بهینه‌سازی محیط کشت صنعتی برای تولید انبوه مخمر زیستی *Candida membranifaciens* عامل کنترل زیستی کپک آبی و کپک خاکستری سیب

محمدرضا خوشایند[1]، لاچین مختارنژاد[2*]، حسن‌رضا اعتباریان[3]، محسن فرزانه[4]، پژمان شیخ پور[5]

[1]استادیار گروه کنترل غذا و دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[2]دانشجوی اسبق بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
[3]استاد گروه گیاه‌پزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
[4]استادیار پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، گروه کشاورزی، دانشگاه شهید بهشتی
[5]داروساز گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
[*]مسئول مکاتبه: E-mail: Mokhtarnejad@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: 92/02/16 تاریخ پذیرش: 92/12/20

چکیده

بهینه‌سازی فرآیند تولید انبوه عوامل کنترل زیستی یکی از مهم‌ترین فعالیت‌ها در صنایع رقابتی می‌باشد تا بخش صنعت را به تولید تجاری آنها ترغیب نماید. در این تحقیق به‌منظور بالابردن تولید زیست‌توده سلولی مخمر *Candida membranifaciens* بهینه‌سازی اجزای محیط کشت با کمک روش رویه پاسخ و در دو مرحله، غربال‌گری اجزای محیط-کشت و بهینه‌سازی سنجه‌های موثر بر تولید انجام گرفت. از ملاس چغندرقند، ملاس نیشکر، آب پنیر و سوکروز به‌عنوان منبع کربن و از عصاره ذرت خیسانده (CSL)، اوره و عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن استفاده گردید. آزمایش‌های متعددی برای انتخاب منابع کربن و نیتروژن و با استفاده از نسخه نه نرم‌افزار Design Expert® طراحی و انجام شدند. نتایج آزمایش‌های غربال‌گری نشان دادند که از بین سنجه‌های انتخاب‌شده، ملاس نیشکر و CSL تاثیر معنی‌داری در رشد مخمر داشتند. هم‌چنین رابطه بین سنجه‌ها و میزان رشد غیرخطی بود. برای انتخاب بهترین معادله‌ای که بتواند رشد مخمر را توصیف کند از روش آماری تجزیه واریانس (ANOVA) استفاده شد. بر این اساس، مدل مناسب یک مدل چند جمله‌ای درجه دوم و اثرات متقابل مربوطه بود. با حل معادله به دست آمده و تجزیه و تحلیل نمودار رویه پاسخ، غلظت بهینه CSL و غلظت ملاس نیشکر در محیط کشت برای رسیدن به حداکثر رشد، به ترتیب 20 و 39/2 گرم در لیتر تعیین شد.

کلمات کلیدی: بهینه‌سازی، تولید انبوه مخمر، کنترل زیستی، محیط کشت صنعتی

مقدمه

با وجود این‌که تعداد زیادی از آنتاگونیست‌های میکروبی برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت بررسی گردیده‌اند، اما تعداد کمی از این عوامل تجاری شده‌اند. در حال حاضر، فقط دو مخمر و یک باکتری برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت به صورت تجاری در آمده‌اند که Deco-182 با نام تجاری Aspire® حاوی مخمر *Candida oleophila* Montrocher در ایالات‌متحده و فلسطین اشغالی، Yild plus® حاوی مخمر *Cryptococcus albidus* C.E. Skinner در آفریقای‌جنوبی و Biosave 100 & 110 فرمولاسیون باکتری *Pseudomonas syringe* در ایالات‌متحده به ثبت

رسیده‌اند (عبادیاس و همکاران 2003). در استفاده تجاری، موفقیت یک عامل کنترل زیستی تا حد زیادی به فرمولاسیون آن بستگی دارد. مشکل اصلی برای تجاری‌کردن محصولات زیستی، ایجاد یک فرآورده پایدار می‌باشد که قابلیت کنترل‌کنندگی خود را همانند سلول‌های تازه حفظ کرده باشد. یک فرمولاسیون میکروبی مناسب، باید دارای صرفه اقتصادی برای تولید، زنده‌مانی مناسب و کافی برای موثربودن آن و استفاده آسان روی میوه‌ها باشد. هم‌چنین اگر مخمر به فرم خشک فرموله شده باشد باید به آسانی قدرت آب-گیری مجدد نشان دهد. در نهایت، قابلیت کنترل‌کنندگی آن باید در تمام مراحل فرمولاسیون، انبارداری طولانی-مدت و آب‌گیری مجدد حفظ شود (عبادیاس و همکاران 2001، ملین و همکاران 2006)

عامل کلیدی مهم دیگر جهت ساخت فرمولاسیون میکروبی تجاری، دست‌یابی به یک محیط کشت کم هزینه قابل‌دسترس برای تولید زیست‌توده سلولی می-باشد که بتواند در مقیاس صنعتی استفاده شود. تجاری کردن فرآورده‌های تخمیری، مستلزم اقتصادی کردن فرایندها و کاهش هزینه‌ها است و کاهش قیمت تمام‌شده فرآورده نیز با استفاده از محیط کشت ارزان‌تر امکان‌پذیر می‌باشد. مثلا" در مورد *Candida sake* Berkhout محیطی بر پایه ملاس نیشکر که به‌عنوان فرآورده جانبی کارخانه‌های تولید شکر قابل دسترسی است ارائه گردیده است (عبادیاس و همکاران 2000).

