www.rifst.ac.ir/jrifst.aspx
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۳، جلد ۳، شماره ۳، صفحات ۲۲۶-۲۱۱

JRIFST

بررسی سینتیک و بهینه‌سازی شرایط رشد مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* به منظور تولید بیوامولسیفایر مانان با استفاده از پودر آب‌پنیر

جلال محمدزاده[۱]، فریده طباطبایی یزدی[۲]، سید علی مرتضوی[۳*]، رسول کدخدایی[۴]، آرش کوچکی[۲]

۱. دانشجوی دکترای گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲. دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳. استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
*نویسنده مسئول (morteza1937@yahoo.com)
۴. دانشیار گروه نانوفناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۸
تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۷/۲۰

واژه‌های کلیدی
بهینه‌سازی
روش سطح پاسخ
کلویورومایسس مارکسیانوس
مانان/مانوپروتئین

چکیده

مانان، گلیکوپروتئینی است که از واحدهای مانوز متصل به پروتئین تشکیل شده و با دارا بودن ساختار ترکیبات آمفی فیلیک طبیعی، می‌تواند به عنوان بیوامولسیفایر مورد استفاده قرار گیرد. لذا در این تحقیق، تولید مانان توسط مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* (PTCC:5194, CBS 6432) با استفاده از روش ترکیبی طرح کسری از فاکتوریل کامل و سطح پاسخ با تعیین تاثیر متغیرهای غلظت لاکتوز بر پایه پودر آب‌پنیر، غلظت عصاره مخمر، فعال‌کننده آنزیمی، pH، دما و حجم مایه تلقیح مورد آزمایش‌های غربال‌گری و بهینه‌سازی قرار گرفت. نتایج نشان داد چهار متغیر غلظت‌های لاکتوز و عصاره مخمر، pH و دما بیشترین تاثیر را بر تولید مانان داشتند (P <۰/۰۵). بهینه‌سازی عوامل موثر با روش سطح پاسخ، شرایط مناسب تولید مانان را با بیشینه ۲۰۹/۲۳ (میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر محیط) در غلظت‌های ۵۲/۶۰ گرم بر لیتر لاکتوز، ۱۰/۳۸ گرم بر لیتر عصاره مخمر، pH برابر ۵/۳۶ و دمای ۳۱/۹۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت بیشینه رشد ویژه ۰/۴۰۱(بر ساعت) نشان داد. همچنین نتایج حاکی از آن بود که مدل مونود با ضریب همبستگی بالا (۰/۹۹۸) می‌تواند جهت پیشگویی رفتار رشد مخمر و تولید مانان مورد استفاده قرار گیرد.

مقدمه

بیوامولسیفایرها، ترکیبات فعال سطحی هستند که از منابع بیولوژیکی به صورت خارج سلولی یا باند شده با سطح سلول، به وسیله باکتری‌ها، مخمرها و یا قارچ‌ها تولید می‌شوند. بیوامولسیفایرها، در مقایسه با منابع سنتزی به لحاظ طبیعی بودن محصول، تجزیه‌پذیری زیستی بالا و سلامت مصرف آن توسط انسان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. بسیاری از بیوامولسیفایرهای حاصل از باکتری‌ها به لحاظ بیماری‌زا بودن بعضی از آنها، مناسب استفاده در صنایع غذایی و یا دارویی نیستند (Priscilla *et al.*, 2008). مخمرها از دیگر منابع تولید بیوامولسیفایرها هستند، اما بسیاری از آنها (مانند *کاندیدا لیپولتیکا*) فقط در حضور ترکیبات غیرمحلول در آب (از قبیل آلکان‌ها و روغن‌ها) قادر به تولید امولسیفایر بوده، ضمن این که راندمان نسبتاً پایین و مشکلات مربوط به جداسازی بیوامولسیفایر از محیط کشت را به همراه دارند (Chuma Conlette, 2011).

مانان/مانوپروتئین، (از آن جایی که مانان به صورت ترکیب قندی مزدوج شده با پروتئین، فقط در دیواره سلولی مخمر یافت می‌شود، لذا در این مقاله، واژه مانان و مانوپروتئین دلالت بر یک معنی دارند) اولین بار از دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* استخراج و به عنوان یک بیوامولسیفایر موثر معرفی گردید (Cameron *et al*., 1998). این ترکیب گلیکوپروتئینی در خارجی‌ترین لایه دیواره سلولی قرار گرفته و از واحدهای مانوزیل با اتصال‌های α ۱ ← ۶ در شاخه اصلی (حدود ۴۰ تا ۶۰ واحد) و شاخه‌های جانبی با اتصال‌های α ۱←۲ و α ۱←۳ به صورت دی، تری و تترا مانوز تشکیل شده است. شاخه اصلی مانوز در حالت معمول به واسطه پیوندهای کووالانسی N-آسیل D-گلوکز آمین به اسید آمینه آسپارژین بخش پروتئینی متصل شده است. علاوه بر آن الیگومرهای غیرمنشعب دیگری از مانوز (۲ تا ۶ واحد) به واسطه گروه‌های هیدروکسیل سرین یا ترئونین بطور مستقیم به پروتئین متصل شده‌اند (Schmidt *et al*., 2005)؛ Dikit و همکاران (۲۰۱۰) مانان را از دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* KA01 (جدا شده از یک فراورده تخمیری محلی) به روش بافر سیترات داغ و دیالیز[1] در مقابل آب مقطر با راندمان و خصوصیات امولسیون‌کنندگی بالا، استخراج و خالص‌سازی کردند. آنان بیان داشتند بیوامولسیفایر مانان استخراج شده، ساختار ترکیبات آمفی‌فیلیک طبیعی را داشته و از توانایی امولسیون‌کنندگی بالایی برخوردار است. مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* مخمر دیگری است که از نظر خویشاوندی، وابسته به *ساکارومایسس سرویسیه* بوده و منبع خوبی جهت استخراج بیوامولسیفایر مانان می‌باشد (Lukondeh *et al*., 2003; Fonseca *et al*., 2008). همچنین این مخمر، بر خلاف بسیاری از مخمرها از جمله *ساکارومایسس سرویسیه*، به دلیل فعالیت بالای آنزیم بتاگالاکتوزیداز، توانایی استفاده از لاکتوز و فراورده‌های حاوی این قند را (مانند پودر آب پنیر) با راندمان بالای توده زیستی دارد. علاوه بر این تحمل دامنه حرارتی بالاتر، حجم بالای توده زیستی و سرعت بالای رشد از دیگر مزایای این مخمر نسبت به مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* می‌باشد (Aktas *et al*., 2006; Ozmihci & Kargi, 2007; Dragone *et al*., 2011). Aguilar-Uscanga و Francois (۲۰۰۵) در مطالعه اثر ترکیبات و شرایط محیط رشد بر ساختار و ترکیبات دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویسیه*، نشان دادند میزان ترکیبات پلی‌ساکاریدی دیواره سلولی و بخصوص مانان بطور معنی‌داری به نوع و غلظت منبع کربنی، وجود ازت کافی در محیط و از میان شرایط محیطی به pH و دمای رشد وابسته است.

Liu و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی شرایط و ترکیبات بهینه محیط کشت مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* جهت تولید مانان، با استفاده از منبع کربنی ساکارز، پپتون سویا و گلیسرول توانستند تولید مانان را تا ۲۱۲/۵۸ درصد در شرایط بهینه افزایش دهند.

دیواره سلولی دارای ساختار فعالی است که می‌تواند نسبت به تغییرات موقعیت فیزیولوژیکی سلول و واکنش با عوامل خارجی خود را تطبیق دهد (Klis *et al*., 2006). به عبارت دیگر، مهندسی دیواره سلولی و مکانیسم‌های مسئول ساخت آن به واسطه ترکیبات و شرایط محیط کشت کنترل می‌گردند (Stanislaw *et al*., 2008)، لذا بهینه‌سازی شرایط و ترکیبات محیط کشت جهت بهره‌برداری کامل از توانایی سویه میکروبی با بیشترین راندمان تولید محصول، امری ضروری بوده و طرح‌های آماری به عنوان ابزاری قدرتمند، این امکان را فراهم نموده‌اند (Ligia *et al*., 2008). ترکیب طرح کسری از فاکتوریل[2] جهت شناسایی عوامل تاثیرگذار معنی‌دار و به دنبال آن بهینه‌سازی عوامل مهم با روش سطح پاسخ[3] به طور موفقیت‌آمیزی در بسیاری از فرایندهای زیست‌فن‌آوری به کار رفته است (Papagora *et al*., 2013; Qiu *et al*., 2013).

