تولید گلوتامیک اسید از ضایعات خرما با بکارگیری کرینه باکتریوم گلوتامیکوم به روش تخمیر غوطه وری

محمود توکلی[i]؛ زهره حمیدی اصفهانی[ii]؛ محمد حسین عزیزی[iii]

چکیده

کشور ایران یکی از بزرگترین کشورهای تولید کننده خرما در جهان است و سالیانه نزدیک به ۵۰٪ از خرمای تولیدی به شکل ضایعات از چرخه اقتصادی کشور خارج می‌شود. هدف از این تحقیق تولید گلوتامیک اسید از ضایعات خرما با استفاده از ریزسازواره *کرینه باکتریوم گلوتامیکوم* CECT۶۹۰ به روش تخمیر غوطه‌وری است. در تحقیق حاضر اثر پنج متغیر مقدار مایه تلقیح، غلظت سوبسترا، مقدار پنی‌سیلین، مقدار فسفات و سن تلقیح در پنج سطح با روش سطح پاسخ مطالعه گردید. بیشترین مقدار گلوتامیک اسید تولید شده ۲۶/۶۷ mg/ml بدست آمد. مقادیر بهینه متغیرهای مقدار مایه تلقیح، غلظت سوبسترا، مقدار پنی‌سیلین، مقدار فسفات و سن تلقیح پیش‌بینی شده توسط مدل درجه دوم به ترتیب ۲ %V/V، ۲۵ %W/V، ۱ U/mL، ۴ g/L و ۱۰ h بدست آمد. بیشینه مقدار گلوتامیک اسید پیش بینی شده توسط مدل ۳۹/۳۲ mg/mL بدست آمد. نتایج تجربی در شرایط بهینه پیش‌بینی شده، اعتبار مدل را تایید نمود.

کلمات کلیدی

گلوتامیک اسید، *کرینه باکتریوم گلوتامیکوم*، ضایعات خرما، تخمیر غوطه‌وری، روش سطح پاسخ

Glutamic Acid Production from Date Wastes by Corynebacterium glutamicum under Submerged Fermentation

M. Tavakkoli; Z. Hamidy E.; M.H. Azizi

ABSTRACT

Iran is one of the largest date producer countries and approximately 50% of date production is wasted annually. The goal of this study is to produce glutamic acid from date waste using *Corynebacterium glutamicum* CECT690 by submerged fermentation. In this study the effect of five variables including inoculum size, substrate concentration, penicillin amount, phosphate amount and inoculum age in five levels using response surface methodology (RSM) has been studied. The greatest value of glutamic acid production was obtained 26.67 mg/mL. The variable optimum contents of inoculum size, substrate concentration, penicillin amount, phosphate amount and inoculum age obtained 2%v/v, 25%w/v, 1U/mL, 4g/L and 10h, respectively. The model predicted 39.32 mg/mL for maximize concentration of glutamic acid. Experimental results in predicted optimum conditions confirmed the model validation.

KEYWORDS

Glutamic acid, Corynebacterium glutamicum, Date waste, Submerged fermentation, Response surface methodology

[i] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس: Email: pardis6000@yahoo.com

[ii] دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس:Email: hamidy_z@modares.ac.ir

[iii] دانشیار، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشت درمانی شهید بهشتی: Email: mhazizitm@yahoo.com

۱- مقدمه

از دهه ۱۹۵۰ با کشف کرینه *باکتریوم گلوتامیکوم*، تولید اسیدهای آمینه به روش تخمیر یک تحول مهم در میکروبیولوژی صنعتی به حساب آمد. با کشف این باکتری و تولید صنعتی گلوتامیک اسید به روش تخمیر، قیمت جهانی آن از ۸ دلار به ۲ دلار کاهش یافت. با گسترش کاربردهای جدید مانند، افزودنی مواد غذایی، مواد دارویی، مکمل خوراک دام، لوازم آرایشی، مواد پلیمری و مواد شیمیایی مورد استفاده در کشاورزی تقاضا برای اسیدهای آمینه با سرعت افزایش یافته و این موضوع باعث گسترش تولید انبوه انواع اسیدهای آمینه شده است. تجارت جهانی اسیدهای آمینه با سرعت رشد سالیانه ۷-۵٪ ، در حال افزایش است [۱]. از میان اسیدهای آمینه تولیدی در دنیا گلوتامیک اسید بیشترین میزان تولید را شامل می‌شود. گلوتامیک اسید به عنوان عامل طعمی به شکل مونو سدیم گلوتامات و به عنوان ماده آغازگر برای تولید بسیاری از مواد شیمیایی استفاده می‌شود. همچنین مقدار گلوتامیک اسید تولید شده با روش تخمیردر سال ۲۰۰۳ یک میلیون و صدهزار تن تخمین زده شد [۲].

افزایش تقاضا به طور مداوم باعث گردیده که تلاش برای افزایش عملکرد تولید متوجه خود ریزسازواره‌ها و بهسازی روش‌های مرتبط با فرایند تولید گردد. مطالعات حاکی از آن است که بخش عمده گلوتامیک اسید در دنیا توسط ریزسازواره کورینه *باکتریوم گلوتامیکوم* تولید می‌شود. با کمک این ریزسازواره سالیانه یک میلیون تن ال- گلوتامات و چهارصد و پنجاه هزار تن ال- لیزین تولید می‌شود[۱]. طبیعت پس مانده ها و ضایعات غنی از مواد آلی آنها را به صورت سوبسترایی مناسب برای ریز سازواره ها در آورده است لذا از آنها در تولید محصولات زیادی همچون اسیدهای آلی و ترکیبات معطر استفاده می شود [۳]. تاکنون محققان از مواد ضایعاتی وپس مانده های زیادی از جمله متانول، ضایعات فیبری پالم (نخل روغنی) آبکافت شده، باگاس نیشکر و باقیمانده کارخانه نشاسته‌سازی از کاساوا برای تولید گلوتامیکاسیداستفاده کرده اند[۶-۳].