یکی از موارد اصلی مربوط به فرمولاسیون تجاری یک فرآورده کنترل‌زیستی، دستیابی به واحدهای تکثیری (کنیدی، کلامیدوسپور، میکرواسکلروت و غیره) فراوان و موثر یک آنتاگونیست می‌باشد. در اغلب موارد، تولید زیست‌توده به‌دلیل شرایط ویژه غذایی و محیطی لازم برای رشد موجود زنده، مشکل است. اگرچه استفاده از هر دو روش تخمیر جامد و مایع متداول می‌باشد، اما توسعه فناوری تخمیر مایع در کشورهای توسعه‌یافته برای تولید اسیدهای آلی، آنتی‌بیوتیک و آنزیم‌های قارچ‌ها و باکتری‌ها باعث شده است که وسایل و تجهیزات لازم برای این کار در دسترس باشند. محیط رشد مطلوب برای تخمیر باید ارزان و از محصولات فرعی کشاورزی هر منطقه به-دست آید. این مواد باید از نظر تعادل مواد غذایی نیز مناسب باشند. ملاس، مخمر نان، پنبه‌دانه، آرد سویا و غیره از این مواد هستند. شرایط انجام تخمیر (هوادهی، pH و دما) همانند نوع محیط می‌تواند روی کیفیت و کمیت موجود زنده تاثیر بگذارد. عامل مهم دیگر در تخمیر مایع، نرخ تولید زیست‌توده می‌باشد که روی هزینه تولید و شانس آلودگی اثر می‌گذارد. بهتر آن است که مقادیر بهینه زیست‌توده در حداقل زمان ممکن تولید شود. در مورد *تریکودرما* و *گلیوکلادیوم* حداقل زمان شش تا هفت روز است که در مقایسه با باکتری‌ها و مخمرها (24 تا 26 ساعت) طولانی است. روش‌های تخمیر مایع و جامد برای تولید انبوه موجودات ریز زنده استفاده می‌شود.

بهینه‌سازی فرآیندها یکی از مهم‌ترین فعالیت‌ها در صنایع رقابتی امروز است. هزینه بالای تحقیقات مستلزم توسعه روش‌های طراحی آزمایش‌هایی است که تعیین سنجه‌های موثر بر یک فرآیند را با حداقل تعداد آزمایش‌ها ممکن نماید. در اغلب فرآیندها، سنجه‌های متعددی موثر هستند که شناخت تعداد و میزان تاثیر هر یک می‌تواند در طراحی و پیش‌برد اقتصادی فرایند، مورد بهره‌برداری قرار گیرد. در این تحقیق به‌منظور افزایش تولید زیست‌توده سلولی مخمر زیستی *Candida membranifaciens* بهینه‌سازی اجزای محیط کشت با کمک روش طراحی آزمایش با استفاده از نسخه نه نرم-افزار Design Expert® و در دو مرحله، غربال‌گری اجزای محیط کشت و بهینه‌سازی سنجه‌های موثر بر تولید انجام گرفت تا علاوه بر افزایش میزان رشد و تولید زیست‌توده سلولی مخمر *C. membranifaciens*، از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه باشد.

مواد و روش ها

تهیه جدایه مخمر

از جدایه **A2** مخمر *Candida membranifaciens* جداسازی شده از سطح میوه‌های سیب که قابلیت آنتاگونیستی آن در پردیس ابوریحان دانشگاه تهران بررسی گردیده بود (علوی‌فرد 1386)، استفاده شد.

بررسی کینتیک رشد (الگوی رشد) جدایه A2 در محیط کشت PDB (Potato Dextrose Broth)

از کشت 24 ساعته مخمر، در محیط کشت PDB سوسپانسیونی با جمعیت 1×10^9 سلول مخمر در آب مقطر سترون تهیه شد. یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به 100 میلی‌لیتر محیط کشت PDB تهیه شده در ارلن‌های 250 میلی‌لیتری اضافه گردید. ارلن‌ها درون شیکر انکوباتور با دمای 30 درجه سانتی‌گراد و سرعت150 دور در دقیقه قرار داده شدند. به فواصل زمانی دو ساعت، یک میلی‌لیتر از این محیط کشت در کنار شعله برداشته شد و جمعیت مخمر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (طول‌موج 600 نانومتر) تعیین گردید. این کار به‌مدت 30 ساعت ادامه یافت (دامتو و همکاران 2012، فان دیژکن و همکاران 1983).

بهینه‌سازی محیط کشت صنعتی

آماده سازی زادمایه

برای تهیه مایه تلقیح از کشت 24 ساعته مخمر، سوسپانسیونی تهیه گردید و جمعیت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (طول موج 600 نانومتر) تعیین شد. برای همه آزمایش‌ها سوسپانسیونی با جذب نوری 1 (CFU= 10^9) تهیه گردید (مختارنژاد 1388).

بهینه سازی اجزای محیط کشت

بهینه‌سازی اجزای محیط کشت به منظور بالا بردن تولید زیست‌توده سلولی مخمر *C. membranifaciens* با کمک نرم افزار طراحی آزمایش و در دو مرحله، غربال-گری اجزای محیط کشت و بهینه‌سازی مقادیر سنجه-های موثر بر تولید انجام گرفت.

غربال‌گری اجزای محیط کشت

در ابتدا به‌منظور بهینه‌سازی یک محیط کشت صنعتی تعدادی منابع کربن و نیتروژن با قابلیت صنعتی شدن انتخاب گردید. از ملاس چغندرقند، ملاس نیشکر، آب‌پنیر و سوکروز به‌عنوان منبع کربن و از عصاره ذرت خیسانده (CSL)، اوره و عصاره مخمر به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده شد. آزمایش‌های متعددی به منظور غربال‌گری منابع کربن و نیتروژن و انتخاب بهترین منبع کربن و منبع نیتروژن با استفاده از نسخه نه نرم افزار Design Expert® طراحی و انجام گردید.

