بهینه سازی و ارزیابی اثر امواج فرا صوت بر میزان رشد مخمر ساکارومایسس سرویزیه (PTCC 5269) در محیط کشت PDB بر پایه آب پنیر با استفاده از روش پاسخ سطح

محمد مهدی قلیان: دانشگاه آزاد اسلامی واحد الیگودرز، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، الیگودرز، ایران. M.Mahdi.Gholian@gmail.com
* **رضا رضائی مکرم:** گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران (*نویسنده مسئول).Rmokarram@tabrizu.ac.ir
محمد امین حجازی: پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور، تبریز، ایران. AminHejazi@yahoo.com
محمود صوتی خیابانی: گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. Sowti_m@yahoo.com
حامد همیشه کار: مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. Hamishehkar.hamed@gmail.com
فاطمه زنده بودی: گروه علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی مشهد، مشهد، ایران. Fzendeboodi@gmail.com
فاطمه کیوانی: گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. Keivani_f@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: برای کاهش هزینه‌های تولید محصولات میکروبی در صنعت، بهتر است از محصولات فرعی یا ضایعات کشاورزی استفاده کرد. فرا صوت با توان پائین می‌تواند نفوذپذیری غشا و سرعت انتقال مواد را بهبود بخشیده و رشد و تولید مثل سلول‌ها را بهینه کند. با توجه به راندمان بالای ساکارومایسس سرویزیه در صنعت تخمیر، در این پژوهش اثر امواج فراصوت و همچنین استفاده از آب پنیر به عنوان سوبسترای جایگزین سوبستراهای کربوهیدراتی، بر میزان رشد ساکارومایسس سرویزیه مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار: در این تحقیق از مخمر ساکارومایسس سرویزیه (PTCC ۵۲۶۹) استفاده شد. بهینه سازی میزان رشد مخمر در محیط کشت PDB فرموله شده با آب پنیر با اعمال امواج فراصوت با سه توان (۲، ۶ و ۱۰ وات) در مدت زمان‌های مختلف (۱۰، ۲۰ و ۳۰ ثانیه) به محیط حاوی مخمر بررسی گردید. میزان توده سلولی پس از فرآیند تخمیر برای نمونه‌ی شاهد و تیمار شده اندازه گیری شد.

یافته ها: شرایط عملکرد بهینه حاصل از روش RSM، توان فراصوت ۶ وات، زمان اعمال فراصوت ۲۰ ثانیه و افزودن ۱۰ درصد گلوکز بود. نتایج نشان داد که امواج فراصوت (با توان ۶ وات و زمان ۳۰ ثانیه) در محیط حاوی آب پنیر، سبب افزایش چشمگیری در میزان رشد مخمر (از ۱۴/۸ گرم به ۶۴/۶ گرم) شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که با اعمال امواج فراصوت با توان پایین می‌توان بازدهی فرآیندهای تخمیر را تا حدود ۴ برابر افزایش داد، هم‌چنین با استفاده از ترکیبات مغذی موجود در آب پنیر، محیطی جدید جهت افزایش بازدهی محصولات تخمیری ایجاد کرد.

کلیدواژه‌ها: محصولات تخمیری، آب پنیر، امواج فراصوت

مقدمه

فراصوت یکی از فناوری‌های نوظهور است که کاربرد آن در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی روز به روز در حال گسترش می‌باشد (۱). نحوه استفاده از امواج فراصوت در صنایع غذائی به دو گونه است: امواج دارای بسامد بالا و توان پائین و امواج دارای بسامد پائین و توان بالا (۲). امواج فراصوت با توان بالا به عنوان ابزاری در تغییر ویژگی های مواد غذایی نظیر هموژنیزه کردن، تمیزکردن، استریل کردن، حرارت دادن، امولسیفیه کردن، مهار فعالیت آنزیم‌ها و میکروب‌ها و متلاشی کردن سلول، تشدید واکنش‌های اکسیداسیون، اصلاح گوشت و اصلاح کریستالیزاسیون استفاده می‌شود (۳).

از امواج فراصوت با توان پایین به عنوان روش تجزیه‌ای و تشخیصی در تهیه اطلاعات مربوط به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مواد غذایی استفاده می‌شود. در این حالت توان به کار رفته به حدی پائین است که پس از قطع امواج فراصوت، هیچ‌گونه تغییری در خواص فیزیکی و شیمیایی مواد غذایی ایجاد نمی‌شود. در نتیجه به این تکنیک غیرمخرب (Non-destructive) می گویند (۴). به کارگیری فراصوت توان پایین در محیط های کشت میکروبی، موجب کاهش یا از بین رفتن بقای زیستی نمی‌شود. در مطالعه ای رادل و همکاران (۵) حیات سلول‌های مخمر که

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-18]

تحت اعمال فراصوت با دامنه‌های امواج مختلف قرار گرفته بودند، بررسی شد. در این تحقیق فراصوت با فرکانس ۲ مگاهرتز مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد، کاهشی در بقای زیستی و حیات سلولی ایجاد نشده است، ولی تغییراتی بر حسب نوع سوسپانسیون و تیمار فراصوت در ویژگی های مورفولوژیکی مخمر ایجاد شده است. سلول میکروارگانیسم ها به طور کاملا مشخصی می تواند حساسیت متفاوتی نسبت به شوک فراصوت از خود نشان دهند ولی در بسیاری از موارد می تواند افزایش نرخ و رشد و تولید شود.

برای مثال در یک تحقیق فرانکو و همکاران(۶) تیمار فراصوت با فرکانس ۲۴ کیلو هرتز به مدت روزانه ۵ دقیقه موجب افزایش نرخ رشد و میزان توده ی سلولی نهایی در *سیانوباکتریوم آنابنا* (*Cyanobacteria Anabaena*) شد، در صورتی که همین تیمار موجب کاهش نرخ رشد میکروارگانیسم *میکروآلگا سلنا سترووم* (*Selenastrum capricornutum*) شد، البته در هر دو میکروارگانیسم تیمار فراصوت سبب افزایش محتویات پروتئینی می شود، اعمال فراصوت بر آنابنا موجب افزایش ۴۶ درصدی تولید توده ی سلولی نسبت به نمونه ی شاهد شد. این اثر مهم فراصوت در دوره های کوتاه اعمال فراصوت، پتانسیل تجاری خوب این تکنیک، در بکارگیری آن در فرآیندهای زیستی را نشان می دهد. ماتیسورا و همکاران (۷) اثر اعمال فراصوت بر رشد مخمر و همچنین تولید دیگر ترکیبات فرار در فرآیند تخمیر را مورد بررسی قرار دادند، نتایج نشان داد دوره ی تخمیر جو و برنج ۶۴-۵۰ درصد کاهش یافت، همچنین در مطالعه ای دیگر چو و همکاران (۸) اعمال فراصوت به مدت ۱۵۰ ثانیه با فرکانس ۲۵ کیلوهرتز، بر روی *میکرونوسپورا اکینوسپورا* (*Micromonospora echinospora*)، موجب افزایش ۷۶ درصدی تولید جنتامایسین درون سلولی شد. مطالعات نشان می دهد اعمال فراصوت در شرایط مناسب موجب تسریع در رشد سلولی و افزایش تولید محصولات تخمیر در اکثر موارد شده است.