ایران یکی از بزرگترین کشورهای تولید کننده خرما در دنیا است و از طرف دیگر آمارها نشان می‌دهد که در طی ۵۰ سال گذشته تولید خرمای کشور ۵۰ میلیون تن بوده که از این مقدار ۱۰ الی ۱۵ درصد صادر، ۳۵ الی ۴۰ درصد به مصرف داخل و ۵۰ درصد آن تحت عنوان ضایعات از چرخه اقتصادی کشور خارج شده است [۷]. از این رو توجه به استفاده از این ضایعات برای تولید محصولات با ارزش افزوده بالا و همچنین کاهش آلودگی محیط زیست حایز اهمیت می‌باشد.

تولید گلوتامیک اسید از ضایعات خرما برای اولین بار در سال ۱۳۸۴ توسط دعوتی انجام شد [۷]. دعوتی در مرحله اول تحقیق خود عوامل موثر در تولید گلوتامیک اسید را بر اساس روش آماری غربالی به ترتیب؛ میزان ضایعات خرما، زمان افزودن پنی‌سیلین، میزان فسفات، دما و میزان بیوتین معرفی کرد. مرحله دوم تحقیق بر اساس طرح فاکتوریل جزئی و بر اساس نتایج آزمایش‌های اولیه؛ اثر سه متغیر دور همزدن، میزان بیوتین و میزان اوره بر تولید گلوتامیک اسید بررسی شد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری آزمایش‌های این مرحله نشان داد که دور همزدن ۲۵۰ دور بر دقیقه و میزان اوره ۳ گرم در لیتر برای تولید گلوتامیک اسید مناسب است. همچنین نتایج نشان داد که بیوتین تاثیر معنی‌داری بر تولید گلوتامیک اسید ندارد و میزان تولید گلوتامیک اسید در ارلن در شرایط بهینه ۸/۷ گرم (۲۸w/w٪) در لیتر حاصل شد [۷].

به منظور تکمیل مطالعه دعوتی، با توجه به نتایج بدست آمده، در این تحقیق متغیرهای موثر (**مقدار مایه تلقیح**، **غلظت سوبسترا**، **مقدار پنی‌سیلین**، **مقدار فسفات و سن تلقیح**) بر تولید ال-گلوتامیک اسیداز ضایعات خرما بهینه می گردند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سوبسترا

ضایعات گوشتی خرما از کارخانه خرما بن بندر عباس، تولید کننده عسل خرما تهیه گردید. ضایعات در دمای ۲۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور طراحی محیط کشت ترکیب شیمیایی ضایعات خرما، شامل رطوبت، خاکستر، چربی توسط دستگاه سوکسله (Soxtec ™ ۲۰۵۰ ,Sweden) ، پروتئین توسط دستگاه میکروکجدال (Analyzer, Sweden KjelTec Auto ۱۰۳۰) [۸] و عناصر معدنی ضایعات خرما با استفاده از دستگاهICP [۱] (پلاسمای جفت شده القایی) (Varian model Vista-pro, Australia) اندازه‌گیری شد [۹].

۲-۲- ریزسازواره

در این تحقیق از ریزسازواره کرینه *باکتریومگلوتامیکوم* CECT۶۹۰ استفاده گردید. این باکتری به شکل آمپول لیوفلیزه از مجموعه میکروبی کشور اسپانیا CECT

(Colección Española de Cultivos Tipo)، تهیه شد. به منظور فعال سازی باکتری لیوفلیزه، کشت بر روی محیط کشت نوترینت آگار در لوله آزمایش بصورت شیب‌دار انجام شد. سپس کشت‌ها در درجه حرارت ۳۵°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید. نگهداری ریزسازواره در درجه حرارت ۳°C انجام شد. کشت دوباره ریزسازواره هر دو هفته یک بار صورت گرفت.

۲-۳- محیط پیش کشت

ترکیب محیط پیش‌کشت آماده شده جهت رشد ریزسازواره‌ها (بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت) عبارت است از: [۱۰].

گلوکز ۵، عصاره مخمر ۰/۵، منگنز سولفات ۰/۰۰۱، آهن سولفات ۰/۰۰۱، منیزیم سولفات ۰/۲، فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۰/۱، فسفات دی پتاسیم هیدروژن ۰/۱و بیوتین ۲۰pg/L.

۵۰ میلی لیتر از محیط پیش‌کشت در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری آماده شد و سپس pH آن به وسیله محلول سود و اسید کلریدریک با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ نرمال بر روی ۷ تنظیم شد و محیط در اتوکلاو تحت دمای۱۲۱/۱°C سترون گردید. توسط آنس سترون یک لوپ از کلنی‌های محیط اسلنت برداشته و در شرایط سترون به محیط پیش کشت اضافه شد. محیط پیش کشت تلقیح شده در دمای ۳۵ °C و سرعت دور همزن ۲۰۰rpm به مدت لازم گرمخانه گذاری شد [۱۰].

۲-٤- محیط کشت اصلی و طراحی آماری آزمایش‌ها

برای بهینه‌سازی شرایط تولید گلوتامیک اسید از روش سطح پاسخ[۲] استفاده گردید. در این مرحله عوامل منبع کربنی (ضایعات خرما)، فسفر (فسفات دی هیدروژن پتاسیم و فسفات دی پتاسیم هیدروژن به مقدار مساوی)، مقدار مایه تلقیح، سن تلقیح و پنی-سیلین در ۵ سطح برای بررسی بیشتر در نظر گرفته شد (جدول ۱). از طرح مرکب مرکزی[۳]CC۰۵۳۰ با ۳۰ آزمایش و ۲ تکرار که شامل ۴ آزمایش در نقطه مرکزی است، استفاده شد [۱۱].

