مدلسازی و بررسی عوامل مؤثر بر تبدیل زیستی روغن کرچک به اسید لینولئیک مزدوج با استفاده از گونه‌های لاکتوباسیلوس

زهرا کوچک‌یزدی[۱]، ایران عالمزاده[۲*]، حدیثه‌سادات طوری کرمی[۳]

۱- دانشجوی دکتری مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی شریف

۲- استاد گروه مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی شریف

۳- کارشناس ارشد مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی شریف

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۹/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۱/۲۱

پیام‌نگار: Alemzadeh@sharif.edu

چکیده

اسید لینولئیک مزدوج CLA، از جمله اسیدهای چرب با خواص زیستی بسیار مفید، مانند تقویت سیستم ایمنی بدن است و می‌تواند به منظور تولید فراورده‌های غذایی فراسودمند به‌کار گرفته شوند. به این جهت، تبدیل زیستی روغن کرچک به اسید لینولئیک مزدوج با به‌کارگیری گونه‌های لاکتوباسیلوس بررسی و مدلسازی شد. در میان باکتریهای بررسی شده، باکتریهای لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC1058 و سپس PTCC1745 از بیشترین توانایی در تولید اسید لینولئیک مزدوج برخوردار بودند. بیشترین بازده تولید با استفاده از آنزیم لیپاز رنکو و شویندهٔ توین ۸۰ به دست آمد. افزودن قندهای فروکتوز و ساکاروز به محیط کشت به کاهش بازده تولید CLA انجامید. این کاهش برای ساکاروز بیشتر بود. مدلسازی میزان تولید CLA و به حداکثر رساندن آن با بهره‌گیری از روش پاسخ سطحی انجام شد. بیشترین بازده تولید CLA برای باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC1058 در نقطه غلظت روغن ۴/۶ mg/mL، درصد وزنی سلول شسته شده ۱۵ %w/v و زمان ۱۲۱ ساعت به میزان ۳۷/۱۱٪ حاصل شد و بیشترین غلظت CLA تولید شده نیز در غلظت روغن ۱۰mg/mL، درصد وزنی سلول شسته شده ۱۵ %w/v و زمان ۱۷۳/۹۲ ساعت به میزان ۲۱۷۷/۶ mg/L به دست آمد.

کلیدواژه‌ها: اسید لینولییک مزدوج، مدلسازی، تبدیل زیستی، روغن کرچک.

۱. مقدمه

اسید لینولئیک مزدوج CLA، گروه و دسته‌ای از ایزومرهای هندسی اسید لینولئیک‌اند که از آثار تقویت سیستم ایمنی، خاصیت ضد سرطانی، ضد تصلب شرائین، ضد چاقی برخوردارند و خطر دیابت را با کم کردن مقاومت انسولین و پایین آوردن سطوح انسولین کاهش می‌دهند[۱]. مصرف انسانی CLA از منابع طبیعی حدود ۱۰ درصد مقدار پیشنهاد شده است. مقدارCLA در غذاهای مصرفی کم است. مقدار مصرف آن در رژیم غذایی انسان فقط ۰/۵ تا ۱ گرم برای هر فرد است. این مقدار نیاز بالقوه زیستی را برآورده نمی‌کند. تحقیقات پزشکی نشان داده است، تأثیرات مطلوب، زمانی

* تهران، دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی شیمی و نفت

حاصل می‌شود که فردی با وزن ۷۰ کیلوگرم هر روز ۳ گرم CLA مصرف کند. با افزایش مقدار مصرف گوشت و لبنیات در رژیم غذایی، سطح چربی‌های اشباع نیز افزایش خواهد یافت. بررسی‌ها نشان داده‌اند که می‌توان از سنتز کردن و آمیختن CLA در فراورده‌های غذایی برای افزایش مقدار آن در رژیم غذایی استفاده کرد.

روغن کرچک از جمله موادی است که می‌تواند در تولیدCLA به عنوان رشدمایه به‌کار رود. علی‌رغم میزان بالای تولید روغن کرچک در دنیا، کمتر از ۱٪ آن برای تولید محصولاتی با خاصیت دارویی استفاده می‌شود، در حالی که با توجه به برخورداری از میزان زیاد اسید رسینولئیک (۸۵٪ تا ۹۰٪) می‌تواند منبع بالقوه‌ای برای تولید CLA به‌شمار آید[۲].

