بررسی امکان تولید اسید های آمینه از ضایعات خرما با به کارگیری دو سوش جهش یافته کرینه باکتریوم گلوتامیکوم CECT690 و CECT77

نفیسه دعوتی[۱]، زهره حمیدی اصفهانی[۲*] و سید عباس شجاع الساداتی[۳]

۱- دانش آموخته دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه علوم وصنایع غذایی،
۲- استادیار دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه علوم وصنایع غذایی،
۳- استاد دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده فنی و مهندسی، بخش شیمی، گروه بیوتکنولوژی

چکیده

با توجه به کاربرد فراوان اسید های آمینه از جمله اسید گلوتامیک در صنایع غذایی، شیمیایی، دارویی، بهداشتی و آرایشی از یک طرف و از طرف دیگرجهت رفع مشکل ضایعات خرما، تولید اسید آمینه از ضایعات خرما مورد بررسی قرار گرفت. از دو سوش جهش یافته *کرینه باکتریوم گلوتامیکوم* CECT690 و CECT77 برای بررسی امکان تولید اسیدهای آمینه استفاده شد. نتایج حاصل از اندازه گیری شیمیایی ضایعات خرما نشان داد که این ماده جهت رشد باکتری بسیار مفید می باشد. از آنجایی که ضایعات خرما یک محیط کشت پیچیده برای رشد باکتری محسوب می شود در این تحقیق عوامل موثر بر تولید اسید آمینه بر اساس طراحی غربالی (screen design) مشخص شد. که به وسیله این روش آماری میزان تاثیر هفت متغیر دردو سطح، بیشترین و کمترین مقدار بررسی شد. نتایج حاصل از اندازه گیری اسیدهای آمینه به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد که دو اسیدآمینه ترئونین و اسید گلوتامیک بیش از سایر اسیدهای آمینه در اثر تخمیر ضایعات خرما تولید شده اند.

تجزیه و تحلیل آماری (طراحی غربالی) نشان داد که میزان ضایعات خرما، زمان افزودن پنی سیلین، میزان فسفات و نوع ریزسازواره بیشترین تاثیر را بر روی تولید اسید گلوتامیک داشتند. در صورتیکه میزان بیوتین ، دما و منبع ازت کمترین اثر را در بین متغیرهای اصلی نشان دادند. در میان اثر متقابل متغیرها میزان خرما و زمان افزودن پنی سیلین بیشترین تاثیر را بر تولید اسیدگلوتامیک داشتند.

تجزیه و تحلیل آماری همچنین نشان داد که در بین متغیرهای اصلی زمان افزودن پنی سیلین، میزان خرما و نوع ریزسازواره به ترتیب بیشترین تاثیر را بر میزان تولید ترئونین داشته اند. نتایج حاصل از اندازه گیری اسیدهای آمینه به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد که علاوه بر ترئونین و اسید گلوتامیک سایر اسیدهای آمینه از جمله والین، آلانین، لیزین، پرولین، تیروزین، فنیل آلانین، لوسین و ایزولوسین نیز تولید شده اند.

کلیدواژگان: اسیدگلوتامیک، ضایعات خرما، *کرینه باکتریوم گلوتامیکوم*، اسیدهای آمینه، ترئونین.

۱-مقدمه

اسیدهای آمینه جزء مواد بسیار با ارزش و مفید در طبیعت هستند و کاربرد فراوانی در صنایع دارویی، شیمیایی ، غذایی، بهداشتی و آرایشی دارا می باشند. ارزش اقتصادی اسید های آمینه تولید شده بیش از ۳ بیلیون دلار در سال ۱۹۹۸ گزارش شده است و رشد سالانه این تجارت ۵-۱۰ درصد می باشد . امروزه در بخش صنایع غذایی بیش از ۱،۰۰۰،۰۰۰ تن