نتایج آزمایش‌ها براساس معادله چند جمله‌ای درجه دوم (رابطه۱) تحلیل می‌شود.

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^{k} a_i X_i + \sum_{i=1}^{k} a_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^{k} a_{ij} X_i X_j \qquad (۱)$$

در فرمول (۱) Y = پیش بینی مدل برای اسید گلوتامیک تولید شده، a_0 = ضریب ثابت، a_i = ضریب اثر خطی، a_{ii} = ضریب اثر مربعات ، a_{ij} = ضریب اثر متقابل و X_i و X_j متغیر ها هستند.

به منظور تهیه محیط کشت اصلی به نمونه‌های آماده شده بر اساس جدول (۱) موادی افزوده شد (بر حسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت) که عبارتند از:

اوره۰/۳، منگنز سولفات ۰/۰۰۱، آهن سولفات ۰/۰۰۱، منیزیم سولفات ۰/۲ [۴].

۵۰ میلی لیتر از محیط کشت اصلی در ارلن مایر های ۲۵۰ میلی لیتری تهیه شد و سپس pH آن به وسیله محلول‌های سود و اسید کلریدریک با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵ و ۱ نرمال بر روی ۷ تنظیم گردید و محیط در اتوکلاو تحت دمای ۱۲۱/۱° C سترون شد.

تخمیر در دمای ۳۵°C به مدت ۴۸ ساعت و دور همزن ۳۰۰rpm صورت پذیرفت. به منظور تراوش اسید گلوتامیک به خارج از سلول باکتری پس از ۸ ساعت پنی سلین جی به محیط کشت در شرایط سترون اضافه شد. کلیه آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد[۷].

۲-۵- استخراج اسیدهای آمینه از محیط کشت

به منظور استخراج اسیدهای آمینه پس از اتمام گرمخانه-گذاری محتوای ارلن حاوی سوبسترای تخمیر شده تحت شرایط خلاء ۱۵ psi و به وسیله کاغذ واتمن شماره ۱ و قیف بوخنر صاف گردید [۱۰] و سپس با دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید [۱۲]. مایع رویی برای اندازه گیری اسیدهای آمینه توسط دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) استفاده گردید.

جدول (۱): متغیر های اصلی در ۵ سطح برای بهینه کردن شرایط برای تولید گلوتامیک اسید

کد	علامت	-۲	-۱	۰	+۱	+۲
مقدار مایه تلقیح (٪V/V)	X_1	۲	۴	۶	۸	۱۰
مقدار سوبسترا (ضایعات خرما) (٪W/V)	X_2	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵
مقدار پنی سیلین (U/mL)	X_3	۱	۲	۳	۴	۵
مقدار فسفات (g/L) *	X_4	۰	۱	۲	۳	۴
سن تلقیح (h)	X_5	۱۰	۱۳	۱۶	۱۹	۲۲

* از KH_2PO_4 و K_2HPO_4 به میزان مساوی به عنوان منبع فسفات استفاده می‌شود.

۲-۶- اندازه‌گیری کمی اسید آمینه آزاد به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

در این آزمایش از روش مشتق‌سازی پیش ستونی اسیدهای آمینه و تجزیه آن با دستگاه HPLC با فاز معکوس استفاده شده است. برای این کار از دستگاه HPLC چهار حلال مدل ۶۰۰E ساخت کمپانی واترز آمریکا با آشکار ساز[۴] فلورسانس مدل ۲۴۷۵ استفاده گردید. ستون اختصاصی اکو- تگ با مشخصات Nova- pack ™C۱۸ (۳/۹× ۱۵۰mm , dp ۴μm) استفاده شد [۱۳].

۳- نتیجه و بحث

۳-۱- نتایج مربوط به تجزیه شیمیایی سوبسترا

ترکیب شیمیایی سوبسترا ضایعات خرما در جدول‌های (۲) و (۳) آورده شده است. .همانگونه که نتایج نشان می دهند ضایعات خرما سوبسترای کربنی مناسب برای ریز سازواره است که حاوی مقدار مناسبی از املاح فسفر، منیزیم و پتاسیم می باشد. به هر حال این سوبسترا حاوی مقادیرپایینی از نیتروژن (پروتئین) و آهن و منگنزاست که به منظور جبران این عناصر ضروری در مراحل مختلف تخمیر این عناصر به محیط تخمیر افزوده شد.

۳-۲- نتایج آزمایش‌های بهینه‌سازی

متغیرهای تحقیق به همراه سطوح متغیرها، نتایج گلوتامیک اسید (mg/mL) حاصل از آزمون‌های تجربی و مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل در جدول (۴) آورده شده است. بیشترین مقدار گلوتامیک اسید تولید شده ۲۶/۶۷ mg/mL بدست آمد که این مقدار مربوط به آزمایش شماره ۲۵ (با شرایط مقدار مایه تلقیح، غلظت سوبسترا، مقدار پنی‌سیلین، مقدار فسفات و سن تلقیح به ترتیب ۶ %V/V، ۱۵ %W/V، ۳ U/mL، ۲ g/L و ۱۰ h) می‌باشد. کمترین مقدار گلوتامیک اسید تولید شده ۲/۶ mg/mL (با شرایط مقدار مایه تلقیح، غلظت سوبسترا، مقدار پنی‌سیلین، مقدار فسفات و سن تلقیح به ترتیب ۸ %V/V، ۲۰ %W/V، ۴ U/mL، ۳ g/L و h ۱۹) بدست آمد که مربوط به آزمایش شماره ۱۶ است.