با درنظر گرفتن آثار بالقوه زیستی CLA، مصرف این اسید چرب در مواد غذایی انسان مورد بحث قرار می‌گیرد. مصرف CLA برای اهداف دارویی و غذایی نیازمند یک فرآیند امن و انتخاب پذیر است. سود جستن از واکنش‌های زیستی برای تولید CLA می‌تواند روشی مناسب باشد[۳]. محصولات نهایی سوخت‌وسازی متنوعی در محیط کشت رها و یا به صورت نامستقیم جمع آوری می‌شود. استوکیومتری وابسته به تشکیل محصول معمولا به چهار گروه تقسیم می‌شود[۴]. گروه اول، محصول اصلی در نتیجه انرژی سوخت‌وساز اولیه تشکیل می‌شود (تولید محصول همگام با رشد انجام می‌شود)، مانند تولید اتانول در حین رشد بی‌هوازی مخمر. گروه دوم، محصول اصلی به صورت نامستقیم از انرژی سوخت‌وساز بوجود می‌آید مانند تولید سیتریک اسید در حین کشت هوازی قارچ. گروه سوم، محصول سوخت‌وسازی ثانویه است، مانند تولید پنی‌سیلین در کشت هوازی قارچ. گروه چهارم، تبدیل زیستی[1] است که محصول رشدمایه، پس از یک یا چند واکنش که با آنزیم‌های درون سلول کاتالیز می‌شود، تولید می‌شود، مانند تولید CLA توسط باکتری‌های در حال استراحت لاکتیک اسید و هیدروکسیلیشن[2] استروئیدها[۴]. در این گروه، سلول به صورت کیسه آنزیمی واکنش تولید محصول را کاتالیز می‌کند بنابراین مقدار تولید محصول به مقدار سلول موجود در محیط واکنش وابسته است. در سال ۲۰۱۱، لی و همکاران تولید CLA را از لینولئیک اسید توسط باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم بررسی کردند[۵]؛ تحیقات مشابهی نیز برای تولید CLA توسط باکتری‌های در حال رشد انجام شده است[۸-۶] تولید CLAتوسط باکتریهای در حال رشد بسیار کمتر از تولید به روش تبدیل زیستی است. این امر به علت اثر بازدارندگی اسیدهای چرب چند غیر اشباع بر رشد سلول است. فرآیندهای شامل سلول‌های شسته شده (در حال استراحت) باکتری اسید لاکتیک به عنوان کاتالیست می‌تواند به جلوگیری از آثار بازدارندگی اسیدهای چرب پلی غیر اشباع به‌عنوان رشدمایه روی رشد سلول کمک کند و در نتیجه واکنش‌ها می‌توانند در غلظت زیاد رشدمایه انجام شوند و میزان تولید به میزان چشمگیری از تولید همگام بارشد بیشتر است[۱۰و۹و۲].

در پژوهش حاضر، اسید لینولئیک مزدوج به روش میکروبی تولید شد. تأثیر عوامل مؤثر بر بازده تولید میکروبی اسید لینولئیک مزدوج شامل شرایط انجام واکنش (زمان انجام واکنش، غلظت سلول و رشدمایه)، استفاده از مکمل‌های محیط کشت، اثر شوینده مصرف شده و نوع آنزیم لیپاز، بررسی و بهینه‌سازی شد.

۲. مواد و روشها

۲-۱ مواد

روغن کرچک از شرکت سیگما تهیه شد. آنزیم لیپاز تولید شده از A.niger PTCC 5010 (تهیه شده در مرکز تحقیقات بیوشیمی)، آنزیم تجاری لیپوزیم تی‌ال آی‌ام (لیپاز یک- سه ویژه ترومومایس لانوگینوزا با فعالیت آنزیمی IUN/g ۲۵۰، چگالی $۴۰۰kg/m^3$ و قطر ذرات mm ۰/۹-۰/۴) که بر دانه‌های سیلیکا تثبیت شده است و آنزیم لیپوزیم آرام آی‌ام (لیپاز یک، سه ویژه ریزوموکورمیهی با فعالیت آنزیمی IUN/g ۱۵۰، چگالی $۴۱۵kg/m^3$ و قطر ذرات mm ۱/۰-۰/۳) از شرکت نووزیم (شهر بگس ورد، دانمارک)، آنزیم لیپاز گاوی از شرکت رنکو، آنزیم لیپاز پروسین پانکراس از شرکت مرک، تهیه شدند. استانداردهای متیل استر اسیدهای چرب شامل پالمیتیک اسید، استئاریک اسید، اولئیک اسید، لینولئیک اسید (۹ سیس ۱۲ سیس اکتادکانوئیک اسید) از شرکت ویکو ژاپن، استاندارد متیل استر اسید لینولئیک مزدوج (۹ سیس ۱۱ ترانس اکتادکانوئیک اسید ۴۲٪، ۱۰ ترانس ۱۲ سیس اکتادکانوئیک اسید ۴۴٪، ۱۰ سیس ۱۲ سیس اکتادکانوئیک اسید ۱۰٪، سایر همپارها

1. Biotransformation
2. Hydroxylation.

(ایزومرها) ۵ ٪) و ریسینولئیک اسید از شرکت سیگما تهیه شدند. گلیسرول، تری فلئوروبر متانولی و سایر مواد شیمیایی از درجه کروماتوگرافی یا تجزیه‌ای بودند و از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. سوش‌های باکتری مورد استفاده (لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC1058[1]، لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC1745[2]، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC1643[3]، لاکتوباسیلوس رامنوسوس PTCC1637[4]) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران[5] تهیه شدند.

