در باکتری موردنظر شناسایی شود. سپس با استفاده از این فاکتورها تولید لیزین با روش رویه پاسخ، بهینه شود.

مواد و روش‌ها

مواد: همه مواد به‌کاررفته در این پژوهش همچون گلوکز، سولفات آمونیوم، متیونین و لیزین (جهت رسم منحنی استاندارد) از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد.

میکروارگانیسم: میکروارگانیسم مورداستفاده یعنی باکتری کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم سویهٔ *ATCC15032* بود و از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به صورت کشت‌داده‌شده بر روی محیط جامد (فعال‌سازی شده) تهیه شد. جهت استفاده و همچنین تهیهٔ استوک (محلول ذخیره‌ای باکتری) از باکتری، یک تک‌کلونی از محیط کشت جامد برداشته و به محیط کشت LB مایع انتقال داده شد. پس از گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه به‌مدت ۱۴ ساعت از آن استوک تهیه شد.

محیط‌های کشت: جهت رشد باکتری و تهیهٔ استوک از آن، از محیط کشت LB استفاده شد. محیط کشت M9 نیز به‌عنوان محیط کشت پایه جهت تولید لیزین استفاده شد. این محیط کشت، حاوی گلوکز (۲ گرم بر لیتر) و نمک‌های کلرید سدیم (۶/۵ گرم بر لیتر)، کلرید پتاسیم (۳ گرم بر لیتر)، کلرید آمونیوم (۱ گرم بر لیتر)، کلرید منیزیم (۰/۵ گرم بر لیتر) و کلرید کلسیم (۰/۰۰۰۵ گرم بر لیتر) است (۱۱).

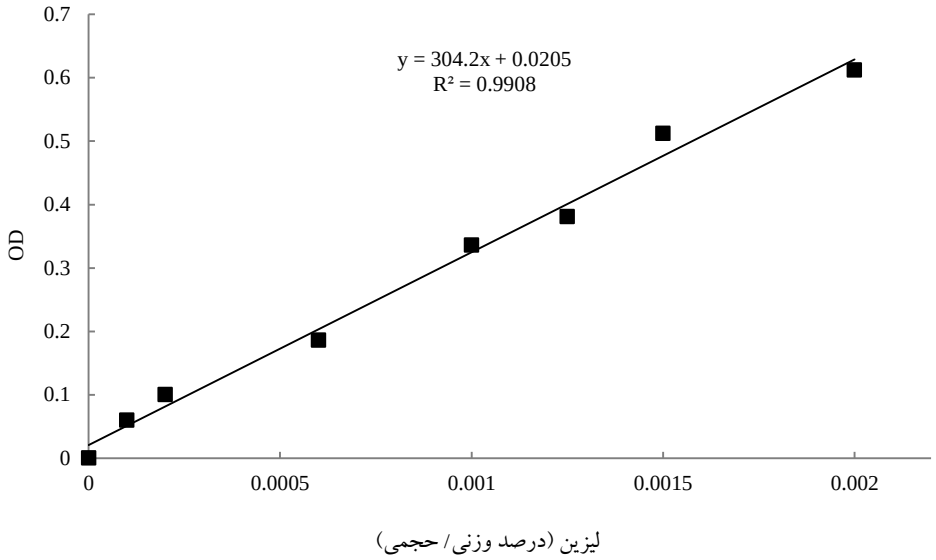
کشت باکتری جهت تولید لیزین: بهترین میزان گزارش‌شده برای تلقیح کشت باکتری *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* سویهٔ *ATCC15032* 20درصد است (۵). به همین دلیل از استوک مایع تهیه‌شده در گلیسرول ۳۰درصد با نسبت ذکرشده تلقیح صورت گرفت. کشت ها در حجم ۵ میلی‌لیتری با pH برابر ۷/۴، تهیه و در زمان های معین در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در انکوباتور با شیک ۱۸۰ دور بر دقیقه (RPM) قرار داده شدند.

اندازه‌گیری غلظت لیزین: جهت اندازه‌گیری غلظت لیزین تولیدی از روش چینارد[۷] استفاده شد. در این روش، اول معرفی حاوی ۲۵ میلی‌گرم نین هیدرین در ۱۰ میلی‌لیتر محلول حاوی اسیدسولفوریک (۴ میلی‌لیتر، ۶ مولار) و اسیداستیک (۶ میلی‌لیتر، گلاسیال) تهیه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های حاوی لیزین به یک میلی لیترمعرف اضافه شد و نمونه‌ها به‌مدت یک ساعت در حمام آب جوش قرار داده شدند. بعد از آن به نمونه‌ها یک میلی‌لیتر اسیداستیک اضافه شد و درنهایت جذب نمونه‌ها در ۵۰۰ نانومتر خوانده شد (۱۲). جهت اندازه گیری غلظت لیزین براساس میزان جذب نمونه‌ها، منحنی استاندارد از میزان جذب لیزین خالص در غلظت‌های

مختلف رسم شد. جهت رسم منحنی استاندارد، غلظت های مختلف از لیزین در محدودهٔ غلظتی ۰/۰۰۰۱ تا ۰/۰۰۲ درصد (درصد وزنی/حجمی) تهیه شد و با استفاده از روش گفته‌شده، جذب آنها به دست آمد و درنهایت منحنی استاندارد رسم شد (شکل ۱). با استفاده از منحنی حاصل، مقدار لیزین موجود در هر نمونه اندازه گیری شد. در این تست غلظت استاندارد لیزین براساس درصد وزنی به حجمی تهیه شد. بنابراین می‌توان گفت هر ۱درصد لیزین معادل ۱۰ گرم بر لیتر خواهد بود.

بهینه‌سازی تولید لیزین: بهینه‌سازی مقدار لیزین تولیدی با روش رویه پاسخ با کمک نرم‌افزار مینی‌تب[8] صورت گرفت.

در این روش پس از مشخص کردن فاکتورهای موردبررسی یک بازه از حداقل و حداکثر مقادیر مؤثر هر یک از موارد تعیین شد و با استفاده از نرم‌افزار به روش طراحی ترکیب مرکزی[9] (CCD) در پنج سطح قرار گرفتند (جدول ۱).



شکل ۱- نمودار استاندارد لیزین. جهت رسم نمودار، غلظت‌های مختلفی از لیزین (درصدهای مختلف وزنی به حجمی) در آب مقطر تهیه شد سپس با روش چینارد میزان جذب (OD) نمونه‌ها به دست آمد.