در این تحقیق، بهینه‌سازی شرایط و ترکیبات محیط کشت بر پایه استفاده از پودر آب پنیر و بررسی اثر متغیرهای مستقل (غلظت‌های لاکتوز، منبع ازت، گلیسرول به عنوان فعال‌کننده آنزیمی، pH، دما و درصد مایه تلقیح)، با استفاده از طرح کسری از

1- Dialysis

2- Fractional factorial design

3- Response surface methodology

فاکتوریل و روش سطح پاسخ بر مبنای بالاترین راندمان تولید مانان در مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* انجام شد، ضمن این که مشخصات و مدل سینتیکی رشد مخمر در شرایط بهینه حاصله نیز بررسی گردید (لازم به ذکر است به دلیل توانایی مصرف بالای قند لاکتوز توسط مخمر مذکور و همچنین عدم وجود مشکلاتی از قبیل فسادپذیری، لاکتوز پایین و حمل و نقل، از پودر آب پنیر استفاده شد).

مواد و روش‌ها

مخمر *کلویورومایس مارکیسانوس* (PTCC:5194, CBS 6432) از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شد. پس از فعال‌سازی، سلول‌ها در محیط YPD آگار شیب‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پودر آب پنیر از کارخانه شیر خشک مولتی خراسان رضوی (با مشخصات: ۵۰ درصد لاکتوز، pH برابر ۵/۸ ، ۱۱/۸درصد پروتئین، ۰/۹۶ درصد فسفر و مقدار ناچیز چربی در ماده خشک) تهیه شد.

تهیه مایه تلقیح

یک لوپ کامل از کلنی خالص مخمر به یک ارلن مایر فلاسک ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط تلقیح (۵ درصد لاکتوز، ۰/۳درصد عصاره مخمر و ۰/۵درصد پپتون در آب مقطر) منتقل و سپس در یک اینکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در دور ثابت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد.

محیط و شرایط کشت اصلی

متغیرهای غلظت لاکتوز بر پایه پودر آب پنیر، عصاره مخمر، فعال‌کننده آنزیمی، pH، دما و حجم مایه تلقیح در در یک ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری با حجم۱۰۰ میلی‌لیتر محیط، در یک اینکوباتور شیکردار (۱۸۰ دور در دقیقه) مورد آزمایش قرار گرفتند (طبق ماتریس طرح). جهت غنی‌سازی محیط فوق، ترکیبات دیگری (KH_2PO_4 ۳ گرم بر لیتر، $(NH_4)_2SO_4$ ۴ گرم بر لیتر، $MgSO_4.7H_2O$ ۰/۵گرم بر لیتر، $CaCl_2$ ۰/۱۳گرم بر لیتر، NaCl ۰/۲۰ گرم بر لیتر) در همه شرایط اضافه گردید. لازم به ذکر است، پروتئین‌های محلول پودر آب پنیر با تنظیم pH در ۴/۵ و دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جدا شده و سپس به عنوان محیط تخمیر استفاده شد (Torija *et al*., 2005).

کشت در سیستم فرمانتورغیرمداوم

شرایط بهینه حاصله در سیستم ارلن مایر، در یک فرمنتور غیرمداوم، (Jar Fermenter, EYELA model MBF-800, Tokyo. Japan)، محتوی ۳ لیتر محلول پودر آب پنیر پروتئین‌گیری شده مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. اکسیژن محلول در سطح ۵۰ درصد با سرعت حجمی هوای ورودی به ظرف فرمانتور (۱ vvm، حجم هوا به حجم محیط در دقیقه) و سرعت همزن (۳۰۰ دور بر دقیقه) به طور مداوم کنترل شد.

جداسازی و آماده‌سازی سلول‌های مخمر

سلول‌های مخمر به وسیله سانتریفوژ محیط کشت محلول در شرایط ۴۵۰۰ ×g برای مدت ۱۰ دقیقه جدا شدند (سه مرتبه شستشو با آب سرد دیونیزه). سپس سلول‌ها در حضور گوی‌های شیشه‌ای (۱۰ درصد وزنی-وزنی) با قطر ۰/۴ میلی‌متر برای چند دوره به مدت ۲ دقیقه در یک دستگاه ورتکس رومیزی[1] و محیط واسط یخ با بالاترین شدت مخلوط شدند. سوسپانسیون حاصله پس از جداسازی و شستشوی گوی‌های شیشه‌ای در ۴۵۰۰ ×g برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصله چندین مرتبه با آب سرد دیونیزه شستشو داده شد (Liu *et al*., 2009).

استخراج و خالص‌سازی بیوامولسیفایر مانان

رسوب حاوی دیواره سلولی از مرحله قبل (۲۰ درصد وزنی-وزنی) در محلول بافر، ۰/۱ مولار سیترات پتاسیم و ۰/۰۲ مولار متابی‌سولفیت‌سدیم در pH معادل ۷ به مدت ۹۰ دقیقه اتوکلاو گذاری شد. مانوپروتئین محلول حاصله، پس از سانتریفوژ به وسیله سه حجم اتانول اسیدی (۱ درصد اسید استیک در

1- Bench-top vortex

اتانول ۹۶ درصد) رسوب داده شد. جهت کامل شدن رسوب نمونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس در ۸۰۰۰ × g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید (Araújo *et al*., 2013). جهت خالص‌سازی، از ستاولون (هگزا دسی تری متیل آمونیم بروماید) به عنوان یک حلال آلی برای رسوب انتخابی و خالص‌سازی بیوامولسیفایر مانان، از دیگر ماکرومولکول‌ها استفاده شد. همچنین جهت خلوص بیشتر رسوب حاصله، در مقابل آب مقطر به مدت ۴۸ ساعت دیالیز و سپس با خشک‌کن انجمادی خشک گردید (Dikit *et al*., 2010; Liu *et al*., 2010).

اندازه‌گیری توده زیستی

سلول‌های مخمر بوسیله سانتریفوژ محلول (سوسپانسیون مخمری) در ۴۵۰۰× g برای مدت ۱۰ دقیقه جدا شدند. سلول‌های مخمر جمع آوری شده در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت تا رسیدن به یک وزن ثابت خشک شدند.

اندازه‌گیری راندمان استخراج:

راندمان بر حسب گرم وزن خشک بیوامولسیفایر تولیدی به ازای صد میلی‌لیتر محیط کشت مخمر، محاسبه شد (Liu *et al*., 2009).

بررسی مشخصات سینتیک رشد میکروبی

منحنی رشد و تعداد مخمرها در مراحل مختلف زمانی رشد، در طی یک دوره ۳۰ ساعته و هر ۲ ساعت با روش کدروت سنجی در ۶۰۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا با استفاده از داده‌های مربوط به جرم خشک مخمر در فاز رشد لگاریتمی برای هر غلظت اولیه لاکتوز، سرعت ویژه رشد مخمر (μ) به دست آمد.

رابطه (۱)

$$Ln\left(\frac{X}{X0}\right) = \mu t$$

(X_0 برابر با جرم خشک سلولی در لحظه شروع است)

با توجه به وابستگی رشد مخمر به غلظت سوبسترا، معادلات لوجستیکی[1] کاربردی نداشت لذا به منظور مدل‌سازی سینتیک رشد در شرایط بهینه حاصله، معادله مدل مونود[2] مورد بررسی قرار گرفت.

رابطه (۲)

$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{(k_s + s)}$$

با داشتن غلظت‌های اولیه لاکتوز (S_0) و به دست آوردن سرعت رشد ویژه رشد مخمر، ثابت‌های معادله مونود بیشینه رشد ویژه (μ_{max}) و ثابت اشباع سوبسترا (Ks) از طریق برازش منحنی با روش غیرخطی حداقل مربعات به دست آمد. سپس با استفاده از ثابت‌های معادله مونود و مقادیر اولیه سوبسترا، منحنی سرعت ویژه رشد بر حسب غلظت‌های اولیه لاکتوز پودر آب پنیر رسم شد. این سرعت با سرعت ویژه رشد به دست آمده از داده‌های تجربی بر حسب غلظت‌های اولیه لاکتوز مقایسه شد. همچنین سرعت مصرف سوبسترا از طریق رابطه ذیل محاسبه شد.