۲-۲ شرایط انجام واکنش تبدیل زیستی

به منظور انجام واکنش تولید اسید لینولئیک مزدوج، مخلوط واکنش، (۲/۵ میلی لیتر) شامل غلظت‌های مختلف روغن کرچک کمپلکس شده با شوینده، بافر فسفات ۰/۲ M (pH ۶)، آنزیم لیپاز (۱۰۰ U/m) و سلول‌های شسته شده در حال استراحت به‌کار رفتند. واکنش در ارلن کوچک در بسته با حجم ۲۵ میلی همراه با تکان دادن آهسته (۱۲۰ rpm) و دمای ۳۷ درجه برای مدت زمانهای متفاوت انجام شد[۲]. مخلوط حاصل پس از استخراج چربی و متیل استرسازی اسیدهای چرب توسط گاز کروماتوگرافی آنالیز شد و مقدار CLA تولید شده از مقایسه مساحت قله‌ها و منحنی استاندارد سی ال ای به دست آمد. میزان بازده تولید با استفاده از رابطه زیر تعیین شد. نتایج به دست آمده در تمام این آزمایشات معدل ۳ اندازه‌گیری بود که با تقریب ۱۰٪ ± درصد قابل بازتولید بود.

بازده تولید CLA = (غلظت روغن کرچک/ غلظت سی ال ای) × ۱۰۰

۲-۳ استخراج چربی

استخراج چربی طبق روش (Bligh and Dyer1959) صورت گرفت. پس از اتمام زمان گرمخانه‌گذاری، به مخلوط واکنش ۷/۵ cc مخلوط کلروفرم متانول به نسبت ۱ به ۲ اضافه شد. به مدت ۱ دقیقه با لولهٔ لرزاننده شدیداً تکان داده شد. سپس ۲/۵ cc کلروفرم به محلول اضافه و مجدداً به مدت ۱ دقیقه تکان داده شد. پس از کلروفرم، ۲/۵ cc آب یون زدوده اضافه شد و مثل قبل ۱ دقیقه شدیداً تکان داده شد. سپس نمونه در سانتریفیوژ قرار داده شد (۱۵ min، ۴۰۰۰ rpm) لایه آبی دور ریخته شد و لایه آلی توسط سرنگ به بالون ۵۰ cc منتقل شد[۱۱]. سلول به منظور بررسی CLA درون سلولی جمع آوری و در بافر فسفات نگهداری شد.

۲-۴ تهیه متیل استر از اسیدهای چرب

پس از جداسازی لایه آلی، از طریق تبخیرکننده روتاری حلال تبخیر شده و نمونه خشک شد. ۱ cc از محلول NaOH متانولی ۱ مولار به نمونه اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. پس از سرد شدن ۶cc محلول HCl متانولی ۴v/v٪ به محلول اضافه شد و در حمام آب ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. پس از خارج کردن بالون از حمام آب و سرد شدن بالون چگالنده جدا شد و ۳ cc هگزان به محلول اضافه و پس از ورتکس در سانتریفیوژ قرار داده شد (۳ min، ۲۰۰۰ rpm). سپس لایه آلی به منظور تزریق به دستگاه GC-Mass توسط سرنگ جدا شد[۱۲].

۲-۵ کروماتوگرافی گازی

برای تعیین اسیدهای چرب از دستگاه کروماتوگرافی گازی جرمی مدل Agilant 5975c ساخت شرکت Agilant (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States of America) استفاده شد که مشخصات آن از این قرار است: نوع ستون (۳۰ متر × ۰/۳۲میلی‌متر × ۰/۲۵ میکرومتر) Hp-5 MS، گاز حامل: هلیم با درجه خلوص ۹۹/۹۹٪، سرعت جریان گاز هلیم: ۱/۲ میلی لیتر در دقیقه، قبل از تزریق، برنامه دمایی به دستگاه داده می‌شود. دمای اولیه ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و سپس با آهنگ ۵ درجه در دقیقه تا دمای ۲۳۰ درجه سلیسوس افزایش می‌یابد و به مدت ۵ دقیقه در این دما نگاه داشته می‌شود؛ سپس با آهنگ ۱۰ درجه در دقیقه تا دمای ۲۷۰ درجه سلیسوس افزایش می‌یابد و به مدت ۵ دقیقه در این دما نگاه داشته می‌شود. دمای تزریق ۲۵۰ و دمای آشکارساز بر روی ۲۷۰ درجه تنظیم می‌شود و مقدار تزریق هر نمونه نیز یک میکرولیتر بود و هر نمونه حداقل سه بار به دستگاه تزریق شد.