* مسئول مکاتبات: hamidy_z@modares.ac.ir

گلوتامات عمدتا به عنوان تشدید کننده طعم مصرف می شود. از کاربرد های دیگر اسیدهای آمینه در صنایع غذایی می توان به موارد زیر اشاره کرد:

ال-آسپارتات و ال-فنیل آلانین با تولید سالانه حدود ۱۰،۰۰۰تن (تولید شیرین کننده ها (آسپارتام))، گلایسین (اصلاح طعم ساخارین)، لیزین با تولید سالانه ٤٥٠،٠٠٠ تن (مکمل جیره غذایی دام، خوک و طیور)، دی-ال-متیونین با تولید سالانه ۳۵۰،۰۰۰ و ال-ترئونین با تولید۱۵،۰۰۰ تن در سال(رژیم غذایی دام).

از جمله مصارف دارویی اسید های آمینه می توان به کاربرد ال- تریپتوفان به عنوان محرک خواب، ال- فنیل آلانین (ضد افسردگی) و دیگر مصارف اسید های آمینه در بلوک های ساختمانی به منظور سنتز عوامل درمانی مختلف اشاره داشت [۱].

با توجه به مطالب گفته شده اسید گلوتامیک بیشترین حجم سنتزی را در بین سایر اسیدهای آمینه دارا می باشد. در بین کشورهای تولید کننده به ترتیب ژاپن۱۲۰، تایوان ۳۸، اروپا ۱۰ وآمریکا ٤ (سال/میلیون پوند) بیشترین تولید کننده اسید گلوتامیک در جهان می باشند [۲].

تحقیقات گسترده ای در زمینه بررسی اثر عوامل مختلف بر تولید اسید گلوتامیک در دنیا شده است که می توان به مطالعاتی که در زمینه اثر هوادهی بر تولید، اثر بیوتین بر تولید (عامل موثر بر نفوذپذیری غشایی)، جهش زایی باکتری جهت افزایش راندمان تولید، استخراج اسید گلوتامیک و غیره اشاره کرد [۸-۳].

از آنجاییکه ملاس نیشکر، ملاس چغندرقند و نشاسته تاپیوکا به عنوان مواد خام اصلی تولید اسید گلوتامیک محسوب می شوند[۹]، مطالعاتی نیز در زمینه جایگزینی سوبسترای تولید اسید گلوتامیک در دنیا شده است. از اقدامات انجام شده در دنیا در این زمینه می توان به تخمیر اسید گلوتامیک از ضایعات آبکافت شده پالم (نخل روغنی) و تخمیر اسید گلوتامیک از نشاسته آبکافت شده کاساوا اشاره کرد[۸-۷].

حدود نیمی از ساکنین نواحی جنوب کشور از راه تولید وتجارت محصول خرما امرار معاش می نمایند. کشور ایران یکی از تولید کنندگان عمده خرما در سطح جهان به شمار می رود بنابراین تاثیر محصول خرما در وضعیت اقتصادی کشور پر اهمیت می باشد. معاونت باغبانی وزارت جهاد کشاورزی کشور میزان تولید خرما را در سال ۱۳۸۲ حدود ۸۵۰ هزار تن پیش بینی نموده است که با توجه به مصرف حدود ۲۵۰ الی ۳۰۰ هزار تنی داخلی و صادرات حدود ۱۰۰ هزار تنی خرما حدود ۵۰۰ هزار تن از این محصول به هدر می رود و یا به مصرف خوراک دام می رسد [۱۰]. به منظور حل مشکل ضایعات خرما در کشور دراین تحقیق برای اولین بار در دنیا از ضایعات خرما به عنوان نوع جدیدی از سوبسترا جهت تولید اسیدهای آمینه استفاده گردید. هدف از این تحقیق امکان تولید تخمیری اسیدهای آمینه به وسیله این ضایعات بود که پس از آن با توجه به نتایج بدست آمده می توان شرایط را برای تولید یکی از اسیدهای آمینه که هم از نظر اقتصادی و هم از نظر میزان تولید شده به صرفه است، بهینه کرد.