رابطه (۳)

$$\mu_s = -\frac{1}{x}\frac{ds}{dt} = \frac{\mu}{y_{x/s}}$$

($y_{x/s}$: راندمان توده سلولی به ازای سوبسترا)

تعیین مقدار لاکتوز از طریق رنگ سنجی

بر اساس واکنش رنگی حاصل بین لاکتوز و متیل آمین، در یک محلول قلیایی داغ و اندازه‌گیری جذب ترکیب قرمز رنگ حاصله در طول موج ۵۴۰ نانومتر انجام شد (Nickerson *et al*., 1986).

طرح آزمایشی و تجزیه و تحلیل آماری

محدوده غلظتی و دامنه اثر هر یک از متغیرها، ابتدا با روش یک فاکتور در یک زمان، بصورت پیش‌تیمار بررسی شدند (نتایج نشان داده نشده است). به منظور گزینش مهم‌ترین متغیرها از طرح کسری از فاکتوریل (2^{6-1}) با شش تیمار (۳۲ آزمایش و ۴ تکرار در نقطه مرکزی) استفاده شد (جدول ۱). بهینه‌سازی متغیرهای معنی‌دار با روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی در پنج سطح توسط نرم افزار Design-Expert انجام شد.

1- Logistic

2- Monod

جدول ۱- دامنه سطوح متغیرها با اعداد حقیقی و کد شده (در طرح کسری از فاکتوریل ۲^(۶-۱))

سطح متغیرها	لاکتوز	عصاره مخمر	فعال کننده آنزیمی	pH	دما	مایه تلقیح
کد شده	(گرم بر لیتر)	(گرم بر لیتر)	گلیسرول(گرم بر یتر)		(درجه سانتی‌گراد)	(درصد)
-۱	۱۰	۴	۰	۴	۲۵	۵
۰	۲۵	۶	۲/۵	۵	۳۰	۷/۵
+۱	۴۰	۸	۵	۶	۳۵	۱۰

نتایج و بحث

انتخاب منبع ازت

در ابتدا، منابع ازتی مختلف (آلی و معدنی) در محلول پودر آب پنیر بر اساس بالاترین میزان راندمان مانان و توده سلولی، مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲). تجزیه آماری نتایج اختلاف معنی‌داری را در میان منابع مختلف نشان داد و همان طور که ملاحظه می‌گردد، بالاترین میزان تولید مانان با اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر منابع در حضور عصاره مخمر و با مقدار عددی ۳/۴ ± ۱۳۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر حاصل شد. راندمان تولید مانان در حضور منابع ازتی معدنی با اختلاف معنی‌داری نسبت به منابع ازتی آلی کمتر بود و از میان آنها سولفات آمونیم بیشترین تاثیر را در تولید مانان داشت. به عبارت دیگر، اثر منابع ازتی مختلف بر راندمان تولید مانان به ترتیب اثر گذاری شامل: عصاره مخمر> عصاره مخمر+ پپتون> پپتون> عصاره گوشت> تریپتون> سولفات آمونیم> نیترات آمونیم> کلرید آمونیم می‌باشند.

جدول ۲- اثر افزودن منابع مختلف ازتی به محلول پودر آب پنیر بر راندمان تولید مانان و توده سلولی

منبع نیتروژن	راندمان مانان (میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر)	توده سلولی (گرم بر لیتر)
عصاره مخمر	۱۳۳±۳/۴[a*]	۱۲/۳۶±۰/۱۷[a]
پپتون	۱۱۵±۳/۷[bc]	۱۰/۸۷±۰/۲[c]
عصاره مخمر+پپتون(۱:۱)	۱۲۱±۳[b]	۱۱/۶۵±۰/۲۵[b]
عصاره گوشت	۹۱±۲/۹[e]	۹/۷۸±۰/۲۸[d]
تریپتون	۱۱۰±۳/۲[dc]	۱۱±۰/۳[bc]
سولفات آمونیم	۷۵±۴/۲[f]	۸/۰۵±۰/۱۴[e]
نیترات پتاسیم	۶۹±۳/۵[fg]	۷/۶۵±۰/۲۶[ef]
کلرید آمونیم	۶۰±۴/۱[h]	۶/۶۶±۰/۱۲[f]

*نتایج در هر ستون که دارای حروف غیرمشابه می‌باشند، دارای اختلاف آماری معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) هستند.

نتایج مشابهی نیز توسط Liu و همکاران (۲۰۰۹) در مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* گزارش شده است. آنان بالاترین راندمان را در حضور منابع ازتی آلی پپتون سویا و عصاره مخمر بدست آوردند و خاطر نشان کردند منابع ازتی معدنی تاثیر معنی‌داری بر افزایش تولید مانان ندارند. همچنین بر اساس نتایج Demirci و Pomettos (۲۰۰۰) حضور منابع ازتی آلی، مخمر را به سوی افزایش میزان توده سلولی و افزایش ضخامت دیواره سلولی سوق داده که علت آن را انتقال و جذب راحت و آسان این منابع گزارش کردند.

انتخاب فعال کننده آنزیمی

آنزیم مانان سنتتاز[1] مخمر یک مخلوط آنزیمی است که حداقل از ده مانوزیل ترانس فراز[2] مختلف تشکیل شده است. مانان سنتتازها در فضای پری‌پلاسمیک غشاء قرار دارند که مکان اصلی بیوسنتز مانان می‌باشد (Kils *et al*., 2006)؛ بعضی از یون‌های غیرآلی و مولکول‌های کوچک و بزرگ می‌توانند به عنوان محرک یا القاءکننده، فعالیت آنزیم‌های مانان سنتتاز را افزایش دهند (Liu *et al*., 2009).

1- Mannan Synthetase
2- Mannosyl-transferase

جدول ۳ اثر افزودن محرک‌های آنزیمی اینوزیتول، EDTA و گلیسرول را بر تولید مانان نشان می‌دهد. نتایج نشان داد، گلیسرول به عنوان محرک آنزیمی بیشترین تاثیر را بر افزایش میزان تولید مانان داشته است.

جدول ۳- اثر افزودن فعال کننده‌های آنزیمی به محلول پودر آب پنیر بر راندمان تولید مانان و توده سلولی

فعال کننده	راندمان مانان (میلی گرم در صد میلی‌لیتر)	توده سلولی (گرم بر لیتر)
اینوزیتول	۱۰۸±۳/۳[c*]	۱۱/۳۲±۰/۲۳[b]
EDTA	۱۱۵±۳/۸[b]	۱۱/۳۷±۰/۱۸[b]
گلیسرول	۱۳۰±۳/۵[a]	۱۲/۴۰±۰/۱۵[a]

*نتایج در هر ستون که دارای حروف غیرمشابه می باشند، دارای اختلاف آماری معنی داری ($P<۰/۰۵$) هستند

غربال‌گری فاکتورهای اصلی

هدف از انجام این آزمایش‌ها انتخاب مهم‌ترین متغیرهای تاثیرگذار بر تولید بیوامولسیفایر مانان با استفاده از طرح کسری از فاکتوریل در شرایط ارلن مایر فلاسک بود. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از مناسب بودن مدل درجه اول جهت برازش و ارزیابی اثرات اصلی شش متغیر بود. تخمین ضرایب تاثیر و معنی‌دار بودن هریک از متغیرها بر تولید مانان در سطح اطمینان ۹۵ درصد در جدول ۴ خلاصه شده است. نتایج نشان داد، تولید مانان و توده سلولی بطور معنی‌داری به ترتیب متأثر از غلظت لاکتوز پودر آب پنیر، pH، غلظت عصاره مخمر و دما می‌باشند. گلیسرول به عنوان فعال‌کننده آنزیمی تاثیر مثبت بر تولید مانان داشت، علی‌رغم این که ضریب تاثیر آن در کنار عوامل دیگر از اهمیت کمتری برخوردار بود (حد بالای آن جهت مرحله بهینه‌سازی در نظر گرفته شد). Bzduch-wrobel و همکاران (۲۰۱۳) تاثیر مثبت گلیسرول را به عنوان تشدید کننده بیوسنتز مانان در ساختار دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* نیز گزارش کردند.