1. *Lactobacillus Plantarum* PTCC1058
2. *Lactobacillus Plantarum Subsp.Plantarum* PTCC1745
3. *Lactobacillus Acidophilus* PTCC1643
4. *Lactobacillus Rhamnosus* PTCC1637
5. http://www.irost.org/

مدلسازی واکنش: طراحی آزمایش‌ها بر اساس طرح مرکب مرکزی با ۳ عامل و هر عامل در پنج سطح با ۲ تکرار در نقطه مرکزی مشتمل بر ۱۶ آزمایش انجام شد. مقادیر متغیرهای مستقل شامل دمای واکنش (°C)، زمان واکنش (hr) و مقدار آنزیم (%)، به مقادیر رمزگذاری شده ۱+ و۰و ۱- تبدیل شده که، به ترتیب، نشانهٔ سطوح زیاد، متوسط و کم است[۱۳]. و در جدول (۱) درج شده است. به منظور تجزیه و تحلیل آماری شامل رگراسیون، تحلیل واریانس، شکل‌های گرافیکی و بهینه‌سازی از نرم افزار دیزاین اکسپرت ۸[1] استفاده شد.

جدول ۱. متغیرهای مستقل و سطوح آنها برای طرح مرکب در فرایند تولید CLA.

متغیرهای مستقل	نماد	سطوح متغیر کد شده		
		۱-	۰	۱+
زمان واکنش (hr)	A	۷۲	۱۲۱	۱۷۰
درصد وزنی سلول شسته شده (% w/v)	B	۱۰	۱۵	۲۰
مقدار رشدمایه (mg/mL)	C	۱۰	۱۵	۲۰

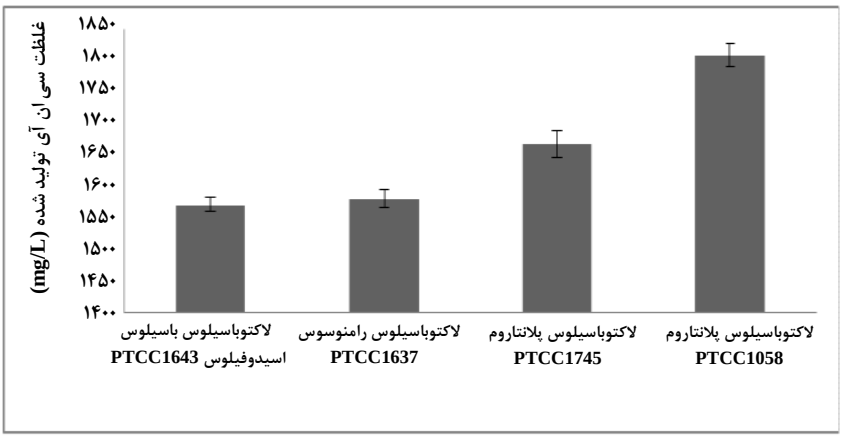
۳. نتایج و بحث

۳-۱ مقایسه توانایی تولید CLA توسط ۴ سوش از خانواده لاکتوباسیلوس‌ها

باکتریهای لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC1058، لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC1745، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC1643، لاکتوباسیلوس رامنوسوس PTCC1637 برای مقایسه میزان تولید CLA آزمایش شدند. با توجه به شکل (۱)، میزان تولیدCLA درشرایط (w/v)۱۵٪ سلول شسته شده، ۴/۶mg/mL روغن کرچک و زمان ۱۲۱ ساعت در حضور لیپاز و بافر فسفات (pH=۶/۵) توسط باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم *PTCC1058* به نحو چشمگیری بیشتر از ۳ سوش دیگر بود. بنابراین، لاکتوباسیلوس پلانتاروم *PTCC1058* انتخاب مناسبی برای تولید CLA است.

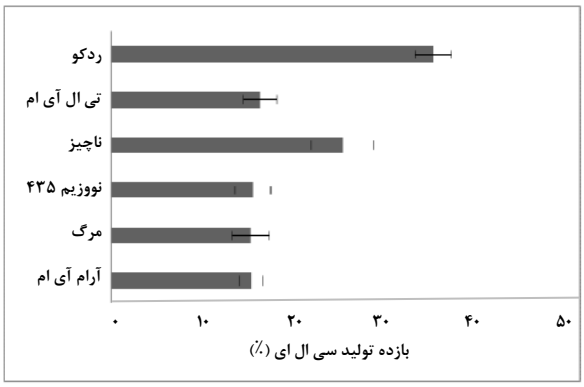
۳-۲ تأثیر نوع آنزیم، نوع شوینده و مکملهای محیط کشت بر بازده تولید CLA

تری آسیل گلیسرول رشدمایهٔ مناسبی برای تولید CLA توسط باکتری لاکتوباسیلوس نیست. بنابراین، ابتدا باید اسیدهای چرب مولکول تری آسیل گلیسرول توسط آنزیم لیپاز هیدرولیز و آزاد شوند. لاکتوباسیلوس پلانتروم می‌تواند از ریسینولئیک اسید آزاد به منظور تولید CLA بهره گیرد. بنابراین، تأثیر شش آنزیم لیپاز بر بازده تولید CLA بررسی شد که در شکل ((۲)- الف) مشاهده می‌شود. واکنش در شرایط (mg/ml) ۵ روغن کرچک و دمای ۳۷°C در مدت زمان ۱۷۰ ساعت انجام گرفت. بیشترین بازده تولید CLA در واکنش با آنزیم لیپاز رنکو (تهیه شده از شرکت کاله) به دست آمد.