تحقیقاتی در زمینه استفاده از خرما در تولید فراورده های تخمیری شده است که می توان به تولید اسید استیک، الکل، پروتئین تک یاخته ای و چربی از خرمای کامل و تولید پروتئین از هسته های خرما اشاره کرد [۱۲-۱۱].

ضایعات خرمای مورد استفاده در این تحقیق تفاله حاصل از پرس خرما در کارخانجات تولید کننده شربت خرما بود که به عنوان منبع کربنی برای تولید اسیدهای آمینه استفاده گردید. به منظور ارزیابی ارزش غذایی این ضایعات میزان ماده قندی و برخی از عناصر ضروری جهت رشد باکتری مورد تجزیه قرار گرفته شد. ضایعات کارخانه شامل ضایعات پالپی (گوشتی) و فیبری بود که به لحاظ پایین بودن میزان قند ضایعات فیبری از ضایعات پالپی در این تحقیق استفاده گردید.

از آنجاییکه خرما برای رشد باکتری کاملا ناشناخته است در این تحقیق به منظور نزدیک شدن به ترکیب مناسبی برای محیط کشت اصلی باکتری از طراحی غربالی استفاده گردید.

آزمونهای غربالی، آزمونهای کوچکی هستند که تعداد زیادی از متغیرها را در بر می گیرد. این آزمونها نقش مهمی در مراحل اولیه هر تحقیق ایفا می نمایند. هدف آنها تمرکز روی متغیرهای مهم و یافتن مؤثرترین متغیرها در تحقیق می باشد. از آنجایی که این آزمونها علیرغم کوچکی، تعداد زیادی از متغیرها را در بردارد، آنها اطلاعات زیادی (از جمله میزان معنی داری هر متغیر) در مورد هر متغیر نمی دهند. لذا این طراحی مقدمه ای برای طراحیهای بهینه سازی است. طراحی های بهینه سازی پس از

مشخص شدن متغیرهای مؤثرقادر است اطلاعات بیشتری در مورد هر کدام از آنهادر اختیار محقق قرار دهد.
معمولا طراحی های غربالی، طراحی های دو سطحی هستند که هر متغیر را در دو سطح بیشترین و کمترین مقدار انتخاب می کند.

یکی از انواع طراحی های دو سطحی طراحی فاکتوریل جزئی (fractional factorial) است که تنها قسمتی از طراحی فاکتوریل کامل استفاده می شود و باعث می شود که تعداد نمونه برداریها کاهش یابد و یکی از طراحی های ارائه شده برای هفت متغیر طراحی فاکتوریل جزئی یک هشتم (١/٨) است یعنی تعداد نمونه ها یک هشتم نمونه ها در فاکتوریل کامل می باشد. نام آزمون غربالی مورد استفاده در این تحقیق FF0716[1] یعنی ١٦ آزمون با ٧ متغیر بود که توسط آن اثر ٧ متغیر از جمله نوع باکتری، زمان افزودن پنی سیلین، نوع منبع ازت، دما، میزان بیوتین، خرما و فسفات بر تولید اسید آمینه در دو سطح بیشترین و کمترین مقدار بررسی گردید[١٣].

٢- مواد و روشها

باکتری های مورد استفاده در این تحقیق دو سوش جهش یافته *کرینه باکتریوم گلوتامیکوم* CECT690 و CECT77 بود که از کلکسیون میکروبی CECT اسپانیا خریداری گردید. در این تحقیق از ضایعات پالپی (تفاله حاصل از پرس) خرما که حاصل از کارخانه خرما بن جنوب (تولید کننده عسل خرما) واقع در بندر عباس بود استفاده شد.