اثر حجم مایه تلقیح نیز بر تولید مانان و توده سلولی معنی‌دار نبود، لذا حد پایین آن یعنی ۵ درصد در مرحله بهینه‌سازی مورد استفاده قرار گرفت (ضمناً کلیه اثرات متقابل گلیسرول و مایه تلقیح با سایر عوامل در مدل کاسته شده معنی‌دار نبوند). Liu و همکاران (۲۰۰۹) نیز تغییر معنی‌داری را بر تولید مانان در حجم‌های مختلف مایه تلقیح مشاهده نکردند و بالاترین تولید مانان را در حجم تلقیح ۴ درصد گزارش نمودند. بنابراین غلظت لاکتوز پودر آب‌پنیر، pH، غلظت عصاره مخمر و دما به عنوان متغیرهای اصلی جهت بهینه‌سازی با روش سطح پاسخ انتخاب شدند.

بهینه سازی تولید بیوامولسیفایر مانان

جهت تعیین روند تغییرات راندمان مانان و بررسی اثر هر یک از متغیرهای مستقل منابع کربنی، ازت، pH و دما در ابتدا نیاز به تعیین مناسب‌ترین مدل جهت برازش داده‌های آزمون می‌باشد. به منظور حصول مدل‌های تجربی برای پیش‌بینی راندمان، رابطه‌های خطی و چند جمله‌ای درجه دوم بر داده‌های بدست آمده از آزمایش‌ها برازش شدند (جدول ۵). با توجه به مقادیر R^2 (۰/۹۸۶)، R^2 اصلاح شده (۰/۹۷۳) و همچنین غیرمعنی‌دار بودن آزمون عدم برازش مدل چند جمله‌ای درجه دوم انتخاب شد. مدل برازش یافته درجه دوم از نظر آماری در سطح ($P<$ ۰/۰۰۰۱) معنی‌دار بوده و آزمون عدم برازش برای تمام صفات مورد اندازه‌گیری در سطح ۹۵ درصد معنی‌دار نبود (پس از برازش مدل، رابطه به دست آمده در معرض الگوریتم رو به عقب[1] به منظور کاهش تعداد جمله‌های غیرمعنی‌دار مدل قرار گرفت).

1- Backward

جدول ۴- تخمین تاثیر متغیرهای اصلی بر تولید مانان حاصل از طرح کسری از فاکتوریل

متغیر	ضرایب	مجموع مربعات	ارزش F	ارزش p	اثرات همگن شده	٪ سهم عوامل
لاکتوز (گرم بر لیتر)	۱۷/۸۱	۱۰۱۴۴/۹۴	۵۴/۹۵	۰/۰۰۰۱	۳۵/۶۱	۲۸/۵۳
عصاره مخمر (گرم بر لیتر)	۱۱/۱۸	۳۹۹۹/۵۳	۲۱/۶۶	۰/۰۰۰۱	۲۲/۳۶	۱۱/۲۵
گلیسرول (گرم بر یتر)	۴/۸۳	۷۴۶/۰۴	۴/۰۴	۰/۰۵۹۱	۹/۶۶	۲/۱۰
pH	۱۵/۷۴	۷۹۲۵/۰۵	۴۲/۹۳	۰/۰۰۰۱	۳۱/۴۷	۲۲/۲۹
دما (درجه سانتی‌گراد)	۱۰/۶۴	۳۴۲۶/۲۰	۱۹/۶۳	۰/۰۰۰۱	۲۱/۲۸	۱۰/۱۹
مایه تلقیح (درصد)	۰/۶۵	۱۳/۳۵	۰/۰۷۲	۰/۷۹۰	۱/۲۹	۰/۰۳۸

جدول ۵- طرح مرکب مرکزی برای متغیرهای مستقل به ترتیب انجام آزمایش (اعداد حقیقی و کد شده)

آزمایش	متغیرهای مستقل								پاسخ	
	لاکتوز (گرم بر لیتر)		عصاره مخمر (گرم بر لیتر)		pH		دما (درجه سانتی‌گراد)		توده سلولی (گرم بر لیتر)	مانان(میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر)
۱	۴۵	(۰)	۱۰	(۰)	۵	(۰)	۳۰	(۰)	۱۶/۳۲	۱۹۰/۷
۲	۳۰	(-۱)	۱۲	(+۱)	۴	(-۱)	۳۵	(+۱)	۸/۵۱	۹۲/۸۲
۳	۶۰	(+۱)	۸	(-۱)	۴	(-۱)	۳۵	(+۱)	۷/۹۳	۷۴/۴۲
۴	۳۰	(-۱)	۱۲	(+۱)	۴	(-۱)	۲۵	(-۱)	۷/۲۴	۷۷/۱۲
۵	۴۵	(۰)	۱۰	(۰)	۵	(۰)	۳۰	(۰)	۱۷	۱۹۹/۲
۶	۳۰	(-۱)	۸	(-۱)	۶	(+۱)	۲۵	(-۱)	۶/۱۲	۶۳/۲۸
۷	۳۰	(-۱)	۸	(-۱)	۶	(+۱)	۳۵	(+۱)	۸/۹۱	۹۷/۷۶
۸	۶۰	(+۱)	۸	(-۱)	۶	(+۱)	۲۵	(-۱)	۱۰/۲۲	۱۱۵/۷۱
۹	۶۰	(+۱)	۱۲	(+۱)	۴	(-۱)	۳۵	(+۱)	۱۰/۱	۱۰۱/۶۵
۱۰	۶۰	(+۱)	۱۲	(+۱)	۴	(-۱)	۲۵	(-۱)	۸/۸۵	۹۸/۵۱
۱۱	۳۰	(-۱)	۱۲	(+۱)	۶	(+۱)	۳۵	(+۱)	۹/۵۷	۱۰۵/۹۲
۱۲	۴۵	(۰)	۱۰	(۰)	۵	(۰)	۳۰	(۰)	۱۶/۶۲	۱۹۴/۴۶
۱۳	۳۰	(-۱)	۱۲	(+۱)	۶	(+۱)	۲۵	(-۱)	۷/۳۱	۷۷/۹۹
۱۴	۴۵	(۰)	۱۰	(۰)	۵	(۰)	۳۰	(۰)	۱۷/۵۴	۲۰۵/۹۲
۱۵	۳۰	(-۱)	۸	(-۱)	۴	(-۱)	۲۵	(-۱)	۴/۲۵	۴۰/۱۷
۱۶	۶۰	(+۱)	۱۲	(+۱)	۶	(+۱)	۳۵	(+۱)	۱۴/۷۵	۱۷۲/۵۹
۱۷	۶۰	(+۱)	۸	(-۱)	۴	(-۱)	۲۵	(-۱)	۶/۵	۵۶/۴۷
۱۸	۳۰	(-۱)	۸	(-۱)	۴	(-۱)	۳۵	(+۱)	۵/۴۳	۶۷/۱۱
۱۹	۶۰	(+۱)	۱۲	(+۱)	۶	(+۱)	۲۵	(-۱)	۱۰/۴۸	۱۳۱/۵۲
۲۰	۶۰	(+۱)	۸	(-۱)	۶	(+۱)	۳۵	(+۱)	۱۳/۴۳	۱۵۵/۹۰
۲۱	۷۵	(+۲)	۱۰	(۰)	۵	(۰)	۳۰	(۰)	۱۱/۴۲	۱۲۹/۷۲
۲۲	۴۵	(۰)	۱۰	(۰)	۵	(۰)	۴۰	(+۲)	۱۰/۵	۱۱۸/۲۷
۲۳	۴۵	(۰)	۱۴	(+۲)	۵	(۰)	۳۰	(۰)	۱۱/۵۱	۱۳۰/۸۰
۲۴	۴۵	(۰)	۱۰	(۰)	۵	(۰)	۳۰	(۰)	۱۷/۳۳	۲۰۳/۳۰
۲۵	۴۵	(۰)	۶	(-۲)	۵	(۰)	۳۰	(۰)	۶/۵	۶۸/۴۵
۲۶	۴۵	(۰)	۱۰	(۰)	۵	(۰)	۲۰	(-۲)	۵/۱۲	۵۱/۲۵
۲۷	۴۵	(۰)	۱۰	(۰)	۳	(-۲)	۳۰	(۰)	۴/۲	۳۹/۸۴
۲۸	۴۵	(۰)	۱۰	(۰)	۷	(+۲)	۳۰	(۰)	۸/۴	۹۲/۲۵
۲۹	۴۵	(۰)	۱۰	(۰)	۵	(۰)	۳۰	(۰)	۱۷/۵۵	۲۰۶/۰۴
۳۰	۱۵	(-۲)	۱۰	(۰)	۵	(۰)	۳۰	(۰)	۵/۸	۵۹/۷۶

