

مقاله پژوهشی

هم‌افزایی اثر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، ال-کارنیتین، HUFA و لسیتین بر تکثیر مخمر *Saccharomyces cerevisiae*

رامین مناف‌فر^{۱*}، کبری خانی‌وش^۲، هدیه یزدانی^۳، رامون ورده^۴

DOI: 10.22124/japb.2025.28879.1556

تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۴

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۳

چکیده

در این پژوهش امکان تحریک تکثیر سلول‌های مخمر *Saccharomyces cerevisiae* با افزودن نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO₂)، HUFA، لسیتین و ال-کارنیتین مورد بررسی قرار گرفت. مخمر پس از فعال‌سازی اولیه در محیط کشت پایه، در مرحله اول ابتدا به صورت انفرادی تحت تاثیر غلظت‌های مختلف این مواد قرار گرفت و بهترین غلظت‌ها انتخاب شدند. در مرحله دوم بهترین غلظت‌های انفرادی برای بررسی تاثیر ترکیبی این مواد بر روی رشد مخمر به کار رفت. در هر دو مرحله میزان تکثیر سلول‌های مخمر با اندازه‌گیری تعداد سلول‌ها و میزان زیست توده تولید شده بررسی و درصد اسیدهای چرب مخمر در بهترین تیمارها با استفاده از کروماتوگرافی گازی سنجش شد. نتایج نشان داد نانوذرات TiO₂ در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر به طور معنی‌داری تکثیر مخمر را افزایش داد. اما بهترین رشد مخمر در حضور ال-کارنیتین مربوط به غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. در حالی که HUFA به تنهایی نتوانست تاثیر خوبی بر تکثیر مخمر داشته باشد، اما در کشت ترکیبی HUFA با لسیتین نتوانست نتایج خوبی را در تکثیر مخمر داشته باشد. همچنین ترکیب نانوذرات و ال-کارنیتین نتوانست تکثیر سلول‌های مخمر را تحریک کند (P<۰/۰۵). بررسی درصد اسیدهای چرب تیمارهای موفق نشان داد در تمامی تیمارها میزان HUFA و PUFA به شدت نسبت به تیمار شاهد بهبود یافت (P<۰/۰۵). اما در بررسی میزان زیست‌توده، بهترین تیمار انفرادی مربوط به ال-کارنیتین به وزن ۰/۶۷ گرم و تیمار ترکیبی HUFA به همراه لسیتین با وزن ۰/۷۵ گرم به دست آمد. نتایج این پژوهش می‌تواند برای کشت انواع مخمر با توانایی تکثیر کم مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: بهینه‌سازی تکثیر صنعتی، لسیتین، مخمر، نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، ال-کارنیتین.

- ۱- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
- ۲- کارشناس ارشد زیست‌فناوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.
- ۳- دانشجوی دکتری شیلات، گروه تولید و بهره‌برداری آریزان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۴- کارشناس ارشد زیست‌فناوری دریا، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

* نویسنده مسئول: R.manaffar@urmia.ac.ir

مقدمه

(Baruah et al., 2010; Ma et al., 2022). این امر به این علت است که در کل روشی آسان، کاربردی و بسیار کم‌هزینه را در تغذیه آبزیان ارائه می‌دهد و از طرفی منجر به افزایش درصد بازماندگی لاروها و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا می‌شود (Ayiku et al., 2020).

امروزه حضور فناوری نانو در رژیم غذایی آبزیان به منظور افزایش رشد آنها بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Vibhute et al., 2023). نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (TiO_2) اندازه‌ای کمتر از ۱۰۰ نانومتر دارند که این ویژگی به منظور رشد و پیشرفت بسیاری از مطالعات به‌ویژه علوم در حال توسعه مانند پزشکی، زیست‌شناسی، شیمی و فیزیک اهمیت قابل توجهی دارد (Khataee and Mansoori, 2011; Gojznikar et al., 2022). نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به عنوان ماده ضدباکتریایی با عملکرد استریلیزاسیون نیز کاربرد دارد. پایداری این ترکیبات در مدت زمان طولانی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها زیاد است. به علاوه، برخی از نانوذرات در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌توانند استریلیزاسیون در دمای بالا را تحمل کنند. با توجه به ویژگی‌های مفید این گروه از نانوذرات، تمایل به استفاده از آنها روز به روز

اهمیت مخمرها در آبی‌پروری و استفاده از آنها در جیره‌های غذایی موجودات آبی بر کسی پوشیده نیست (Jessina et al., 2022). محصولات مخمری، همچنین، به عنوان یک منبع پروتئینی در رژیم غذایی در تولید میگوی آب شور استفاده می‌شود (Ernesto Cesena et al., 2021; Zhang et al., 2024). کاربرد و اهمیت مخمرها تنها به حوزه شیلات ختم نمی‌شود بلکه با توجه به مطالعات انجام شده در حوزه گیاه‌شناسی (Mokhtarnejad and Farzaneh, 2020)، صنایع غذایی (Perricone et al., 2022) بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی (Pitt and Hocking, 1997) می‌توان به نقش گسترده این میکروارگانیسم‌ها در حوزه‌های مختلف پی برد. در میان مخمرها، مخمر *Saccharomyces cerevisiae* یکی از شناخته شده‌ترین مخمرها است که به عنوان مکمل غذایی در تغذیه جانداران مختلف تاکنون مورد استفاده قرار گرفته است. در صنعت تکثیر و پرورش آبزیان، به منظور افزایش مقاومت به استرس‌های مختلف محیطی به جای استفاده از مخمرهای طبیعی از مخمرهای غنی شده با مواد آلی و معدنی مختلف و همچنین اسیدهای چرب و یا پروتئین‌های شوک حرارتی استفاده می‌شود

افزایش پیدا کرده است (Serov et al., 2024). تاکنون مطالعات بسیاری درباره بررسی همه جانبه این نوع از نانوذرات مانند نحوه اثرگذاری بر جانداران، میزان سمیت و چگونگی بهبود استفاده از آنها انجام شده است. به طور مثال پاسخ فیزیولوژیکی جلبک اسپیرولینا (*Spirulina*) را در زمان قرارگیری در معرض نانوذرات دی اکسید تیتانیوم مورد بررسی قرار دادند که طبق نتایج، کریستال روتایل بیشترین تاثیر را بر تولید فیکوسیانین و کریستال آاناتاز بیشترین تاثیر را در تولید آلفوفیکوسیانین و فیکواریتین داشت (Pourbozorgi-Rudsari et al., 2022). همچنین در مورد اثر دی اکسید تیتانیوم بر رشد گیاه ذرت گزارش شده است که در تیمارهای آزمایشی استفاده از غلظت های کم از این نانوذرات نسبت به تیمارهای شاهد، به طور معنی داری باعث افزایش رشد گیاه مورد نظر می شود. در حالی که با افزایش غلظت این نانوذرات رشد گیاه ذرت کاهش پیدا کرد و تاثیری در بهبود رشد گیاه نشان نداد (Daghan, 2018). مطالعات محدود درباره استفاده از نانوذرات به عنوان محرک رشد در مخمر نشان داده است که با افزودن نانوذرات مغناطیسی آهن می توان میزان تولید محصول توسط مخمر را تا ۱/۵ برابر افزایش داد (Seifi et al., 2020). همچنین در سال های اخیر، استفاده از ترکیباتی که رشد و عملکرد میکروارگانیسم هایی مانند مخمر *S. cerevisiae* را بهبود بخشد، افزایش یافته است. استفاده از غلظت های کم نانوذرات TiO_2 می تواند باعث افزایش رشد و تولید زیست توده مخمرها شوند، در حالی که در غلظت های بیشتر اثر مہاری بر رشد دارند و باعث ایجاد سمیت سلولی می شوند (Usatii et al., 2016).

کارنیتین نوعی ترکیب طبیعی با فرمول شیمیایی $NO_3H_{15}C_7$ و دارای وزن مولکولی ۱۶۱/۲ گرم است. مطالعات پیشین نشان دادند که استفاده از ال-کارنیتین در تغذیه ماهی باس دهان بزرگ (*Micropterus salmoides*) باعث افزایش قابل توجه وزن بدن شد و توانست عملکرد رشد و متابولیسم لیپید را در نمونه های مورد مطالعه بهبود بخشد (Chen et al., 2020). گونه های دیگری از ماهیان مانند گربه ماهی زرد (*Pelteobagrus fulvidraco*)، قزل آالی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، سوف نقره ای (*Bidyanus bidyanus*)، گربه ماهی آسیایی (*Clarias batrachus*)، گربه ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*) و فیل ماهی (*Huso huso*) نیز به تغذیه با ال-کارنیتین پاسخ مثبت دادند

تولید متابولیت‌های ثانویه در مخمر را نیز بهبود می‌بخشد (Bossie and Martin, 1989; Aguedo et al., 2002; Duan et al., 2015; Ferraz et al., 2021).