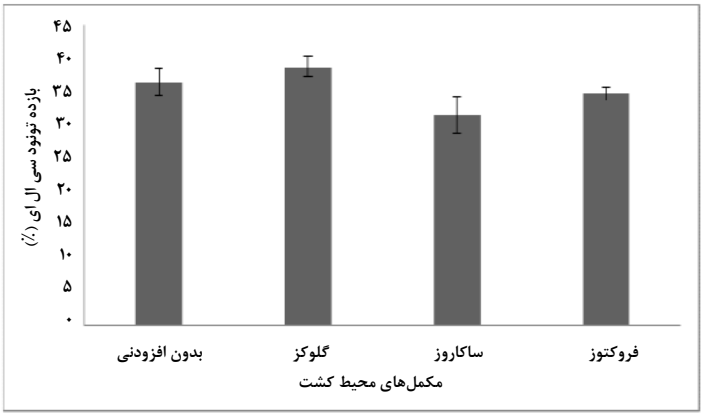
شکل ۱. مقایسه میزان تولید CLA توسط ۴ سوش باکتری (لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC1058، لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC1745، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC1643، لاکتوباسیلوس رامنوسوس PTCC1637). در شرایط واکنش: w/v % ۱۵ سلول شسته شده، ۴/۶ mg/mL روغن کرچک و زمان ۱۲۱ ساعت در حضور لیپاز و بافر فسفات pH=۶/۵.

1. Design Expert 8



(الف)

(ب)



(پ)

شکل ۲. تأثیر: (الف) نوع آنزیم لیپاز؛ (ب) نوع شوینده؛ (پ) کربوهیدراتها به عنوان مکمل محیط کشت، بر بازده تولید CLA.

با توجه به این که رشدمایهٔ مولکول تری گلیسرید است، باید رشدمایه، همراه با شویندهٔ عمل آوری شود، به طوری که در مخلوط واکنش به خوبی پراکنده و برای باکتری مهیا و تأمین شود. بنابراین، تأثیر سه نوع شویندهٔ مختلف بر بازده تولید CLA بررسی شد. که در شکل ((۲)- ب) مشاهده می‌شود که بیشترین بازده تولید با استفاده از توبین ۸۰ به دست آمده است. در انجام این واکنشها (%V/V) ۱گلیسرول و شویندهٔ مخلوط شد و واکنش در شرایط استاندارد یعنی با استفاده از (mg/mL) ۵ روغن کرچک و دمای ۳۷°C در مدت زمان ۱۷۰ ساعت انجام گرفت.

انواع کربوهیدرات‌ها، نمک‌ها و برخی فلزات از جمله مکمل‌های محیط کشت به‌شمار می‌آیند که در زمینه افزایش تولید CLA قابل بررسی‌اند. تأثیرات متفاوتی برای افزودن قندها به محیط کشت حاوی باکتری گزارش شده است. در این پژوهش تأثیر انواع کربوهیدراتها بر بازده تولید سی ال ای بررسی شد، که نتایج آن در شکل ((۲)- ج) مشاهده می‌شود. افزودن گلوکز برای تسریع در انجام فرایند زیست هیدروژن‌دارشدن تا حدی موجب افزایش بازده می‌شود. در پژوهش هایی که از سلولهای در حال رشد برای تولید CLA استفاده کردند، افزایش تولید CLA با افزودن گلوکز قابل توجه است؛ زیرا گلوکز به عنوان منبع کربنی ساده موجب رشد بیشتر سلولها و تولید بیشتر می‌شود. با توجه به این که در این پژوهش از سلولهای شسته شده (در حال استراحت) استفاده شده است، میزان افزایش بازده کمتر است. افزودن قندهای فروکتوز و ساکاروز موجب کاهش بازده تولید CLA شد. این کاهش برای ساکاروز بیشتر بود زیرا پس از انحلال شکسته شده و موجب افزایش میزان مولکولهای حل شده در محیط و در نتیجه کاهش همپارسازی می‌شود. نتایج مشابهی توسط کیم و همکاران مشاهده شده است[۱۴].

۳-۳ مدلسازی تبدیل زیستی روغن کرچک به CLA

برای مدلسازی میزان CLA در واکنش و به حداکثر رساندن آن، از روش پاسخ سطحی استفاده شد. این روش به ما امکان می‌دهد که با کمترین میزان آزمایش، تأثیر متغیرهای مختلف را در نتایج بررسی و بهینه‌سازی کنیم. همچنین، رابطهٔ بین تولید CLA را با متغیرهای مستقل شامل زمان واکنش (ساعت)، درصد وزنی سلول شسته شده (% w/v) و غلظت رشدمایه (mg/mL) به صورت یک معادله ریاضی به دست می‌آوریم.