در ابتدا 100 میلی‌لیتر از محیط کشت‌های مختلف با توجه به غلظت‌های تعیین شده برای هر سنجه (به جز اوره) در یک ارلن 250 میلی‌لیتری تهیه شد و برای استریل کردن، به مدت 15 دقیقه در 121 درجه سانتی-گراد اتوکلاو گردید. محلول اوره فیلترشده (0.22 JETBIOFIL)، به‌صورت جداگانه به محیط اتوکلاوشده خنک اضافه شد. تمام ارلن‌ها پس از خنک‌شدن با یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده از کشت 24 ساعته مخمر (OD = 1) مایه‌زنی و داخل شیکر انکوباتور با سرعت 150 دور در دقیقه و دمای 30 درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. بعد از 24 ساعت میزان رشد مخمر در هر ارلن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و با استفاده از نرم‌افزار فوق‌الذکر مشخص گردید.

در مرحله اول غربال‌گری با استفاده از طرح پلاکت-برمن آزمایشی مطابق جدول 1 طراحی و اجرا شد (ویت‌من و هنزل 2001).

جدول 1- اجزای محیط کشت و غلظت‌های آن‌ها در طراحی پلاکت‌برمن

متغیرها	اجزای محیط کشت	مقادیر (گرم در لیتر)		
		-	صفر	+
X1	ملاس نیشکر	صفر	3	6
X2	ملاس چغندر قند	2	4	6
X3	آب پنیر	صفر	3	6
X4	اوره	صفر	3	6
X5	CSL	0/5	3/25	6
X6	عصاره مخمر	صفر	3	6
X7	سوکروز	صفر	3	6

در این روش (پلاکت‌برمن) هر سنجه (x1, x2,…., x7) دارای دو سطح می‌باشد که به صورت + و − نشان داده می‌شوند، بنابراین باید برای هرسنجه دو غلظت در نظر گرفته شود. این غلظت‌ها باید تا حد امکان محدوده باریکی داشته و برای تولید زیست‌توده سلولی موثر باشند. سنجه‌ها و محدوده غلظت‌های آن‌ها در جدول 2 آمده است.

تعداد آزمایش‌ها در این روش $k+1$ می‌باشد؛ طوری‌که k تعداد متغیرها (اجزای محیط کشت) می‌باشد. تعداد علائم مثبت و منفی در هر آزمایش به‌ترتیب برابر $(k+1)/2$ و $(k-1)/2$ است. هر ستون باید دارای مقادیر مثبت و منفی باشد. اثر هر متغیر توسط معادله 1 محاسبه می‌شود:

$$E_{(xi)} = \frac{2(\sum M_{i+} - M_{i-})}{N} \qquad (1$$

در این معادله $E_{(xi)}$ اثر غلظت متغیر مورد آزمایش می‌باشد M_{i+} و M_{i-} تعداد سلول‌های مخمر که متغیر X_i به ترتیب در غلظت بالا و پائین تعریف شده است. N در این معادله نشان‌دهنده تعداد آزمایش‌ها می‌باشد.

هم‌چنین پنج آزمایش انجام شد که در این پنج آزمایش تمام سنجه‌ها در مقدار حد وسط غلظت بالا و پائین تعریف شدند.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش قبلی، آزمایش دیگری با استفاده از طراحی فاکتوریل کسری مطابق جدول 3 طراحی و اجرا گردید (ویت‌من و هنزل 2001).

فاکتورها و محدوده غلظت‌های آن‌ها در جدول 4 آمده است. تعداد آزمایش‌ها در این روش 2^{k-p} می‌باشد، k تعداد متغیرها (اجزای محیط کشت) می‌باشد. در این آزمایش k برابر با تعداد متغیرها (ملاس چغندر، ملاس نیشکر، عصاره مخمر و غیره) است.

جدول2- طراحی آزمایش تاثیر سنجه‌های محیطی روی تولید زیست‌توده سلولی مخمر ***C. membranifaciens***

شماره آزمایش	متغیرها										
	X1	**X2**	**X3**	**X4**	**X5**	**X6**	**X7**	**D1**	**D2**	**D3**	**D4**
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
2	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
3	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
4	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
5	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
6	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
7	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
8	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
9	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
10	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
11	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

X1, X2,…, X7 سنجه‌ها ی آزمایش مطابق جدول2

D1, D2, D3, D4 سنجه‌های منظور نشده در این آزمایش

جدول3- اجزای محیط کشت و غلظت‌های آن‌ها در فاکتوریل کسری

متغیرها	اجزای محیط کشت	مقادیر (گرم در لیتر)		
		-	صفر	+
X1	ملاس نیشکر	2	4	6
X2	ملاس چغندرقند	2	4	6
X3	CSL	1	2	3
X4	عصاره مخمر	0/1	0/15	2

جدول 4- طراحی آزمایش تاثیر سنجه‌های موثر در تولید زیست‌توده سلولی مخمر به روش طراحی فاکتوریل کسری

شماره آزمایش	متغیرها X1	X2	X3	X4-
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	+	-	-	+
4	+	-	-	+
5	-	+	-	+
6	-	+	-	+
7	+	+	-	-
8	+	+	-	-
9	-	-	+	+
10	-	-	+	+
11	+	-	+	-
12	+	-	+	-
13	-	+	+	-
14	-	+	+	-
15	+	+	+	+
16	+	+	+	+
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

بهینه‌سازی سنجه‌های موثر بر رشد

روش رویه پاسخ (ویت‌من و هنزل 2001) برای بهینه‌سازی اجزای محیط کشت موثر در تولید زیست-توده سلولی، به‌منظور بالابردن تولید سلول، با استفاده از طراحی ترکیب مرکزی (Central composite design) مورد استفاده قرار گرفت (جدول 5). در این مرحله آزمایش‌ها روی محیط کشت بر پایه ملاس نیشکر و CSL انجام شد.