باتوجه به این که بررسی اثرات ترکیبی موادی همچون ال-کارنیتین، اسیدهای چرب، لسیتین و نانوذرات فلزی مختلف بر مخمر به صورت محدود انجام شده است، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم، اسیدهای چرب غیراشباع، ال-کارنیتین و لسیتین بر رشد مخمر *Saccharomyces cerevisiae* تحت شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

فعال‌سازی اولیه مخمر و آماده‌سازی تیمارها

در این مطالعه، از مخمر پروبیوتیک *Saccharomyces cerevisiae* و سویه استاندارد ATCC-2601 تهیه شده از کلکسیون پژوهشکده آرتیمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه استفاده شد. پس از آماده‌سازی محیط کشت و افزودن استوک مخمر به محیط کشت، مقادیر مورد نیاز از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (فاین‌نانو، ایران)، اسیدهای چرب HUFA (INVE، بلژیک) حاوی EPA و DHA،

(Chen et al., 2020). بر همین اساس، مطالعات نشان داده‌اند که ال-کارنیتین با انتقال اسیدهای چرب به میتوکندری نقش بسیار مهمی در رشد و زنده‌مانی سلول‌ها در مواقع استرس دارد و موجب بهبود شرایط رشد سلولی می‌شود (Hoppel, 2003).

اسیدهای چرب را بر اساس وجود یا عدم وجود پیوندهای دوگانه در ساختمان آنها به انواع اشباع و غیراشباع طبقه‌بندی می‌کنند. اسیدهای چرب غیراشباع بلندزنجیره (Highly Unsaturated Fatty Acids: HUFA Polyunsaturated) از PUFAها (Fatty Acids) بوده و دارای زنجیره کربنی بلندتر (حداقل ۲۰ اتم کربن) و تعداد پیوندهای دوگانه بیشتر (سه پیوند دوگانه یا بیشتر) هستند، از ترکیبات بسیار مهم برای رشد جانداران محسوب می‌شوند. اسیدهای چرب غیراشباع بلندزنجیره، مانند اسید لینولئیک و اسید اولئیک نقش بسیار مهمی در تنظیم ترکیب غشای سلولی مخمر ایفا می‌کند و از این طریق فعالیت متابولیکی سلول‌های مخمر را بهبود می‌بخشد. لسیتین نیز به عنوان یک منبع فسفولیپیدی باعث استحکام غشای سلولی مخمر شده و مقاومت سلول‌ها به تنش‌های محیطی را موجب می‌شود. همچنین، این ماده

لسیتین (نوترون، ایران) و ال-کارنیتین سه تکرار و در شرایط بهینه کشت داده شدند. همچنین یک تیمار شاهد که فاقد هر گونه تعیین شده طبق جدول‌های ۱ و ۲ به محیط کشت افزوده شد و مخمرها در این تیمارها در (Aoki et al., 2002).

جدول ۱: تکثیر مخمر در حضور غلظت‌های مختلف HUFA، ال-کارنیتین و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به صورت انفرادی

نوع تیمار	شاهد	A	B	C	D	E
HUFA (mg/mL)	-	۰/۰۷۵	۰/۱۴۷	۰/۲۲۵	۰/۳	-
ال-کارنیتین (mg/mL)	-	۰/۰۰۱	۰/۰۰۵	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۱
TiO ₂ (mg/L)	-	۱	۵	۳۰	۸۰	-

جدول ۲: تکثیر مخمر در حضور غلظت‌های مختلف HUFA، لسیتین، ال-کارنیتین و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به صورت ترکیبی

تیمار	HUFA (mg/mL)	لسیتین (mg/mL)	ال-کارنیتین (mg/mL)	TiO ₂ (mg/L)
شاهد	-	-	-	-
A	-	-	۰/۰۱	۳۰
B	-	-	۰/۰۱	۸۰
C	-	-	۰/۰۵	۳۰
D	-	-	۰/۰۵	۸۰
E	۰/۱	۰/۰۱	-	-
F	۰/۲	۰/۰۲	-	-
G	۰/۳	۰/۰۳	-	-
H	۰/۴	۰/۰۴	-	-
I	۰/۵	۰/۰۵	-	-

انجام شد (Patnaik et al., 2024). پس از اتمام این مرحله از کشت، زیست‌توده توسط سانتیفریوژ (اپیدروف، آلمان) با ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جدا و برای مرحله بعد نگهداری شد.

کشت منفرد: بررسی تاثیر مواد مختلف به صورت انفرادی بر روی مخمر

در این مرحله از کشت ابتدا تاثیر HUFA، ال-کارنیتین، لسیتین و نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم به صورت انفرادی در غلظت‌های مختلف بر روی رشد و بقاء مخمر بررسی شد (جدول ۱).

کشت مخمر در تیمار HUFA

برای تیمار مخمر با HUFA (اسیدهای چرب بلندزنجیره غیراشباع)، غنی‌سازی مخمر با افزودن مستقیم غلظت‌های مختلف HUFA (جدول ۱) در محیط کشت پایه (شاهد) صورت گرفت. برای پایداری بیشتر و بهتر امولسیون، ترکیب حاوی اسید چرب به مدت ۱۰ دقیقه در سونیکاتور (Soniprep 150, MSE, آلمان) تیمار شد (Aoki et al., 2002; Hosseini et al., 2020).

فعال‌سازی اولیه مخمر *Saccharomyces cerevisiae* در محیط کشت پایه

به منظور آماده‌سازی مخمر از محیط پایه و استاندارد استفاده شد (Aoki et al., 2002). بدین منظور ۱۴ گرم پودر عصاره مخمر، ۱۴ گرم گلوکز و ۷ گرم K_2HPO_4 به آب مقطر اضافه و به حجم یک لیتر رسانده شد. پس از همزدن مواد تا حل شدن کامل در آب مقطر، pH محیط کشت اندازه‌گیری شد. برای تنظیم pH در محدوده ۶ از ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک استفاده شد. سپس محیط کشت در دستگاه اتوکلاو (طب‌گستر، ایران) استریل شد. فرایند استریل‌سازی محیط کشت در شرایط دمایی ۱۲۱/۵ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۱۵ دقیقه انجام شد. پس از استریل شدن محیط کشت و خنک شدن آن، نسبت به تلقیح سلول‌های مخمر در محیط کشت اقدام شد. تلقیح سلول‌های مخمر با افزودن ۵۰ میلی‌گرم مخمر با استفاده از لوپ استریل انجام شد. ارلن‌های حاوی محیط کشت و سلول‌های مخمر روی شیکر انکوباتور (پارس‌آزما، ایران) قرار داده شد. در این مرحله، انکوباسون تحت شرایط دمایی ۳۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه برای شیکر، در مدت زمان ۲۴ ساعت

کشت مخمر با ال-کارنیتین

انفرادی برای ساخت ترکیبی برای بررسی میزان رشد و بقای مخمر استفاده شد.

در تمامی آزمون‌ها ال-کارنیتین به صورت مستقیم بدون هیچ گونه دخل و تصرفی به محیط کشت آماده در تیمارهای مختلف بر اساس جدول ۱ و ۲ افزوده شد.

کشت مخمر با HUFA به همراه لسیتین

از لسیتین به عنوان یک ماده منفرد برای تست استفاده نشد، زیرا بر اساس تجربه مشخص بود که این ماده فقط یک ماده همراه برای جذب بهتر اسیدهای چرب است. اما در تیمارهای ترکیبی این ماده به همراه HUFA موجب می‌شود که مواد در آب به صورت امولسیون درآید و به راحتی در اختیار مخمرهای معلق در محیط قرار گیرد. به صورت تجربی و با بررسی اولیه، مقدار مصرف HUFA و لسیتین با نسبت ۱:۱۰ تهیه شد. بقیه مراحل دقیقاً مانند پروتکل تیمار HUFA بود (جدول ۲).