آب پنیر مایعی زرد مایل به سبز است که پس از انعقاد شیر به وسیله اسید یا آنزیم پروتئولیتیک، در مرحله آب گیری از دلمه شیر جدا می شود (۹). آب پنیر دارای مواد آلی مفیدی است که در فرآیند تولید پنیر، از شیر وارد آن می‌شود. به طور متوسط آب پنیر حاوی حدود ۷۰-۶۵ گرم در هر کیلوگرم ماده جامد بوده است که این ماده جامد شامل لاکتوز، پروتئین، خاکستر، ازت غیرپروتئینی و جربی است. اجزاء پروتئینی آب پنیر شامل بتالاکتوگلوبولین، آلفالاکتالبومین و سایر انواع پروتئین ها از جمله ایمونوگلوبولین ها است (۱۰). آب پنیر به سبب دارا بودن پروتئین هایی با بالاترین کیفیت بیولوژیکی، دارای ارزش تغذیه ای بسیار بالایی می باشد. به دلیل وجود این مواد، آب پنیر دارای COD (Chemical Oxygen Demand) (حدود ۷۶۰۰۰ppm) و BOD بسیار بالا (حدود ۴۰۰۰۰ ppm) می‌باشد که به عنوان پساب بسیار آلوده در نظر گرفته می‌شود(۹).

مقدار BOD نرخ مصرف اکسیژن در داخل آب توسط ارگانیزم ها است. اگر BOD کم باشد آب پاک و فاقد ارگانیسم است یا آنکه ارگانیزم های داخل آب مرده و نیازی به مصرف اکسیژن ندارند. مقدار COD یا همان (اکسیژن خواهی شیمیایی)، یکی از مهمترین شاخص های سنجش آلودگی فاضلاب است. آلودگی فاضلاب ناشی از مواد خارجی است که وارد آب شده و بصورت معلق یا محلول باعث آلودگی آن و تولید فاضلاب شده اند. بدیهی است هرچه مقدار این مواد در فاضلاب بیشتر باشد، بار آلودگی آن نیز بیشتر خواهد بود. بنابراین اندازه گیری مقدار مواد خارجی فاضلاب کلید اصلی در تعیین مقدار آلودگی و آلایندگی فاضلاب است.

اگر آب پنیر بر روی خاک های کشاورزی پخش شود، املاح آن باعث جلوگیری از رشد گیاهان خواهد شد. میزان BOD (Biological Oxygen Demand) بالای آب پنیر عمدتا به دلیل لاکتوز موجود در آن می‌باشد که حتی پس از جداسازی پروتئین ها با تکنولوژی های جدید غشایی نیز در آن‌ها باقی می‌ماند (۱۱). نظر به تنوع گسترده ترکیبات موجود در آب پنیر و همین طور عکس العمل مناسب این زیر فرآورده نسبت به عمل

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-18]

آوری توسط روش های مختلف بیولوژیکی، جهت کاهش آلودگی آن راه های متعدد و متفاوتی پیشنهاد شده است. در این روش ها صرفا کاهش بار آلودگی آب پنیر و حفظ محیط اطراف واحد های تولیدی مورد نظر است و اساسا بر تصفیه بیولوژیکی آب پنیر قرار دارند. از مهمترین این روش‌ها می‌توان به تخمیر های هوازی و بی‌هوازی اشاره نمود (۱۲).

همچنین در طول دو دهه اخیر نیز استفاده از آب پنیر به عنوان ماده اولیه تخمیر، به نحو گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته و نتیجه حاصل از انجام این بررسی‌ها نشان داده که امکان پذیرترین فرآیندها در این راستا، استفاده از آب پنیر در جهت افزایش رشد سلولی، تولید پروتئین تک یاخته، اتانول و اسید های آلی می باشد. بدین ترتیب نه تنها می توان محصولات مفید و گرانقیمتی را به دست آورد، بلکه می توان میزان بالای آلودگی ناشی از آن را نیز تا حدود ۹۵-۹۰ درصد کاهش داد (۹).

مخمر را می‌توان قدیمی ترین میکروارگانیسم صنعتی شناخته شده توسط بشر در نظر گرفت. مخمرها یوکاریوت هایی تک سلولی هستند که در طبقه بندی علمی جانداران در فرمانرو یا سلسله (Kingdom) قارچ‌ها و شاخه آسکومیست‌ها دسته بندی می‌شوند. مخمرها به سه صورت فعالیت می کنند؛ اکسیدکننده، تخمیرکننده، هم اکسید کننده و هم تخمیر کننده. بهترین ماده انرژی زا برای آن ها قندها می باشند (۱۳).

مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* تخمیرکننده قوی است که در صنایع مختلف تخمیری نظیر نان و نوشیدنی‌های الکلی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳). این مخمر نسبت به شوک‌های محیطی مثل pH پایین و دمای بالا مقاومت زیادی دارد و محیط کشت آن حاوی قند، نمک های معدنی با pH، ۴/۳ تا ۴/۵ و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و غلظت قند بین ۰/۵ تا ۱/۵٪ می‌باشد (۱۴). کلنی‌های *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط کشت آگار حاوی عصاره دکستروز، توانایی بالایی از خود نشان می‌دهند (۱۵). این مخمر کارایی بسیار بالایی در صنعت تخمیر دارد و طی فرآیند تخمیر با تولید بالای متابولیت فعالیت می کند. کاربرد گسترده آن در فرآیند های تخمیری در صنایع غلات خود گویای این مهم می باشد سلول های این مخمر، در هر دو صنعت تولید اتانول و تولید نان، بیشترین راندمان را از خود نشان داده اند (۱۶). به همین جهت راهکارهایی برای افزایش متابولیت حاصل ارائه شده که از آن جمله استفاده از آب پنیر به عنوان کمک پایه محیط کشت می‌باشد (۱۷)

روش کار

میکروارگانیسم مورد نظر *ساکارومایسس سرویزیه* PTCC5269 انتخاب و به صورت آمپول لیوفلیزه از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران دریافت شد. مخمر جهت آماده سازی در شرایط استریل در ۱۰۰ میلی لیتر از محیط کشت مایع PDB (Potato dextrose Broth) فعال سازی شد (۱۸). این محیط برای کشت و شمارش مخمر ها به کار می رود.پلیت های تهیه شده به صورت ضخیم و قطور تهیه می شوند تا در طی انکوباسیون طولانی مدت،اثرات خشک شدن را کاهش دهند. همچنین از این محیط برای تحریک اسپورسازی (تهیه لام و اسلاید)،برای نگهداری کشت های ذخیره (stock) بعضی از درماتوفیت ها و برای تفکیک انواع غیر معمولی درماتوفیت ها از طریق تولید پیگمان استفاده می شود. این محیط مناسب ترین محیط برای رشد و تولید متابولیت مخمر ساکارومایسس سرویزیه می باشد . برای این منظور از دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و لرزاننده ۱۰۰ دور در دقیقه استفاده شد. جهت نگهداری مخمرها از محیط کشت جامد شیب دار PDA (Potato Dextrose Agar) و گرمخانه گذاری در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد استفاده گردید (۱۹). برای اثر افزودن قند، گلوکز D^+ تهیه و بر حسب درصد های مورد نظر به تیمارهای مشخص شده، اضافه گردید. برای مشاهده نمونه‌ها از میکروسکوپ نوری با دوربین دیجیتال استفاده شد.

برای اعمال فراصوت، دستگاه فراصوت پروب با توان پائین انتخاب شد. به جهت سهولت کار و به

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-18]

حداقل رساندن احتمال آلودگی ثانویه، محیط کشت در درون لوله آزمایش تهیه شد. آزمایش با انتقال ۲٪ کشت آغازگر به لوله ها آغاز شد. برای کاهش احتمال مرگ و میر مخمر در اثر افزایش دمای ناگهانی ناشی از اعمال فراصوت، کنترل شرایط دمایی و کاهش دمای نمونه طی اعمال فراصوت، با استفاده از حمام یخ انجام شده و دما در حدود درجه حرارت محیط تثبیت گردید (۲۰).