٢-١-روشهای ارزیابی

عناصر ضروری برای رشد باکتری شامل سدیم، منیزیم، منگنز، پتاسیم و فسفر می باشد که مقادیر آن به شرح زیر در ضایعات خرما اندازه گیری شد. منیزیم و منگنز با دستگاه جذب اتمی، پتاسیم و سدیم توسط دستگاه فلیم فتومتری و فسفر به روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد[١٤]. قند خرما نیز به وسیله روش رنگ سنجی دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) اندازه گیری شد که جذب آن در این روش توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ٥٧٥ نانومتر اندازه گیری شد[١٥].

اندازه گیری کیفی اسید آمینه به روش کروماتوگرافی لایه نازک انجام شد. در این روش از صفحات سیلیکاژل G و از حلال آب/ فنل به نسبت حجمی/حجمی ٨٠/٢٠ استفاده شد [١٦].
اندازه گیری کمی اسیدهای آمینه به وسیله روش کروماتوگرافی مایع با فشار بالا و در مد فاز معکوس (HPLC) انجام شد. در این روش از مشتق سازی اسیدهای آمینه با ٦-آمینو کینولیل-ان-هیدروکسی سوکسینیمیدیل کاربامات[2] استفاده شد. شدت جریان فاز متحرک در ستون یک میلی لیتر در دقیقه، زمان رانش صد دقیقه، ستون مورد استفاده C18 و دمای ستون ٣٧ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. روش مورد استفاده گرادیانت[3] با سه حلال استونیتریل، بافر استات فسفات و آب با درجه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بود. از آشکارساز فلورسنس با طول موج تحریک ٢٥٠ نانومتر و طول موج نشر ٣٩٥ نانومتر استفاده گردید [٧].

٢-٢- تخمیر

فرایند تخمیر شامل دو مرحله پیش کشت و کشت اصلی می باشد. در مرحله پیش کشت هدف تکثیر باکتری و در مرحله کشت اصلی هدف تولید اسیدهای آمینه می باشد. قبل از انجام مرحله تخمیر باکتریهای خریداری شده به صورت خشک شده انجمادی بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند تا باکتری فعال حاصل گردد سپس برای فعال سازی باکتری ها هر چند وقت یکبار از محیط قبلی بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده می شد.

الف- تهیه وتلقیح محیط پیش کشت

مواد تشکیل دهنده محیط پیش کشت به صورت زیر می‌باشد:
گلوکز٥، عصاره مخمر٠/٥، سولفات منگنز٠/٠٠١، سولفات آهن٠/٠٠١، سولفات منیزیم٠/٢، فسفات دی هیدروژن پتاسیم٠/١، فسفات دی پتاسیم هیدروژن٠/١ برحسب گرم در ١٠٠ میلی لیتر و بیوتین ٢٠pg/l .
pH اولیه محیط کشت به وسیله سود و اسید کلریدریک بر روی ٧ تنظیم گردید. سپس حدود ١٠ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری فعال شده بر روی نوترینت آگار به محیط پیش کشت

1.Fractional factorial

2. 6- aminoquinolyl- N-hydroxysaccinimidyl carbomates
3.Gradiant

سترون شده اضافه گردید. سپس محیط پیش کشت تلقیح شده با شدت دور همزن ۱۵۰rpm به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری شد[۷].

ب- تهیه و تلقیح محیط کشت اصلی

در این مرحله از آزمایش ها، ۷ نوع متغیر در دو سطح (معمولاً کمترین و بیشترین مقادیر ممکنه) به منظور نزدیک شدن به شرایط بهینه رشد باکتری بر روی سوبسترای ضایعات خرما بررسی شد . آزمایش های طراحی شده بر اساس روش غربال (FF0716) در جدول ۱ (صفحه بعد)آورده شده است [۱۳].

از ریزسازواره های *کرینه باکتریوم گلوتامیکوم* CECT690 (A) و *کرینه باکتریوم گلوتامیکوم* CECT77 (B) استفاده شد.