کشت مخمر با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم

به منظور آماده‌سازی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و تهیه استوک اصلی نانوذره مورد استفاده در کشت منفرد و ترکیبی مخمر، مقدار ۵۰ میلی‌گرم از نانوذره TiO_2 در ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل و به مدت ۶۰ دقیقه در سونیکاتور قرار داده شد تا نانوذرات به طور کامل از یکدیگر جدا شوند. به منظور ایجاد سوسپانسیونی از نانوذرات که ذرات آن از هم کاملاً جدا شده باشند، علاوه بر سونیکاسیون (Sonication)، ماده BSA نیز در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت مخمر استفاده شد. پس از افزودن BSA به محیط کشت، نانوذره TiO_2 در غلظت‌های اشاره شده در جدول‌های ۱ و ۲ به محیط کشت پایه مخمر در سه تکرار اضافه شد.

کشت ترکیبی: بررسی تاثیر مواد مختلف به صورت ترکیبی بر روی مخمر

کشت مخمر با ال-کارنیتین به همراه نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم

مراحل آماده‌سازی محیط کشت پایه طبق مراحل قبلی انجام شد. محیط کشت پایه ابتدا در شرایط استریل به لوله‌های آزمایش انتقال داده شد. قبل از تلقیح نانوذرات به محیط کشت مخمر، به هر تیمار ۵۰ میکرولیتر BSA نیز اضافه شد (جدول ۲).

در این مرحله از بهترین تیمارهای مرحله

شمارش سلول‌های مخمر

از لام هموسیتمتر نئوبار به منظور شمارش سلول‌های مخمر استفاده شد. بدین منظور، قبل از برداشت زیست‌توده مخمر، نمونه تکان داده شد تا کاملاً همگن شود. سپس مقدار ۱ میلی‌لیتر از نمونه حاوی مخمر به درون بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد و با استفاده از آب مقطر دیونیزه به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسید تا رقیق‌سازی نمونه انجام شود. شمارش سلول‌های مخمر با استفاده از لام نئوبار در زیر میکروسکوپ انجام شد (Wang et al., 2021).

اندازه‌گیری زیست‌توده، استخراج چربی و تعیین میزان اسید چرب مخمر

نمونه‌های مخمر در ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (5417R, Eppendorf, آلمان) شدند. توده مخمر پس از سانتریفیوژ با سرم فیزیولوژی شست‌وشو داده شد و بعد از توزین زیست‌توده به درون ظروف شیشه‌ای ۱۵ میلی‌لیتری با درب پیچی تفلون‌دار منتقل شد. برای استخراج چربی از روش Leiboritz و همکاران (۱۹۸۷) استفاده شد. در این روش از اتر به عنوان ماده حلال موثر استفاده شد. به هر نمونه ۱۰ میلی‌لیتر اتر افزوده شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴۰ درجه

سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شد. بعد از گذشت مدت زمان انکوباسیون، محلول حاوی اتر به ظرف جدیدی انتقال داده شد. تمام این مراحل برای بار دوم تکرار شد. پس از تبخیر اتر، چربی استخراج شده در کف ظرف باقی مانده و توزین شد. از این طریق، درصد چربی تام هر نمونه اندازه‌گیری شد. برای سنجش اسیدهایی چرب از دستگاه کروماتوگرافی گازی (7890B, Agilent, آمریکا) استفاده شد. دستگاه مجهز به ستون موئین با ابعاد ۵۰ متر و ۲۵ میکرومتر بود. به ۱ گرم از زیست‌توده، ۵ میلی‌لیتر محلول برابر اتانول و تولوئن و ۰/۱ میلی‌لیتر محلول استاندارد داخلی حاوی اسید چرب حل شده در ایزواکتان اضافه شد و به شدت به هم زده شد. مقدار ۵ میلی‌لیتر از محلول برابر استیل کلرید و متانول به عنوان عامل استریفیکاسیون افزوده شد. در ظروف محکم بسته شد و هر ظرف در حمام آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار داده شد و در این مدت هر ۱۰ دقیقه یک بار تکان داده شد. بعد از آن، لوله‌ها به آرامی از داخل آب جوش خارج و در دمای محیط سرد شد. سپس مقدار ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه و ۵ میلی‌لیتر هگزان اضافه شد. محتویات لوله به شدت مخلوط شد و در ۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. به وسیله یک

میکروبیپت و با دقت فراوان، فاز رویی برداشته و به لوله‌های جدید انتقال داده شد. سپس با استفاده از فیلتر سولفات سدیم آب‌گیری و به بالن‌های گلابی‌شکل منتقل شد. با استفاده از روتاتور (Heidolph، آلمان) نسبت به تغلیظ نمونه‌ها اقدام شد. از عصاره به دست آمده، مقدار ۰/۴ میکرولیتر به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) معنی‌دار بودن اختلاف موجود بین میانگین تیمارهای آزمایشی مشخص و سپس با استفاده از پس‌آزمون دانکن (Duncan) تفاوت بین تیمارها در سطح اعتماد ۹۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انجام تحلیل‌های آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ استفاده شد و نمودارها در نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 رسم شد.

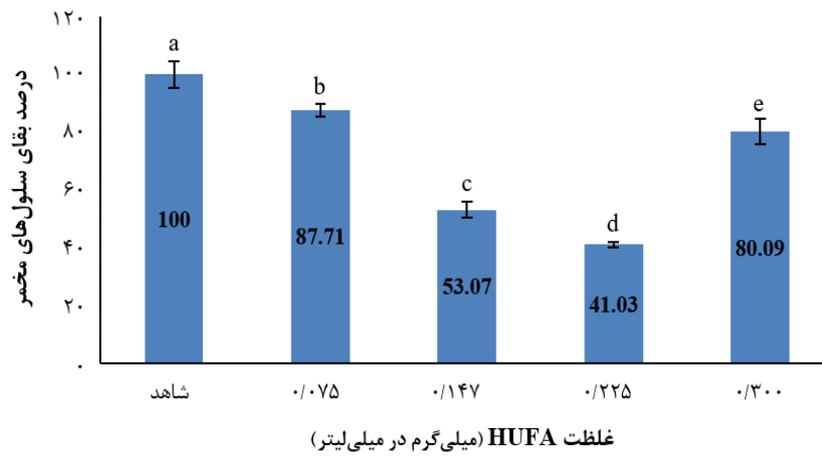
نتایج

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در برخی غلظت‌ها نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم می‌توانند موجب تحریک رشد مخمر شوند. نانوذرات در

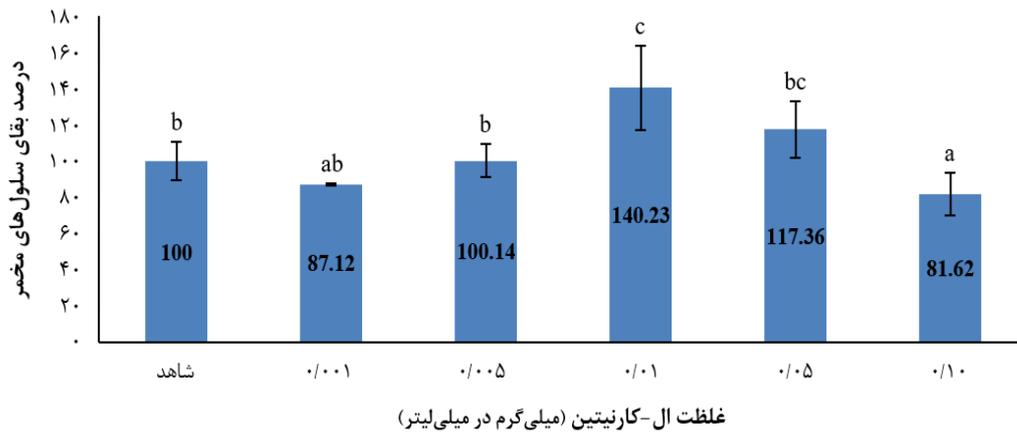
کشت انفرادی مخمر باعث افزایش ۱۶/۱۲ درصدی تراکم سلول‌های مخمر نسبت به تیمار شاهد شدند. افزایش غلظت نانوذرات TiO_2 در محیط، اثر این ماده را بر تحریک و رشد سلول‌های مخمر تشدید کرد. در کشت سلول‌های مخمر با ترکیبی از TiO_2 و ال-کارنیتین مشاهده شد که رشد این سلول‌ها نسبت به سلول‌های تیمار شاهد روند کاهشی داشت و این مقدار برابر با ۳/۳ درصد بود. سلول‌های مخمر در محیط کشت حاوی ال-کارنیتین افزایش رشد ۵/۲۹۴ درصدی را از خود نشان دادند. بیشترین و کمترین تاثیر در رشد سلول‌های مخمری که با ال-کارنیتین تیمار شده بودند به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. HUFA به تنهایی دارای اثر منفی در رشد سلول‌های مخمر بود، تنها در برخی از غلظت‌ها اثر منفی این ماده بر سلول‌های نمونه نسبت به غلظت‌های دیگر کمتر بود (۰/۰۷۵ و ۰/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر HUFA). میانگین درصد بقای سلول‌های مخمر در تیمار حاوی HUFA برابر با ۶۵/۴۷ درصد بود که نسبت به تیمار شاهد ۳۴/۵۳ درصد رشد این سلول‌ها در حضور HUFA کاهش یافت. تیمار مخمر با ۰/۲۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از HUFA بیشترین تاثیر را در کاهش رشد و