جدول (۲): ترکیبات اصلی ضایعات خرما بر اساس وزن خشک*

نام ترکیب	درصد (بر اساس وزن خشک)
رطوبت	۲۱/۴ ±۰/۷۱
خاکستر	۰/۸۴ ±۰/۰۶
چربی	۰/۶۷ ±۰/۰۳
پروتئین	۰/۴۶ ±۰/۰۲
قند احیاء	۴۰/۴۵ ±۲/۳۱

* مقادیر میانگین ± انحراف استاندارد

جدول (۳): مقدار برخی از عناصر معدنی ضایعات خرما

نام عنصر	(mg/100g) بر اساس وزن خشک
آهن	۰/۸۶۵ ±۰/۰۱
منگنز	۰/۲±۰/۰۲
فسفر	۱۹/۷۸ ±۱/۴۱
منیزیم	۱۸/۶۲ ±۰/۴۵
پتاسیم	۱۴۶/۹۵ ±۴/۸۱

* مقادیر میانگین ± انحراف استاندارد

تجزیه واریانس (ANOVA)[۵] به منظور تعیین معنی‌داری مدل چند جمله‌ای درجه دوم[۶] صورت پذیرفت. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس برای میزان ال-گلوتامیک اسید تولید شده در محیط تخمیر در جدول (۵) نشان داده شده است. مقدار عددی R^2 نشان‌دهنده میزان انحراف داده‌ها از مدل رگرسیون می‌باشد و می‌توان چنین نتیجه گرفت که رگرسیون بخوبی توانسته رابطه بین شرایط کشت (سوبسترا، مقدار مایه تلقیح، سن تلقیح، پنی-سیلین و فسفات) و گلوتامیک اسید تولید شده را نشان داده و پیش‌بینی کند. P-value < ۰/۰۱ ، معنی داری مدل را تایید می‌کند.

جدول (۴): نتایج آزمایش‌های بهینه سازی و نتایج بدست آمده از مدل پیش‌بینی آماری

شماره آزمایش	مقادیر مربوط به کدها					گلوتامیک اسید تولیدشده(mg/mL)*	گلوتامیک اسید پیش‌بینی شده (mg/mL)
	X_5	X_4	X_3	X_2	X_1		
۱	+۱	-۱	-۱	-۱	-۱	۳/۰۹ ±۰/۱۲	۳/۴۱
۲	-۱	+۱	-۱	-۱	-۱	۹/۲۴ ±۰/۳۴	۱۱/۹۶
۳	-۱	-۱	+۱	-۱	-۱	۱۱/۲۳ ±۲/۳۱	۱۲/۷۳
۴	+۱	+۱	+۱	-۱	-۱	۵/۸۱ ±۰/۱۴	٦/۸۳
۵	-۱	-۱	-۱	+۱	-۱	۱۲/۹۷ ±۱/۳۷	١٤/٦٧
۶	+۱	+۱	-۱	+۱	-۱	۵/۱۱ ±۰/۱۴۱	٦/٣٣
۷	+۱	-۱	+۱	+۱	-۱	۴/۳۱ ±۰/۲۸	٤/٣١

۸	−۱	+۱	+۱	+۱	−۱	۱۰/۶۱ ±۰/۸۷	۱۳/۰٤
۹	−۱	−۱	−۱	−۱	+۱	۱۰/۷۳ ±۴/۴۲	۱۱/٤۸
۱۰	+۱	+۱	+۱	−۱	+۱	۷/۸۳ ±۰/۳۷	۸/۱۲
۱۱	+۱	−۱	+۱	−۱	+۱	۱۳/۴۵ ±۰/۲۱	۱۲/۵۲
۱۲	−۱	+۱	+۱	−۱	+۱	۱۱/۴۵ ±۳/۴۶	۱۲/۹۳
۱۳	+۱	−۱	−۱	+۱	+۱	۳/۷۷ ±۰/۳۶	۳/۰۷
۱۴	−۱	+۱	−۱	+۱	+۱	۱۴/۸۳ ±۰/۲۳	۱٦/۵۲
۱۵	−۱	−۱	+۱	+۱	+۱	۹/۸۷ ±۰/۸۸	۱۰/۳٤
۱۶	+۱	+۱	+۱	+۱	+۱	۲/۶۱ ±۰/۱۴	۲/۵۹
۱۷	۰	۰	۰	۰	−۲	۱۱/ ۷۱ ±۰/۲۴	۷/٤۳
۱۸	۰	۰	۰	۰	+۲	۸/۲۷ ±۰/۴۹	۸/۵۱
۱۹	۰	۰	۰	−۲	۰	۹/۶۷ ±۰/۸۱	۸/۰۸
۲۰	۰	۰	۰	+۲	۰	۷/۴۷ ±۰/۱۴	۵/۸۱
۲۱	۰	۰	−۲	۰	۰	۱۱/۷۴ ±۱/۴۹	۹/۵۱
۲۲	۰	۰	+۲	۰	۰	۱۰/۶۹ ±۱/۳۱	۹/٤٤
۲۳	۰	−۲	۰	۰	۰	۷/۲۱ ±۱/۴۱	۷/۳۸
۲۴	۰	+۲	۰	۰	۰	۱۲/۵۱ ±۰/۶۸	۸/۸۳
۲۵	−۲	۰	۰	۰	۰	۲۶/۶۷ ±۱/۱۷	۲۲/۰۲
۲۶	+۲	۰	۰	۰	۰	۶/۷۵ ±۱/۰۶	۷/۸۹
۲۷	۰	۰	۰	۰	۰	۸/۶۷ ±۰/۳۷	۹/۷۳
۲۸	۰	۰	۰	۰	۰	۸/۸۷ ±۱/۶۵	۹/۷۳
۲۹	۰	۰	۰	۰	۰	۸/۴۵ ±۰/۰۷	۹/۷۳
۳۰	۰	۰	۰	۰	۰	۹/۴۰ ±۰/۷۱	۹/۷۳