در شرایط سترون ۱۰ میلی لیتر از محیط پیش کشت به محیط کشت های اصلی اضافه گردید و محیط کشتهای تلقیح شده در دو دمای ۳۰ °C و ۳۹ °C به مدت ٤٨ ساعت و شدت دور همزن۱۵۰ دور در دقیقه گرمخانه گذاری شدند و بر اساس طراحی انجام شده به یکسری از نمونهها بعد از ۸ ساعت از تلقیح و به یکسری دیگر بعد از ١٦ ساعت پنیسیلین جی به میزان ٤/٨ واحد در هر میلی لیتر محیط کشت با پیپت سترون اضافه گردید.

ج- استخراج اسیدهای آمینه از محیط کشت

به منظور استخراج اسیدهای آمینه پس از اتمام گرمخانهگذاری محتوای ارلن حاوی سوبسترای تخمیر شده تحت شرایط خلاء ۱۵ PSI و به وسیله کاغذ واتمن شماره ۱ و قیف بوخنر صاف شد و سپس با سرعت ۰۰۰،٦ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت محتوای صاف شده تا زمان اندازه گیری اسیدهای آمینه تولید شده در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد [۷].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج حاصل از اندازه گیری شیمیایی و دستگاهی

میزان عناصر موجود در ضایعات خرما در جدول ۲ آورده شده است. میزان قند موجود در ضایعات خرما ۵۰ درصد بر اساس وزن مرطوب اندازهگیری شد. بنابراین ضایعات خرما میتواند منبع کربنی خوبی جهت تخمیر اسیدهای آمینه باشد.

جدول۲ میزان عناصراندازه گیری شده در ۱۰۰ گرم ضایعات خرما

نوع عنصر	میزان عنصر (نمونه g/۱۰۰ g)
منیزیم	۰/۰۵
منگنز	۰/۷
پتاسیم	۰/۵
سدیم	۰
فسفر	۰/۲۳۲

در اندازهگیری کیفی اسیدهای آمینه به وسیله روش کروماتوگرافی لایه نازک عدم حضور اسید های آمینه در نمونه خرمای تخمیر نشده و تشخیص اسید های آمینه در نمونه خرمای غنیسازی شده و تخمیر شده به وسیله باکتری *کرینه باکتریوم گلوتامیکوم* تاکید بر این دارد که ضایعات خرما به تنهایی فاقد اسیدهای آمینه است و جهت تخمیرآن نیاز به غنی سازی دارد. کروماتوگرام مربوط به استاندارد اسیدهای آمینه اندازه گیری شده به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از اندازه گیری اسیدهای آمینه به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا حاکی از آن بود که میزان اسیدگلوتامیک و ترئونین تولیدشده نسبت به سایر اسیدهای آمینه تولید شده بیشتر است. به همین دلیل در این مقاله تنها به بحث روی نتایج مربوط به این دو اسیدآمینه می پردازیم. میزان اسید گلوتامیک و ترئونین اندازه گیری شده به روش HPLC مربوط به نمونههای مجهول مورد طراحی در این تحقیق در جدول ۳ آورده شده است.

علاوه بر اسید گلوتامیک و ترئونین سایر اسیدهای آمینه نظیر والین، آلانین، لیزین، پرولین، تیروزین، لوسین، ایزولوسین و فنیل آلانین نیز تولید می شود (شکل۲).