بعد از بررسی سلول‌های رشد یافته مخمر در محیط‌های کشت مختلف و شمارش آنها با لام هموسیتومتر مشخص شد که سلول‌های مخمر در محیط کشت حاوی HUFA نه تنها تحت تاثیر این ماده افزایش نیافته بودند، بلکه کاهش در تعداد سلول‌های مخمر مشاهده شد ($P < 0/05$). شکل ۱ بیانگر مقایسه میزان رشد سلول‌های مخمر در تیمارهای مختلفی از HUFA است. نتایج میزان تکثیر سلول‌های مخمر در محیط کشت حاوی ال-کارنیتین در شکل ۲ ارائه شده است. پس از گذشت مدت زمان ۴۸ ساعت از حضور مخمر در محیط کشت انفرادی حاوی ال-کارنیتین، بررسی مشاهدات چنین نشان داد که بیشترین میزان رشد مخمر به ترتیب مربوط به تیمارهای ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که با تیمار شاهد و دیگر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$). در بررسی تاثیر نانوذرات TiO_2 ، تاثیر معنی‌دار و مثبتی بر تعداد سلول‌های مخمر در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد که این اختلاف نزدیک به ۸۰ درصد بیشتر از تیمار شاهد بود ($P < 0/05$). این در حالی است که در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر روند کاهشی در تعداد سلول‌های مخمر مشاهده شد (شکل ۳).

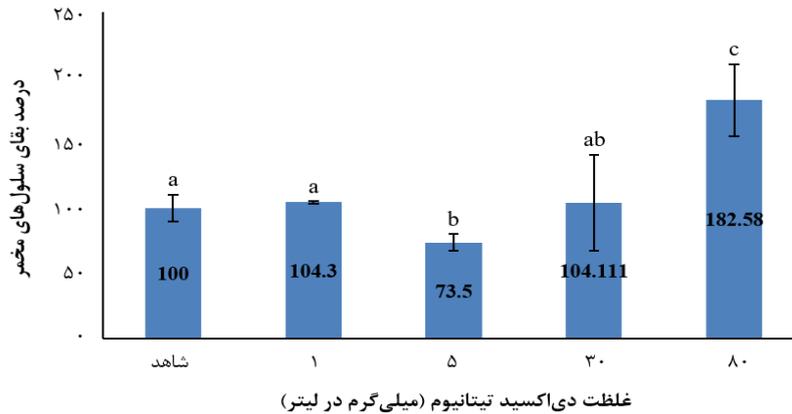
بازماندگی این سلول‌ها نسبت به تیمار شاهد از خود نشان داد. با این حال، در بین نمونه‌ها آنهایی که در معرض ۰/۰۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از HUFA قرار گرفته بودند نسبت به بقیه غلظت‌های مورد استفاده، سلول‌های مخمر کمتر کاهش رشد داشتند. در کشت ترکیبی سلول‌های مخمر به همراه HUFA و لسیتین، نتایج نشان داد که رشد سلول‌ها در این تیمار نسبت به سلول‌های موجود در تیمار شاهد افزایش ۴۵/۶ درصدی داشت است. ال-کارنیتین نسبت به HUFA به طرز قابل ملاحظه‌ای اثر افزایشی در تحریک سلول‌های مخمر از خود نشان داد. این بدان معناست که تیمارهایی که ال-کارنیتین را دریافت کرده بودند نسبت به نمونه‌هایی که آن را دریافت نکرده بودند، بیشترین رشد و بقا را از خود نشان دادند (۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ال-کارنیتین). در بررسی تاثیر ترکیبی HUFA، ال-کارنیتین و لسیتین نیز مشخص شد که این مواد نیز می‌توانند تا حدودی موجب تحریک رشد در سلول‌های مخمر شوند، در حالی که در برخی از غلظت‌ها اثر مهارکننده شدیدی بر روی مخمرها داشت و در برخی غلظت‌های میانه توانست این اثر را به صورت مزمین اعمال کند.



شکل ۱: مقایسه میزان رشد سلول‌های مخمر در محیط HUFA پس از ۴۸ ساعت (میانگین \pm انحراف معیار). حروف لاتین متفاوت روی نمودار نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است ($P < 0.05$).



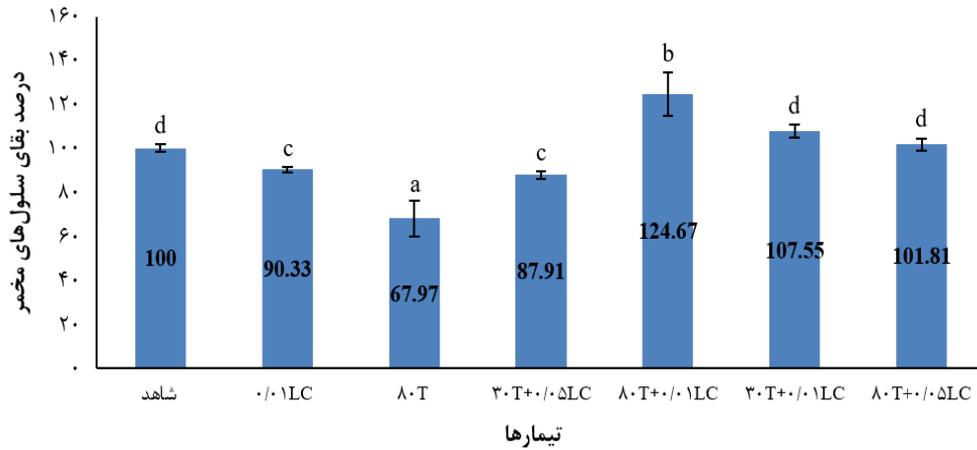
شکل ۲: مقایسه میزان رشد سلول‌های مخمر در محیط ال-کارنیتین پس از ۴۸ ساعت (میانگین \pm انحراف معیار). حروف لاتین متفاوت روی نمودار نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است ($P < 0.05$).



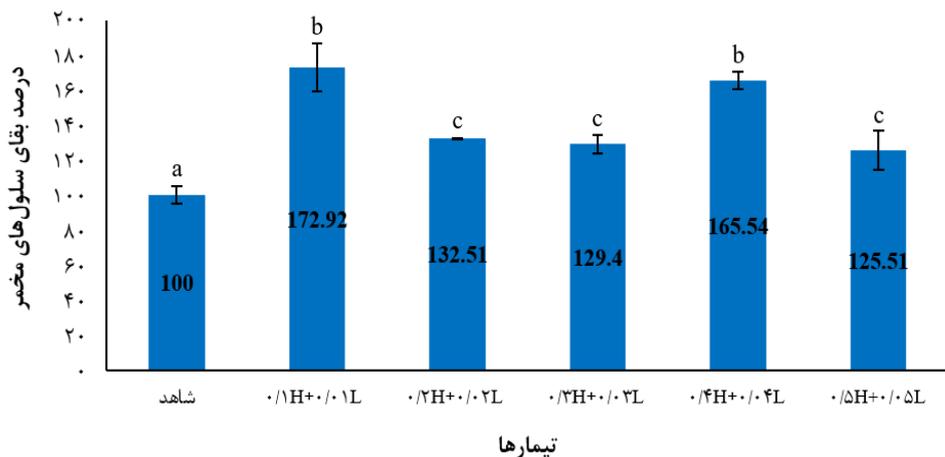
شکل ۳: مقایسه میزان رشد سلول‌های مخمر در محیط نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم پس از ۴۸ ساعت (میانگین \pm انحراف معیار). حروف لاتین متفاوت روی نمودار نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است ($P < 0.05$).