در این روش متغیرها در پنج سطح (-α, -1, 0, 1, +α) بررسی گردید. رفتار سامانه را می‌توان توسط معادله درجه دو شماره 2 توصیف کرد. در این معادله Y پاسخ پیش‌بینی‌شده، β◦ عرض از مبدا، $\beta_3, \beta_2, \beta_1$ ضریب خطی، $\beta_{33}, \beta_{22}, \beta_{11}$ ضریب درجه دو $\beta_{23}, \beta_{13}, \beta_{12}$ ضریب اثر متقابل و x_3, x_2, x_1 متغیرهای مستقل.

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (2)$$

برای انتخاب بهترین معادله‌ای که می‌تواند رشد مخمر را توصیف کند از روش آماری تجزیه واریانس (ANOVA) استفاده شد. محاسبه‌های آماری توسط نرم‌افزار Design-Expert انجام گرفت.

جدول 5- اجزا محیط کشت و غلظت‌های آن‌ها در طراحی ترکیب مرکزی

متغیرها	علائم	α	-۱	صفر	۱	+α
		سطوح				
ملاس نیشکر	A	4	2	1/17	6	6/83
CSL	B	4	2	1/17	6	6/83

برای طراحی آزمایش بهینه سازی و تجزیه نتایج آن از نرم افزار Design Expert® استفاده شد. سنجه‌ها و محدوده غلظت‌های آن‌ها در جدول 6 آمده است.

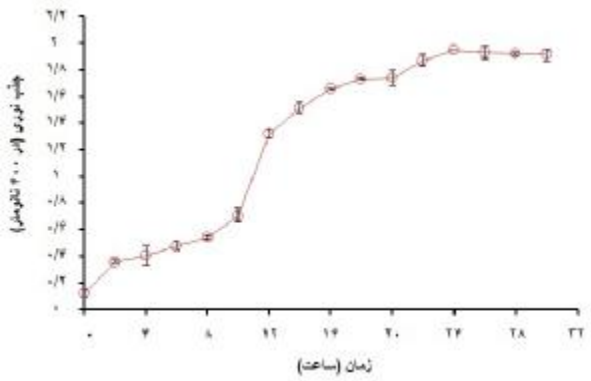
اعتبارسنجی مدل ریاضی به‌دست‌آمده جهت پیش‌گویی حداکثر رشد

به‌منظور اعتباربخشیدن به مدل آزمایش، سه آزمایش مکمل با استفاده از مقادیر بهینه‌شده انجام گرفت.

نتایج

بررسی کینتیک رشد (الگوی رشد) جدایه A2 در محیط کشت PDB

بررسی روند رشد جدایه A2 مخمر نشان داد که این مخمر بعد از 24 ساعت به حداکثر رشد خود در محیط کشت رسید و بعد از آن وارد فاز سکون گردید. بر این اساس زمان داده برداری در آزمایش‌های بعدی 24 ساعت بعد از مایه‌زنی اولیه محیط کشت بود (شکل 1).



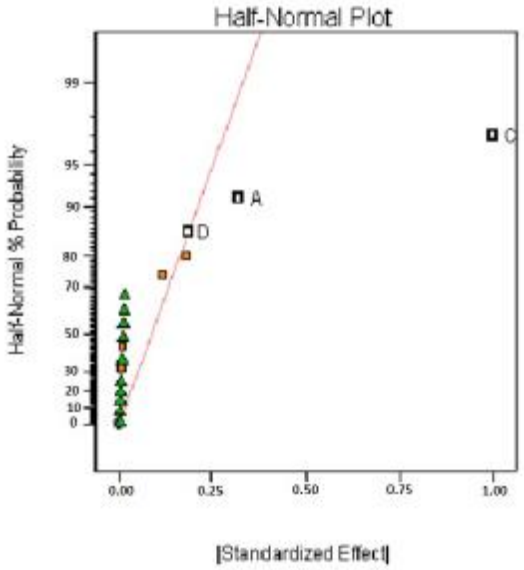
شکل1- الگوی رشد مخمر ***Candida membranifaciens*** در محیط کشت **PDB**

جدول6- طراحی آزمایش تاثیر سنجه‌های موثر در تولید زیست‌توده سلولی مخمر با روش طراحی ترکیب مرکزی

متغیرها/ سطوح		
شماره آزمایش	**A**	**B**
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-α	0
6	+α	0
7	0	-α
8	0	+α
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0

غربال‌گری اجزای محیط کشت

تجزیه آماری داده‌های آزمایش اول بر پایه روش پلاکت‌برمن نشان داد که از بین سنجه‌های استفاده شده (ملاس چغندرقند، ملاس نیشکر، آب پنیر، اوره، عصاره مخمر، سوکروز و CSL) تاثیر ملاس نیشکر، ملاس چغندرقند، CSL و عصاره مخمر در رشد جدایه A2 *Candida membranifaciens* در محیط کشت به ترتیب 46، 2، 7 و 3/5 درصد بوده است. بر این مبنا چهار سنجه فوق برای آزمایش بعدی که غربال‌گری با روش طراحی فاکتوریل کسری بود، انتخاب گردیدند.