نتایج جدول ۶ بیانگر تاثیر معنی‌دار اثر عوامل اصلی و اثر درجه دوم فاکتورها بر میزان راندمان بیوامولسیفایر می‌باشند. از میان اثر متقابل عامل‌های مورد بررسی، اثر متقابل بین غلظت لاکتوز با pH، غلظت عصاره مخمر با pH و دما با pH، معنی‌دار بود و غلظت منبع کربن، pH، غلظت منبع ازت و دما به ترتیب بیشترین تاثیر را بر پاسخ داشتند. ملاحظه می‌گردد، R^2 و R^2 اصلاح شده مدل مورد بررسی تفاوت چندانی با یکدیگر ندارند که در واقع نشان می‌دهد متغیرهای غیرمعنی‌داری به مدل اضافه نشده است. مقدار بالای R^2 و R^2 اصلاح شده و متناسب بودن مقادیر این دو فاکتور مؤید قدرت بالای مدل در پیش‌بینی می‌باشد (Koocheki *et al*, 2009).

برای تعیین مدل سطح پاسخ از برایند پاسخ‌های خطی، درجه دو و اثر متقابل متغیرهای مستقل استفاده شد. معادله ذیل ارتباط تجربی میان میزان راندمان مانان و متغیرهای آزمایش با اعداد حقیقی را نشان می‌دهد:

رابطه (۴)

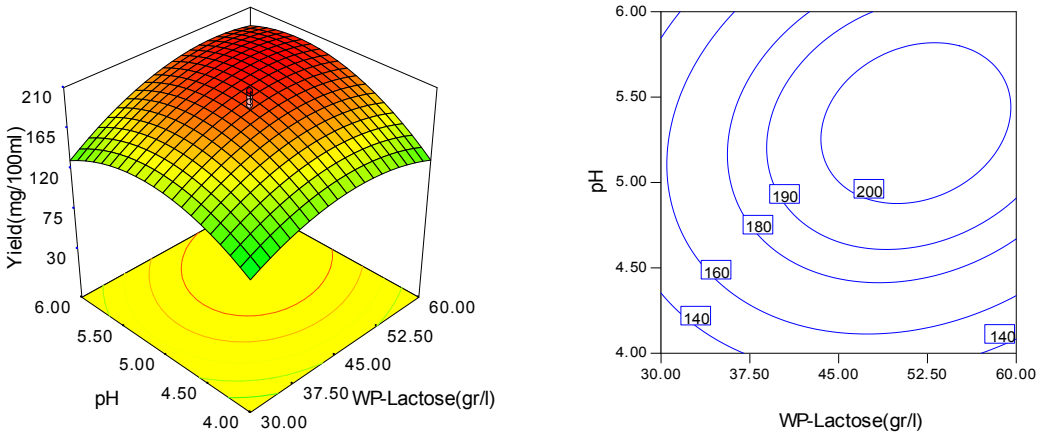
$$Y = -۲۴۸۴/۳۷ + ۷/۳۹X_1 + ۱۳۶/۱۳X_2 + ۲۹۷/۴۱X_3 + ۶۳/۲۳X_4 - ۰/۱۱X_1^2 - ۵/۸۸X_2^2 - ۳۱/۹۲X_3^2 - ۱/۰۸X_4^2 + ۰/۷۳X_1X_3 - ۲/۳۹X_2X_3 + ۱X_3X_4$$

جدول ۶- تجزیه واریانس متغیرهای خطی، درجه دوم و اثرات متقابل هر پاسخ در مدل برازش یافته درجه دوم کاسته بر داده‌های پاسخ

منبع	مجموع مربعات SS	درجه آزادی DF	میانگین مربعات MS	ارزش F	ارزش P
مدل	۸۳۱۶۰/۹۲	۱۱	۷۵۶۰/۰۸	۱۰۸/۵۹	۰/۰۰۰۱
منبع کربنی: (X_1)	۷۵۱۲/۲۴	۱	۷۵۱۲/۲۴	۱۰۷/۹۰	۰/۰۰۰۱
منبع نیتروژن: (X_2)	۴۰۵۳/۶۶	۱	۴۰۵۳/۶۶	۵۸/۲۲	۰/۰۰۰۱
pH : (X_3)	۷۲۵۶/۱۵	۱	۷۲۵۶/۱۵	۱۰۴/۲۲	۰/۰۰۰۱
دما: (X_4)	۴۸۵۸/۹۸	۱	۴۸۵۸/۹۸	۶۹/۷۲	۰/۰۰۰۱
X_1X_3	۱۹۵۸/۷۳	۱	۱۹۵۸/۷۳	۲۸/۱۳	۰/۰۰۰۲
X_2X_3	۳۶۷/۲۰	۱	۳۶۷/۲۰	۵/۲۷	۰/۰۳۳۹
X_3X_4	۴۰۰/۳۰	۱	۴۰۰/۳۰	۵/۷۵	۰/۰۲۹۵
X_1^2	۱۶۸۰۷/۵۱	۱	۱۶۸۰۷/۵۱	۲۴۱/۴۱	۰/۰۰۰۱
X_2^2	۱۵۱۹۰/۰۳	۱	۱۵۱۹۰/۰۳	۲۱۸/۱۸	۰/۰۰۰۱
X_3^2	۲۷۹۶۰/۶۴	۱	۲۷۹۶۰/۶۴	۴۰۱/۶۰	۰/۰۰۰۱
X_4^2	۲۰۳۶۲/۶۰	۱	۲۰۳۶۲/۶۰	۲۹۲/۴۷	۰/۰۰۰۱
باقی مانده	۱۲۵۳/۲۱	۱۸	۶۹/۶۲		
عدم برازش مدل	۱۰۵۳	۱۳	۸۱	۲/۰۳	۰/۲۲۵۰ ns
خطای خالص	۲۰۰/۲۲	۵	۴۰/۰۴		
تصحیح کلی	۸۴۴۱۴/۱۳	۲۹			
R^2-pred=۰/۹۳۸			R^2-Adj=۰/۹۷۳		R^2=۰/۹۸۵

تاثیر غلظت منبع کربنی و pH بر میزان راندمان تولید مانان

ارتباط بین فاکتورها و پاسخ می‌تواند بوسیله نمودارهای تراز و یا سه بعدی با عملکرد دو فاکتور به طور هم‌زمان و ثابت نگه داشتن سایر فاکتورها در نقطه میانی بهتر درک و شناسایی شود. تاثیر غلظت لاکتوز محلول پودر آب پنیر به عنوان منبع کربنی و pH بر میزان راندمان در شرایط ثابت دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت عصاره مخمر ۱۰ گرم بر لیتر به صورت رویه پاسخ نشان داده شده است (شکل ۱). با توجه به معنی‌دار بودن اثرات خطی و درجه دوم غلظت لاکتوز و pH، وجود انحناء در نمودار رویه را می‌توان انتظار داشت. با افزایش غلظت لاکتوز تا ۵۲/۵ گرم بر لیتر لاکتوز بر پایه پودر آب پنیر مقدار راندمان بطور چشم‌گیری بخصوص در pH بین ۵ تا ۵/۵ افزایش یافته و از آن به بعد تا ۵۵ گرم بر لیتر تقریبا ثابت و در غلظت‌های بالاتر روند کاهشی داشته است.