فرموله کردن محیط کشت بر پایه آب پنیر: جهت بررسی اثر افزودن آب پنیر به عنوان یک محیط پیچیده (Complex) بر راندمان تولید متابولیت توسط *ساکارومایسس سرویزیه*، محیط کشت PDB (Potato dextrose Broth) بر اساس افزودن آب پنیر فرموله شد. به این ترتیب که با جایگزینی آب پنیر به جای افزودن آب مقطر، محیط کشت مورد نظر تهیه شد. این انتخاب سبب می‌شود تا از یک محیط کشت ساده (Define)، بتوان یک محیط کشت پیچیده مناسب و جدید برای افزایش راندمان تولید متابولیت توسط مخمر بهینه سازی کرد. پس از افزودن آب پنیر به محیط خشک، اتوکلاو کردن در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. به جهت اینکه شرایط برای دو تیمار یکسان باشد، pH آب پنیر با سود ۰/۱ نرمال خنثی شد تا مشابه pH محیط PDB معمولی باشد.

اعمال امواج فراصوت به مخمر: برای اعمال فراصوت، جهت سهولت کار و به حداقل رساندن احتمال آلودگی ثانویه، محیط کشت در درون لوله آزمایش تهیه شد. آزمایش با انتقال ۲٪ کشت آغازگر به لوله ها آغاز شد. پروب در عمق یک سانتی متری محیط کشت، درون لوله قرار داده شد. یک نمونه به عنوان شاهد و شانزده تیمار (تعیین فرمولاسیون با روش سطح پاسخ)، تهیه شده و تیمار فراصوت با فرکانس ۲۴ کیلو هرتز، با توجه به توان فراصوت، زمان اعمال فراصوت و افزودن گلوکز اعمال شد(۲۰). به جهت اینکه سلول‌های اولیه مخمر تحت فراصوت قرار گرفت و برای اینکه سلول‌های حاصل از رشد نیز تحت فراصوت قرار گرفته و برای مشاهده نتیجه نهایی، هر سه ساعت یکبار به صورت مداوم تا پایان آزمایش انجام و تغییرات مشاهده و ثبت شدند. کلیه آزمون ها سه بار تکرار شدند. دما و pH مایع به صورت متناوب اندازه گیری شد(۲۱). دمای محیط درون لوله در هنگام اعمال امواج با استفاده از حمام یخ در دمای محیط نگه داشته شد. تخمیر در دامنه دمایی ۱±۳۷ درجه سانتیگراد، به مدت ۴۸ ساعت ادامه پیدا کرد (۲۲).

اندازه گیری وزن خشک مخمر: آزمون تعیین وزن خشک، به جهت بررسی زنده مانی مخمر بعد از اعمال فراصوت و همچنین برای بررسی اثر متغیر های فراصوت و میزان گلوکز محیط بر رشد مخمر و تشکیل توده زیستی انجام شد (۲۳). در مرحله قبل از اعمال فراصوت و بعد از تیمار با فراصوت، از نمونه ها وزن خشک گرفته شد و میزان افزایش وزن خشک، نشان دهنده رشد مخمر و عدم مرگ آن طی اعمال فراصوت می‌باشد. برای این کار، ابتدا حجم مشخصی از محیط براث PDB حاوی میکروارگانیسم تخمیر شده را برداشته و به ظرف های سانتریفوژ منتقل گردیده و سه بار عمل سانتریفیوژ نمونه ها با G=۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه انجام شد، سوپرناتانت فوقانی از آن جدا شد و پروتئین تک یاخته توسط افزودن آب مقطر، سه بار شستشو گردید (۲۳)، سپس برای رسوب‌دادن مجدد، در همان شرایط سانتریفوژ گردید. پروتئین تک یاخته به ظرف های شیشه ای که از قبل وزن شده بودند، منتقل در نهایت آون گذاری در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد تا رسیدن به وزن ثابت انجام شد برای این کار توزین نمونه ها هر ۲ الی ۳ ساعت یک بار انجام شد تا زمانی که وزن نمونه در اثر حرارت و دما تغییر نکرد و ثابت ماند. تفاوت وزن اولیه و نهایی میزان پروتئین تک یاخته را تعیین نمود (۲۴) .

تجزیه و تحلیل آماری: برای بهینه سازی اثر فاکتورها بر راندمان افزایش وزن خشک مخمر از طرح آماری روش سطح پاسخ (Response surface methodology) استفاده شد. برای بهینه سازی در روشهای طراحی آزمایش (Design of experiments) روشهای بهینه سازی شامل Mixture design، Taguchi، Response Surface Methodology وجود دارند که اولی برای

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-18]

جدول ۱- متغیر های اصلی در سه سطح جهت تعیین میزان پاسخ

نوع متغیر	واحد	نماد ریاضی متغیر	سطوح متغیر		
			+۱	۰	-۱
توان فراصوت	وات (W)	X_1	۱۰	۶	۲
زمان اعمال فراصوت	ثانیه (.Sec)	X_2	۳۰	۲۰	۱۰
افزودن گلوکز	درصد ٪ (w/w)	X_3	۱۵	۱۰	۵

فرمولاسیون دومی برای شرایط فرآیندی و سومی دارای کاربرد همزمان برای تغییرات فرآیندی و فرمولاسیون است. روش RSM خود دارای ۲ تکنیک است. یکی Central Composite Design که همزمان میتواند ۲ تا ۹ فاکتور (متغیر مستقل) را با تعداد زیادی پاسخ (متغیر وابسته) مدل سازی و بهینه نماید. دیگری Box- Behnken که ۳ الی ۷ فاکتور را با تعداد زیادی پاسخ (متغیر وابسته) مدل سازی نموده و بهینه می کند. نکته قابل توجه این است که برای استفاده از این روشها از ابتدا طراحی تیمار ها باید بوسیله این روشها انجام گیرد تا بتوان تحلیل داده ها را نیز به همین روشها و به کمک نرم افزار انجام داد. بطوریکه طراحی تیمار ها توسط نرم افزار و البته با توجه به اطلاعاتی که به آن داده می شود مشخص می‌گردد و پس از بدست آمدن نتایج آزمایشها، تحلیل داده ها نیز توسط نرم افزار صورت گرفته و نقطه بهینه بدست می آید. در واقع RSM با استفاده از رگراسیون و بر اساس یک تابع چند جمله ای درجه دو مدل سازی ریاضی داده ها را انجام میدهد.در این تحقیق از طرح باکس- بنکن (Box-Behnken) با ۱۶ آزمایش که شامل ۴ آزمایش در نقطه مرکزی است، استفاده گردید (۲۵). اثرات تغییرپذیری غیر قابل توجیه در پاسخ مشاهده شده، به علت عامل های خارجی، به وسیله تصادفی کردن ترتیب آزمایش ها کاهش داده شد. متغیر های مستقل طرح در سه سطح (۱- ، ۰ ، ۱+) شامل توان فراصوت (X_1، وات) در سطوح (۲ ، ۶ و ۱۰ وات) ، زمان اعمال فراصوت (X_2 ، ثانیه) در سطوح (۱۰ ، ۲۰ و ۳۰ ثانیه) و افزودن گلوکز به عنوان منبع قند (X_3، وزنی/وزنی٪) در سطوح (۵ ، ۱۰ و ۱۵ ٪) می‌باشند. متغیر وابسته (Y) میزان وزن خشک (گرم) انتخاب شد (جدول ۱).