با توجه به اینکه ریزاندامگانهای مختلف توانایی‌های متفاوتی از نقطه نظر استفاده از رشدمایهٔ موجود و یا تولید محصول مورد نظر دارند، بنابراین انتخاب میکروب مناسب برای هر واکنش زیست شیمیایی ضروری است. به این منظور باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC1058 با توجه به تولید بیشتر CLA انتخاب شد. همچنین، از میان انواع آنزیم و شوینده، آنزیم لیپاز رنکو و توبین ۸۰ به علت بازده تولید بیشتر به منظور انجام واکنشها به‌کار گرفته شوند.

نتایج تجربی به دست آمده بر اساس طرح مرکب مرکزی برای باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC1058 در جدول (۲) درج شده است.

آنالیز واریانس در جدول (۳) درج شده است که با توجه به آن می‌توان پارامترهای مؤثر و نامؤثر را از یکدیگر جدا کرد. میزان P-Value نشان دهنده میزان تأثیر هر پارامتر است. در صورتی که مقدار آن کمتر از ۰/۰۵ باشد، پارامتر مؤثر شناخته می‌شود. P-Value مدل کوچک است، که نشان می‌دهد مدل سنترال کامپوزیت مدل مناسبی در تعیین پارامترهای مورد نظر بوده است.

جدول ۲. آزمایشهای طراحی شده از روش سنترال کامپوزیت و نتایج حاصل برای باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC1058.

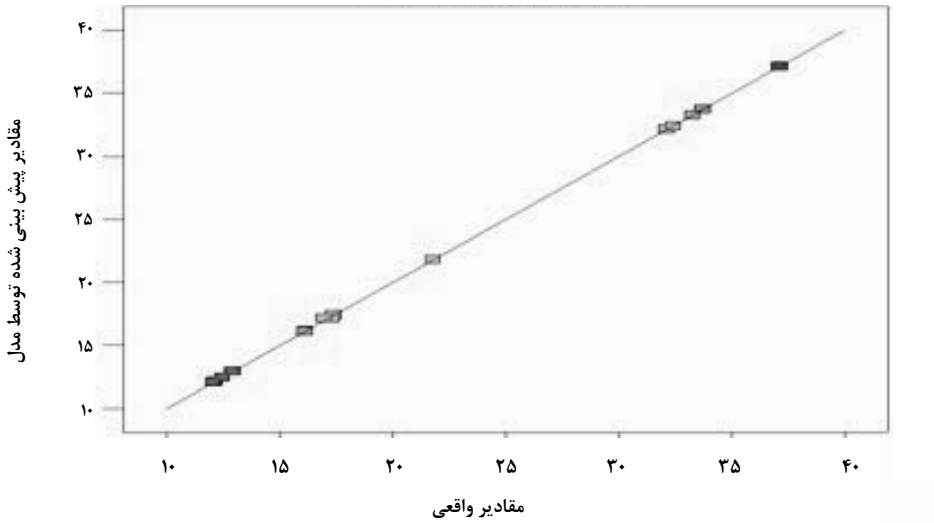
آزمایش	متغیر ۱ A زمان (ساعت)	متغیر ۲ B غلظت سلول (%w/v)	متغیر ۳ C غلظت روغن (mg/mL)	پاسخ ۱ غلظت تولید (mg/L)	پاسخ ۲ بازدهی تولید (٪)
۱	۷۲	۲۰	۵	۱۶۲۰/۵۸	۳۲/۴۱۱۵
۲	۱۲۱	۱۵	۱۵/۴	۱۸۵۵/۲۴	۱۲/۰۴۷
۳	۱۲۱	۱۵	۴/۶	۱۷۰۷/۲۶	۳۷/۱۱۴۴
۴	۱۲۱	۹/۶	۱۰	۱۶۱۲/۵۷	۱۶/۱۲۵۷
۵	۷۲	۱۰	۵	۱۶۰۶/۲۹	۳۲/۱۲۵۷
۶	۶۸/۰۸	۱۵	۱۰	۱۶۱۵/۱۹	۱۶/۱۵۱۹
۷	۷۲	۱۰	۱۵	۱۸۲۴/۲	۱۲/۱۶۱۳
۸	۱۲۱	۱۵	۱۰	۱۷۲۷/۴۴	۱۷/۲۷۴۴
۹	۱۲۱	۱۵	۱۰	۱۶۹۷/۴۴	۱۶/۹۷۴۴
۱۰	۱۷۰	۱۰	۱۵	۱۹۳۸/۱۱	۱۲/۹۲۰۷
۱۱	۷۲	۲۰	۱۵	۱۸۱۴/۲۲	۱۲/۰۹۴۸
۱۲	۱۷۳/۹۲	۱۵	۱۰	۲۱۷۷/۶	۲۱/۷۷۶
۱۳	۱۷۰	۲۰	۵	۱۶۶۳/۴۷	۳۳/۲۶۹۵
۱۴	۱۷۰	۲۰	۱۵	۱۸۷۲/۶۴	۱۲/۴۸۴۳
۱۵	۱۷۰	۱۰	۵	۱۶۸۵/۴۱	۳۳/۷۰۸۱
۱۶	۱۲۱	۲۰/۴	۱۰	۱۷۴۰/۲	۱۷/۴۰۲

جدول ۳. آنالیز واریانس در تعیین پارامترهای مؤثر و نامؤثر بازده تولید.