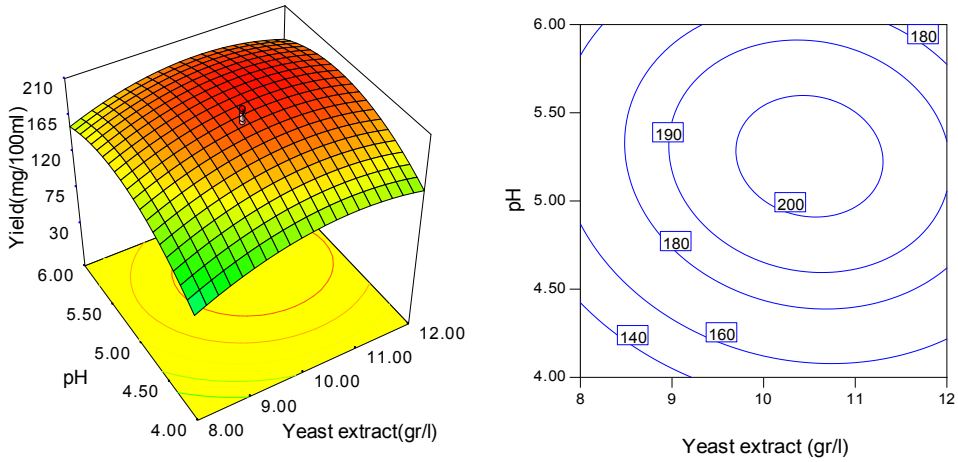


شکل ۱- منحنی‌های سطح پاسخ تراز و سه بعدی اثر تداخلی منبع کربنی و pH بر میزان راندمان مانان

همچنین ملاحظه می‌گردد در pHهای پایین راندمان به طور مشخصی پایین است و افزایش سایر عوامل مانند غلظت لاکتوز نیز نتوانسته راندمان را افزایش دهد که نشان دهنده پایین بودن سرعت اتولیزاسیون لاکتوز پودر آب پنیر در این شرایط می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت در محدوده غلظتی ۴۵ تا ۵۵ گرم بر لیتر لاکتوز و pH ۵ تا ۵/۵ میزان راندمان بالایی مشاهده شده و خارج از این محدوده افزایش pH و غلظت لاکتوز تاثیر مثبتی بر راندمان نداشته است. Aguilar-Uscanga و Francois (۲۰۰۵) نشان دادند سهم دیواره سلولی و ترکیبات آن به طور معنی‌داری بسته به نوع و غلظت منبع کربنی قابل تغییر است. Liu و همکاران (۲۰۰۹) بیشینه راندمان تولید مانان را در مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* در غلظت ۴۹/۸ گرم بر لیتر ساکارز به دست آوردند و خاطر نشان کردند، اثرات بازدارندگی غلظت‌های بالای منبع کربنی، به دلیل تغییر قدرت یونی و فشار اسمزی بالای حاصله، کاهش میزان توده سلولی و در نتیجه کاهش راندمان مانان را به دنبال دارد. Lukondeh و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند افزایش غلظت لاکتوز از ۶۰ گرم بر لیتر به بالا سبب کاهش غلظت توده سلولی در مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* شده است. یکی دیگر از مشکلاتی که ممکن است در غلظت‌های بالای قند در حین گسترش توده سلولی اتفاق بیفتد تولید اتانول است که کاهش رشد سلولی را به دنبال دارد (Ligia *et al.*, 2008).

تأثیر غلظت منبع ازت و pH بر میزان راندمان تولید مانان

غلظت عصاره مخمر و pH بر میزان راندمان در شرایط ثابت دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت لاکتوز ۴۵ گرم بر لیتر به صورت رویه پاسخ نشان داده شده است (شکل ۲).

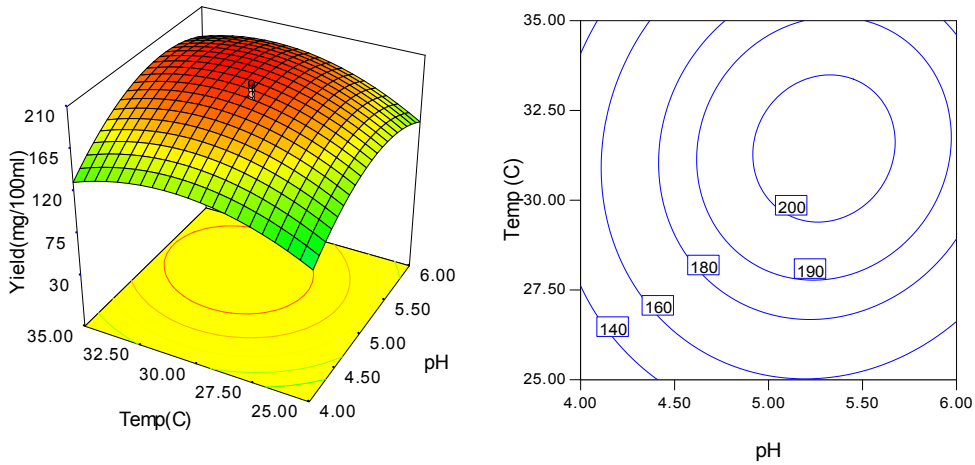


شکل ۲- منحنی‌های سطح پاسخ تراز و سه بعدی اثر تداخلی منبع ازت و pH بر میزان راندمان مانان

افزایش غلظت عصاره مخمر تا ۱۱ گرم بر لیتر در محدوده pHهای ۴ تا ۵/۵ سبب افزایش راندمان شد و در pH بالای ۵/۵ تاثیر مثبتی بر راندمان نداشت. در غلظت‌های بالاتر از ۱۱ گرم بر لیتر، راندمان در یک حد ثابتی باقی مانده و به نظر می‌رسد مخمر غلظت‌های بالاتر عصاره مخمر را به دلیل اتمام منبع کربنی و توقف رشد نتوانسته جذب کند. غلظت‌های پایین منبع ازتی سبب کاهش بیوسنتز پروتئین‌ها و بنابراین کاهش پروتئین‌های دیواره سلولی می‌گردد و غلظت‌های بالای آن سرعت رشد را افزایش داده اما به دلیل طبیعت پیچیده این منبع، در غلظت‌های بالاتر اثر بازدارنده بر تولید مانان داشته است. Lizicarova و همکاران (۲۰۰۷) به این نتیجه رسیدند که در نقصان منبع نیتروژن رشد سلولی و به دنبال آن مانان تا ۱۴ درصد کاهش یافته که می‌تواند تاییدی بر نتایج این تحقیق باشد. بنابراین غلظت عصاره مخمر در محدوده ۱۰ تا ۱۱ گرم بر لیتر و pH ۵ تا ۵/۵ بالاترین راندمان را نشان دادند.

تأثیر درجه حرارت و pH بر میزان راندمان تولید مانان

اثر درجه حرارت و pH بر میزان راندمان در شرایط ثابت غلظت لاکتوز ۴۵ گرم بر لیتر و غلظت عصاره مخمر ۱۰ گرم بر لیتر به صورت رویه پاسخ نشان داده شده است (شکل ۳).



شکل ۳- منحنی‌های سطح پاسخ تراز و سه‌بعدی اثر تداخلی دما و pH بر میزان راندمان مانان

دما تا مقدار ۳۲/۵ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش راندمان و بالاتر از این دما تاثیر مثبتی بر راندمان نداشته و در دماهای بالاتر از ۳۵ درجه سانتی‌گراد، رشد سلولی، فعالیت آنزیمی و مقدار مانان کاهش یافته است. در درجه حرارت پایین، راندمان بطور مشخصی پایین است و افزایش سایر عوامل مانند غلظت لاکتوز نیز نتوانسته راندمان را افزایش دهد که نشان دهنده پایین بودن سرعت مصرف لاکتوز در این شرایط می‌باشد. به عبارت دیگر محدوده دمایی ۳۰ تا ۳۲/۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۵ تا ۵/۵ بالاترین راندمان را نشان دادند.

درجه حرارت یکی از مهم‌ترین فاکتورهای محیطی موثر در رشد میکروارگانیسم‌ها است که سبب تغییر بسیاری از مسیرهای بیوسنتزی و متابولیکی خصوصاً پروتئین‌ها و فعالیت آنزیم‌ها می‌شود. بنابراین انتظار می‌رود دما تولید یک متابولیت خاص را تسریع یا مهار کند. Liu و همکاران (۲۰۰۹)، بیشینه‌ی راندمان تولید مانان را در مخمر *ساکارومایسس سرویسیه* در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند و بیان داشتند رشد سلولی مخمر و فعالیت آنزیم‌های بیوسنتزکننده مانان در دماهای بالای ۳۲ درجه سانتی‌گراد متوقف شده است. Aguilar-Uscanga و Francois (۲۰۰۵) در بررسی تاثیر pH و درجه حرات بر ترکیبات دیواره سلولی خصوصاً مانان نشان دادند، در دامنه حرارتی ۳۷ درجه سانتی‌گراد علی‌رغم افزایش سرعت رشد سلولی مقدار مانان به دلیل کاهش فعالیت آنزیم‌هایی که در پلیمریزاسیون مانان شرکت دارند، بطور معنی‌داری کاهش یافته است و بیشترین مقدار مانان را در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و کمترین مقدار آن را در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند. همچنین نشان دادند با افزایشpH از ۳ تا ۵ مقدار مانان بطور معنی‌داری افزایش و پس از آن کاهش یافته است. Schultz و همکاران (۲۰۰۶)، بیشینه توده سلولی مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* را بر پایه پودر آب پنیر در pH ۵/۶ و دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد به دست آوردند که با دامنه pH و حرارتی حاصل از این بخش تحقیق همسو می‌باشد.