نرم افزار SAS 9.1 (انگلستان) برای تجزیه و تحلیل داده های آماری مورد استفاده قرار گرفت. داده های آزمایشی با معادله چند جمله ای درجه دوم تطبیق داده شد و ضریب همبستگی محاسبه شد. ضریب همبستگی (Correlation Coefficient) ابزاری آماری برای تعیین نوع و درجه رابطه ی یک متغیر کمی با متغیر کمی دیگر است وشدت رابطه و همچنین نوع رابطه (مستقیم یا معکوس) بین متغیرها را نشان می‌دهد. معادله چند جمله ای درجه دوم استفاده شده در تجزیه و تحلیل به صورت زیر است:

معادله (۱)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i<j}}^{k-1} \sum_{j=2}^{k} \beta_{ij} X_i X_j$$

در این فرمول Y متغیر وابسته یا پاسخ مدل، β_0، β_i ، β_{ii} و β_{ij} به ترتیب ضرایب رگرسیون برای عامل های ضریب ثابت (عرض از مبدأ)، ضریب اثر خطی، ضریب اثر درجه دوم و ضریب اثر متقابل هستند و X_i و X_j متغیر های مستقل هستند. نرم‌افزار آماری Statistica 10 برای ایجاد سطوح پاسخ و کنتور در حالی مورد استفاده قرار گرفت که یک متغیر در معادله چند جمله ای درجه دوم ثابت نگه داشته شد.

یافته‌ها

با توجه به ۱۶ تیمار مورد آزمون که با روش سطح پاسخ بدست می آید، آزمون های مورد نظر انجام شد و نتایج آزمایش های تأثیر اثر توان فراصوت، زمان اعمال فراصوت و اثر افزودن گلوکز روی میزان وزن خشک مخمر در محیط کشت PDB حاوی آب پنیر در جدول (۲) آورده شده

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-18]

است. با توجه به داده های این جدول کمترین و بیشترین میزان وزن خشک مخمر ۱۴/۸ گرم و ۶۴/۶ گرم (به ترتیب در نمونه شماره ۱ و ۸) مشاهده شد.

نتایج تجزیه و تحلیل نحوه پراکندگی داده‌ها اطراف مقدار میانگین برای میزان وزن خشک مخمر در مرحله بهینه سازی در جدول (۳) نشان داده شده است. مدل به دست آمده برای پیش بینی تأثیر توان فراصوت (X_1)، زمان اعمال فراصوت (X_2) و افزودن گلوکز (X_3) بر روی میزان وزن خشک مخمر با حذف عوامل غیر معنی دار به صورت زیر به دست می‌آید (معادله ۲).

$$Y = -14.6562 + 3.7300 X_2 - 4.5250 X_3 - 0.5391 X_1^2 - 0.0645 X_2^2 + 0.2660 X_3^2 \quad \text{(معادله ۲)}$$

جدول ۲- نمایش تأثیر توان فراصوت، زمان اعمال فراصوت و افزودن گلوکز بر روی میزان وزن خشک مخمر در محیط کشت PDB حاوی آب پنیر (اعداد به صورت میانگین آورده شده اند).

فرمولاسیون	میزان وزن خشک مخمر (گرم) *	فرمولاسیون	میزان وزن خشک مخمر (گرم) *
تیمار ۱	۱۴/۸ ± ۰/۰۳۲	تیمار ۹	۲۸/۴ ± ۰/۰۰۱۵
تیمار ۲	۳۵/۱ ± ۰/۰۰۱	تیمار ۱۰	۱۶/۶ ± ۰/۰۰۱۳
تیمار ۳	۲۴/۵ ± ۰/۰۰۳۲	تیمار ۱۱	۵۲/۶ ± ۰/۰۲۱
تیمار ۴	۲۸/۳ ± ۰/۰۰۱۴	تیمار ۱۲	۵۷/۵ ± ۰/۰۰۰۱
تیمار ۵	۲۰/۶ ± ۰/۰۱۳	تیمار ۱۳	۴۰/۹ ± ۰/۰۰۳
تیمار ۶	۳۸/۹ ± ۰/۰۳۲	تیمار ۱۴	۳۷/۴ ± ۰/۰۰۷
تیمار ۷	۳۹/۷ ± ۰/۰۴۱	تیمار ۱۵	۳۹/۱ ± ۰/۰۰۳
تیمار ۸	۶۴/۶ ± ۰/۰۰۵۱	تیمار ۱۶	۴۵/۶ ± ۰/۰۰۲

* اعداد به صورت میانگین ± انحراف استاندارد آورده شده است.

جدول ۳- نتایج تجزیه و تحلیل واریانس تأثیر توان فراصوت، زمان اعمال فراصوت و افزودن گلوکز بر روی میزان وزن خشک مخمر در محیط کشت PDB حاوی آب پنیر

منبع تغییرات	ضرایب رگرسیون	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	F	P
X_1	+ ۰/۵۰۰۰	۱	۲/۰۰۰۰	۲/۰۰۰۰	۰/۰۷۳۷	۰/۷۹۵۳
X_2	+ ۳/۷۳۰۰	۱	۵۹۳/۴۰۱۳	۵۹۳/۴۰۱۳	۲۱/۸۴۲۰	۰/۰۰۳۵**
X_3	- ۴/۵۲۵۰	۱	۱۴۶۶/۱۱۱۰	۱۴۶۶/۱۱۱۰	۵۳/۹۶۴۸	۰/۰۰۰۳***
X_1^2	- ۰/۵۳۹۱	۱	۲۹۷/۵۶۲۵	۲۹۷/۵۶۲۵	۱۰/۹۵۲۷	۰/۰۱۶۳*
X_1X_2	- ۰/۱۰۳۱	۱	۶۸/۰۶۲۵	۶۸/۰۶۲۵	۲/۵۰۵۳	۰/۱۶۴۶
X_1X_3	+ ۰/۲۰۸۸	۱	۶۹/۷۲۲۵	۶۹/۷۲۲۵	۲/۵۶۶۴	۰/۱۶۰۳
X_2^2	- ۰/۰۶۴۵	۱	۱۶۶/۴۱۰۰	۱۶۶/۴۱۰۰	۶/۱۲۵۳	۰/۰۴۸۲*
X_2X_3	+ ۰/۰۳۳۰	۱	۱۰/۸۹۰۰	۱۰/۸۹۰۰	۰/۴۰۰۸	۰/۵۵۰۰
X_3^2	+ ۰/۲۶۶۰	۱	۱۷۶/۸۹۰۰	۱۷۶/۸۹۰۰	۶/۵۱۱۰	۰/۰۴۳۴*
مدل	-	۹	۲۸۵۱/۰۵۰۰	۳۱۶/۷۸۳۳	۱۱/۶۶۰۲	۰/۰۰۳۷**
اثر خطی	-	۳	۲۰۶۱/۵۱۲۰	۶۸۷/۱۷۰۸	۲۵/۲۹۳۵	۰/۰۰۰۸***
اثر درجه دوم	-	۳	۶۴۰/۸۶۲۵	۲۱۳/۶۲۰۸	۰/۸۶۳۰	۰/۰۱۶۸*
اثر متقابل	-	۳	۱۴۸/۶۷۵۰	۴۹/۵۵۸۳	۱/۸۲۴۲	۰/۲۴۳۱
باقی مانده	-	۶	۱۶۳/۰۰۷۵	۲۷/۱۶۸۰	-	-
عدم تطابق داده ها با مدل	-	۳	۱۲۵/۵۱۷۵	۴۱/۸۳۹۱	۳/۳۴۸۱	۰/۱۷۳۸
خطای خالص	-	۳	۳۷/۴۹۰۰	۱۲/۴۹۶۷	-	-
کل	-	۱۵	۳۰۱۴/۰۵۷۰	-	-	-