جدول ۱- مقادیر واقعی و کدبندی‌شدهٔ متغیرهای مستقل استفاده‌شده در طراحی آزمایش‌ها

متغیر مستقل (فاکتور)	بازه و مقادیر واقعی سطوح کدبندی‌شدهٔ فاکتورها				
	$-\alpha^*$	-۱	صفر	+۱	$+\alpha$
گلوکز x_1:(g/l%)	۸	۱۰	۱۲	۱۴	۱۶
سولفات آمونیوم x_2:(g/l%)	۲	۳	۴	۵	۶
متیونین x_3: (mM)	۰/۵	۲	۲/۵	۵	۶/۵
زمان x_4 : (day)	۱	۲/۵	۴	۵/۵	۷

$^*\alpha$=۲

جدول ۲- شرایط آزمایش‌های پیشنهادشده توسط CCD جهت بهینه‌سازی و مدل‌سازی فرآیند

شماره آزمایش	گلوکز (٪)	آمونیوم سولفات (٪)	متیونین (میلی مولار)	زمان (روز)
۱	۱۰	۵	۲	۲/۵
۲	۱۴	۳	۵	۵/۵
۳	۱۰	۵	۵	۵/۵
۴	۱۰	۵	۵	۲,۵
۵	۱۲	۴	۵/۳	۴
۶	۱۰	۳	۲	۲/۵
۷	۱۴	۵	۵	۲/۵
۸	۱۴	۵	۲	۵/۵
۹	۱۰	۳	۵	۵/۵
۱۰	۱۲	۴	۵/۳	۴
۱۱	۱۲	۴	۵/۶	۴
۱۲	۱۰	۵	۲	۵/۵
۱۳	۱۴	۳	۵	۲/۵
۱۴	۱۲	۴	۵/۳	۴
۱۵	۱۲	۶	۵/۳	۴
۱۶	۱۴	۳	۲	۵/۵
۱۷	۱۴	۵	۲	۲/۵
۱۸	۸	۴	۵/۳	۴
۱۹	۱۴	۵	۵	۵/۵
۲۰	۱۴	۳	۲	۲/۵
۲۱	۱۲	۲	۵/۳	۴
۲۲	۱۲	۴	۵/۳	۷
۲۳	۱۶	۴	۵/۳	۴
۲۴	۱۲	۴	۵/۳	۱
۲۵	۱۲	۴	۵/۳	۴
۲۶	۱۲	۴	۵/۳	۴
۲۷	۱۲	۴	۵/۰	۴
۲۸	۱۰	۳	۲	۵/۵
۲۹	۱۰	۳	۵	۲/۵
۳۰	۱۲	۴	۵/۳	۴
۳۱	۱۲	۴	۵/۳	۴

سپس توسط نرم‌افزار، به‌طوری که در جدول ۲ دیده می‌شود، ۳۱ ماتریس از مقادیر مختلف هریک از این چهار فاکتور در کنار هم طراحی شد. این آزمایش‌ها شامل ۱۶ آزمایش فاکتوریل در سطوح ۱- و ۱+ عامل‌ها، ۱۳ آزمایش تکرار در سطوح مرکزی (۰) و ۲ آزمایش در نقاط محوری بود.

گرانوله‌کردن: برای گرانوله‌کردن محیط کشت حاوی لیزین، pH آن کاهش داده و بر روی هات پلیت با دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. با کمک همزن مکانیکی محیط کشت حاوی لیزین همزده شد و در این حین نشاسته، نمک کلرید سدیم (به‌عنوان پرکننده) و سولفات آمونیوم (افزایندهٔ نسبی pH) در بازه‌های زمانی مشخص به آن اضافه شد (۲ و ۱۳).

نتایج

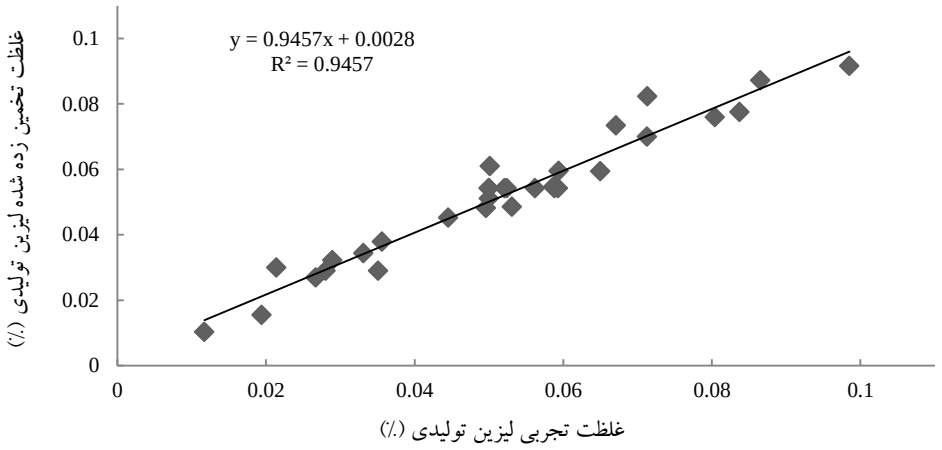
بررسی فاکتورهای مؤثر بر تولید لیزین در *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* سویهٔ *ATCC15032*: با تغییر شرایط محیطی از جمله شرایط تغذیه‌ای می‌توان تولید لیزین را افزایش داد، از جملهٔ این شرایط می‌توان به تغییر منابع کربنی، نیتروژنی و افزودنی‌های محیط کشت اشاره کرد. در این پژوهش اثر منابع کربنی مختلف (همچون نشاسته، لاکتوز، ساکارز و گلوکز)، منابع نیتروژنی متفاوت (همچون اوره، کلرید آمونیوم و سولفات آمونیوم) و همچنین افزودنی‌های مختلف (همچون بیوتین و متیونین) بر تولید لیزین توسط *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* سویهٔ *ATCC15032* بررسی شد. نتایج مشخص کرد از بین مواد به‌کاررفته، گلوکز به‌عنوان منبع کربنی، سولفات آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژنی و متیونین به‌عنوان افزودنی در محیط کشت پایه M9 بیشترین تأثیر را بر تولید لیزین داشتند (نتایج نشان داده نشده است). بنابراین گلوکز،

سولفات آمونیوم و متیونین جهت بررسی بیشتر انتخاب شدند. همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، با بررسی تأثیر عوامل ذکرشده بر تولید لیزین، نتایج نشان داد که در محیط M9 میزان تولید لیزین ۰/۰۰۰۷ گرم بر لیتر است. با افزودن گلوکز، سولفات آمونیوم و متیونین، میزان تولید به‌ترتیب به مقدار ۲/۴، ۲/۸ و ۶/۵ برابر افزایش یافته است. درنهایت میزان تولید لیزین در محیط M9، متیونین ۳درصد (وزنی/حجمی)، سولفات آمونیوم ۳درصد (وزنی/حجمی) و گلوکز ۳درصد (وزنی/حجمی) بررسی شد. نتایج نشان داد (جدول ۳) که در این محیط کشت میزان تولید لیزین نسبت به محیط M9 تا ۲۰۰ برابر افزایش یافته است.

بهینه‌سازی تولید لیزین با روش رویه پاسخ: با توجه به نتایج حاصل در این پژوهش بر تولید لیزین، جهت بهینه سازی تولید لیزین چهار متغییر غلظت گلوکز، آمونیوم سولفات، متیونین و همچنین زمان گرماگذاری انتخاب شد. سپس با استفاده از روش رویه پاسخ، ۳۱ محیط کشت با شرایط مختلف پیشنهاد شد (جدول ۳). گفتنی است که محدوده‌های (سطوح) مورداستفاده برای هر کدام از عوامل بررسی‌شده به‌طوری بود که در این محدوده‌ها این عوامل باعث افزایش و سپس باعث کاهش میزان تولید لیزین می‌شدند (نتایج نشان داده نشده است). براساس شرایط پیشنهادشده توسط نرم‌افزار، محیط‌های کشت مختلف تهیه شد و بعد از تلقیح باکتری در آنها، در زمان‌های مختلف پیشنهادی (توسط نرم‌افزار) گرماگذاری شد. سپس مقدار لیزین تولیدی اندازه‌گیری شد. گفتنی است که آزمایش‌ها تا ۴ بار تکرار شدند. از مقایسهٔ نتایج تجربی و محاسبه شده مشخص شد R^2 منحنی حاصل، ۰/۹۴ است (شکل۲ و جدول۴).