شکل 2- نمودار بررسی اثر سنجه‌رهای موثر در رشد *C. membranifaciens* در طراحی فاکتوریل کسری. C، عصاره مخمر، A، ملاس نیشکر و D، معرف CSL می‌باشد

نتایج آزمایش‌های غربال‌گری نشان داد (شکل 2) که از بین سنجه‌های انتخاب شده به عنوان منبع کربن (ملاس چغندرقند، ملاس نیشکر، آب پنیر و سوکروز)، ملاس نیشکر تاثیر معنی‌داری در رشد مخمر داشت. از بین منابع نیتروژن (اوره، عصاره مخمر و CSL)، تاثیر عصاره مخمر و CSL معنی‌دار بودند با توجه به اهمیت قیمت در تولید صنعتی، CSL برای مطالعه‌های بعدی انتخاب شد. بر اساس نتایج ذکرشده در جدول 7، منحنی معنی‌دار می‌باشد که نشان می‌دهد رابطه بین سنجه‌ها و میزان رشد، غیرخطی است. معنی‌دار شدن عدم کفایت مدل (Lack of fit) به این معنی است که مدل خطی، کفایت مدل‌سازی را برای تولید زیست‌توده نمی‌دهد.

جدول 7-نتایج تجزیه ANOVA برای تولید زیست توده سلولی مخمر *C. membranifaciens* در طراحی فاکتوریل کسری

منبع	میانگین مربعات	درجه آزادی
مدل	**1/56519	3
A-ملاس نیشکر	0/425756	1
C-عصاره مخمر	4/131056	1
D-CSL	0/138756	1
امنحنی	**0/626851	1
باقی¬مانده	0/01382	14
عدم کفایت مدل	**0/046481	4
خطای خالص	0/000755	10
خطای کل		18

بهینه‌سازی سنجه‌های موثر در رشد

روش رویه پاسخ برای بهینه‌سازی اجزای محیط کشت موثر در تولید زیست‌توده سلولی، به‌منظور بالا بردن تولید سلول با استفاده از طراحی Central composite

براساس نتایج طراحی فاکتوریل کسری، دو سنجه معنی‌دار ملاس نیشکر و CSL برای بهینه‌سازی تولید حداکثر زیست‌توده سلولی مخمر با استفاده از روش رویه پاسخ انتخاب شدند.

بر اساس نتایج انتخاب معادله رشد مخمر، مدل مناسب، یک مدل چندجمله‌ای درجه دوم و تداخل‌های مربوطه بود (جدول 8). نتایج آماری معنی‌دار بودن سنجه‌های ملاس نیشکر و CSL و میزان برازش آن‌ها در مدل، در جدول 9 نشان داده شده است. همان‌طوری‌که در جدول مشاهده می‌شود، مدل از نظر آماری کاملاً معنی‌دار می‌باشد ($P<0.05$) و عدم کفایت مدل (Lack of fit) معنی‌دار نمی‌باشد ($P>0.05$).

جدول 8- نتایج آماری به‌دست‌آمده جهت انتخاب مدل مناسب تولید زیست‌توده سلولی مخمر *C. membranifaciens* با استفاده از سنجه‌های ملاس نیشکر و CSL

منبع	میانگین مربعات	درجه آزادی
اثر متقابل میانگین×کل	23/80062	1
اثر متقابل خطی× میانگین	0/064563	2
اثر متقابل تعامل دو عاملی× خطی	0/0361	1
اثر متقابل درجه دوم× تعامل دو عاملی	0/091498**	2
اثر متقابل درجه سوم× درجه دوم	/007287	2
باقیمانده	0/003296	5
کل	1/859992	13

جدول 9- آنالیز واریانس سنجه‌های موثر بر تولید زیست‌توده سلولی مخمر *C. membranifaciens*

منبع	درجه آزادی	میانگین مربعات
مدل	4	0/084410426**
ملاس	1	0/09115803**
CSL	1	0/037967619*
ملاس× CSL	1	0/0361*
ملاس× ملاس	1	0/0172416054*
باقیمانده	8	./005204403
عدم کفایت مدل	4	./00708805
خطای خالص	4	0/00322
خطای کل	12	
انحراف معیار	0/0722142	
میانگین	1/353077	
ضریب تغییرات%	5/331666	
فشار	0/167036	

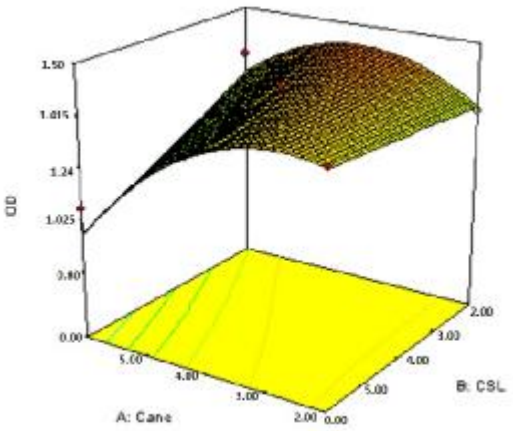
بر این اساس مدل ریاضی رابطه بین متغیرها (A, B) و پاسخ (Y) را می توان با معادله زیر توصیف کرد:

$$Y = 1.449 - 0.11A - 0.07B - 0.095AB - 0.156A^2 \quad (3$$

در این فرمول Y مقدار رشد سلولی مخمر و A غلظت ملاس نیشکر در محیط کشت و B غلظت CSL می‌باشد.

همان‌طوریکه در شکل3 مشاهده می‌شود رابطه غلظت ملاس نیشکر (Cane) در محیط کشت و رشد مخمر از توان دوم و رابطه بین غلظت عصاره مخمر (Yeast) در محیط کشت و رشد مخمر خطی است. مقدار OD با افزایش میزان ملاس‌نیشکر ابتدا افزایش و بعد کاهش می‌یابد.