*مقادیر میانگین ± انحراف استاندارد

جدول (۵): تجزیه واریانس برای مدل درجه دوم

منبع	درجه آزادی	میانگین مربعات
مدل	۲۰	*٤۸/۸۲٦۸
اثر خطی	۵	*۱۲٤/۸۳۷٦
اثر درجه دوم	۵	*۳۲/۵۵۳۲
اثر متقابل	۱۰	*۱۸/۹۵۸۲
خطا باقیمانده[1]	۳۹	٦/۲۷٦۸
عدم تطابق با مدل[2]	٦	۳۱/۵۹۰۲
خطای خالص	۳۳	۱/٦۷٤٤
کل	۵۹	–

[1]Residual error.[2]Lack of fit. R^2= 79.96%; Adj-R^2= 69.68%

معنی داری در سطح ۱٪

همانطور که از جدول (۶) مشخص است از اثرات خطی فقط سن تلقیح معنی‌دار می‌باشند (P< ۰/۰۱). در مورد اثرات درجه دوم در تولید گلوتامیک اسید در این تحقیق مقدار سوبسترا و سن تلقیح معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵). اثرات متقابل مقدار مایه تلقیح-سوبسترا، سوبسترا-پنی‌سیلین، سوبسترا-سن تلقیح و پنی-سیلین- فسفات معنی‌دار می‌باشند (P< ۰/۰۵).

با استفاده از ضرایب متغیرها در جدول (۶) مدل درجه دوم (معادله ۲) بدست آمد:

$$Y = 9.733167 + 0.2679X_1 - 0.5697X_2 - 0.0158X_3 + 0.3617X_4 - 3.5325X_5 - 0.4405X_{11} - 0.6961X_{22} - 0.0655X_{33} - 0.4055X_{44} + 1.3058X_{55} - 0.9988X_{12} - 0.0850X_{13} - 0.0188X_{14} + 0.4155X_{15} - 1.2719X_{23} + 0.3981X_{24} - 1.2519X_{25} - 0.9256X_{34} + 0.6831X_{35} - 0.2906X_{45} \quad (۲)$$

جدول (۶): ضرایب رگرسیون و مقادیر معنی‌دار بودن آنها در تولید میکروبی گلوتامیک اسید

متغیر	ضریب	مقادیر	p
X_1	a_1	۰/۲۶۷۹	۰/۴۶۳۲
X_2	a_2	-۰/۵۶۹۷	۰/۱۲۴۳
X_3	a_3	-۰/۰۱۵۸	۰/۹۶۵۳
X_4	a_4	۰/۳۶۱۷	۰/۳۲۳۴
X_5	a_5	-۳/۵۳۲۵	**/۰۰۰۱
$X_1 * X_1$	a_{11}	-۰/۴۴۰۵	۰/۲۰۶۷
$X_2 * X_2$	a_{22}	-۰/۶۹۶۱	*۰/۰۴۹۳
$X_3 * X_3$	a_{33}	-۰/۰۶۵۵	۰/۸۴۹۶
$X_4 * X_4$	a_{44}	-۰/۴۰۵۵	۰/۲۴۴
$X_5 * X_5$	a_{55}	۱/۳۰۵۸	**۰/۰۰۰۵
$X_1 * X_2$	a_{12}	-۰/۹۹۸۸	*۰/۰۲۹۸
$X_1 * X_3$	a_{13}	-۰/۰۸۵	۰/۸۴۸۸
$X_1 * X_4$	a_{14}	-۰/۰۱۸۷۵	۰/۹۶۶۴
$X_1 * X_5$	a_{15}	۰/۴۱۵۵	۰/۳۶۰۲
$X_2 * X_3$	a_{23}	-۱/۲۷۱۹	**۰/۰۰۶۵
$X_2 * X_4$	a_{24}	۰/۳۹۸۱	۰/۳۷۴۲
$X_2 * X_5$	a_{25}	-۱/۲۵۱۹	*۰/۰۰۷۴
$X_3 * X_4$	a_{34}	-۰/۹۲۵۶	*۰/۰۴۳۲
$X_3 * X_5$	a_{35}	۰/۶۸۳۱	۰/۱۳۱۰
$X_4 * X_5$	a_{45}	-۰/۲۹۰۶	۰/۵۱۵۵

*در سطح (P< ۰/۰۵) و ** معنی‌دار در سطح (P< ۰/۰۱).*

۳-۳- مقادیربهینه پیش‌بینی شده توسط مدل درجه دوم برای متغیرها

مقادیر گلوتامیک اسید پیش‌بینی شده توسط معادله درجه دوم، بر اساس مقادیر بهینه جدول (۷) ، ۳۹/۳۲ میلی گرم در میلی لیتر است. جدول (۷) مقادیر بهینه پیش‌بینی شده توسط نرم افزار SAS ۹/۱ برای هر یک از متغیرها را نشان می‌دهد.