	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F-value	P-value	
مدل	۱۲۷/۰۹	۹	۱۴۱/۰۹	۳۹۱/۷۹	۰/۰۰۰۱<	معنی‌دار
زمانA-	۴/۹۴	۱	۴/۹۴	۱۳/۷۲	۰/۰۱۰۰	
غلظت سلولB-	۰/۲۰	۱	۰/۲۰	۰/۵۶	۰/۴۸۲۱	
غلظت روغنC-	۱۱۲۶/۸۰	۱	۱۱۲۶/۸۰	۳۱۲۸/۲۹	۰/۰۰۰۱<	
AB	۰/۰۱۱۷	۱	۰/۰۱۱۷	۰/۰۴۸	۰/۸۳۳۹	
AC	۰/۵۱	۱	۰/۵۱	۱/۴۱	۰/۲۸۰۳	
BC	۰/۱۴	۱	۰/۱۴	۰/۴۰	۰/۵۵۰۷	
A^2	۰/۰۰۵	۱	۰/۰۰۵	۰/۰۱۴	۰/۹۰۹۸	
B^2	۱/۰۷	۱	۱/۰۷	۲/۹۷	۰/۱۳۵۵	
C^2	۱۲۱/۱۶	۱	۱۲۱/۱۶	۳۳۶/۳۶	۰/۰۰۰۱<	
باقیمانده	۲/۱۶	۶	۰/۳۶			

هماهنگی داده‌های واقعی و مدل انتخاب شده در نرم‌افزار را در شکل (۳) مشاهده می‌کنید. مدل و داده‌های واقعی به صورت مطلوبی بر هم منطبق شده‌اند.

مقدار بهینه به دست آمده برای زمان واکنش، درصد وزنی سلول شسته شده و غلظت روغن توسط نرم افزار مشخص شد. بیشترین بازده تولید CLA در نقطه غلظت روغن ۴/۶mg/mL، درصد وزنی سلول شسته شده w/v ۱۵٪ و زمان ۱۲۱ ساعت به میزان ۳۷/۱۱٪ به دست آمد که این نقطه به عنوان نقطه بهینه انتخاب شد. همچنین، بیشترین غلظت CLA تولید شده در نقطه غلظت روغن ۱۰mg/mL، درصد وزنی سلول شسته شده w/v ۱۵٪ و زمان ۱۷۳/۹۲ ساعت به میزان ۲۱۷۷/۶ mg/L به دست آمد.



شکل ۳. نمودار همخوانی بین مقادیر آزمایشگاهی وپیش بینی شده توسط مدل.

رابطه بین متغیرهای مستقل و پاسخ به صورت زیر بـه دسـت آمـده است:

بازده تولید سی ال ای = ۱۷/۱۲+۲/۶۰* A +۰/۵۹* B -۱۱/۶۱* C -۰/۱۴* AB -۰/۱۶* AC -۰/۰۴۴* BC +۱/۵۸* A^2 -۰/۳۱*B^2 +۶/۳۹* C^2 +۰/۰۴۴* ABC -۰/۶۷* A^2B +۱/۳۷* A^2C -۲/۱۶* AB^2 -۲/۱۴*A^2B^2

غلظت سی ال ای تولید شـده = ۱۷۱۲/۴۴+۲۶۰/۳۸* A+۵۹/۰۹* B+۶۸/۵۱* C -۱۱/۴۶* AB +۶/۲۹* AC -۸/۴۸ * BC +۱۵۷/۷۱* A^2 -۳۰/۹۱* B^2 +۵۸/۹۹* C^2-۲/۴۱* ABC -۶۹/۴۸* A^2B +۴۰/۶۷* A^2C-۲۲۳/۵۸* AB^2-۱۴۵/۱۲* A^2B^2

در این معادله A، B و C مقادیر رمزگذاری شده متغیرهـای مسـتقل آزمون، به ترتیب، زمـان واکـنش (hr)، غلظـت سـلول شسـته شـده (% w/v) و غلظت روغن کرچک (mg/mL) است.