با حل معادله شماره 3 و تجزیه نمودار رویه پاسخ، بهینه غلظت CSL ملاس نیشکر در محیط کشت برای رسیدن به حداکثر رشد، به‌ترتیب 20 و 39/2 گرم در لیتر می باشد.



شکل3- نمودار رویه پاسخ رابطه ملاس نیشکرو CSL بروی رشد مخمر *C. membranifaciens*

اعتبار سنجی مدل ریاضی به‌دست‌آمده جهت پیشگویی حداکثر رشد

پاسخ مشاهده‌شده برابر با 1/45 و 1/49بود. نتایج نشان داد (نتایج ارائه نشده است) که همبستگی بالایی بین پاسخ پیش‌بینی‌شده و پاسخ عملی به‌دست‌آمده در آزمایشگاه وجود دارد که تائیدی بر معتبر بودن مدل می‌باشد.

بحث

برای تولید تجاری یک فرمولاسیون میکروبی، آنتاگونیست باید در مقیاس نیمه‌صنعتی و صنعتی تولید شود. در حالت کلی و بسته به نوع عامل کنترل زیستی (قارچ، باکتری، مخمر، نماتد و ویروس)، روش تخمیر جامد و مایع برگرفته از فناوری پیشرفته صنعت غذا و داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (پاول و همکاران 1993). معمولا" برای تولید مخمرها و باکتری‌ها از روش تخمیر مایع داخل ماشین‌های تخمیر-کننده دارای هم‌زن استفاده می‌شود. صرف‌نظر از روش تولید، هدف دست‌یابی به تولید حداکثر زیست‌توده سلولی با کم‌ترین هزینه‌های تولید می‌باشد (گلازر و همکاران 1995، فراول و همکاران 1999). از اهداف این تحقیق نیز یافتن منابع کربن و نیتروژن قابل‌دسترس و بهینه‌سازی مقدار مصرف آن‌ها بود که علاوه بر افزایش تولید زیست‌توده سلولی، تولید انبوه آن از نظر اقتصادی امکان‌پذیر باشد. در تخمیر صنعتی تقریبا" 30 درصد هزینه‌ها مربوط به محیط کشت می‌باشد (ریواس و همکاران 2003).

موجودات زنده برای رشد و تولید متابولیت‌ها به منبع کربن و نیتروژن نیاز داشته و فرآورده‌های جانبی کارخانه‌ها از جمله ملاس، نشاسته، آب پنیر و عصاره-ذرت از منابع ارزان قیمت کربن و نیتروژن هستند (اوه و همکاران 2004). نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که نوع منبع کربن و نیتروژن بر میزان رشد

سلولی تاثیر بسزایی دارد. امروزه از ملاس نیشکر جهت پرورش بسیاری از موجودات زنده استفاده می‌شود (برتولین و همکاران 2003). کوستا و همکاران 2001 نیز اهمیت ملاس چغندرقند را به‌عنوان یک محیط پایه در افزایش میزان رشد سلولی جدایه *Pantoea agglomerans* Ewing CPA-2 ثابت نمودند. از طرفی، استفاده از هیدروکربن‌های خالص مثل گلوکز، فروکتوز، سوکروز، لاکتوز و قندهای دیگر در میکروبیولوژی صنعتی باعث بالارفتن هزینه تمام‌شده برای تولید فرآورده می‌شود. از این‌رو در بسیاری موارد از ضایعات کشاورزی و صنعتی که از این قندها غنی می‌باشند (مثل ملاس) استفاده می‌گردد (اونباسلی 2009). ملاس یکی از فرآورده‌های جنبی کارخانه‌های تولید شکر است، هم‌چنین CSL یک منبع حاوی ویتامین‌ها و مواد معدنی است. این دو به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تخمیر میکروارگانیسم‌ها به‌کار رفته‌اند و گزارش‌های متعددی مبنی بر کارایی و مقرون به صرفه‌بودن این مواد در مراحل تخمیر وجود دارد (کیم و همکاران 2007). نتایج ما نشان داد که ملاس نیشکر نسبت به ملاس چغندرقند و آب پنیر بیش‌ترین تاثیر را در افزایش رشد سلولی مخمر داشت. به نظر می‌رسد این اختلاف مربوط به تفاوت مواد تشکیل‌دهنده آن‌ها باشد. قند اصلی آب پنیر لاکتوز می‌باشد و بر اساس گزارش استگ و فان در میر (1985)، به‌طور میانگین ملاس نیشکر حاوی 40 درصد سوکروز و 15 درصد گلوکز و 13 درصد فروکتوز می‌باشد درحالی‌که ملاس چغندرقند حاوی 66 درصد سوکروز، یک درصد گلوکز و یک درصد فروکتوز می‌باشد. هرچند غلظت این مواد بسته به کارخانه و منطقه کشاورزی متغیر است ولی در حالت کلی درصد گلوکز و فروکتوز در ملاس نیشکر در مقایسه با ملاس چغندرقند بیشتر است (استگ و فان در میر 1985). در بررسی‌های صورت گرفته روی مصرف مواد غذایی مشخص شده است که سلول‌های مخمر *Candida sake* گلوکز و فروکتوز موجود در محیط را قبل از سوکروز مورد استفاده قرار می‌دهند (عبادیاس و همکاران 2003). این مطلب می‌تواند تائیدی بر نتایج ما که نشان‌دهنده تاثیر بیشتر ملاس نیشکر در افزایش تولید سلولی نسبت به ملاس چغندر قند است، باشد. در حالت کلی، گلوکز که قند موجود در محیط کشت ملاس نیشکر است فوراً و به‌راحتی توسط مخمرها استفاده می‌شود اما سوکروز باید ابتدا شکسته شده و سپس مصرف گردد. بر اساس نتایج به‌دست-آمده از رشد کم این مخمر در محیط کشت آب پنیر، می توان چنین استنباط کرد که این جدایه قادر به استفاده از قند لاکتوز نمی‌باشد. هر چند که از نظر تاثیر بر افزایش تولید زیست‌توده سلولی، بیشترین تاثیر مربوط به محیط کشت حاوی ملاس چغندرقند و عصاره مخمر بوده اما استفاده از عصاره‌مخمر در محیط کشت مقرون به صرفه نمی‌باشد. دلیل انتخاب CSL برای آزمایش‌های بعدی تاثیر زیاد آن بر تولید زیست‌توده سلولی نسبت به اوره و قابل توجیه بودن در مقیاس صنعتی و تجاری این منبع بوده که هم به‌عنوان منبع کربن و هم منبع ازت مطرح می‌باشد و یکی از منابع نیتروژنی است که نیتروژن را به صورت پروتئین در اختیار میکروارگانیسم‌ها قرار می‌دهد (ریواس و همکاران 2003).