$R_2 = \%\ 94.59$, $R^2_{adj} = 86.48\ \%$

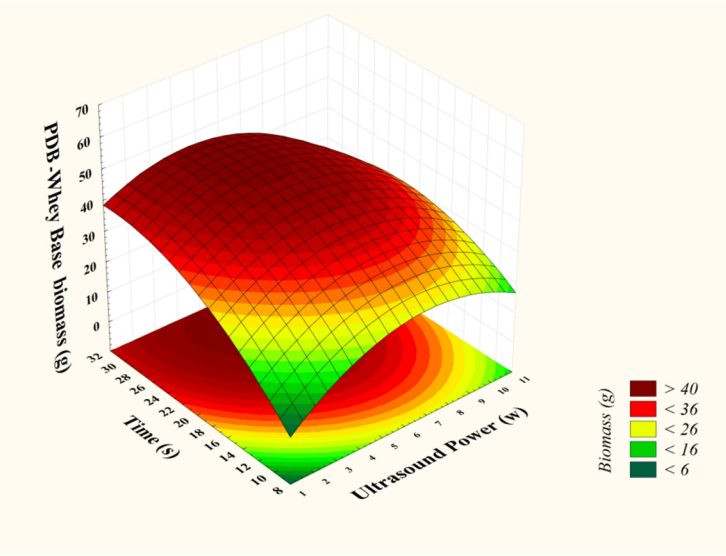
* نشان دهنده معنی داری در سطح احتمال ۵٪ ، ** نشان دهنده معنی داری در سطح احتمال ۱٪ و *** نشان دهنده معنی داری در سطح احتمال ۰/۱٪ است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-18]

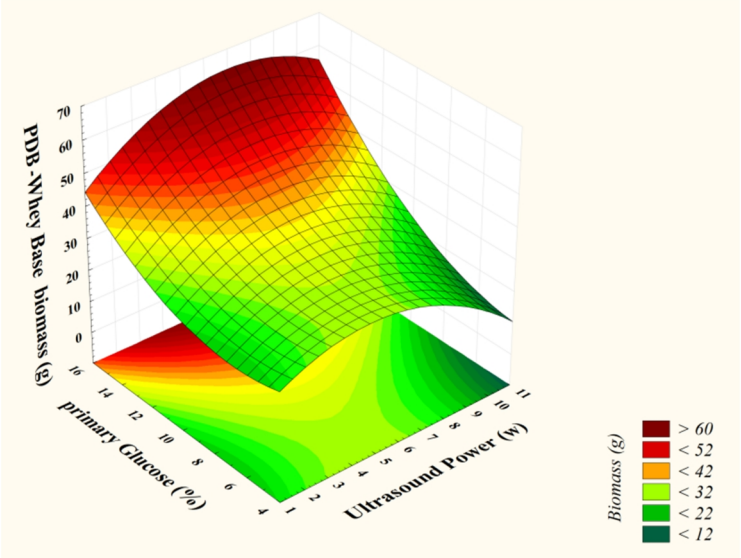
مقادیر p برای مدل ($p<۰/۰۱$) و برای عدم تطابق داده ها با مدل (۰/۱۷) تأییدی بر تطابق خوب مدل با داده های آزمایشی به دست آمده دارد. همانطور که در جدول (۳) مشخص است، اجزای مدل (X_2 $p<۰/۰۱$)، (X_3 $p<۰/۰۰۱$)، (X_1^2 $p<۰/۰۵$)، (X_2^2 $p<۰/۰۵$)، (X_3^2 $p<۰/۰۵$) معنی دار بودند. به این ترتیب که اثر زمان، افزودن گلوکز، و همچنین اثر متقابل توان-توان، زمان-زمان و افزودن گلوکز-افزودن گلوکز در سطوح ذکر شده معنی دار بودند.

ضرایب و مقادیر p مدل نشان می‌دهد که میزان وزن خشک مخمر به طور زیادی به توان فراصوت، زمان اعمال فراصوت و میزان افزودن گلوکز بستگی داشت ($p<۰/۰۱$)، (جدول ۳).

اثر خطی متغیرها نشان می‌دهد که با افزایش توان فراصوت، زمان اعمال فراصوت و میزان افزودن گلوکز، میزان وزن خشک مخمر افزایش می‌یابد ($p<۰/۰۰۱$)، (جدول ۳). همچنین اثر درجه دوم متغیرها نشان می‌دهد که با افزایش درجه دوم توان فراصوت، زمان اعمال فراصوت و میزان افزودن گلوکز، میزان وزن خشک مخمر افزایش می‌یابد ($p<۰/۰۵$)، (جدول ۳). مقدار



شکل ۱- نمودار سطح پاسخ تأثیر توان فراصوت و زمان اعمال فراصوت بر روی میانگین وزن خشک مخمر (گرم)



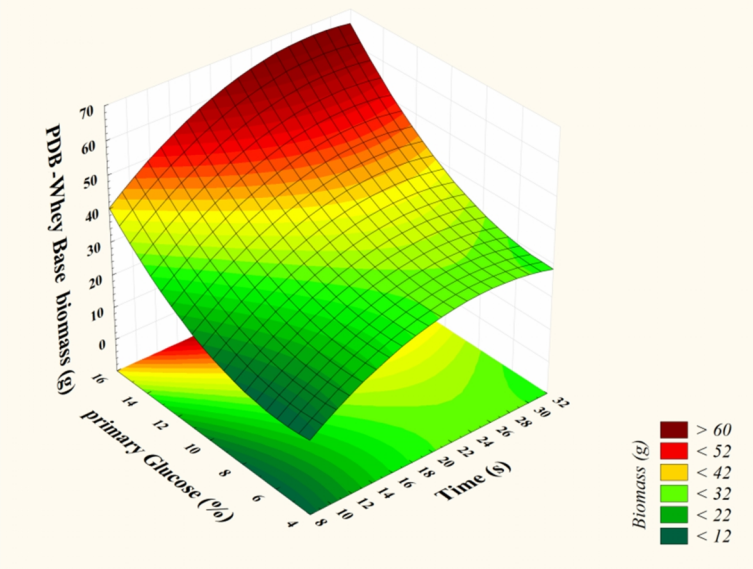
شکل ۲- نمودار سطح پاسخ تأثیر توان فراصوت و افزودن گلوکز بر روی میانگین وزن خشک مخمر (گرم)

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-18]

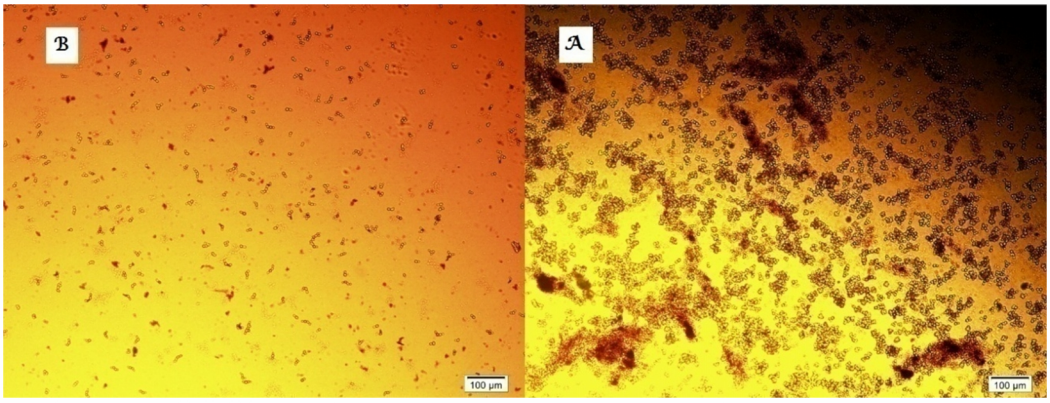
عددی ضریب تبیین R^2_{adj} برای مدل رگرسیونی به دست آمده ۸۶/۴۸٪ بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مدل رگرسیونی توانسته رابطه بین متغیر های مستقل (توان فراصوت، زمان اعمال فراصوت و افزودن گلوکز) و متغیر وابسته (وزن خشک مخمر) را نشان دهد و پیش بینی کند.