مخمر در طول دوره و در غلظت‌های مختلف به طور موثری افزایش یافت (شکل ۵). نتایج بررسی میزان اسیدهای چرب در بین نمونه‌های تیمارهای مختلف (جدول ۳) نشان داد که بهترین میزان از اسیدهای چرب در تیمار غنی شده با HUFA دیده شد. لازم به یادآوری است که این میزان از اسید چرب در تیماری که حاوی اسید چرب بود دور از انتظار نیست. با این حال، در تیمارهای غنی شده با ال-کارنیتین نیز این مقدار افزایش یافت که نشان از سوخت و ساز اسیدهای چرب در مخمر دارد. این در حالی است که هیچ نوع اسید چربی به محیط کشت افزوده نشده بود.

در بررسی تاثیر مواد مورد مطالعه به صورت ترکیبی بر رشد سلول‌های مخمر، اثر نانوذرات TiO_2 به همراه ال-کارنیتین در محیط کشت ترکیبی، بهترین افزایش تراکم در سلول‌های مخمر در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به همراه ۰/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ال-کارنیتین مشاهده شد (شکل ۴). نکته جالب توجه اینجا است که غلظت‌های به کار رفته در کشت ترکیبی، همان غلظت‌های موثر در کشت منفرد بود که در تاثیر ترکیبی تا حدودی اثر یکدیگر را خنثی کردند و این امر باعث شد که اختلاف آماری تا حدودی کاهش پیدا کند. درباره تاثیر HUFA به همراه لسیتین می‌توان چنین اظهار داشت که رشد سلول‌های



شکل ۴: مقایسه میزان رشد سلول‌های مخمر در محیط ال-کارنیتین + نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم پس از ۴۸ ساعت (میانگین \pm انحراف معیار). حروف لاتین متفاوت روی نمودار نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است ($P < 0.05$). LC: ال-کارنیتین (میلی‌گرم در میلی‌لیتر). T: دی‌اکسید تیتانیوم (میلی‌گرم در لیتر).



شکل ۵: مقایسه میزان رشد سلول‌های مخمر در محیط HUFA + لسیتین پس از ۴۸ ساعت (میانگین \pm انحراف معیار). حروف لاتین متفاوت روی نمودار نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است ($P < 0.05$). H: HUFA (میلی‌گرم در میلی‌لیتر). L: لسیتین (میلی‌گرم در میلی‌لیتر).

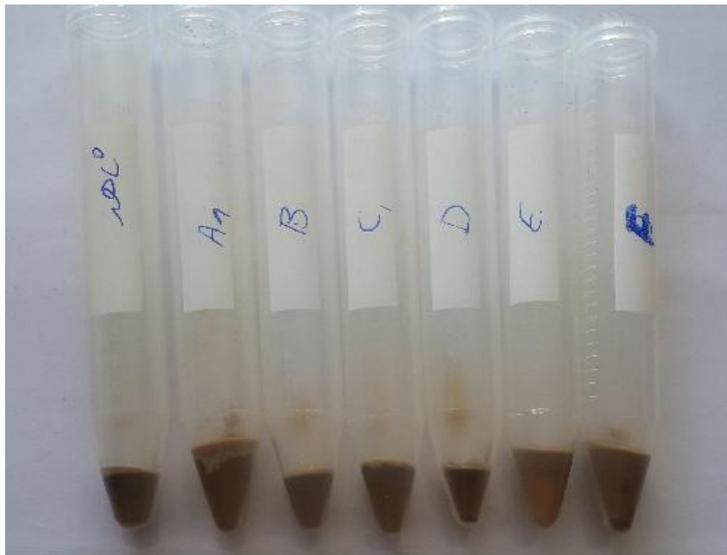
جدول ۳: درصد اسیدهای چرب مخمر کشت داده شده در محیط‌های موفق (میانگین \pm انحراف معیار)

تیمار				شاهد	نام	اسید چرب (%)
+HUFA لسیتین +۰/۱mg/mL (۰/۰۱mg/mL)	+TiO ₂ ال-کارنیتین +۸۰mg/L (۰/۰۱mg/mL)	TiO ₂ (۸۰mg/L)	ال-کارنیتین (۰/۰۱mg/mL)			
SFA						
۳/۵۵ $\pm 0/17^c$	۵/۳۴ $\pm 0/12^e$	۱/۵۵ $\pm 0/07^b$	۴/۳۳ $\pm 0/46^d$	۱/۱۰ $\pm 0/63^a$	مرستیک اسید	C14:0
۱۸/۷۵ $\pm 0/45^a$	۳۴/۳۲ $\pm 0/17^c$	۲۲/۰۲ $\pm 1/45^b$	۴۳/۳۶ $\pm 1/47^d$	۴۹/۴۳ $\pm 1/1^e$	پالمیتیک اسید	C16:0
۴/۸۰ $\pm 0/74^d$	۶/۰۵ $\pm 0/03^e$	۱/۰۲ $\pm 0/22^a$	۳/۵۱ $\pm 0/22^c$	۱/۱۰ $\pm 0/19^b$	استئاریک اسید	C18:0
۰/۲۴ $\pm 0/03^b$	ND	۰/۰۶ $\pm 0/05^a$	۰/۲۱ $\pm 0/02^b$	ND	آراشیدیک اسید	C20:0
۰/۲۱ $\pm 0/02^c$	ND	۰/۰۳ $\pm 0/01^a$	۰/۰۶ $\pm 0/02^b$	ND	بهنیک اسید	C22:0
MUFA						
۰/۱۰ $\pm 0/01^a$	۰/۱۰ $\pm 0/01^a$	۳/۳۴ $\pm 2/56^b$	ND	ND	میرستولیک اسید	C14:1n5
۰/۴۲ $\pm 0/09^b$	۰/۲۱ $\pm 0/03^a$	۰/۷۷ $\pm 0/22^c$	۰/۵۲ $\pm 0/02^c$	۲/۱۴ $\pm 1/04^d$	پالمیتولیک اسید	C16:1n7
۲۹/۱۴ $\pm 1/30^b$	۳۴/۳۱ $\pm 3/11^c$	۲۵/۵۰ $\pm 0/56^a$	۲۴/۳۱ $\pm 0/71^a$	۳۸/۸۷ $\pm 2/10^c$	اولئیک اسید	C18:1n9
۲/۳۸ $\pm 0/28^b$	۲/۰۳ $\pm 0/12^b$	۱/۶۴ $\pm 0/23^a$	۳/۸۸ $\pm 0/38^c$	۶/۲۲ $\pm 1/20^d$	واکسنیک اسید	C18:1n7
PUFA						
۱/۷۷ $\pm 0/06^c$	۱/۴۰ $\pm 0/02^b$	۱/۱۸ $\pm 0/21^a$	۱/۶۸ $\pm 0/04^c$	ND	لینولئیک اسید	C18:2n6
۱/۷۹ $\pm 0/03^c$	۱/۲۱ $\pm 0/02^b$	۰/۵۴ $\pm 0/24^a$	۲/۸۸ $\pm 0/02^d$	ND	آلفا-لینولئیک اسید	C18:3n3
ND	ND	ND	ND	ND	گاما-لینولئیک اسید	C18:3n6
ND	ND	ND	ND	ND	استاریدونیک اسید	C18:4n3
۰/۴۰ $\pm 0/01^a$	ND	۰/۴۵ $\pm 0/36^a$	۰/۳۵ $\pm 0/01^a$	ND	آراشیدونیک اسید	C20:4n6

۵/۳۰ ±۰/۱۲ ^c	۱/۲۲ ±۰/۰۳ ^a	۱/۴۵ ±۰/۰۲ ^a	۳/۲۶ ±۰/۰۲ ^b	ND	ایکوزاپنتانوئیک اسید	C20:5n3
ND	ND	ND	ND	ND	داکوزاپنتانوئیک اسید	C22:5n6
۱۰/۱۴ ±۰/۲۴ ^b	۲/۳۴ ±۰/۰۳ ^a	۲/۹۳ ±۰/۰۴ ^a	۹/۲۴ ±۰/۱۷ ^b	ND	داکوزاهگزانوئیک اسید	C22:6n3

SFA: اسیدهای چرب اشباع (Saturated Fatty Acid); MUFA: اسیدهای چرب غیراشباع با یک پیوند دوگانه
 PUFA: اسیدهای چرب غیراشباع با چند پیوند دوگانه (Polyunsaturated)
 Fatty Acid): ND: تعیین نشده (Not Determined).
 در هر ردیف، اعداد با حروف لاتین غیریکسان دارای اختلاف آماری معنی‌دار با یکدیگر هستند ($P < 0.05$).