بنابراین بهینه‌سازی فرآیندها یکی از مهم‌ترین فعالیت‌ها در صنایع رقابتی امروز می‌باشد و راهنمای تولید انبوه عوامل کنترل زیستی نیز باید بهینه باشد تا صنعت را به تولید تجاری آن ترغیب نماید. از طرف دیگر هزینه بالای تحقیقات، مستلزم استفاده از روش‌هایی است که تعیین سنجه‌های موثر بر یک فرآیند را با حداقل تعداد آزمایش‌ها ممکن نماید که این عمل با استفاده از روش‌های کلاسیک و طراحی آماری صورت می‌گیرد. در تحقیق حاضر مشخص گردید که وقتی تعداد زیادی از سنجه‌ها وجود دارند می‌توان از آزمایش‌های غربال‌گری برای حذف فاکتورهای غیرمهم قبل از تلف‌شدن وقت و هزینه استفاده کرد و از

پرطرفدارترین طراحی‌ها برای غربال‌گری می‌توان به طرح‌های فاکتوریل کسری 2^{k-p} و پلاکت‌برمن اشاره کرد (لازیک 2004، آرمسترانگ 2006). بعد از غربال‌گری اولیه، روش رویه‌پاسخ می‌تواند برای یافتن شرایط بهینه سامانه، با در نظر گرفتن سنجه‌های مؤثر بر پاسخ، به‌کار رود. این روش شامل مجموعه‌ای از طراحی‌های آزمایش، تجزیه و فناوری بهینه‌سازی است که جهت بهینه‌سازی و پیدا کردن مقادیر سنجه‌ها برای رسیدن به حداکثر پاسخ فرآیند، کاربرد دارد (آرمسترانگ 2006).

به‌عنوان مثال به‌منظور به‌دست‌آوردن غلظت بهینه ملاس و CSL در محیط کشت برای تولید حداکثر زیست‌توده سلولی *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen با استفاده از روش رویه پاسخ، بیش‌ترین زیست‌توده زمانی حاصل شد که ملاس با غلظت 6/4 درصد و CSL با غلظت 17 درصد به محیط کشت اضافه گردید (کیم و همکاران 2007). هم‌چنین جهت افزایش تولید باکتری پروبیوتیک *Bifidobacterium pseudocatenulatum* در محیط کشت پایه شیر در ابتدا با استفاده از روش فاکتوریل 2^3 عصاره مخمر را که تاثیر مثبت در افزایش تولید داشت، انتخاب نمودند و در مرحله بعد به‌منظور بهینه‌کردن محیط کشت با استفاده از روش رویه پاسخ، بهینه غلظت شیر 2/8 درصد و عصاره مخمر 2/2 درصد گزارش گردید (استفین و همکاران 2007).

بر اساس بررسی‌های به‌عمل‌آمده تاکنون از روش رویه پاسخ برای بهینه‌سازی محیط کشت مخمرهای زیستی کشاورزی استفاده نشده و تحقیق حاضر اولین مطالعه صورت گرفته در این زمینه می‌باشد. در این پژوهش سعی بر این بود که در نهایت محیط کشتی معرفی شود که در مقیاس تجاری و صنعتی قابل توجیه باشد و بر اساس نتایج حاصل به‌نظر می‌رسد که محیط کشت حاوی ملاس نیشکر به‌عنوان منابع کربن و CSL به عنوان منبع نیتروژن این قابلیت را دارا باشد.

سپاس‌گزاری

این پژوهش با استفاده از امکانات آزمایشگاهی گروه کنترل غذا و دارو دانشکده داروسازی و همکاری صمیمانه مسئول محترم آزمایشگاه، آقای حسین جمالی‌فر انجام شد که بدین‌وسیله نگارندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را ابراز می دارند.

منابع

علوی فرد ف، 1386. بررسی امکان کنترل بیولوژیک کپک خاکستری سیب توسط چند جدایه مخمر و بررسی بعضی از مکانیسم‌های آنتاگونیستی آن‌ها. پایا نامه کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی. مجتمع آموزش عالی ابوریحان دانشگاه تهران.

مختارنژاد ل، 1388. فرمولاسیون گونه‌های مختلف مخمر، **Rhodotorula mucilaginosa** ، **Pichia guilliermondii**، **Candida membranifaciens** و پایداری آن‌ها در بستره‌های مختلف برای کنترل بیولوژیکی کپک آبی سیب. پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی. مجتمع آموزش عالی ابوریحان دانشگاه تهران.