جدول ۳- میزان لیزین تولیدی در محیط کشت M9 و محیط کشت‌های M9 تغییریافته

نام محیط کشت	مقدار لیزین تولیدی خالص (گرم بر لیتر)	مقایسهٔ میزان تولید نسبت به محیط M9 (برابر)
M9	۰/۰۰۰۷	۱
M9 + گلوکز ۳درصد	۰/۰۰۱۷	۲/۴
M9 + آمونیوم سولفات ۳درصد	۰/۰۰۲	۲/۸
M9 + متیونین ۳درصد	۰/۰۰۴۶	۶/۵
M9 + متیونین ۳درصد+ سولفات آمونیوم ۳درصد+ گلوکز ۳درصد	۰/۱۴	۲۰۰



شکل ۲- مقایسهٔ نتایج تجربی لیزین تولیدی با نتایج تخمین‌زده‌شده لیزین تولیدی توسط مدل پیشنهادی RSM

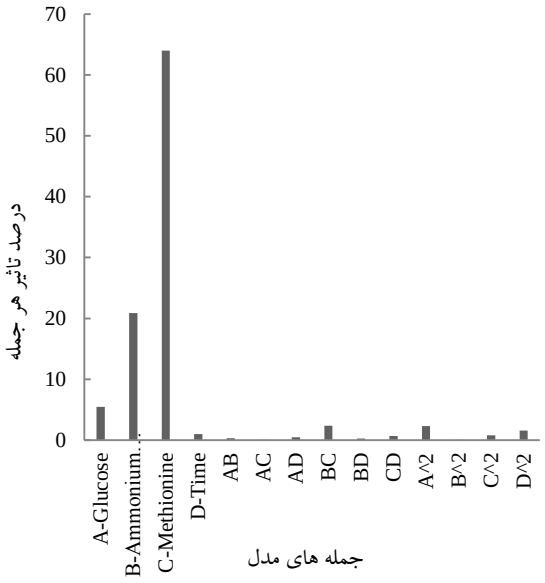
جدول ۴- شرایط آزمایش‌های پیشنهادشده توسط CCD جهت بهینه‌سازی و مدل‌سازی فرآیند

شماره آزمایش	گلوکز (درصد وزنی به حجمی)	آمونیوم سولفات (درصد وزنی به حجمی)	متیونین (میلی‌مولار)	زمان (روز)	مقدار لیزین تولید شده به لحاظ تجربی (درصد وزنی به حجمی)	مقدار لیزین تولیدشده تخمین‌زده شده توسط مدل (درصد وزنی به حجمی)
۱	۱۰	۵	۲	۲/۵	۰/۰۳۵۱ ± ۰/۰۰۱۷	۰/۰۲۸۹
۲	۱۴	۳	۵	۵/۵	۰/۰۵۹۴۰ ± ۰/۰۰۲۲	۰/۰۵۹۴
۳	۱۰	۵	۵	۵/۵	۰/۰۸۳۷ ±۰/۰۰۳۱	۰/۰۷۷۴
۴	۱۰	۵	۵	۲,۵	۰/۰۸۰۴ ±۰/۰۰۳۰	۰/۰۷۵۸
۵	۱۲	۴	۵/۳	۴	۰/۰۵۸۸ ± ۰/۰۰۲۲	۰/۰۵۴۱
۶	۱۰	۳	۲	۲/۵	۰/۰۱۹۴ ± ۰/۰۰۰۷	۰/۰۱۵۴
۷	۱۴	۵	۵	۲/۵	۰/۰۹۸۵ ± ۰/۰۰۳۴	۰/۰۹۱۵
۸	۱۴	۵	۲	۵/۵	۰/۰۴۹۶ ± ۰/۰۰۱۷	۰/۰۴۸۰
۹	۱۰	۳	۵	۵/۵	۰/۰۵۸۷ ± ۰/۰۰۲۰	۰/۰۵۴۶
۱۰	۱۲	۴	۵/۳	۴	۰/۰۵۶۲ ± ۰/۰۰۲۰	۰/۰۵۴۱
۱۱	۱۲	۴	۵/۶	۴	۰/۰۷۱۳ ± ۰/۰۰۲۵	۰/۰۸۲۲
۱۲	۱۰	۵	۲	۵/۵	۰/۰۳۵۶ ± ۰/۰۰۱۵	۰/۰۳۷۸
۱۳	۱۴	۳	۵	۲/۵	۰/۰۶۵۰ ± ۰/۰۰۲۲	۰/۰۵۹۳
۱۴	۱۲	۴	۵/۳	۴	۰/۰۵۲۱ ± ۰/۰۰۲۰	۰/۰۵۴۱
۱۵	۱۲	۶	۵/۳	۴	۰/۰۶۷۱ ± ۰/۰۰۲۲	۰/۰۷۳۳
۱۶	۱۴	۳	۲	۵/۵	۰/۰۳۳۱ ± ۰/۰۰۱۴	۰/۰۳۴۲
۱۷	۱۴	۵	۲	۲/۵	۰/۰۴۴۵ ± ۰/۰۰۱۶	۰/۰۴۵۱
۱۸	۸	۴	۵/۳	۴	۰/۰۲۱۴ ± ۰/۰۰۰۸	۰/۰۲۹۸
۱۹	۱۴	۵	۵	۵/۵	۰/۰۸۶۵ ± ۰/۰۰۲۹	۰/۰۸۷۰
۲۰	۱۴	۳	۲	۲/۵	۰/۰۲۶۷ ± ۰/۰۰۰۸	۰/۰۲۶۸
۲۱	۱۲	۲	۵/۳	۴	۰/۰۲۸۹ ± ۰/۰۰۰۹	۰/۰۳۲۱
۲۲	۱۲	۴	۵/۳	۷	۰/۰۷۱۲ ± ۰/۰۰۲۳	۰/۰۶۹۹
۲۳	۱۶	۴	۵/۳	۴	۰/۰۵۰۰ ± ۰/۰۰۱۸	۰/۰۵۰۹
۲۴	۱۲	۴	۵/۳	۱	۰/۰۵۰۱ ± ۰/۰۰۱۷	۰/۰۶۰۹
۲۵	۱۲	۴	۵/۳	۴	۰/۰۵۰۰ ± ۰/۰۰۱۷	۰/۰۵۴۱
۲۶	۱۲	۴	۵/۳	۴	۰/۰۵۲۴ ± ۰/۰۰۲۰	۰/۰۵۴۱
۲۷	۱۲	۴	۵/۰	۴	۰/۰۱۱۷ ± ۰/۰۰۰۴	۰/۰۱۰۱
۲۸	۱۰	۳	۲	۵/۵	۰/۰۲۸۰ ± ۰/۰۰۰۸	۰/۰۲۸۸
۲۹	۱۰	۳	۵	۲/۵	۰/۰۵۳۱ ± ۰/۰۰۱۹	۰/۰۴۸۵
۳۰	۱۲	۴	۵/۳	۴	۰/۰۵۳۱ ± ۰/۰۰۲۱	۰/۰۵۴۱
۳۱	۱۲	۴	۵/۳	۴	۰/۰۵۰۰ ± ۰/۰۰۱۶	۰/۰۵۴۱