در بررسی میزان زیست‌توده تولید شده در گرم و HUFA + لسیتین (۱/۰۱+۰/۱ میلی‌گرم تیمارهای مختلف، بیشترین میزان زیست‌توده مخمر در تیمارهای ۸۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات TiO₂ با وزن ۰/۶۴ گرم، ۰/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ال-کارنیتین با وزن ۰/۶۷ گرم در میلی‌لیتر) با وزن ۰/۷۵ گرم در مقایسه با تیمار شاهد (محیط کشت پایه) با وزن ۰/۴۵ گرم به دست آمد (شکل ۶).



شکل ۶: زیست‌توده تولید شده در تیمارهای نهایی مختلف مخمر

بحث

داده‌اند که افزودن HUFA به محیط کشت مخمر می‌تواند بهبود انتقال مواد مغذی و افزایش انعطاف‌پذیری غشای سلولی را در پی داشته باشد که به رشد بهتر و کارایی بیشتر تخمیر کمک می‌کند (Stewart, 2017). از طرفی لسیتین غیر از این که یک ماده طبیعی و امولسیفایر بسیار موفق برای حل کردن امولسیون‌های چربی در آب است، به عنوان یک فسفولیپید حیاتی در ساختار غشاهای سلولی شناخته می‌شود. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که اضافه کردن لسیتین به محیط کشت مخمر می‌تواند باعث بهبود پایداری غشای سلولی و کاهش اثرات تخریبی ناشی از استرس اکسیداتیو شود که این خود به افزایش سرعت تکثیر و بازدهی زیستی مخمر منجر می‌شود (Nielsen et al., 2019).

بر اساس این مطالعه و همسو با گزارش‌های بالا، هم‌افزایی میان TiO_2 ، ال-کارنیتین، HUFA و لسیتین به دلیل تاثیر مشترک این ترکیبات بر افزایش انتقال مواد مغذی، بهبود متابولیسم سلولی، تثبیت غشای سلولی و کاهش استرس اکسیداتیو رخ می‌دهد. به نظر می‌رسد نانوذرات TiO_2 می‌تواند فعالیت آنزیم‌های متابولیکی را افزایش دهد، در حالی که ال-کارنیتین به بهبود تولید انرژی کمک می‌کند.

مطالعات نشان داده‌اند نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم می‌توانند تاثیر مثبتی بر رشد مخمر داشته باشند. بر اساس منابع موجود به نظر می‌رسد نانوذرات با تغییر نفوذپذیری غشای سلولی و افزایش استرس اکسیداتیو قابل کنترل باعث تحریک رشد سلول‌ها می‌شوند (Ono and Iwahashi, 2022). به طور خاص، گزارش شده است که TiO_2 در غلظت‌های مناسب می‌تواند باعث افزایش سرعت تقسیم سلولی و بهبود تولید زیستی شود، هرچند غلظت‌های بالا ممکن است اثرات سمی داشته باشند (Chen et al., 2022). اما ال-کارنیتین که به عنوان تنظیم‌کننده متابولیسم اسیدهای چرب در سلول‌ها شناخته شده است می‌تواند در محیط موجب افزایش تولید ATP در سلول شود (Wang et al., 2003) که این امر به تقویت رشد و بقای سلول‌های مخمر کمک می‌کند. علاوه بر این، ال-کارنیتین باعث کاهش استرس اکسیداتیو شده و به پایداری ساختار غشای سلولی کمک می‌کند، که خود به افزایش سرعت تکثیر مخمر منجر می‌شود. از طرفی مطالعات نشان داده است اسیدهای چرب HUFA دارای نقش‌های زیستی مهم در تنظیم عملکرد غشای سلولی هستند. گزارش‌ها نشان

مربوط به نقش ال-کارنیتین در انتقال اسیدهای چرب به درون میتوکندری سلول‌های مخمر دانست که این امر در نهایت می‌تواند رشد سلول‌های مخمر را به طرز مثبتی افزایش دهد. ال-کارنیتین با تحریک بتا-اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری و کاهش تجمع رادیکال‌های آزاد، موجب بهبود متابولیسم انرژی و رشد میکروارگانیسم‌ها شود. از طرف دیگر، در غلظت‌های بیشتر از ال-کارنیتین اثر این ماده بر افزایش رشد سلول‌های مخمر کاهش می‌یابد. این امر می‌تواند ناشی از اشباع شدن مسیرهای متابولیکی باشد (Franken and Bauer, 2010).

در این پژوهش مشخص شد که استفاده از غلظت‌های زیاده‌تر از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، نسبت به غلظت‌های کمتر، موجب افزایش قابل توجه تعداد سلول‌های مخمر شد. این مسئله بیانگر اثر وابسته به غلظت نانوذرات TiO_2 است، به طوری که در غلظت‌های مناسب می‌تواند به عنوان محرک رشد عمل کند. این یافته با مطالعاتی که نقش نانوذرات مختلف را در بهبود رشد میکروارگانیسم‌ها از طریق افزایش جذب نور و یا فعالیت‌های کاتالیتیکی سطحی بررسی کردند، مطابقت دارد (Sukmanowski et al., 2005). کاهش رشد سلول‌های مخمر در

همچنین HUFA موجب انعطاف‌پذیری بیشتر غشای سلولی می‌شود، در حالی که لسیتین نقش پایداری ساختار سلولی را ایفا می‌کند. این اثرات ترکیبی، باعث افزایش سرعت تکثیر و بهبود تولید زیستی در مخمر می‌شود.

در این پژوهش، نتایج به دست آمده از شمارش سلولی حاکی از آن بود که HUFA به تنهایی، نه تنها رشد سلول‌های مخمر را افزایش نداد، بلکه باعث کاهش معناداری در تعداد سلول‌ها شد. کاهش در تعداد سلول‌های مخمر به احتمال زیاد به علت اثرات سمی یا مهارکننده برخی از اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیره بر ساختار سلولی و مسیرهای متابولیکی مخمر باشد. این امر به این دلیل اتفاق می‌افتد که در محیط کشت مخمرها اگر عوامل آنتی‌اکسیدان وجود نداشته باشد، سمیت اکسیداتیو ناشی از HUFA منجر به مهار رشد در سلول‌های مخمر می‌شود. از طرفی احتمالاً مخمر در جذب اسیدهای چرب خوب نیز به دلیل عدم استفاده از امولسیفایرها مشکل داشت.

بررسی تاثیر ال-کارنیتین در این پژوهش نشان داد که این ترکیب در غلظت‌های کمتر به ویژه ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به طور معنی‌داری باعث افزایش رشد در سلول‌های مخمر شد. مشاهده چنین نتیجه‌ای را می‌توان

ترکیب اسیدهای چرب با لسیتین، باعث افزایش قابل توجه رشد سلول‌های مخمر در غلظت‌های مختلف شد. می‌توان چنین نتیجه گرفت که لسیتین با امولسیون کردن ذرات بزرگ چربی موجب شده است که اسیدهای چرب در ذرات ریزتر قابلیت عبور از غشای سلول را داشته باشند و در نهایت رشد سلول‌های مخمر را بهبود بخشیده‌اند. افزایش اسیدهای چرب در تیمار HUFA قابل پیش‌بینی بود و توانست موفقیت غنی‌سازی مخمر را نشان دهد. با این حال، حضور نسبی اسیدهای چرب در تیمارهای ال-کارنیتین بدون افزودن مستقیم لیپید به محیط، نقش این ترکیب را در فعال‌سازی مسیرهای اندوژن آنابولیسم و کاتابولیسم لیپیدها نشان می‌دهد. نتایج مطالعات پیشین ما نشان داده بود که در صورت غنی‌سازی مخمر یا دستکاری آن با حذف لایه پروتئینی که موجب هضم بهتر مخمر می‌شود، رشد و بقای بیشتر آرتیمیا تضمین می‌شود (ثبت اختراع داخلی به شماره ۸۷۷۱۵).