بهینه‌یابی و اعتبار سنجی مدل

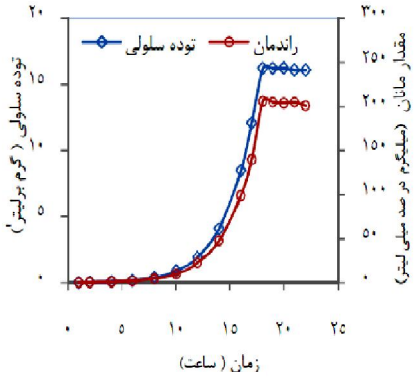
شرایط بهینه تولید مانان با استفاده از روش بهینه‌یابی عددی نرم‌افزار مذکور در شرایط غلظت منبع کربنی برابر ۵۲/۶۰ گرم بر لیترلاکتوز پودر آب‌پنیر (۱۰۵/۶ گرم بر لیتر پودر آب پنیر)، منبع ازت ۱۰/۳۸ گرم بر لیتر عصاره مخمر، pH برابر ۵/۳۶ و دمای ۳۱/۹۰ درجه سانتی‌گراد با بیشینه راندمان ۲۰۹/۲۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر با سرعت بیشینه رشد ویژه برابر با ۰/۴۰۱ (بر ساعت) به‌دست آمد.

جهت تصدیق مدل، آزمایشات تأییدی نقاط بهینه در سه تکرار، در شرایط ارلن مایر فلاسک با اندازه‌گیری مجدد راندمان و مقایسه آن با راندمان حاصل از مدل صورت گرفت. متوسط بیشینه راندمان حاصله از سه تکرار ۰/۲۵± ۲۰۸/۴۹ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر حاصل شد. لذا با توجه به پیش‌بینی راندمان حاصل از مدل، در نقاط بهینه با مقدار عددی ۲۰۹/۲۳ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط، می‌توان درجه تطبیق بالای راندمان تجربی را با راندمان پیش‌بینی‌شده ملاحظه نمود. همچنین نتایج بررسی شرایط بهینه حاصله در یک فرمنتور غیرمداوم، حاکی از افزایش راندمان مانان به مقدار عددی ۲۵۰/۳۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط و سرعت بیشینه رشد ویژه برابر با ۰/۴۲۹(بر ساعت) بود. لازم به ذکر است، بهبود راندمان در شرایط فرمنتور نسبت به شرایط ارلن مایر فلاسک می‌تواند مربوط به افزایش اکسیژن قابل دسترس، توزیع یکنواخت مواد مغذی و کنترل بهتر pH در محیط کشت باشد (Ghaly *et al.*, 2004).

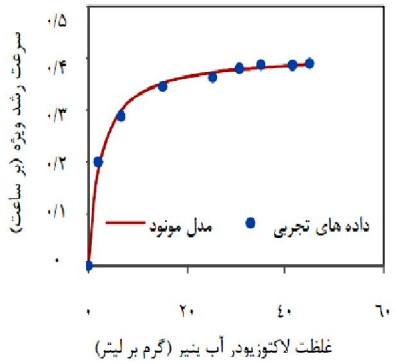
سینتیک رشد سلول و تولید مانان در شرایط بهینه

بررسی‌های سینتیکی یکی از مهم‌ترین روش‌ها جهت بهینه‌سازی فرایندهای بیولوژیکی می‌باشند. بررسی منحنی رشد و تولید مانان در شرایط بهینه نشان داد، پس از گذشت ۱۸ ساعت، لاکتوز تقریباً بطور کامل مصرف و مخمر وارد فاز سکون شده و بیشترین مقدار مانان نیز در ابتدای همین فاز به دست آمده است (شکل۴-الف). با اتمام منبع کربن در انتهای فرایند، رشد مخمر هم متوقف شد که می‌تواند نشان‌دهنده مناسب بودن لاکتوز پودر آب‌پنیر برای این مخمر و تنها سوبسترای محدودکننده رشد در

محیط باشد. ضمن این که در طی فاز لگاریتمی، نسبت رشد ویژه در مقابل زمان ثابت باقی ماند و چنین استنباط می‌شود که اثر ممانعت‌کننده‌ای مانند الکل نیز وجود نداشته است (Goswami *et al.*, 2012).



(الف)



(ب)

شکل ۴- الف) منحنی رشد و تولید محصول در شرایط بهینه ب) مقایسه مدل مونود و داده‌های تجربی در غلظت‌های مختلف لاکتوز

نتایج بدست آمده از رشد مخمر، در غلظت‌های مختلف سوبسترا نشان داد، ضریب رشد ویژه در ارتباط با غلظت سوبسترا، محدود کننده می‌باشد. این ارتباط به کمک برازش منحنی معادله مدل مونود با ضریب همبستگی ۰/۹۹۸ قابل توضیح بود (شکل ۴-ب). ثابت‌های مدل مونود و سایر مشخصات سینتیکی مخمر*کلویورومایسس مارکسیانوس* در شرایط بهینه رشد در جدول ۷ خلاصه شده است.

جدول ۷- مشخصات سینتیکی رشد مخمر*کلویورومایسس مارکسیانوس* در شرایط بهینه

مدل	سایر مشخصات سینتیکی						
	بیشینه رشد ویژه	ثابت اشباع	توده سلولی به ازای هر گرم سوبسترا	محصول به ازای هر گرم سوبسترا	سرعت مصرف سوبسترا	زمان دوتا شدن	ضریب همبستگی
	μ_{max}	Ks	$Y_{x/s}$	$Y_{p/x}$	μ_s	T_D	R^2
مونود	۰/۴۰۱±۰/۰۲	۲/۳۸±۰/۲۵	۰/۴۰۸±۰/۰۲	۰/۱۰۸±۰/۱۵	۰/۰۰۷±۰/۰۰۵ ۱	۱/۷۷±۰/۰۴	۰/۹۹۸

نتایج مشابهی توسط Ozmihci و Kargi (۲۰۰۸) در بررسی مدل‌های سینتیکی رشد این مخمر، در غلظت‌های مختلف لاکتوز گزارش شد. Lukondeh و همکاران (۲۰۰۳)، مشخصات سینتیکی مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* (FII 510700) را با راندمان توده سلولی برابر ۰/۴۵گرم سلول به ازای هر گرم سوبسترا، غلظت سلولی ۲۱ گرم در لیتر و سرعت بیشینه رشد ویژه برابر ۰/۳۸(بر ساعت)، گزارش کردند که تفاوت موجود با نتایج این تحقیق می‌تواند ناشی از اختلاف فیزیولوژیکی بین سوش‌ها، ترکیبات و شرایط محیط رشد باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به استقبال روز افزون مصرف امولسیفایرها، تمایل به یافتن منابع جدید جهت تولید امولسیفایرهای طبیعی از اهمیت قابل توجهی بر خوردار می‌باشد. در این راستا، راه‌های بیوتکنولوژی یکی از مؤثرترین و مناسب‌ترین روش‌های تولید این‌گونه محصولات با بکارگیری میکروارگانیسم‌ها، خصوصاً مخمرها و استفاده از منابع کم‌مصرف به شمار می‌روند. در این تحقیق، روش ترکیبیِ طرح کسری از فاکتوریل و بهینه‌سازی با روش سطح پاسخ به شکل

موفقیت‌آمیزی برای بهینه‌سازی عامل‌های تأثیرگذار بر راندمان تولید مانان در محیط کشت حاصل از پودر آب پنیر، مورد استفاده قرار گرفت. مدل حاصله بیانگر تناسب و ضریب اطمینان بالای مدل برای پیش‌بینی میزان راندمان مانان در شرایط مختلف بود. بر این اساس، شرایط بهینه تولید مانان در مخمر *کلویورومایسس مارکسیانوس* (PTCC:5194, CBS 6432)، در غلظت‌های برابر ۵۲/۶۰ گرم بر لیتر لاکتوز محلول پودر آب پنیر (۱۰۵/۶ گرم بر لیتر پودر آب پنیر) و ۱۰/۳۸ گرم بر لیتر عصاره مخمر، pH برابر ۵/۳۶ و دمای ۳۱/۹۰ درجه سانتی‌گراد با بیشینه راندمان ۲۰۹/۲۳ میلی‌گرم در صد میلی‌لیتر و سرعت بیشینه رشد ویژه برابر با ۰/۴۰۱ (بر ساعت) به دست آمد. مدل و داده‌های سینتیکی حاصل از این تحقیق، نیز می‌تواند اطلاعات پایه و کاربردی جهت برآورد مصرف سوبسترا، تشکیل محصول و طراحی عملیات بخصوص در اهداف صنعتی تولید مانان را فراهم کند.