برای تعیین کردن تغییرات میزان وزن خشک مخمر با تغییر متغیرهای مستقل، سه منحنی سطح پاسخ سه بعدی که در آن متغیر وابسته (وزن خشک مخمر) بر محور Z در مقابل هر دو متغیر مستقل، در حالی که سایر متغیرها در مقادیر بهینه شان نگه داشته شوند، ترسیم شدند. بر اساس شکل ۱ اثر متقابل افزایش توان و زمان اعمال فراصوت بر میزان وزن خشک، در مورد اثر توان به صورت درجه دوم و برای زمان به صورت خطی می‌باشد. به این ترتیب که با افزایش توان تا مقادیر متوسط، افزایش وزن خشک، در متوسط ۶ وات بیشترین وزن خشک که برابر با ۶۴/۶ گرم و در مقادیر بالا کمترین وزن خشک برابر با ۱۴/۸ گرم حاصل می‌شود. همچنین با بالارفتن زمان اعمال فراصوت، افزایش وزن خشک مشاهده می‌شود.

همانطور که در نمودار شکل (۲) مشاهده می‌شود، اثر متقابل افزایش توان فراصوت و افزودن گلوکز بر میزان وزن خشک، در مورد اثر توان به صورت درجه دوم و برای افزودن گلوکز به صورت خطی می‌باشد. به این ترتیب که با افزایش توان تا مقادیر متوسط، افزایش وزن خشک، در متوسط بیشترین مقدار برابر با ۶۴/۶ گرم و در مقادیر بالا کمترین وزن خشک حاصل می‌شود. همچنین با



شکل ۳- نمودار سطح پاسخ تأثیر زمان اعمال فراصوت و افزودن گلوکز بر روی میانگین وزن خشک مخمر (گرم)



شکل ۴- تصویر میکروسکوپ نوری از ساکارومایسس سرویزیه قبل (A) و بعد (B) از اعمال فراصوت. (گرفته شده با عدسی X10)

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-18]

بالارفتن میزان افزودن گلوکز، افزایش وزن خشک مشاهده می‌شود.

اثر متقابل افزایش زمان اعمال فراصوت و افزودن گلوکز بر میزان وزن خشک، در مورد اثر زمان به صورت درجه دوم و برای افزودن گلوکز به صورت خطی می‌باشد (شکل ۳). به این ترتیب که با افزایش زمان افزایش وزن خشک به صورت درجه دوم حاصل می‌شود. همچنین با بالارفتن میزان افزودن گلوکز، افزایش وزن خشک به صورت خطی مشاهده می‌شود.

برای مشاهده رابطه بین مخمرها از تصویر میکروسکوپی (شکل ۴) استفاده شد. برای این کار قبل و بعد از اعمال فراصوت از نمونه ها با میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین دیجیتال تصاویری تهیه گردید.

بحث و نتیجه گیری

یکی از فاکتور هایی که می‌تواند تحت تأثیر فراصوت تغییر کند، رشد *ساکارومایسس سرویزیه* و تولید توده سلولی می‌باشد. این پدیده بر روی میزان توده سلولی پروتئینی تولیدی (توده زیستی) تأثیر زیادی می‌گذارد (۲۳). بنابراین بررسی میزان توده سلولی حاصل، یکی از فاکتور های مهم در بررسی اثر فراصوت بر مخمر می‌باشد و برای این کار وزن خشک مخمر سنجیده می‌شود. بررسی تغییرات میزان وزن خشک مخمر در سه منحنی سطح پاسخ سه بعدی نشان می دهد که بیشترین میزان رشد سلولی حاصل از روش RSM، در محیط کشت PDB، مقدار ۶۴/۶ گرم بود (جدول ۲). به این ترتیب شرایط عملکرد بهینه رشد سلولی حاصل از روش RSM، در محیط کشت PDB توان فراصوت ۶ وات، زمان اعمال فراصوت ۲۰ ثانیه و افزودن ۱۰ درصد گلوکز گزارش شد.

نتایج این آزمایش با نتایج وانگ و همکاران (۲۶)مطابقت داشت. بر اساس این پژوهش، در اثر اعمال فراصوت با توان پایین ۱ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز میزان مصرف منبع قندی در محیط تخمیر حاوی آب پنیر افزایش یافته و هم چنین متابولیت تولیدی در این محیط نیز افزایش یافته است. براساس این تحقیق دلیل اصلی این امر افزایش نفوذپذیری سلول مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* به قند و درنتیجه مصرف بیشتر ترکیبات موجود در محیط تخمیر توسط مخمر و در نهایت تولید و آزاد سازی بیشتر اتانول در نمونه‌های فراصوت زده بوده است. گلوکز در غلظت های بالا تقسیم سلولی را تحریک می کند و مانع از رفتن *ساکارومایسس سرویزیه* به سمت تولید متابولیت می شود، به تدریج با کاهش گلوکز در دسترس، مخمر به سمت تولید متابولیت می رود. در حالیکه در آب پنیر به دلیل وجود لاکتوز، نسبت کربن در دسترس کمتر می شود. در آب پنیر با کاهش منبع قندی محیط، مخمر به سمت استفاده از لاکتوز می رود و چون مصرف لاکتوز سخت بوده و آنزیم مورد نظر توسط مخمر سنتز نمی شود، میزان قند در دسترس کمتر شده و در نتیجه تولید محصول تحریک می شود.

کوویاتکوسکا و همکاران (۲۷) اثر فراصوت بر سلول های *ساکارومایسس سرویزیه* جهت افزایش تولید اتانول از آب پنیر را بررسی کردند. در این تحقیق فراصوت با توان پایین (توان ۱ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز) جهت افزایش اتانول اعمال شد. وی نشان داد که با بکارگیری فراصوت با شرایط ذکر شده میزان وزن خشک در مقایسه با نمونه های بدون فراصوت حدود ۳٪ افزایش یافت. همچنین میزان لاکتوز مصرف شده در نمونه های تیمار شده با فراصوت ۶٪ بیشتر از نمونه های تیمار نشده با فراصوت بود.

جومدچا و پراتیپاسون (۲۸) اثر فراصوت با توان پایین را بر فرآیند تخمیر و رشد سلولی مخمر بررسی نمودند. نتایج حاصل از آزمایشات این گروه نشان داد که رشد سلول های مخمر در نمونه های تیمار شده با فراصوت افزایش یافت. لائوپایبون و همکاران (۲۹) اثر منبع کربنی و نیتروژنی را بر میزان تولید اتانول بررسی نمودند. لانچون وهمکاران (۲۱) تاثیر فراصوت با توان پایین را بر خصوصیات فیزیولوژیکی *ساکارومایسس سرویزیه* بررسی نمودند. فراصوت با فرکانس ۲۴ کیلوهرتز، توان ۲ وات به مدت ۳۰ دقیقه اعمال شد. اثر فراصوت بر قدرت تخمیر و فعالیت پروتئیناز این مخمر بررسی گردید. براساس نتایج فعالیت آنزیمی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-18]

و وزن خشک مخمر افزایش یافت.