بررسی میزان زیست‌توده تولیدی چنین نشان داد که تیمارهای حاوی نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و ال-کارنیتین و ترکیب HUFA با لسیتین به ترتیب منجر به تولید بیشترین وزن زیست‌توده شدند که این موضوع

غلظت‌های کم این مسئله را بیان می‌کند که استفاده از غلظت‌های زیر آستانه ممکن است نه تنها فاقد اثر مثبت در رشد جاندار باشد، بلکه می‌تواند به دلیل داشتن تعاملات نامناسب با سلول‌ها اثر مهاری و حتی سمی نیز داشته باشد. در کشت ترکیبی مخمر *Saccharomyces cerevisiae* زیادترین افزایش تراکم سلولی، مربوط به ترکیب نانوذرات TiO_2 (در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر) و ال-کارنیتین (در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بود. هرچند اثر هم‌افزایی کامل بین این دو ماده مشاهده نشد و تا حدودی اثرات آنها یکدیگر را تعدیل کردند، اما همچنان این ترکیب بهترین نتیجه را در میان تیمارهای ترکیبی نشان داد. چنین نتیجه‌ای این مسئله را می‌تواند روشن کند که ترکیبات نانوذرات و مکمل‌های آلی ممکن است با توجه به شرایط محیطی و نوع میکروارگانیسم پاسخ‌های متفاوتی را ایجاد کند. در مطالعه Brown و همکاران (۲۰۱۲) مشخص شد که نانوذرات نقره به تنهایی روی ایزوله‌های مقاوم *Pseudomonas aeruginosa* و *Enterobacter aerogenes* اثر دارد و هنگام ترکیب با آمپی‌سیلین قدرت بیشتری خواهد داشت (Brown et al., 2012).

2020). به طور کلی می‌توان گفت در مواردی که مخمرها رشد کندی در محیط‌های کشت عمومی دارند می‌توان این مواد را به محیط‌های کشت افزود و رشد آنها را تحریک کرد. در مجموع، یافته‌های این پژوهش و مقایسه با نتایج مشابه در مطالعات قبلی نشان داد که نانوذرات، تنظیم‌کننده‌های متابولیسم و ترکیبات فسفولیپیدی همگی به بهبود رشد و عملکرد سلولی در سیستم‌های زیستی کمک می‌کنند. ترکیب نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم، ال-کارنیتین، HUFA و لسیتین باعث یک اثر هم‌افزایی چندجانبه می‌شود که می‌تواند در توسعه فرایندهای زیستی جدید در صنعت تخمیر و زیست‌فناوری کاربرد داشته باشد. پژوهش‌های آینده می‌توانند این هم‌افزایی را با مطالعات تجربی دقیق‌تر تایید کنند و مسیرهای بهینه‌سازی این فناوری را بیشتر آشکار سازند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با استفاده از اعتبارات صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران نهاد ریاست جمهوری و با همکاری و حمایت دانشگاه ارومیه انجام شده است. بدین وسیله، نویسندگان قدردانی خود را از سازمان‌های نامبرده شده اعلام می‌دارند.

تطابق بالایی با داده‌های به دست آمده از شمارش سلول‌ها و نتایج رشد دارد. این نتایج نشان‌دهنده توان زیاد این ترکیبات در بهبود تولید زیستی مخمرها است که می‌تواند در کاربردهای صنعتی به‌ویژه تولید مکمل‌های زیستی، بیوتکنولوژی، غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده همزمان از نانوذرات، اسیدهای چرب و ال-کارنیتین می‌تواند تاثیر بسیار خوبی در تولید زیست‌توده سلول‌های مخمر داشته باشد به طوری که می‌توان در مقادیر مناسب از این مواد در محیط‌های کشت آماده برای تکثیر مخمرها استفاده کرد. موجودات مختلف ریزمانند آرتمیا، روتیفر و مخمر به عنوان غذای گونه‌های بسیاری از آبزبان، مورد استفاده قرار می‌گیرند و در این بین ارزش غذایی یکی از مهم‌ترین عوامل انتخاب غذای زنده و یا غیر زنده برای جانداران است. در بیشتر مطالعات قبلی مشخص شد که رژیم غذایی به تنهایی شامل مخمر نانویی منجر به کسب نتایج نسبتاً ضعیفی در پرورش آرتمیا می‌شود. با توجه به نامطلوبی نتایج در تغذیه آرتمیا با مخمر نانویی، تحقیقات دامنه‌داری در رابطه با غنی‌سازی و دستکاری‌های لازم روی مخمرها انجام شده است (Shekarchi et al.,

منابع

- Aguedo M., Beney L., Wache Y., Belin J.M. and Gervais P. 2002.** Interaction of odorous lactones with phospholipids: Implications in toxicity towards producing yeast cells. *Biotechnology*, 24: 1975–1979. doi: 10.1023/A:1021129800080
- Aoki H., Miyamoto N., Furuya Y., Mankura M., Endo Y. and Fujimoto K. 2002.** Incorporation and accumulation of docosa-hexaenoic acid from the medium by *Pichia methanolica* HA-32. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 66: 2632–2638. doi: 10.1271/bbb.66.2632
- Ayiku S., Shen J., Tan B., Dong X. and Liu H. 2020.** Effects of dietary yeast culture on shrimp growth, immune response, intestinal health and disease resistance against *Vibrio harveyi*. *Fish and Shellfish Immunology*, 102: 286–295. doi: 10.1016/j.fsi.2020.04.036
- Baruah K., Ranjan J., Sorgeloos P. and Bossier P. 2010.** Efficacy of heterologous and homologous heat shock protein 70s as protective agents to *Artemia franciscana* challenged with *Vibrio campbellii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 1(29): 733–739. doi: 10.1016/j.fsi.2010.07.011
- Bossie M.A. and Martin C.E. 1989.** Nutritional regulation of yeast delta-9 fatty acid desaturase activity. *Journal of Bacteriology*, 171(12): 6409–6413. doi: 10.1128/jb.171.12.6409-6413.1989
- Brown A.N., Smith K., Samuels T.A., Lu J., Obare S.O. and Scott M.E. 2012.** Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8): 2768–2774. doi: 10.1128/AEM.06513-11
- Chen B., Pan Y., Chen Y., Zhang Z., Yang Z., Zheng M., Lu T., Jiang L. and Qian H., 2022.** TiO₂ nanoparticles exert an adverse effect on aquatic microbial communities. *Science of the Total Environment*, 831: 1–11 (154942). doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.154942
- Chen Y., Sun Z., Liang Z., Xie Y., Su J., Luo Q., Zhu J., Lin Q., Han T. and Wang A. 2020.** Effects of dietary fish oil replacement by soybean oil and L-carnitine supplementation on growth performance, fatty acid composition, lipid metabolism and liver health of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides*. *Aquaculture*, 520: 734596. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734596
- Daghan H. 2018.** Effects of TiO₂ nanoparticles on maize (*Zea mays*

- L.) growth, chlorophyll content and nutrient uptake. *Applied Ecology and Environmental Research*, 16: 6873–6883. doi: 10.15666/aeer/1605_68736883
- Duan L.L., Shi Y., Jiang R., Yang Q., Wang Y.Q., Liu P.T., Duan C.Q. and Yan G.L. 2015.** Effects of adding unsaturated fatty acids on fatty composition of *Saccharomyces cerevisiae* and compounds in wine on fatty acid major volatile. *South Africa of Enology and Viticulture*, 36(2): 285–295. doi: 10.21548/36-2-962
- Ernesto Cesena C., Vega-Villasante F., Aguirre-Guzman G., Luna-Gonzalez A. and Campa-Cordova A. 2021.** Update on the use of yeast in shrimp aquaculture: A minireview. *International Aquatic Research*, 13(1): 1–16. doi: 10.22034/iar.2021.1904524.1066
- Ferraz L., Sauer M., Sousa M.J. and Branduardi P. 2021.** The plasma membrane at the cornerstone between flexibility and adaptability: Implication for *Saccharomyces cerevisiae* as a cell factory. *Frontiers in Microbiology*, 12: 1–11 (715891). doi: 10.3389/fmicb.2021.715891
- Franken J. and Bauer F.F. 2010.** Carnitine supplementation has protective and detrimental effects in *Saccharomyces cerevisiae* that are genetically mediated. *FEMS Yeast Research*, 10(3): 270–281. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00610.x
- Gojznikar J., Zdravkovic B., Vidak M., Leskosek B. and Ferk P. 2022.** TiO₂ nanoparticles and their effects on eukaryotic cells: A double-edged sword. *International Journal of Molecular Science*, 15(23): 1–18 (12353). doi: 10.3390/ijms232012353
- Hoppel C. 2003.** The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *American Journal of Kidney Diseases*, 41: 4–12. doi: 10.1016/S0272-6386(03)00112-4
- Hosseini H.R., Manaffar R. and Ghojaie M. 2017.** The effect of zinc oxide nanoparticles and ethanol extracts of hyssop (*Hyssopus officinalis*) on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Animal Environment*, 9(2): 297–304.
- Jessina G.F., Jaculine-Pereira J. and Petchimuthu M. 2022.** Yeast in aquaculture. *Biotica Research Today*, 4(12): 857–859.
- Khataee A. and Mansoori G.A. 2011.** Nanostructured Titanium Dioxide Materials: Properties, Preparation and Applications. World Scientific Publishing Company, Singapore. 189P. doi: 10.1142/8325
- Leiboritz H.E., Benqrson D.A., Mouqle P.D. and Simpson K.L. 1987.** Effects of *Artemia* lipid function on growth and survival of