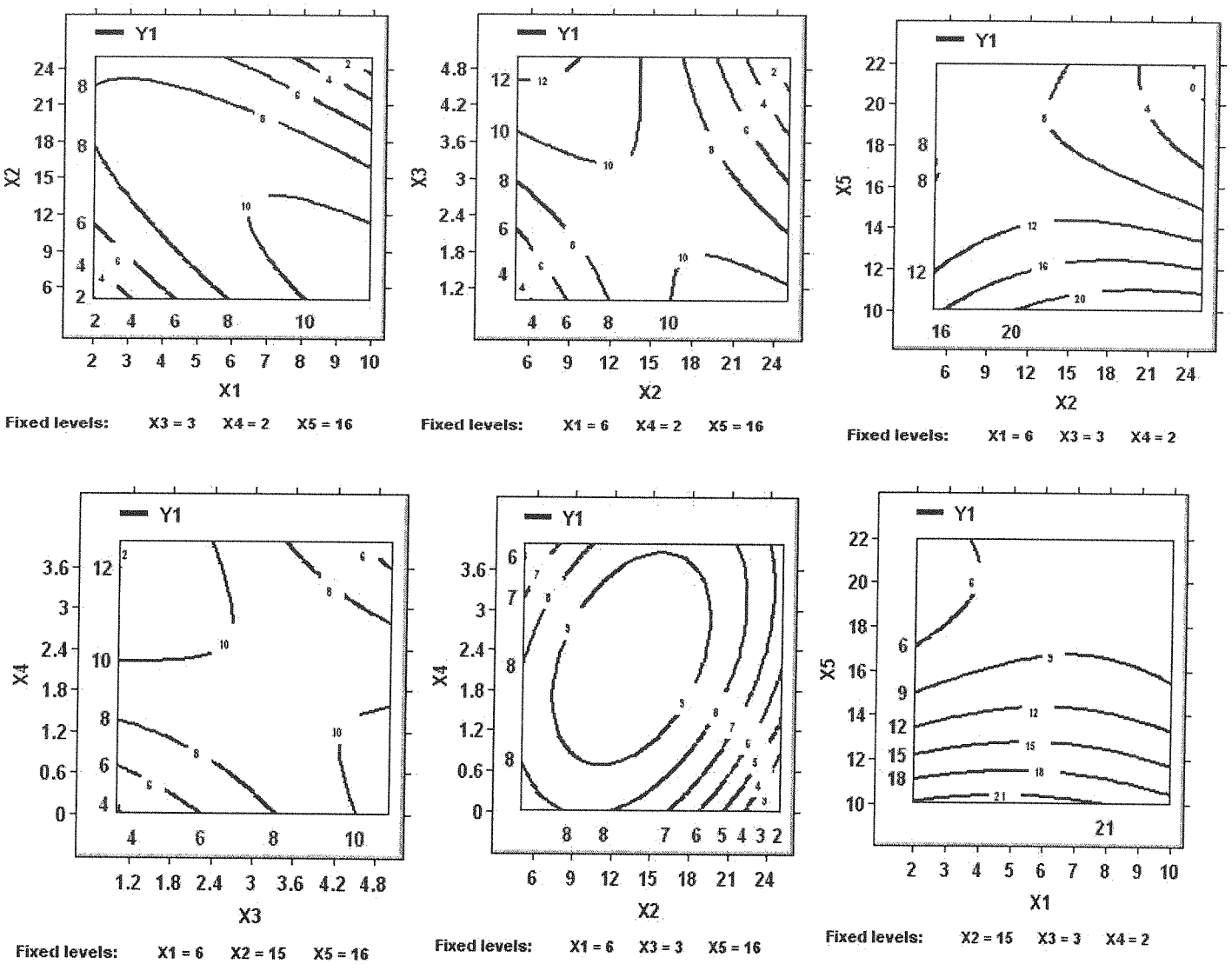
جدول (۷): مقادیر مدل درجه دوم

متغیر	مقدار واقعی	مقدار کد
مقدار مایه تلقیح (%V/V)	۲	-۲
مقدار سوبسترا (%W/V)	۲۵	+۲
مقدار پنی‌سیلین (U/mL)	۱	-۲
مقدار فسفات (g/L)	۴	+۲
سن تلقیح (h)	۱۰	-۲

۳-٤- ارزیابی[۷] مدل درجه دوم

مدل درجه دوم بدست آمده در این تحقیق برای تعیین شرایط بهینه تولید گلوتامیک اسید از ضایعات خرما استفاده گردید. شرایط بهینه پیش‌بینی شده توسط مدل برای متغیرهای مقدار مایه تلقیح، غلظت سوبسترا، مقدار پنی‌سیلین، مقدار فسفات و سن تلقیح به ترتیب، ۲ %V/V، ۲۵ %W/V، ۱ U/mL، ۴ g/L و ۱۰ h پیش‌بینی می‌شود. بیشینه مقدار گلوتامیک اسید در شرایط گفته شده ۳۹/۳۲ mg/mL بدست آمد. به منظور ارزیابی مدل، تخمیر در شرایط پیش‌بینی شده انجام شد. نتایج نشان داد که بیشینه مقدار گلوتامیک اسید تولید شده در شرایط آزمایشگاه mg/mL ۳۶/۶۴ می‌باشد. بنابراین مدل درجه دوم به خوبی شرایط تولید گلوتامیک اسید از ضایعات خرما را پیش‌بینی نموده است.

۳-۵- نمودارهای سطح پاسخ و کانتور و اثرات متقابل بین متغیرها



شکل ۱- نمودارهای کنتور نشاندهنده تاثیر اثر متقابل سوبسترا- مقدار مایه تلقیح (a)، پنی سیلین- سوبسترا (b)، سن تلقیح- سوبسترا (c)، فسفات- پنی سیلین (d)، فسفات- سوبسترا (e) و سن تلقیح- مقدار مایه تلقیح (f). X_1: مقدار مایه تلقیح، X_2: غلظت سوبسترا، X_3: مقدار پنی-سیلین، X_4: مقدار فسفات و X_5: سن تلقیح