۴. نتیجه‌گیری کلی

در میـــان چهـــار ســـوش بـــاکتری بررســـی شـــده در ایـــن پـژوهش (لاکتوباسـیلوس پلانتـاروم PTCC1058، لاکتوباسـیلوس پلانتـاروم PTCC1745، لاکتوباسـیلوس اسـیدوفیلوس PTCC1643، لاکتوباسـیلوس رامنوسـوس PTCC1637) بـاکتری PTCC1058 و سپس PTCC1745 بیشترین توانایی تولید اسید لینولئیک مزدوج را دارند. با توجه به این که رشدمایه، مولکول تری گلیسرید است، باید رشدمایه، همراه با شوینده عمل آوری شود، به طوری که در مخلوط واکنش به خوبی پراکنده و برای باکتری مهیا باشد. بنـابراین، تـأثیر سه نوع شویندهٔ مختلف بر بازده تولید CLA بررسی شد و بیشـترین بازده تولید با استفاده از توبین۸۰ به دست آمده است. تـری آسـیل گلیسـرول رشـدمایهٔ مناسـبی بـرای تولیـد CLA توسـط بـاکتری لاکتوباسیلوس نیست. بنابراین، ابتدا باید اسـیدهای چـرب مولکـول تری آسیل گلیسـرول توسـط آنـزیم لیپـاز هیـدرولیز و آزاد شـوند. لاکتوباسیلوس پلانتروم می‌تواند از ریسینولئیک اسید آزاد به منظور تولید CLA استفاده کند. بنابراین، تأثیر شش آنزیم لیپـاز بـر بـازده تولید CLA بررسی شد که بیشترین بازده تولید CLA در واکنش بـا آنزیم لیپاز رنکو (تهیه شده از شرکت کاله) به دست آمد. به منظـور مدلسازی میزان CLA در واکنش و به حـداکثر رسـاندن آن از روش پاسخ سطحی استفاده شد. بیشترین بازده تولید CLA برای بـاکتری لاکتوباسـیلوس پلانتـاروم PTCC1058 در نقطـه غلظـت روغـن ۴/۶mg/mL، درصد وزنی سلول شسته شده ۱۵٪ w/v و زمـان ۱۲۱ ساعت به میـزان ۳۷/۱۱٪ بـه دسـت آمـد. بیشـترین غلظـت CLA تولید شده نیـز در نقطـه غلظـت روغـن ۱۰ mg/mL، درصـد وزنـی سلول شسـته شـده ۱۵٪ w/v و زمـان ۱۷۳/۹۲ سـاعت بـه میـزان ۲۱۷۷/۶ mg/L به دست آمد.

مراجع

[1] Adamczak, M., Bornscheuer, U. T., Bednarski, W., "Properties and biotechnological methods to produce lipids containing conjugated linoleic acid", European journal of lipid science and technology, 110(6): p. 491-504, (2008).

[2] Ando, A., Ogawa, J., Kishino, S., Shimizu, S., "Conjugated linoleic acid production from castor oil by Lactobacillus plantarum JCM 1551", Enzyme and microbial technology. 35(1): p. 40-45, (2004).

[3] Andrade, J. C., Ascencao, K., Gullon, P., "Production of conjugated linoleic acid by food-grade bacteria: A review", International Journal of Dairy Technology, 65(4): p. 467-481, (2012).

[4] Bailey, J. E., Ollis, D. F., "Biochemical engineering fundamentals", Chemical Engineering Education, (1976).

[5] Liu, P., Shen, S., Ruan, H., Zhou, Q., Ma, L., He, G., "Production of conjugated linoleic acids by Lactobacillus plantarum strains isolated from naturally fermented Chinese pickles", Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 12(11): p. 923-930, (2011).

[6] Kishino, S., Ogawa, J., Omura, Y., Matsumura, K., "Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria", Journal of the American Oil Chemists' Society, 79(2): p. 159-163, (2002).

[7] Hou, J., Liu, Y., Wang, Y., Xiao, Z., Liu, F., Yu, W., Wang, F., "Promoting the production of conjugated linoleic acid by optimizing the fermentation parameters of Lactobacillus sp", Milchwissenschaft, 66(4): p. 368-371, (2011).

[8] Gorissen, L., Raes, K., Weckx, S., Dannenberger, D., "Production of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid isomers by Bifidobacterium species", Applied microbiology and biotechnology, 87(6): p. 2257-2266, (2010).

[9] Ogawa, J., Matsumura, K., Kishino, S., "Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12-octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by Lactobacillus acidophilus", Applied and environmental microbiology, 67(3): p. 1246-1252, (2001).

[10] Zhao, H. W., Lv, J. P., Li, S. R., "Production of conjugated linoleic acid by whole-cell of Lactobacillus plantarum A6-1F", Biotechnology & Biotechnological Equipment, 25(1): p. 2266-2272, (2011).

[11] Bligh, E. G., Dyer, W. J., "A rapid method of total lipid extraction and purification", Canadian journal of biochemistry and physiology, 37(8): p. 911-917, (1959).

[12] Lin, T. Y., Lin, C. W., Lee, C. H., 'Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid', Food Chemistry, 67(1): p. 1-5, (1999).

[13] Yazdi, Z. K., Alemzadeh, I., "Improvement of palm oil and sunflower oil blends by enzymatic interestrification", International Journal of Food Science & Technology, 46(5): p. 1093-1099, (2011).

[14] Kim, Y., Liu, R., "Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria", Journal of Food Science, 67(5): p. 1731-1737, (2002).