در روش رویه پاسخ از تحلیل پارتو جهت تعیین عوامل مؤثر استفاده می‌شود (۱۴) در این روش تأثیر هر عامل ازطریق محاسبهٔ درصد تأثیر هر جمله در پاسخ پیش‌بینی‌شده، توسط رابطهٔ زیر به دست می‌آید (۱۵ و ۱۶). معادله ۱:

$$P_i = \left(\frac{b_i^2}{\sum_{i=1}^{n} b_i^2} \right) \times 100$$

در این رابطه P_i درصد تأثیر هر جمله و b_i معرف ضریب هر جمله است. همچنین در این معادله i نمی‌تواند صفر باشد ($i \neq 0$). نتایج حاصل از تحلیل پارتو در شکل ۳ ارائه شده است. براساس نتایج حاصل، غلظت متیونین مهم‌ترین عامل مؤثر در فرآیند است (P_1= ۷۱/۲۳٪). پس از آن درصد گلوکز، مقدار سولفات آمونیوم و زمان گرماگذاری به‌ترتیب بیشترین تأثیر را دارند. گفتنی است براساس آنالیز واریانس انجام‌گرفته و همچنین آنالیز پارتو(شکل ۳) جمله به توان یک زمان، تأثیری در فرآیند ندارد؛ اما با توجه به نتایج جدول ۵ که حاصل از آنالیز واریانس و محاسبه‌شده توسط نرم‌افزار مینی‌تب است هرچند مقدار P-Value مربوط به زمان بزرگ‌تر از ۰/۰۵ است که مؤید عدم تأثیر معنادار زمان است. با این حال همان‌طور که در جدول ۵ نشان داده شده است، جمله به توان دو زمان (D^2) و همچنین برهم‌کنش زمان با غلظت متیونین (CD) معنی‌دار است. مقادیر P-Value جمله‌های ذکرشده به‌ترتیب برابر ۰/۰۰۱۳ و ۰/۰۱۳۸ است که کمتر از ۰/۰۵ هستند؛ بنابراین جملهٔ عامل زمان باید در مدل حفظ شود تا تأثیر جمله‌های توان دو زمان (D^2) و برهم‌کنش زمان با غلظت متیونین (CD) در نظر گرفته شود. در غیر این صورت کلیهٔ فاکتورهای مربوط به زمان بایستی از مدل حذف می‌شدند.



شکل ۳- نتایج حاصل از تحلیل پارتو

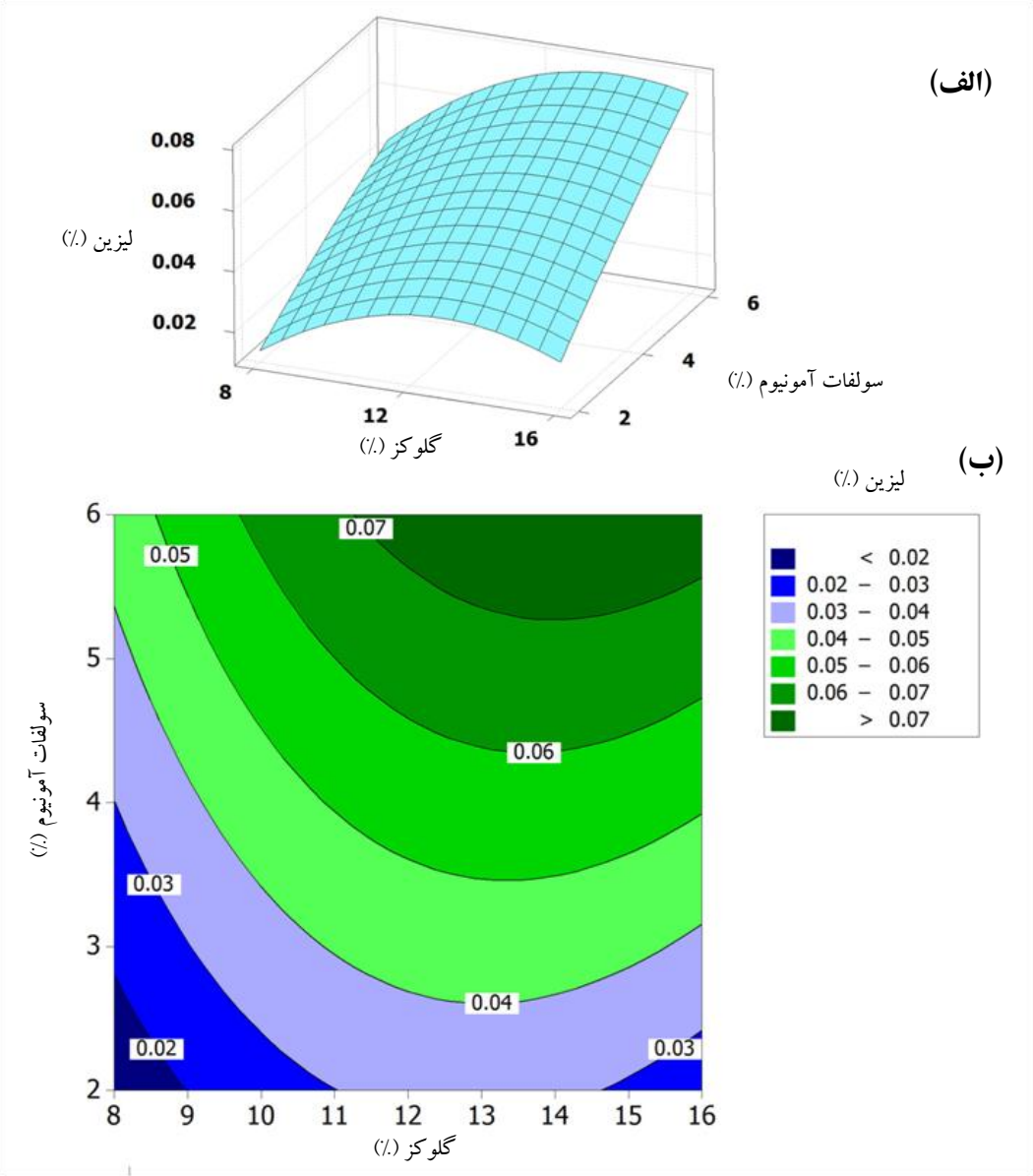
جدول ۵- ضرایب محاسبه شده برای مدل توصیف‌کنندهٔ فرآیند تولید لیزین