شکل a-۱ نمودار کانتور تاثیر سوبسترا و مقدار مایه تلقیح برای گلوتامیک اسید را نشان می‌دهد. دیده می‌شود که منحنی کانتور برای گلوتامیک اسید بصورت لبه بالارونده^ است [۱۴]. بیشترین مقدار گلوتامیک اسید در غلظت سوبسترا (۱۳ %W/V-۵) و مقدار مایه تلقیح (۱۰-۶/۵ %V/V) بدست آمد. شکل a-۱ نشان می‌دهد که در مورد اثر متقابل سوبسترا و مقدار مایه تلقیح در مقادیر مرکزی سایر متغیرها با افزایش مقدار مایه تلقیح در مقادیر سوبسترای به میزان پایین تولید گلوتامیک اسید افزایش می‌یابد. مقدار مایه تلقیح به میزان بالا با کاهش مدت زمان فاز تاخیر و تولید بیومس زیاد موجب افزایش تولید محصول در محیط تخمیر می‌شود [۱۵]. شکل b-۱نمودار کانتور تاثیر سوبسترا و پنی‌سیلین بر مقدار گلوتامیک اسید را نشان می‌دهد. منحنی کانتور گلوتامیک اسید بصورت زین اسبی است. افزایش پنی‌سیلین در غلظت سوبسترا (۱۰ %W/V-۵) موجب افزایش گلوتامیک اسید می‌شود. بیشترین مقدار گلوتامیک اسید در غلظت سوبسترا(۱۰ %W/V-۵) و پنی‌سیلین (۵ U/mL-۴/۶) بدست

می‌آید. شکل b-۱ نشان می‌دهد که با افزایش مقدار پنی‌سیلین در مقادیر پایین سوبسترا در مقادیر مرکزی سایر متغیرها تولید گلوتامیک اسید افزایش می‌یابد. شاید علت آن تغییر ترکیب دیواره سلولی باکتری تحت شرایط یاد شده باشد. با افزودن پنی‌سیلین به محیط تخمیر گلوتامیک اسید، تولید مایکولیک اسید در دیواره سلول محدود می‌شود. شکل c-۱ نمودار کانتور تاثیر سوبسترا و سن تلقیح بر گلوتامیک اسید را نشان می‌دهد. منحنی کانتور گلوتامیک اسید بصورت زین اسبی است. همانطور که از شکل مشخص است، افزایش غلظت سوبسترا در سن تلقیح ۱۱-۱۰ ساعت موجب افزایش تولید گلوتامیک اسید می‌شود. بیشترین مقدار گلوتامیک اسید (۲۰ mg/mL) در غلظت سوبسترا (%W/V ۲۵-۱۱) و سن تلقیح (۱۱-۱۰) ساعت بدست می‌آید. نتایج این تحقیق نشان داد که سن تلقیح اثر معنی داری بر تولید گلوتامیک اسید از ضایعات خرما دارد جدول (۶)، بطوریکه با افزایش سن تلقیح (فاز ساکن) میزان گلوتامیک اسید تولیدی کاهش می‌یابد. دعوتی (۱۳۸۴) نشان داد که محدوده رشد لگاریتمی کربنه *باکتریوم گلوتامیکوم* روی ضایعات خرما از ۲ تا ۱۸ ساعت می باشد [۷]. شرایط فیزیولوژیکی مایه تلقیح در زمان انتقال به مرحله بعدی تخمیر تاثیر زیادی را بر روی راندمان تخمیر می‌گذارد [۱۵]. بالا بودن مقدار گلوتامیک اسید تولید شده در شرایط فوق را می‌توان اینگونه تفسیر کرد که ریزسازواره در مرحله رشد لگاریتمی و در شرایط مناسب فیزیولوژیکی به محیط کشت شامل سوبسترا ضایعات خرما افزوده شده است و به همین خاطر تولید گلوتامیک اسید بالایی دیده می شوند. شکل d-۱ نمودار کانتور تاثیر پنی‌سیلین و فسفات بر گلوتامیک اسید را نشان می‌دهد. منحنی کانتور گلوتامیک اسید بصورت زین اسبی است. همانطور که از شکل مشخص است، افزایش مقدار فسفات در مقدار پنی‌سیلین (U/mL ۱/۲-۱) برای افزایش گلوتامیک اسید مناسب است. بیشترین مقدار گلوتامیک اسید در مقدار پنی‌سیلین (U/mL ۱/۲-۱) و مقدار فسفات(g/L ٤-۳/٦) بدست می‌آید. در شکل b-۱ که اثر متقابل بین سوبسترا و پنی‌سیلین نشان داده شد، نتایج نشان داد که مقادیر بالای پنی‌سیلین تولید گلوتامیک اسید را تشدید می‌کند. شکل d-۱ نشان داد که مقادیر پایین پنی-سیلین تولید گلوتامیک اسید را تشدید می‌نماید. این اختلاف را می‌توان اینگونه تفسیر نمود که با تغییر شرایط محیط کشت ترکیب دیواره سلولی ریزسازواره تغییر می‌کند و مقدار پنی‌سیلین موثر برای تخمیر گلوتامیک اسید از ضایعات خرما به شرایط محیط کشت وابستگی زیادی دارد.

شکل e-۱ تاثیر سوبسترا و فسفات را بر روی گلوتامیک اسید در شرایط سن تلقیح، مقدار مایه تلقیح و مقدار پنی‌سیلین ثابت نشان می‌دهد. منحنی کانتور گلوتامیک اسید بصورت ماکزیمم ساده[۹] است. در مقادیر فسفات (g/L ۳/۸-۰/٦) در غلظت سوبسترا (%W/V ۱۹-۹) و نقاط مرکزی سایر متغیرها گلوتامیک اسید بالایی تولید می‌شود. در شکل d-۱ نیز نشان داده شد که در مقادیر بالای فسفات تولید گلوتامیک اسید تشدید می‌شود. مقایسه این شکل با شکل های a-۱، b-۱ و c-۱ نشان می‌دهد که اثر متقابل سوبسترا با مقدار مایه تلقیح ، پنی‌سیلین و سن تلقیح رفتار متفاوتی را نشان می‌دهد و می‌توان نتیجه گرفت که شرایط تخمیر تحت تاثیر مقدار سوبسترا قرار می‌گیرد. نتایج جدول (۶) نیز این موضوع را تایید می‌کند.