تأثیر سطوح مختلف توان فراصوت و زمان اعمال فراصوت را روی میانگین وزن خشک مخمر: در بررسی اثر متقابل توان و زمان اعمال فراصوت، بیشترین میزان وزن خشک مخمر در مقادیر متوسط توان فراصوت و مقادیر بالای زمان اعمال فراصوت حاصل می‌شود. این نتایج با نتایج سولایمن و همکاران (۳۰) مطابقت دارد. این محققان در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که با اعمال فراصوت با توان ۱۱ وات میزان میانگین وزن خشک *کلایورومایسس مارکسیانوس* افزایش می‌یابد همچنین بر اساس نتایج حاصل از این تحقیقات در صورت طولانی شدن زمان اعمال فراصوت وزن خشک نهایی به دلیل اثرات تخریبی بر مخمر کاهش می‌یابد.

تأثیر سطوح مختلف توان فراصوت و افزودن گلوکز را روی میانگین وزن خشک مخمر (گرم): بیشترین میزان وزن خشک مخمر در بررسی اثر متقابل توان فراصوت و افزودن گلوکز، در مقادیر متوسط توان فراصوت و مقادیر بالای افزودن گلوکز حاصل می‌شود. نتایج این تحقیق با نتایج یالشین و اوزباس (۳۱) مطابقت دارد. این محققان در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که با افزایش گلوکز تا میزان ۵۰ گرم بر لیتر، میانگین وزن خشک مخمر نیز افزایش یافت اما با افزایش بیش از این مقدار به دلیل بالا رفتن فشار اسمزی محیط تخمیر بر تعداد سلول ها اضافه نمی‌شود. همچنین ژیونگ همکاران (۳۲) در مطالعات خود به این موضوع پی بردند که با افزایش مقدار گزایلوز تا میزان ۱۱۰ گرم بر لیتر میزان وزن خشک سلول بیشتر می‌شود.

تأثیر سطوح مختلف زمان اعمال فراصوت و افزودن گلوکز را روی میانگین وزن خشک مخمر: در مقادیر متوسط به بالای زمان اعمال فراصوت و مقادیر بالای افزودن گلوکز، بیشترین میزان وزن خشک مخمر در بررسی اثر متقابل زمان فراصوت و افزودن گلوکز حاصل شد. این نتایج با نتایج سولایمن همکاران (۳۰) مطابقت دارد. این محققان در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که با اعمال فراصوت در زمان های متوسط به بالا، میزان وزن خشک افزایش می‌یابد اما در توان های بالاتر و زمان های طولانی تر اعمال فراصوت، به دلیل آسیب میکروارگانیسم، اثر بازدارندگی بر رشد و در نتیجه کاهش وزن خشک نهایی مخمر را به دنبال خواهد داشت. شرایط عملکرد بهینه حاصل از شکل درجه دوم مدل RSM برای بیشترین وزن خشک مخمر در محیط کشت PDB حاوی آب پنیر ، توان فراصوت (۶ وات)، زمان اعمال فراصوت (۲۰ ثانیه) و افزودن گلوکز (۱۰ ٪) تعیین شد.

اثر فراصوت توان پائین در محیط های میکروبی: به کارگیری فراصوت توان پایین در محیط های کشت میکروبی، موجب کاهش یا از بین رفتن بقای زیستی نمی‌شود. همانطور که در تصویر میکروسکوپی (شکل ۴) مشاهده می شود، با اعمال فراصوت آگلومره های مربوط به تجمع مواد دفع شده توسط سلول در اطراف مخمر از هم باز شده و مخمرها از هم فاصله می گیرند، در نتیجه ورود و خروج اکسیژن و دی‌اکسید کربن و همچنین ورود مواد غذایی و خروج مواد دفعی تسهیل شده و با اثر بر مصرف گلوکز و کاهش گلوکز باقیمانده در محیط، در نهایت سبب افزایش رشد و افزایش وزن خشک مخمر خواهد شد (۳۳).

این اثر مهم فراصوت در دوره های کوتاه اعمال فراصوت، پتانسیل تجاری خوب این تکنیک، در بکارگیری آن در فرآیند های زیستی را نشان می‌دهد. در مواد تراکم ناپذیر، تنش ناشی از امواج فراصوت سبب تسهیل آب زدایی از طریق کانال های موجود یا ایجاد کانال های جدید می‌گردد. در دوره انقباض امواج، کانال های میکروسکوپی در مسیر عبور امواج و در دوره انبساط موازی با آن به وجود می‌آیند. چنین سازوکاری به کاهش گرادیان فشار می‌انجامد و خروج مواد را تسهیل می‌کند. تحریک فراصوت با توان پائین، در صنعت استخراج مواد دارویی و گیاهی در دامنه وسیعی کاربرد دارد. فراصوت می‌تواند نفوذپذیری غشا و سرعت انتقال مواد را بهبود بخشد و رشد و تولید مثل سلول ها را بهینه کند. این موارد نشان می‌دهد که فراصوت، کاربردی مناسب در صنعت تخمیرخواهد داشت.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-18]

فراصوت این پتانسیل را دارد که در توان معینی موجب افزایش انتقال جرم در درون یک سلول شود (۳۴). فراصوت با ایجاد ریز جریان هایی درون سلول.گیاهان و جانوران، سبب افزایش انتقال از لایه های مرزی سلول خواهد شد. فراصوت می تواند موجب افزایش نرخ انتقال اکسیژن در مایع، حذف دی اکسید کربن و حل شدن ذرات جامد معلق شود. این عمل باعث افزایش به کارگیری سوبسترا های با حلالیت کم شده و به طور مستقیم موجب افزایش بازدهی فرآیند تخمیر می شود (۳۵).

در این پژوهش با اعمال امواج فراصوت به *ساکارومایسس سرویزیه*، میزان رشد این مخمر به میزان چشمگیری افزایش یافت که این امر نشان دهنده ی موثر بودن این فناوری جدید در بالا بردن ظرفیت تولید صنایع تخمیری است. هم چنین بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، استفاده از آب پنیر به عنوان فرآورده جانبی کارخانه‌های لبنی، روشی نوین و کاربردی جهت افزایش رشد مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* و متعادل کننده محیط رشد میکروارگانیسم می‌باشد که در نهایت سبب افزایش راندمان رشد این میکروارگانیسم جهت تولید پروتئین تک یاخته می‌گردد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از پرسنل محترم آزمایشگاه فرمولاسیون مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، همچنین پرسنل محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه تبریز که ما را در انجام آزمایشات یاری کردند، صمیمانه قدردانی می شود.

منابع

1. Awad TS, Moharram HA, Shaltout OE, Asker D, Youssef MM. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review Food Research International. 2012; 48(2): 410-427.

2. Juan GJA. High-power ultrasonic processing: recent developments and prospective advances. Journal of Physics Procedia, 2010; (3): 35-47.

3. Mason TJ. Developments in ultrasound – nonmedical. Prog. Biophys. Mol. Biol. 2007; (93): 166–175.

4. Kwiatkowska B, Bennett J, Akunna J, Walker GM, and Bremner DH. Stimulation of bioprocesses by ultrasound Biotechnology Advances, 2011; 29 (6): 768-780.

5. Radel S, McLoughlin AJ, Gherardini L, Doblhoff-Dier O, Benes E. Viability of yeast cells in well controlled propagating and standing ultrasonic plane waves. Ultrasonics. 2000; 38(1-8): 633-637.

6. Francko DA, Taylor SR, Thomas BJ, McIntosh D. Effect of low-dose ultrasonic treatment on physiological variables in Anabaena flos-aquae and Selenastrum capricornutum. Biotechnol. Lett. 1990; 12: 219-224.