جمله مدل	ضریب محاسبه‌شده	P-value
b_0	۰/۰۵۴	۰/۰۰۱۳
A- گلوکز	۰۰۳E-۵/۲۷۱	۰/۰۰۰۱<
B- سولفات آمونیوم	۰/۰۱۰	۰/۰۰۰۱<
C- متیونین	۰/۰۱۸	۰/۱۱۴۰
D- زمان	۰۰۳E-۲/۲۵۷	۰/۴۷۶
AB	۰۰۳E-۱/۲۰۶	۰/۹۳۱۸
AC	۰۰۴E-۴۳۷/۱-	۰/۳۷۵۸
AD	۰۰۳E-۱/۵۰۶-	۰/۰۵۲۹
BC	۰۰۳E-۳/۴۵۶	۰/۵۰۳۷
BD	۰۰۳E-۱/۱۳۱-	۰/۲۸۴۴
CD	۰۰۳E-۱/۸۳۱-	۰/۰۱۳۸
۲A^	۰۰۳E-۳/۴۱۹-	۰/۷۸۴۷
۲B^	۰۰۴E-۳/۴۳۶-	۰/۱۳۱۰
۲C^	۰۰۳E-۱/۹۶۹-	۰/۰۳۶۲
۲D^	۰۰۳E-۲/۸۲۸	۰/۰۰۱۳

تأثیر متقابل عامل‌های مورد بررسی بر تولید لیزین:

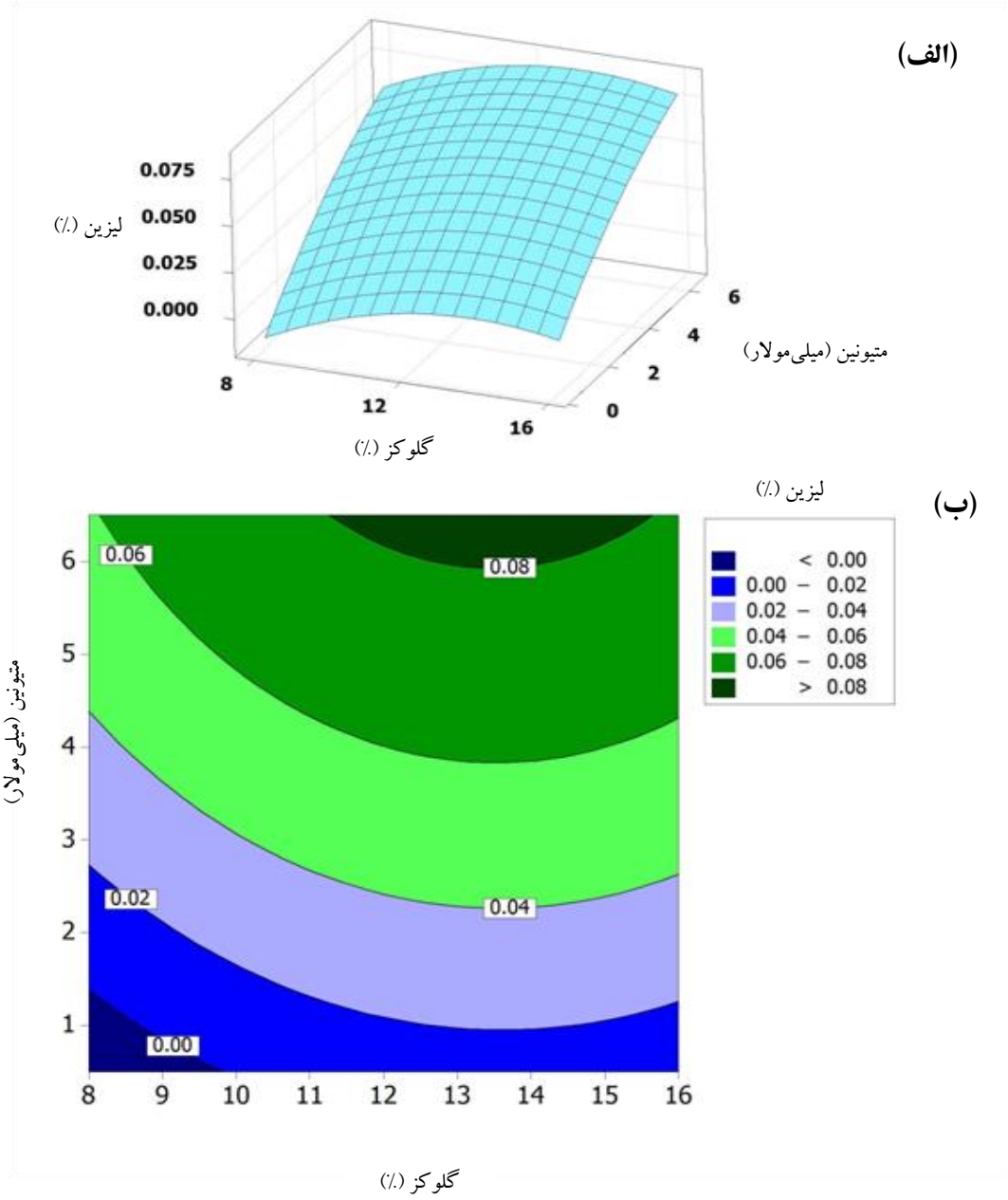
ازطریق نمودارهای سه‌بعدی و کانتور حاصل از تجزیه و تحلیل نرم‌افزار می‌توان تأثیر هم‌زمان دو عامل را بر تولید لیزین بررسی کرد.

شکل ۴ رابطهٔ بین تولید لیزین با افزایش میزان گلوکز و آمونیوم سولفات را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۴ دیده می‌شود در بررسی تأثیر متقابل گلوکز و سولفات آمونیوم، غلظت متیونین و زمان گرماگذاری تایت در نظر گرفته شده‌اند. با افزودن گلوکز به محیط تولید لیزین تا یک حد خاص (غلظت ۱۲درصد) افزایش تولید لیزین مشاهده می‌شود؛ اما بعد از آن غلظت، افزایش گلوکز باعث کاهش تولید لیزین می‌شود. آمونیوم سولفات نیز تا غلظت ۵درصد باعث افزایش تولید لیزین می‌شود.