Abadias M, Teixido N, Usall J, Vinas I and Magan N, 2000. Solute stresses affect growth patterns, endogenous water potentials and accumulation of sugars and sugar alcohols in cells of the biocontrol yeast *Candida sake*. Journal of Applied Microbiology 89: 1009-1017.

Abadias M, Teixido N, Usall J, Benabarre A and Vinas I, 2001. Viability, efficacy and stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. Journal of Food Protection 64: 856-861.

Abadias M, Usall J, Teixido N and Vinas I, 2003. Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. Phytopathology 93: 436-442.

Armstrong NA, 2006. Pharmaceutical experimental design and interpretation. 2th ed. Boca Raton: Talor & Francis.

Bertolin TE, Schmidell W, Maiorano AE, Casara J and Costa J, 2003. Influence of carbon, nitrogen and phosphorous sources on glucomylase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation. Zeitschrift für Naturforschung 58: 708-712.

Costa E, Teixdo N, Usall J, Atares E and Vinas I, 2001. Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commerical products and by-products. Applied Microbiology and Biotechnology 56: 367-371.

Damtew W, Admassu Emire SH and Bahiru Aber A, 2012. Evaluation of growth kinetics and biomass yield efficiency of industrial yeast strains. Archives of Applied Science Research 4 (5): 1938-1948.

Fravel DR, Rhodes DJ and Larkin RP, 1999. Production and commercialization of biocontrol products p 365–376 In: Albajes R, Gullino LM, Lenteren JC van and Elad Y (eds.), Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops. Kluwer, Dordrecht.

Glazer AN and Nikaido H, 1995. Microbial biotechnology. Freeman, New York.

Gholamnejad J, Etebarian HR, Sahebani N and Roustaee A, 2009. Characterization of biocontrol activity of two strain from Iran against blue mold of apple in order to reduce the environmental pollution. Journal of International Environmental Application & Science 4: 28-36.

Kim YH, Kang SW, Lee JH, Chang H, Yun Ch, Paik HD, Kang CHW and Kim SW, 2007. High cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 in fed-batch culture for the production of β-glucan. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 13(1): 153-158.

Lazic ZR, 2004. Design of experiments in Chemical Engineering. Morristown: Wiley- VCH.

Melin PS, Hakansson T, Eberhad H and Schnurer S, 2006. Survival of the biocontrol yeast *Pichia anomala* after long-term storage in liquid formulations and different temperatures, assessed by flow cytometry. Journal of Applied Microbiology (100): 264-271.

Oh SE, Min B and Logan BE, 2004. Cathode performance as a factor in electricity generation in microbial fuel cells. Environmental Science Technology 38: 4900-4904.

Onbasli AB, 2009. Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas* spp. Journal of Environmental Biology 30: 161-163.

Powell KA and Jutsum AR, 1993. Technical and commercial aspects of biocontrol products. Journal of Pesticide Science 37: 315-321.

Rivas B, Torre P, Domfínguez JM, Perego P, Converti A and Parajó JC, 2003. Carbon material and bioenergestic balances of xylitol production from corn cob by *Debaryomyces hansenii*, Biotechnology Programs 19: 706-713.

Steg A and Van Der Meer JM, 1985. Differences in chemical composition and digestibility of beet and cane molasses. Animal Feed Science Technology 13: 83-91

Stephenie W, Kabeir BM, Shuhaim M, Rosfarizan M and Yazid AM, 2007. Growth optimization of a probiotic candidate, *Bifidobacterium peudocatenulatum* G4, in milk medium using response surface methodology. Biotechnology and Bioprocess Engineering 12: 106-113.

Van Dijken JP, Weusthuis RA and Pronk JT, 1983. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. Antonie van Leeuwenhoek 63: 343–352

Wittmann C and Heinzle E, 2001. Modeling and experimental design for metabolic flux analysis of lysine-producing Corynebacteria by mass spectrometry. Metabolic engineering 3(2):173-91.

Screening and Optimization of Industrial Medium for Mass Production of *Candida membranifaciens*, Biocontrol Agent of Blue Mold and Gray Mold Diseases of Apple

Mohammad Reza Khoshayand[1], Lachin Mokhtarnejad[*2], Hasan Reza Etebarian[3], Mohsen Farzaneh[4], Pejman Sheikhpour[5]

[1]Associate Professor, Department of Drug and Food Control, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Science.
[2]Former Student of Department of Plant Protection, College of Abureihan, University of Tehran.
[3]Professor, Department of Plant Protection, College of Abureihan, University of Tehran.
[4]Associated Professor, Medicinal Plants and Drugs Research Institute of Shahid Beheshti University.
[5]Pharmacists, Pharmaceutics Department, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Science.
[*] Corresponding author: Mokhtarnejad@ut.ac.ir

Received: 6 May 2013 Accepted: 11 March 2014

Abstract

The optimization of nutrient factors in mass production of biological agents is one of the most important processes in trade and industry development. In this study, response surface methodology (RSM) has been used to increase cell biomass production of *Candida membanifaciens* by optimizing medium components during two steps; screen of medium culture composition and evaluation of process factors. Sugar beet molasses, cane molasses, permit powder and sucrose used as carbon sources while corn step liquor, urea and yeast extract were used as nitrogen source. Different sources of carbon and nitrogen were studied by Design-Expert software. Results exhibited that sugar cane molasses and CSL have significant effect on biomass production of the yeast. Based on analysis of variance (ANOVA), a quadratic polynomial model with its interactions was found to be best model for determining yeast growth. According to growth equation as well as analyzing response surface plots, the optimal concentrations of sugar cane molasses and CSL in the medium were determined 20 g/l and 39.2 g/l respectively.

Key words: Biocontrol, Industrial medium, Optimization, Yeast production,