7. Kazuo M, Masato H, Nunokawa Yataro, Satoh Masanori, Honda Keisuke. Acceleration of cell growth and ester formation by ultrasonic wave irradiation. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994; 77(1): 36-40.

8. Chu J. et al. On-line ultrasound stimulates the secretion and production of gentamicin by Micromonospora echinospora. Process Biochem, 2000; 35: 569–572.

9. Prazeres Ana R, Carvalho Fátima, Rivas Javier. Cheese whey management: A review. Journal of Environmental Management, 2012; 110(15): 48-68.

10. Paraskevopoulou A, Athanasiadis I, Blekas G, Koutinas AA, Kanellaki M, Kiosseoglou V. Influence of polysaccharide addition on stability of a cheese whey kefir-milk mixture. Food Hydrocolloids. 2003; 17(5): 615-620.

11. Stocker U.von, Marison IW. Unconventional utilization of whey in Switzerland, in: T.K. Ghose (Ed.), Bioprocess Engineering, IRS Press, Oxford, United Kingdom, 1993:330–364.

12. Smithers GW. Whey and whey proteins—from 'gutter-to-gold'. International Dairy Journal. 2008; 18 (7): 695-704.

13. Jay JM, Loessner MJ, and Golden DA. Modern Food Microbiology. Part II- Habitats, Taxonomy, and Growth Parameters: Springer. 2005.

14. Atlas R. Microbiological Production of Food .In: Microbiological media for the examination of Food. (2nd ed.). New York: Taylor and Francis Group and CRC Press. 2006.

15. Bochu W, Lanchun S, Jing Z, Yuanyuan Y, and Yanhong Y. The influence of Ca2+ on the proliferation of S. cerevisiae and low ultrasonic on the concentration of Ca2+ in the S. cerevisiae cells. Colloids Surf B Biointerfaces. 2003; (32):35–42.

16. Stuart H. Essential Microbiology: Essential Microbiology. 2005.

17. Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. Bioresource technology. 2000; 74: 69-80.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-18]

18. Mobini M, Nahvi I, Ghaedi K, and Tavassoli M. Isolation of high resistant species of Saccharomyces cerevisiae. Research in Pharmaceutical Sciences. 2007; (2): 10-28.
19. Ozmihci S, Kargi F. Fermentation of cheese whey powder solution to ethanol in a packed-column bioreactor: effects of feed sugar concentration. J. Chem. Technol. Biotechnol. 2009; (84): 106-111.
20. Mason TJ, Lormier JP. Applied Sonochemistry. Wiley-VCH: Weinheim, Germany. 2002.
21. Lanchun S, Bochu W, Liancai Z, Jie L, Yanhong Y, Chuanren D. The influence of low-intensity ultrasonic on some physiological characteristics of Saccharomyces cerevisiae. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2003;30 (1-2): 61-66.
22. Mendham M, Denney Y, Barnes JD, Thomas M. Vogel's textbook of Quantitative Chemical Analysis. Prentice Hall, Paris. 2000.
23. Altinta M, Ulgen KO, Kırdar B, Onsan ZI, and Oliver SG. Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factors. Enzyme and Microbial Technology. 2002; (31): 640–647.
24. Damtew W, Emire SA, Aber AB. Evaluation of Growth Kinetics and Biomass Yield Efficiency of Industrial Yeast Strains. Applied Science Research. 2012; 4 (5):1938-1948.
25. Box GEP, Behnken DW. Some new three level designs for the study of quantitative variables, Technometrics. 1960;2: 455–475.
26. Zhenbin W, Xiaoming L, Pingping L, Jie Z, Shiqing W, Haile M. Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment. Bioresource Technology. 2012, (117): 222–227.
27. Kwiatkowska B, Bennett J, Akunna J, Walker GM, Bremner DH. Stimulation of bioprocesses by ultrasound. Biotechnology Advances. 2011; 29(6):768-780.
28. Jomdecha C, Prateepasen A. The research of low ultrasounic energy affects to yeast growth in fermentation process. Paper presented at the 12th-PCNDT 2006-Asia Pacific Conference on NDT, Auckland, New Zealand. 2006.
29. Lakkana L, Sunan N, Penjit S, Preekamol K, Pattana L. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. Bioresource Technology. 2009; 100(18): 4176-4182.
30. Sulaiman AZ, Ajit A, Yunus RM, and Chisti Y. Ultrasound-assisted fermentation enhances bioethanol productivity. Biochemical Engineering Journal. 2011; 54 (3): 141-150.
31. Yalçin SK, Özbas ZY. Effects of different substrates on growth and glycerol production kinetics of a wine yeast strain Saccharomyces cerevisiae Narince 3 Process Biochemistry. 2004; 39(10): 1285-1291.
32. Xiong M, Chen G, Barford J. Alteration of xylose reductase coenzyme preference to improve ethanol production by Saccharomyces cerevisiae from high xylose concentrations Bioresource Technology. 2011; 102 (19): 9206-9215.
33. Ke W, Zhonggui M, Chengming Z, Jianhua Z, Hongjian Z, Lei T. Influence of nitrogen sources on ethanol fermentation in an integrated ethanol–methane fermentation system Bioresource Technology. 2012; 120, 206-211.
34. Vilkhu K, Mawson R, Simons L, Darren B. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2008; 9 (2): 161-169.
35. Jayani C, Christine O, Sandra K, Muthupandian A. Ultrasonics in food processing Ultrasonics Sonochemistry. 2012; 19(5): 975-983.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-18]

Optimization and evaluation effect of ultrasound on the *Saccharomyces cerevisiae* (PTCC 5269) biomass in PDB medium based on whey using response surface methodology (RSM)

Mohammad Mahdi Gholian, Young researchers and elite Club, Aligoudarz Brunch, Islamic Azad University, Aligoudarz, Iran.
***Reza Rezaei Mokarram,** Department of Food Science and Technology, Tabriz University, Tabriz, Iran (*Corresponding author). Rmokarram@tabrizu.ac.ir
Mohammad Amin Hejazi, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Tabriz, Iran.
Mahmoud Sowti Khiabani, Department of Food Science and Technology, Tabriz University,Tabriz, Iran.
Hamed Hamishehkar, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
Fatemeh Zendeboodi, Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran.
Fatemeh Keivani, Department of Food Science and Technology, Tabriz University, Tabriz, Iran.

Abstract

Background: It is better to use agricultural by-products or waste for microbial production to reduce costs in the industry. Whey is one of the by-products that are rich in nutrients like vitamins, proteins and essential amino acids. Low-intensity ultrasound stimulation can improve membrane permeability and also help optimize the growth and reproduction of cells. According to high efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* in the fermentation industry, the purpose of this study was to investigate the effect of ultrasound and the use of whey as alternative substrate carbohydrate substrates on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*.

Methods: PDB medium was formulated by adding a certain amount of dextrose and 1% whey. Ultrasound was applied to the medium containing yeast with three powers (2, 6 and 10 W) at different time periods (10, 20, 30 sec). The amount of cell mass was measured after fermentation process for control and treated samples.

Results: Optimum operating conditions obtained from RSM was the power of ultrasound 6 W, sonication time of 20 seconds and Add 10% glucose. Results showed that ultrasonic waves (with a power of 6 kW and 30 seconds) and medium containing whey increased the growth of yeast (from 8/14 to 6/64 mg).

Conclusion: Based on the results, the low-power ultrasound can expedite fermentation process up to 4 times, also using nutritious compounds in whey new media could be created to increase fermentation output and prevent possible pollutions. Whey is used as a novel and applied method to enhance the growth of the *Saccharomyces cerevisiae*, which will ultimately increase the growth efficiency of the microorganisms.

Keywords: Fermentation product, Whey, Ultrasound

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-07-18]