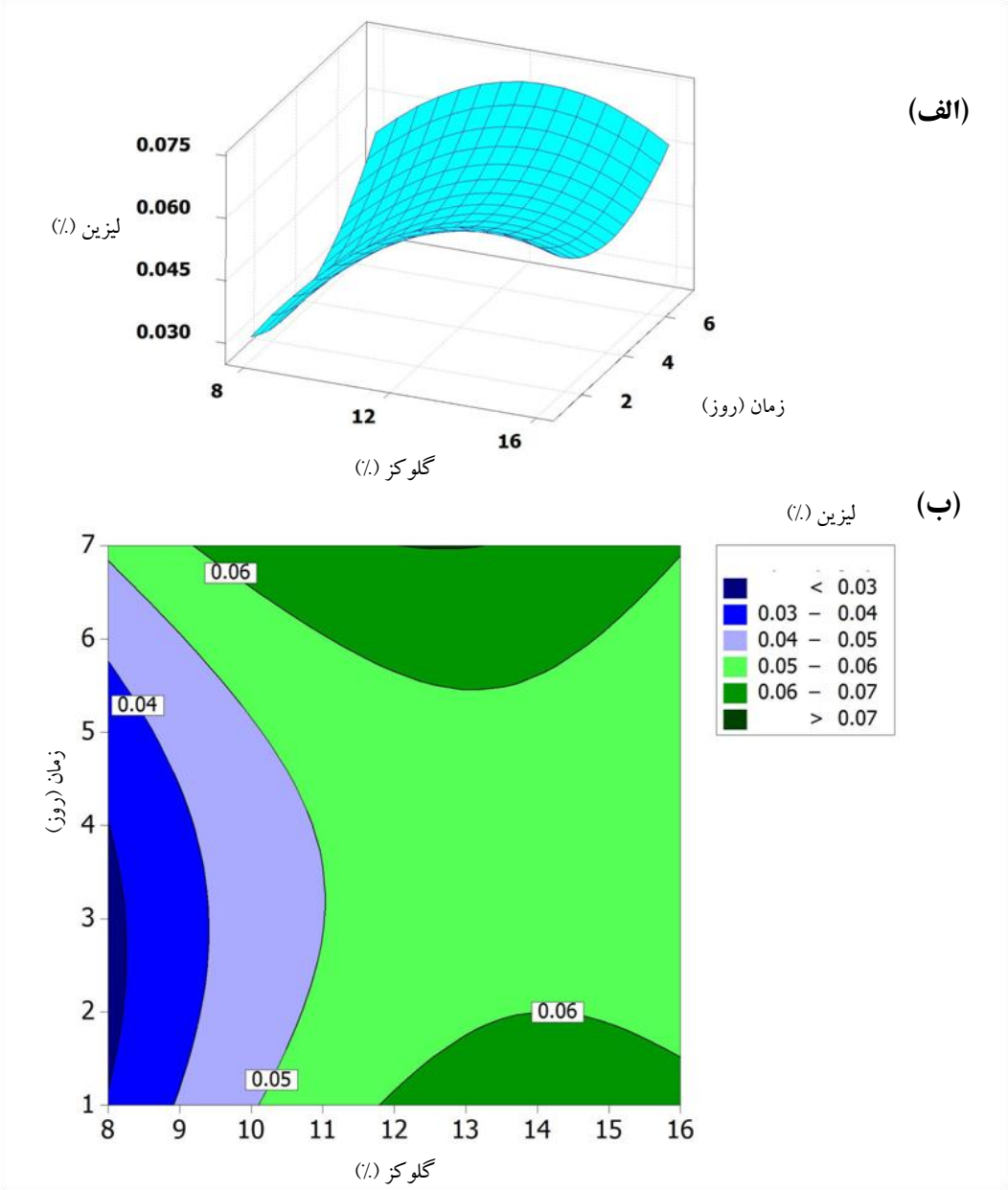
شکل۴- اثر هم‌زمان گلوکز و سولفات آمونیوم بر تولید لیزین در غلظت ۳/۵ میلی‌مولار متیونین طی ۴ روز گرماگذاری. (الف) تأثیر متقابل گلوکز و سولفات آمونیوم بر تولید لیزین (ب) نمودار کانتور تولید لیزین در غلظت‌های مختلف از گلوکز و سولفات آمونیوم

با توجه به شکل ۵ که نشان‌دهندهٔ رابطهٔ تأثیر افزایش مقدار متیونین و گلوکز در تولید لیزین است، مشخص شد که با افزایش مقدار متیونین تا غلظت ۵ میلی‌مولار مقدار تولید لیزین نیز افزایش می‌یابد؛ از طرف دیگر همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، گلوکز نیز تا غلظت ۱۴درصد باعث افزایش و سپس باعث کاهش تولید می شود. در این بررسی غلظت آمونیوم سولفات و زمان گرماگذاری ثابت فرض شد.



شکل ۵- تأثیر هم‌زمان غلظت‌های مختلف از گلوکز و متیونین بر تولید لیزین در غلظت ۴درصد از سولفات آمونیوم و طی ۴ روز گرماگذاری. (الف) ارتباط بین تولید لیزین با مقدار گلوکز و متیونین. (ب) نمودار کانتور رابطهٔ تولید لیزین با مقدار گلوکز و متیونین.

همان گونه که در شکل ۶ (تأثیر متقابل مقدار گلوکز و زمان گرماگذاری در غلظت ثابت متیونین و آمونیوم سولفات) دیده می‌شود، افزایش زمان گرماگذاری نیز تولید لیزین را افزایش می‌دهد (جز بخش ۰-۴ روز که با کاهش روبه‌رو است و آن نیز می‌تواند به‌علت خطای آزمایش باشد) درواقع زمان تأثیر مثبتی در تولید لیزین دارد. افزایش زمان به‌همراه افزایش مقدار گلوکز باعث افزایش تولید لیزین می‌شود.



شکل۶- تأثیر متقابل غلظت‌های مختلف گلوکز و زمان‌های متفاوت بر تولید لیزین در غلظت ۴درصد از سولفات آمونیوم و غلظت ۳/۵ میلی مولار از متیونین. (الف) ارتباط تولید لیزین با مقدار گلوکز و متیونین. (ب) نمودار کانتور رابطهٔ تولید لیزین با مقدار گلوکز و زمان گرماگذاری.

درنهایت نتایج نشان داد که با مقایسهٔ نتایج حاصله از تولید لیزین در محیط کشت M9 در مدت یک هفته (۰/۷ میلی‌گرم درلیتر) (جدول ۱) با محیط کشت شماره ۷ (جدول ۴) یعنی محیط کشت M9 حاوی ۱۴درصد گلوکز، ۵درصد آمونیوم سولفات و متیونین ۵ میلی‌مولار (تولید ۰/۹۸ گرم در لیتر لیزین در مدت ۲/۵ روز) دیده می‌شود که تولید لیزین تقریباً ۱۴۰۰ برابر افزایش یافته است.

گرانوله‌کردن: با توجه به اهمیت محیط حاوی لیزین در صنعت غذای دام و طیور محیط کشت حاوی لیزین گرانوله شد. همان‌طور که در شکل ۷ نشان داده شده است، گرانول‌های حاوی لیزین تهیه شدند. این گرانوال ها به‌دلیل دارابودن عصارهٔ باکتری علاوه بر آمینواسید دارای پروتئین و ویتامین نیز هستند.

شکل ۷-گرانول‌های لیزین

بحث و نتیجه‌گیری

افزایش تولید آمینواسید لیزین هم با تغییرات مهندسی ژنتیک و یا با مهندسی محیط می‌تواند از دید میکروبیولوژی صنعتی مهم باشد. با این حال با توجه به کم‌هزینه‌بودن و کم‌خطربودن مهندسی محیط نسبت به مهندسی ژنتیک (به‌لحاظ ایمنی زیستی) امروزه استفاده از آن بیشتر مورد توجه واقع شده است.