منابع

1. Aguilar-Uscanga, B. & Francois, J. M. 2005. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and cultivation. Applied Microbiology and Biotechnology, 37: 268-274.
2. Aktas, N., Boyaci, H., Mutlu, M. & Tanyolac, A. 2006. Optimization of lactose utilization in deproteinated whey powder by Kluyveromyces marxianus using surface methodology. Bioresource Technology, 97: 2252-2259.
3. Araujo, V., Ferreira de Melo, A., Gaspar Costa, A. & Leite de Souza, E. 2013. Followed extraction of β-glucan and mannoprotein from spent brewer's yeast (*Saccharomyces uvarum*) and application of the obtained mannoprotein as a stabilizer in mayonnaise. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 12: 23-35.
4. Bzducha-Wrobel, A., Kieliszek, M. & Blazejak, S. 2013. Chemical composition of the cell wall of probiotic and brewer's yeast in response to cultivation medium with glycerol as a carbon source. European Food Research & Technology, 245: 234-237.
5. Cameron, D. R., Cooper, D. G. & Neufeld, R. J. 1998. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. Applied and Environmental Microbiology, 54: 1420-1425.
6. Chuma Conlette, O. 2011. Influence of growth media Composition on the emulsifying activity of bioemulsifiers produced by four bacterial isolates substrate specificity. Life Science Journal, 8: 253-259.
7. Demiric, A. & Pometo, A. L. 2000. Enhanced organically bound chromium yeast production. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 531-536.
8. Dikit, P., Maneerat, H. & Aran, H. 2010. Emulsifier properties of mannoprotein extract from yeast isolated from sugar palm wine. Science Asia, 36: 312-318.
9. Dragone, G., Mussatto, S., Silva, J. & Teixeira, A. 2011. Optimal fermentation condition for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. Biomass & Bioenergy, 35: 1977-1982.
10. Fonseca, G., Heinzle, E., Wittmann, C. & Gombert, A. K. 2008. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. Applied Microbiology and Biotechnology, 79: 339–354.
11. Ghaly, A. E., Kamal, M. A. & Avery, A. 2004. Influence of temperature rise on kinetic parameters during batch propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey under ambient conditions. World Journal Microbiology and Biotechnology, 19: 741-749.

12. Goswami, G., Chakraborty, S., Chaudhuri, S. & Dutta, D. 2012. Optimization of process by response methodology and kinetic modeling for batch production of canthaxanthin. Bioprocess and Biosystems Engineering, 35: 1375-1388.

13. Klis, F., Mol, P., Hellingwerf, K. & Brul, S. 2006. Dynamic of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology Reviews, 26: 239–256.

14. Koocheki, A., Taherian, A. R., Razavi, M. A. & Bostan, A. 2009. Response surface methodology for optimization of extraction yield, viscosity and emulsion stability of mucilage extracted from *Lepidium perfoliatum* seeds. Food Hydrocolloids, 23: 2369-2379.

15. Ligia, R., Jose, T., Rosario, O., Henny, C. & Van, D. M. 2008. Surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by bacteria. Process Biochemistry, 41: 1-10.

16. Liu, H. Z., Wang, Q. & Fang, F. 2009. Statistical optimization of culture media and conditions for production of mannan by *saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 14: 577-584.

17. Liu, X. Y., Wang, Q. X. & Liu, H. Z. 2010. A new isolation methods of mannan and glucans from spent yeast *saccharomyces cereviciea*. Food Hydrocolloids, 22: 239-247.

18. Lizicarova, I., Matulova, M. & Capek, K. 2007. Human pathogen *candida dubliniensis*: a cell wall mannan with a high content of mannose residues. Carbohydrate Polymers, 10: 1016-1023.

19. Lukondeh, T., Ashboit, N. & Rogers, P. L. 2003. Evaluation of *Kluyveromycesmarxianus* as a source of yeast autolysates. Journal of International Microbiology and Biotechnology, 30: 52-56.

20. Nickerson, T. A., Vujicic, I. F. & Lin, A. Y. 1986. Colorimetric estimation of lactose and its hydrolytic products. Journal of Dairy Science, 59: 386-390.

21. Ozmihci, S. & Kargi, F. 2008. Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder solution as function of substrate and yeast concentration. Bioresource Technology, 98: 2978-2984.

22. Papagora, C., Roukas, T. & Kotzekidou, P. 2013. Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. Food and Bioproducts Processing, 91: 413-420.

23. Priscilla, F., Amaral, F., Coelho, I. & Marrucho, M. 2008. Bisourfactants from yeast: characteristics, production and application. Landes Bioscience, 4: 1-14.

24. Qiu, J., Song, F., Qiu, Y. & Guan, X. 2013. Optimization of the medium composition of a biphasic production system for mycelia growth and spore production of *Aschersonia placenta* using response surface methodology. Journal of Invertebrate Pathology, 112: 108-115.

25. Schmidt, M., Strenk, E. Boyer, M. & Fritsch, J. 2005. Importance of cell wall mannoproteins for septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 22: 715–723.

26. Schultz, N., Chang, L., Hauck, A., Reuss, M. & Syldatk, C. 2006. Microbial production of single-cell protein from whey concentrates. Applied Microbiology and Biotechnology, 69: 515-520.

27. Stanislaw, B., Wanda, D. R., Malgorzata, G. & Piotr, W. 2008. Impact of magnesium and mannose in the cultivation media on the magnesium biosorption, the biomass yield and on the cell wall structure of *Candida utilis* yeast. European Food Research Technology, 227: 695-700.

28. Torija, M. J., Beltran, G., Novo, M. & Mas, A. 2005. Effect of nitrogen source on the fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiology, 20: 255-258.

Study of kinetic and optimization of the growth conditions of *Kluyveromyces marxianus* for the production of mannan bioemulsifier using cheese-whey powder

Jalal Mohammadzadeh[1], Farideh Tabatabaee[2], Seyed Ali Mortazavi[3*], Rassoul Kadkhodaee[4], Arash Koocheki[2]

1. PhD. Student, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
3. Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

*Corresponding author (morteza1937@yahoo.com)

4. Associate Professor, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food science and Technology, Mashhad, Iran

Abstract

Mannan is a glycoprotein which consists of mannose polymers attached to the protein backbone that due to its natural amphiphilic compounds, it can be used as an effective bioemulsifier. Therefore, in this study, optimization and screening tests were conducted on the production of mannan from kluyveromyces marxianus using combinatorial method of the fractional of full factorial design and response surface together with determining the influence of the variables of lactose concentration based on whey powder, the concentration of yeast extract, enzyme activator and pH. It was revealed that the four variables of lactose and yeast concentration, pH and temperature had the most influence on the production of the mannan. The optimization of effective factors using response surface methodology demonstrated suitable conditions for mannan production with the maximum of 209.23 mg/100 ml with concentration level of 52.60 gr/l of the lactose, 10.38 yeast extract, pH of 5.36 and the temperature of 31.90°C with the maximum growth rate of 0.401 h-1. Results also showed that monod's model had high correlation coefficient (0.998) and therefore could be used for prediction of yeast growth behavior as well as mannan production.

Keywords: Kluyveromyces marxianus, Mannan\Mannoprotein, Optimization, Response surface methodology