شکل f-۱ تاثیر مقدار مایه تلقیح و سن تلقیح را بر روی گلوتامیک اسید تولیدی در شرایط مقدار فسفات، مقدار سوبسترا و مقدار پنی‌سیلین ثابت نشان می‌دهد. در مقادیر سن تلقیح پایین در هر مقداری از مقدار مایه تلقیح موجب افزایش گلوتامیک اسید می‌شود.

٤- نتیجه گیری کلی

در این تحقیق تاثیر سن تلقیح، مقدار مایه تلقیح، مقدار فسفات، غلظت سوبسترا و مقدار پنی‌سیلین بر روی تولید گلوتامیک اسید مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که تنها سن تلقیح اثر خطی ($P<$ ۰/۰۱) بر روی تولید گلوتامیک اسید داشت. در مورد تاثیر غلظت سوبسترا بر تولید گلوتامیک اسید، می‌توان گفت که در شرایط مختلف تخمیر مقادیر بهینه سوبسترا متفاوت است و به عبارت دیگر تخمیر گلوتامیک اسید از ضایعات خرما تحت تاثیر متقابل غلظت سوبسترا با سایر متغیرها قرار دارد. مدل درجه دوم بدست آمده مقادیر پایین پنی-سیلین را پیشنهاد کرده است. در مورد مقدار فسفات نتایج نشان داد که مقادیر بالا تولید گلوتامیک اسید را تشدید می‌کند. موثرترین متغیر تحقیق حاضر سن تلقیح می‌باشد. مقایسه مقدار گلوتامیک اسید تولید شده در شرایط بهینه محیط کشت در این تحقیق با نتایج تحقیق دعوتی و همکاران بر روی تولید گلوتامیک اسید از ضایعات خرما ۳۲۱٪ افزایش تولید را نشان داد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ضایعات خرما سوبسترای مناسبی برای تولید گلوتامیک اسید می‌باشد. با توجه به شرایط بهینه بدست آمده در این تحقیق، تعیین سرعت هوادهی مناسب در شرایط قابل کنترل فرمانتور ضروری به نظر می‌رسد. بعد از این مرحله تولید نیمه صنعتی گلوتامیک اسید امکان پذیر است.

۵- مراجع

[۱] Leuchtenberger, W.; Huthmacher, K.; Drauz, K.; "Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects". Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 69, p.p.1-8, 2005.

[۲] Krämer, R.; Functional Foods and Biotechnology, Boca Raton, CRC Press, 2007.

[۳] Jyothi, A. N.; Sasikiran, K.; Nambisan, B.; Balagopalan, C.; "Optimisation of glutamic acid production from cassava starch factory residues using Brevibacterium divaricatum". Process Biochem. Vol. 40, p.p. 3576-3579, 2005.

[۴] Azuma, T. N.; Nakanishi, T.; "Isolation and characterization of a stable L-arginine producer from continuous culture broth of Corynebacterium acetoacidophilum", J. Ferment. Technol, vol. 66, p.p. 279-284, 1988.

[۵] Hirao, T.; Nakano, T.; Azuma, T.; Sugimoto, M.; Nakanishi, T.; "l-lysin production in continuous culture of an l-lysin hyper producing mutant of Corynebacterium glutamicum". Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 32, p.p. 269-273, 1989.

[۶] Nampoothiri, K. M.; Pandey, A.; "Solid state fermentation for L-glutamic acid production using Brevibacterium sp". Biotechnol. Lett. 18(2), 199–204, 1996.

[۷] دعوتی، نفیسه؛ تولید گلوتامیک اسید از ضایعات خرما توسط کرینه باکتریوم گلوتامیکوم . پایان نامه کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، ۹۵ ص،۱۳۸۴."

[۸] حسینی، زیبا؛ روش‌های متداول در تجزیه مواد غذایی، انتشارات دانشگاه شیراز، چاپ چهارم، ۱۳۸۲.

[۹] Sahari, M. A.; Barzegar, M.; Radfar, R.; "Effect of varieties on the composition of dates (Phoenix dactylifera L.) — note". Food Sci. Technol. Int., vol. 13, p.p. 269-275, 2007.

[۱۰] Das, K.; Anis, M.; Mohd A, B. M. N.; Ismail, N.; "Fermentation and recovery of glutamic acid from palm wast hydrolysate by ion-exchange resin column", J. Biotechnol. Bioeng, vol. 48, p.p. 551-555, 1995.

[۱۱] Haaland, P. D.; Experimental Design in Biotechnology, Elsevier Science Publishing Co, 1990.

[۱۲] Zamani, J.; Roostaazad R.; "An efficient strategy to over production of glutamic acid in corynebacterium glutamicum fermentation", Scientia Irancia, vol. 3, p.p. 203-206, 2001.

[۱۳] Waters AccQ. "Tag chemistry package". Instruction Manual, Manual Number WAT 052874, REVO, U.S.A, 1993.

[۱۴] Myers, R. H.; Montgomery, D. C.; Response Surface Methodology: Process and Product Optimization using Designed Experiments. New York. John Wiley and Sons, Inc, 2002.

[۱۵] Stanbury, P. F.; Whittaker, A.; Hall, S. J.; Principles of Fermentation Technology, 2nd Edition, Jordon Hill, 1995.

۶- زیرنویس‌ها

[1] Inductively Coupled Plasma
[2] Response surface methodology (RSM)
[3] Central composition
[4] Detector
[5] Analysis of variance
[6] Second order polynomial model
[7] Validation
[8] Rising ridge
[9] Simple maximum