در این پژوهش با تغییر میزان گلوکز (منبع کربنی)، آمونیوم سولفات (منبع نیتروژنی)، مقدار متیونین (افزودنی) و زمان گرماگذاری، افزایش ۱۴۰۰ برابری نسبت به محیط کشت پایه M9 حاصل شد. با توجه به میزان R^2 بالا (۰/۹۴) می‌توان گفت نتایج تجربی و تخمین‌زده‌شده در این پژوهش هم‌خوانی بالایی دارد و بنابراین مدل پیشنهادی در این پژوهش قابل‌اعتماد است. نتایج حاصل از تحلیل پارتو نشان داد که در افزایش میزان تولید لیزین، متیونین بیشترین اهمیت را دارد و سپس گلوکز، مقدار آمونیوم سولفات و زمان گرماگذاری اهمیت دارند. متیونین به‌عنوان یک افزودنی، تأثیر زیادی در تولید لیزین دارد. دلیل این امر تأثیر متیونین در مهار عمکرد اپرون سازندهٔ آنزیم‌های دخیل در ساخت آمینواسیدهایی است که از یک پیش ساز مشترک با لیزین ساخته می‌شوند (۱۷). از جملهٔ این آمینواسیدها ترئونین و ایزولوسین است که در حضور متیونین میزان تولید آنها از ۷ به ۲ میلی‌مولار کاهش می یابد و درنتیجه پیش‌ساز مشترک آنها توسط آنزیم‌های تولیدکنندهٔ لیزین بیشتر مصرف می‌شود و لیزین بیشتری تولید می‌گردد (۱۷). بنابراین می‌توان گفت در باکتری *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* سویهٔ *ATCC15032* مسیر تولید ترئونین و ایزولوسین از پیش‌ساز مشترک با لیزین

بیشتر است به‌طوری که با مهار این مسیر توسط متیونین، تولید لیزین در مقایسه با سایر عوامل موردبررسی به‌میزان زیادی افزایش می‌یابد. در ردهٔ دوم اهمیت جهت افزایش تولید لیزین گلوکز قرار دارد. نتایج این پژوهش نشان داد مقدار ۱۴درصد گلوکز، بیشترین تأثیر را در افزایش تولید لیزین دارد و غلظت‌های بالاتر از آن باعث کاهش تولید لیزین می‌شود. برای تولید لیزین در دسترس‌بودن سوبسترا به‌عنوان یک فاکتور مهم نقش بسزایی دارد. این امر نه تنها برای تولید لیزین بلکه برای توانایی زیستن و رشد باکتری نیز مهم است. گلوکز یکی از انواع منابع کربنی قابل‌استفاده توسط *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* و در عین حال بهترین آنهاست (۱۸). طبق مطالعات انجام‌شده در سال ۱۹۸۵، مشخص شد که افزایش غلظت گلوکز از یک حد مشخص، رشد باکتری را در سطح پایینی محدود می‌کند (۱۸). درواقع علت این امر تأثیر مقدار سوبسترای اضافی بر کاهش تولید محصول است؛ زیرا با افزایش گلوکز مقدار رشد باکتری تا حدی که شرایط ایجاب می‌کند افزایش می یابد (۱۸). بعد از رسیدن باکتری به مرحلهٔ ایستایی از رشد خود، از یک طرف تولید آمینواسید و خروج آنها از باکتری افزایش می‌یابد و از طرف دیگر باکتری با کمبود فاکتور مهمی مانند آمینواسیدها روبه‌رو می‌شود. درنتیجه رشد باکتری در زمانی که غلظت لیزین به حداکثر می‌رسد شروع به کاهش‌یافتن می‌کند؛ پس از مدتی کاهش رشد باکتری باعث کاهش تولید لیزین می شود (۱۹). از این رو در این پژوهش تا غلظت ۱۴درصد از گلوکز افزایش تولید و پس از آن کاهش تولید کاهش مشاهده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که آمونیوم سولفات به‌لحاظ اهمیت در تأثیر بر تولید لیزین، نسبت به متغیرهای دیگر در ردهٔ سوم قرار می‌گیرد. حضور منبع نیتروژنی مانند آمونیوم سولفات یکی از عوامل مؤثر در افزایش تولید لیزین است. لیزین در باکتری *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* برخلاف سایر باکتری از دو مسیر سوکسینیلاز و دهیدروژناز ساخته می شود. دسترسی باکتری به آمونیوم، تعیین‌کنندهٔ مسیر نهایی تولید لیزین از پیش‌ساز پیریدین ۲،۶ دی کربوکسیلات به دی‌آمینوپیمیلات است. درواقع حضور آمونیوم باعث استفاده باکتری از آنزیم دی‌آمینوپیمیلات دهیدروژناز می‌شود. تمایل این آنزیم به آمونیوم بالا است (با K_m بالای ۳۵ میلی‌مولار) و باعث می‌شود در حضور مقدار بالای آمونیوم، ۵۰درصد از مسیر سنتز لیزین را به عهده بگیرد (۲۰). برعکس در حضور نیتروژن‌های آلی مانند اوره و گلوتامیک‌اسید این فرآیند به سمت آنزیم خانواده سوکسینیلاز سوق پیدا می‌کند (۲۰). با این حال افزایش بیش‌ازحد یون آمونیوم با ایجاد تغییر در فشار اسمزی از رشد باکتری و تولید لیزین جلوگیری می‌کند (۲۱). افزایش زمان تا یک حد معقول باعث افزایش تولید لیزین می‌شود؛ اما پس از گذشت مدت‌زمان طولانی باکتری با کمبود مواد غذایی روبه‌رو می‌شود و تولید لیزین کاهش می‌یابد (۹). در این پژوهش در محیط کشت شماره ۷ (جدول۴) که دارای گلوکز ۱۴درصد، آمونیوم سولفات ۵درصد و متیونین ۵ میلی‌مولار است و به‌مدت ۲/۵ روز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد گرماگذاری شده است، مقدار لیزین تولیدی نسبت به محیط کشت پایه M9 (۰/۰۰۰۷ گرم بر لیتر) تا ۱۴۰۰برابر (۰/۹۸ گرم بر لیتر) افزایش داشت. در یک پژوهش نلوفر[۱۰] و همکاران با استفاده از گلوکز (۱۴درصد)، با کمک عصارهٔ ماهی، برخی نمک‌ها و

بیوتین به‌عنوان افزاینده، در طی سه روز میزان تولید لیزین را ۲/۶ برابر افزایش دادند (۹). در پژوهشی دیگر در باکتری *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* سویهٔ *ATCC 13032* با تغییرات ژنتیکی محدود به یک یا دو ژن تولید تا ۷۰ برابر (از ۱ میلی‌مولار به ۷۰ میلی‌مولار) افزایش یافت (۲۲). امروزه با افزایش تغییرات در بیش از ده‌ها ژن تولید را تا تقریباً یک مول بر لیتر رسانده‌اند (افزایش تولید تا ۱۰۰۰ برابر) (۲۳). در سال ۲۰۰۸ با استفاده از گونهٔ جهش‌یافتهٔ *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* سویهٔ *AeC-2* در محیط کشت حاوی گلوکز، آمونیوم سولفات و تغییر برخی از فاکورهای فیزیکی مثل دما و pH و در دو مرحله استفاده از روش رویه پاسخ و با R^2=۰/۸۴ مقدار تولید لیزین تا ۲/۶ برابر افزایش داده شد (۱۰). در این پژوهش بعد از انتخاب ۴ متغییر از بین چندین متغییر مؤثر در تولید لیزین و طی یک مرحلهٔ رویه پاسخ با R^2=۰/۹۴، میزان تولید لیزین تا حدود ۱۴۰۰ برابر افزایش یافت؛ بنابراین با توجه به افزایش چشمگیر در میزان افزایش لیزین و همچنین صحت بالای مدل پیشنهادی توسط روش رویه پاسخ می‌توان گفت که با به‌کاربردن روش حاضر می‌توان تا مقدار قابل توجهی میزان تولید لیزین را در *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* بدون نیاز به دستکاری ژنتیکی و در یک محیط کشت قابل‌دسترس بهبود بخشید. در این پژوهش با تغییر تنها چهار فاکتور که از ویژگی‌های بارز آنها دردسترس‌بودن است مقدار تولید لیزین طی ۶۰ ساعت به‌طرز چشمگیری افزایش یافت.