- larval in land liver sides. P: 469–476. In: Sorgeloss P., Begtson D.A., Deelier W. and Japers E. (Eds.). *Artemia Research and its Application*. University Press, Belgium.
- Ma Y., Liu Z., Hao L., Wu J., Qin B., Liang Z., Ma J., Ke H., Yang H., Li Y. and Cao J. 2022.** Oral vaccination using *Artemia* coated with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing cyprinid herpesvirus-3 envelope antigen includes protective immunity in common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) larvae. *Research in Veterinary Science*, 130: 184–192. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.03.013
- Mokhtarnejad L. and Farzaneh M. 2020.** A review on yeast roles and applications on biological control of plant diseases [In Persian]. *Biocontrol in Plant Protection*, 8(1): 137–157. doi: 10.22092/bcpp.2020.124040
- Nielsen J. 2019.** Yeast cells handle stress by reprogramming their metabolism. *Nature*, 572: 184–185. doi: 10.1038/d41586-019-02288-y
- Ono Y. and Iwahashi H. 2022.** Titanium dioxide nanoparticles impart protection from ultraviolet irradiation to fermenting yeast cells. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 30: 1–5 (101221). doi: 10.1016/j.bbrep.2022.101221
- Patnaik P., Nady N., Barlit H., Guihan A. and Labunskyy V.M. 2024.** Lifespan regulation by targeting heme signaling in yeast. *GeroScience*, 46(5): 5235–5245. doi: 10.1007/s11357-024-01218-9
- Perricone V., Sandrini S., Irshad N., Savoini G., Comi M. and Agazzi A. 2022.** Yeast-derived products: the role of hydrolyzed yeast and yeast culture in poultry nutrition, a review. *Animals*, 12(11): 1–20 (1426). doi: 10.3390/ani12111426
- Pitt J.I. and Hocking A.D. 1997.** *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional, UK. 520P. doi: 10.1007/978-0-387-92207-2
- Pourbozorgi-Rudsari N., Madadkar-Haghjou M. and Ghiasvand A. 2022.** Physiological responses of *Spirulina plantensis* to nanoparticles of TiO₂ and citrate [In Persian]. *Iranian Journal of Plant Biology*, 14(1): 39–62. doi: 10.22108/ijpb.2023.135148.1297
- Seifi M.M., Iranmanesh E., Asadollahi M.A. and Arpanaei A. 2020.** Biotransformation of benzaldehyde into l-phenylacetyl carbinol using magnetic nanoparticles-coated yeast cells. *Biotechnology Letters*, 42(4): 597–603. doi: 10.1007/s10529-020-02798-0
- Serov D.A., Gritsaeva A.V., Ynbaev F.M., Simakin A.V. and Gudkov S.V. 2024.** Review of antimicrobial properties of titanium dioxide nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(19): 1–

- 51 (10519). doi: 10.3390/ijms251910519
- Shekarchi B., Nekuei-Fard A. and Manaffar R. 2020.** Feeding *Artemia* larvae with yeast heat shock proteins 82 (HSPs82) to enhance the resistance against abiotic stresses (hyperosmotic and high temperature). Iranian Journal of Fisheries Science, 19(1): 19–30. doi: 10.22092/ijfs.2019.118229
- Stewart G.G. 2017.** The structure and function of the yeast cell wall, plasma membrane and periplasm. P: 55–75. In: Stewart G.G. (Ed.). *Brewing and Distilling Yeasts. The Yeast Handbook.* Springer, Switzerland. doi: 10.1007/978-3-319-69126-8_5
- Sukmanowski J., Viguie J.R., Nolting B. and Royer F.X. 2005.** Light absorption enhancement by nanoparticles. Journal of Applied Physics, 97(10): 1–7. doi: 10.1063/1.1899249
- Usatii A., Chiselita N. and Efremova N. 2016.** The evaluation of nanoparticles ZnO and TiO₂ effects on *Saccharomyces cerevisiae* CNMN-Y-20 yeast strain. Acta Universitatis Cibiniensis Series (E), 85: 85–92. doi: 10.1515/auaft-2016-0007
- Vibhute P., Jaabir M. and Sivakamavalli J. 2023.** Applications of nanoparticles in aquaculture. P: 127–155. In: Kirthi A.V., Loganathan K. and Karunasagar I. (Eds.). *Nanotechnological Approaches to the Advancement of Innovations in Aquaculture.* Springer, Switzerland. doi: 10.1007/978-3-031-15519-2_8
- Wang R., Lorantfy B., Fusco S., Olson L. and Franzen C.J. 2021.** Analysis of methods for quantifying yeast cell concentration in complex lignocellulosic fermentation processes. Scientific Reports, 11(1): 1–12 (11293). doi: 10.1038/s41598-021-90703-8
- Wang J., Du R., Qin J., Wang S., Wang W., Li H. and Pang Q. 2003.** Effect of yeast chromium and L-carnitine on lipid metabolism of broiler chickens. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 16(12): 1809–1815. doi: 10.5713/ajas.2003.1809
- Zhang L., Zhang P., Tan P., Zu D., Wang L., Ding Z. and Shao Q. 2024.** *Yarrowia lipolytica* as a promising protein source for pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) diet: Impact on growth performance, metabolism, antioxidant capacity, and apparent digestibility. Frontiers in Marine Science, 11: 1–12 (1370371). doi: 10.3389/fmars.2024.1370371



Research Paper

Synergistic effects of titanium dioxide nanoparticles, L-carnitine, HUFA and lecithin on the proliferation of industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Ramin Manaffar^{1*}, Kobra Khanivash², Hediye Yazdani³, Ramon Vardeh⁴

DOI: 10.22124/japb.2025.28879.1556

Received: November 2024

Accepted: July 2025

Abstract

The possibility of stimulating the proliferation of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells by adding titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles, HUFA, lecithin and L-carnitine was investigated in this study. After initial activation in the basal culture medium, the yeast was first individually exposed to different concentrations of these substances, and the best concentrations were selected. Then, the best individual concentrations were used to investigate the combined effect of these substances on yeast growth. In both stages, the rate of yeast cell proliferation was measured by measuring the number of cells obtained and the amount of biomass produced, as well as the percentage of yeast fatty acids in the best treatments using gas chromatography. The results showed that TiO₂ at a concentration of 80mg/L significantly increased yeast proliferation. However, the best yeast growth in the presence of L-carnitine was related to concentrations of 0.01 and 0.05mg/mL. While HUFA alone did not have a good effect on yeast proliferation, the combination of HUFA with lecithin was able to have good results in yeast proliferation. Also, the combination of nanoparticles and L-carnitine was able to stimulate the proliferation of yeast cells (P<0.05). The study of the percentage of fatty acids of successful treatments showed that in all treatments, the amount of HUFA and PUFA was greatly improved compared to the control (P<0.05). However, in the study of biomass, the best individual treatment was obtained for L-carnitine with a weight of 0.67g and the combination treatment of HUFA with lecithin with 0.75g. The results of this study can be used for the cultivation of yeast types with low proliferation ability.

Key words: *Optimizing Industrial Proliferation, Lecithin, Yeast, Titanium Dioxide Nanoparticles, L-carnitine.*

1- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

2- M.Sc. in Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.

3- Ph.D. Student in Fisheries, Department of Production and Utilization of Aquatics, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

4- M.Sc. in Marine Biotechnology, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.

*Corresponding Author: R.manaffar@urmia.ac.ir