ازآنجاکه لیزین آمینواسید صنعتی است، گرانوله کردن آن اهمیت ویژه‌ای دارد؛ به همین منظور سعی شده تا با مواد ارزان و دردسترس گرانوله‌کردن محیط کشت حاوی لیزین صورت گیرد. گرانوله‌کردن آن هم ازطریق جداکردن و تخلیص لیزین از محیط کشت و هم به محیط کشت (به‌همراه باکتری) صورت می‌گیرد. با توجه به هزینه‌بَربودن تخلیص لیزین و همچنین غنای بالای گرانول‌ها (به‌لحاظ غذایی) در حضور باکتری (۲) در این پژوهش سعی شد روشی آسان جهت گرانوله کردن محیط کشت حاوی لیزین ارائه شود.

درنهایت می‌توان گفت با توجه به میزان R^2 بالای (۰/۹۴) منحنی ارتباط بین نتایج تجربی و نتایج تخمین زده‌شده، مدل پیشنهادی در این پژوهش از صحت بالایی برخوردار بوده و از بین عوامل موردبررسی، متیونین بیشترین تأثیر را در افزایش تولید لیزین داشته است. همچنین نتایج نشان داد محیط کشت M9 حاوی ۱۴درصد گلوکز، ۵درصد آمونیوم سولفات و متیونین ۵ میلی‌مولار باعث افزایش چشمگیر تولید لیزین در باکتری *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* سویهٔ *ATCC15032* (تا ۱۴۰۰ برابر بیشتر از محیط M9) شد که این میزان افزایش با روش‌های تغییر گسترده ژنتیکی در باکتری *کورینه‌باکتریوم گلوتامیکوم* برابری می‌کند. با این حال با توجه به اینکه سویهٔ باکتری مورداستفاده در این پژوهش سویهٔ صنعتی نیست، می‌توان جهت افزایش تولید تا حد موردقبول در صنعت (۲۰۰ گرم در لیتر) از سویهٔ صنعتی و با به‌کاربردن محیط کشت و روش پیشنهادی در این پژوهش استفاده کرد.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

References

(1) Okfar N. *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*. First ed. California: Science Publishers; 2007.

(2) Herman T. Industrial Production of Amino Acids by Coryne form Bacteria. *Journal Of Biotechnology* 2003; 104 (1): 155-172

(3) Shen Xi., Zhou N., Liu Sh. Degradation and Assimilation of Aromatic Compounds by *Corynebacterium glutamicum*: Another Potential for Applications for This Bacterium? *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012; 95 (1): 77-89.

(4) Georgi T., Rittmann D., Wendisch VF. Lysine and Glutamate Production by *Corynebacterium glutamicum* on Glucose, Fructose and Sucrose: Roles of Malic Enzyme and Fructose-1, 6-Bisphosphatase. *Metabolic Engineering* 2005; 7(4): 291-301.

(5) Shah A. H., Abdul H., Safia A., Khan GM. Optimization of Culture Conditions for L-Lysine Fermentation by *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biological Sciences* 2002; 2(3): 151-156.

(6) Myers Raymond H., Montgomery DC. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiment.* NewYourk: *A* Wiley-Interscience Publication; 2002.

(7) Kaboosi H., Tabari N., Samadlouie HR. Optimization of α-amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens* using response surfaces methodology. *Biological Journal of Microorganism* 2014; 15(11): 79-90.

(8) Poroch-Seritan M., Gutt S., Gutt G., Cretescu I., Cojocaru C., & Severin, T. Design of experiments for statistical modeling and multi-response optimization of nickel electroplating process. *Chemical Engineering Research and Design* 2011; 89(2): 136-147.

(9) Coello N., Montiel E., Concepcion M., Christen P. Optimisation of a culture medium containing fish silage for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresource technology* 2002; 85(2): 207-11.

(10) Nelofer R., Syed Q., Nadeem M. Statistical Optimization of Process Variables for L-Lysine Production by *Corynebacterium glutamicum*. *Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi* 2008; 33(2): 50-57.

(11) Green M R., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Vol 1. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 2012.

(12) Chinard FP. Photometric Estimation of Proline and Ornithine. *Journal Of Biological Chemistry* 1952; 199(1): 91-95.

(13) Härkönen H., Koskinen M., Linko P., Siika-aho M., Poutanen K. Granulation of enzyme powders in a fluidized bed spray granulator. *LWT-Food Science and Technology* 1993; 26(3): 235-41.

(14) Khataee AR., Zarei M., Asl S K. Photocatalytic Treatment of a Dye Solution Using Immobilized Tio 2 Nanoparticles Combined with Photoelectro-Fenton Process: Optimization of Operational Parameters. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2010; 648(2): 143-150.

(15) Abdessalem A K., Oturan N., Bellakhal N., Dachraoui M., Oturan MA. Experimental Design Methodology Applied to Electro-Fenton Treatment for Degradation of Herbicide Chlortoluron. *Applied Catalysis B: Environmental* 2008; 78(3): 334-341.

(16) Haaland PD. *Experimental Design In Biotechnology*. First ed. NewYork: Marcel Dekker; 1989.

(17) Vrljic M., Kronemeyer W., Sahm H., Eggeling L. Unbalance of L-Lysine Flux in *Corynebacterium glutamicum* and Its Use for the Isolation of Excretion-Defective Mutants. *Journal of Bacteriology* 1995; 177(14): 4021-4027.

(18) Sassi AH., Fauvart L., Deschamps A M., Lebeault, J M. Fed-Batch Production of L-Lysine by *Corynebacterium glutamicum*. *Biochemical Engineering Journal* 1998; 1(1): 85-90.

(19) Eikmanns BJ., Eggeling L., Sahm H. Molecular Aspects of Lysine, Threonine, and Isoleucine Biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Antonie Vanleeuwenhoek* 1993; 64(2): 145-163.

(20) Ekwealor IA., Obeta JAN. Studies on Lysine Production by *Bacillus megaterium*. *African Journal of Biotechnology* 2005; 4(7): 633-638.

(21) Hadj S A., Queric M P., Deschamps A M., Lebeault J M. Optimisation of L-Lysine Production by*Corynebacterium sp* in Fed-Batch Cultures.*Biotechnology Letters* 1988; 10(8): 583-586.

(22) Hirao T., Nakano T., Azuma T., Sugimoto M., Nakanishi T. L-Lysine Production in Continuous Culture of andL-Lysine Hyperproducing Mutant of *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1989; 32(3): 269-273.

(23) Georgi T., Rittmann D., Wendisch VF. Lysine and Glutamate Production by *Corynebacterium Glutamicum*on Glucose, Fructose and Sucrose: Roles of Malic Enzyme and Fructose-1, 6-Bisphosphatase. *Metabolic Engineering* 2005; 7(4): 291-301.

[1]- Response surface methodology (RSM)
[2]- Central composite design
[3]- Box-Behnken designs
[4]- Central points
[5]- Orthogonality
[6]- Axial points
[7]- Chinard
[8]- Mini tab
[9]- Central composite design
[10]- Nelofer R.