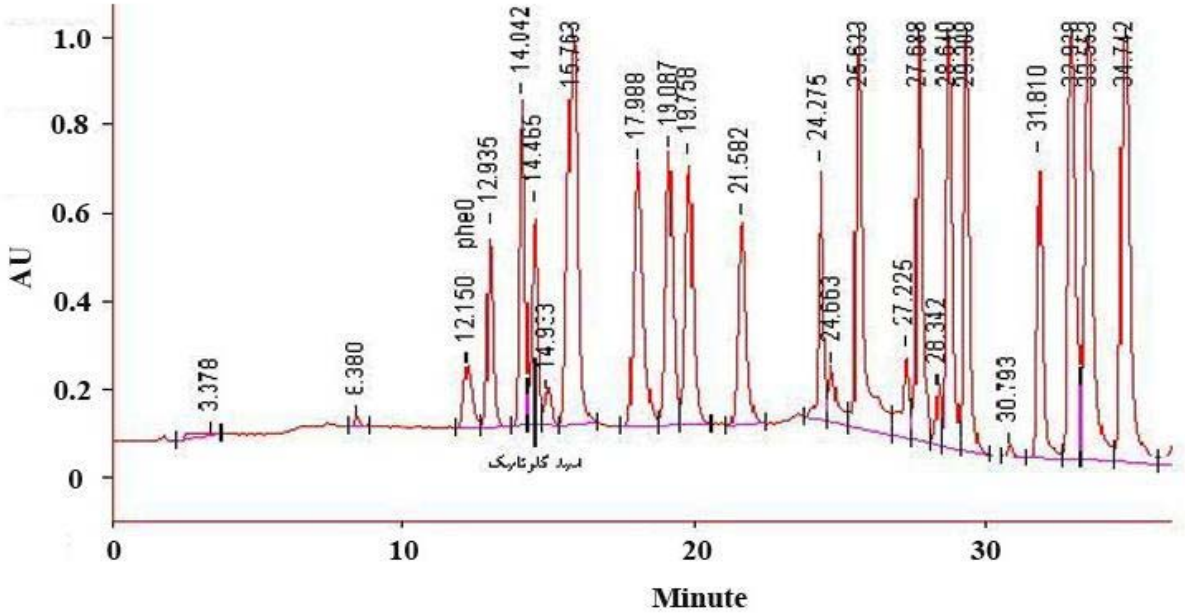
با توجه به جدول۳ بیشترین میزان ترئونین واسید گلوتامیک تولیدی مربوط به نمونه ۱ می باشد (شکل۳) و این نشان دهنده این است که شرایط این آزمون برای تولید مطلوب می باشد همچنین با توجه به این جدول نتیجه گیری می شود که ترئونین بیشتر از اسید گلوتامیک تولید می شود.

جدول١ آزمایش های طراحی شده بر اساس آزمون غربال (FF0716)

شماره آزمایش	نوع ریزسازواره	دمای کشت(°C)	نوع منبع ازت	میزان فسفات (g/100ml)	زمان افزودن پنی‌سیلین(h)	میزان بیوتین (µg/l)	میزان خرما (g/100ml)
١	A	٣٠	اوره	٠	٨	٠	١٠
٢	A	٣٠	اوره	٠/٢	١٦	١٠٠	٢٥
٣	A	٣٠	مخمر	٠	٨	١٠٠	١٠
٤	A	٣٠	مخمر	٠/٢	٨	٠	٢٥
٥	A	٣٩	اوره	٠	١٦	٠	٢٥
٦	A	٣٩	اوره	٠/٢	٨	١٠٠	١٠
٧	A	٣٩	مخمر	٠	٨	١٠٠	٢٥
٨	A	٣٩	مخمر	٠/٢	١٦	٠	١٠
٩	B	٣٠	اوره	٠	٨	١٠٠	٢٥
١٠	B	٣٠	اوره	٠/٢	١٦	٠	١٠
١١	B	٣٠	مخمر	٠	١٦	٠	٢٥
١٢	B	٣٠	مخمر	٠/٢	٨	١٠٠	١٠
١٣	B	٣٩	اوره	٠	١٦	١٠٠	١٠
١٤	B	٣٩	اوره	٠/٢	٨	٠	٢٥
١٥	B	٣٩	مخمر	٠	٨	٠	١٠
١٦	B	٣٩	مخمر	٠/٢	١٦	١٠٠	٢٥

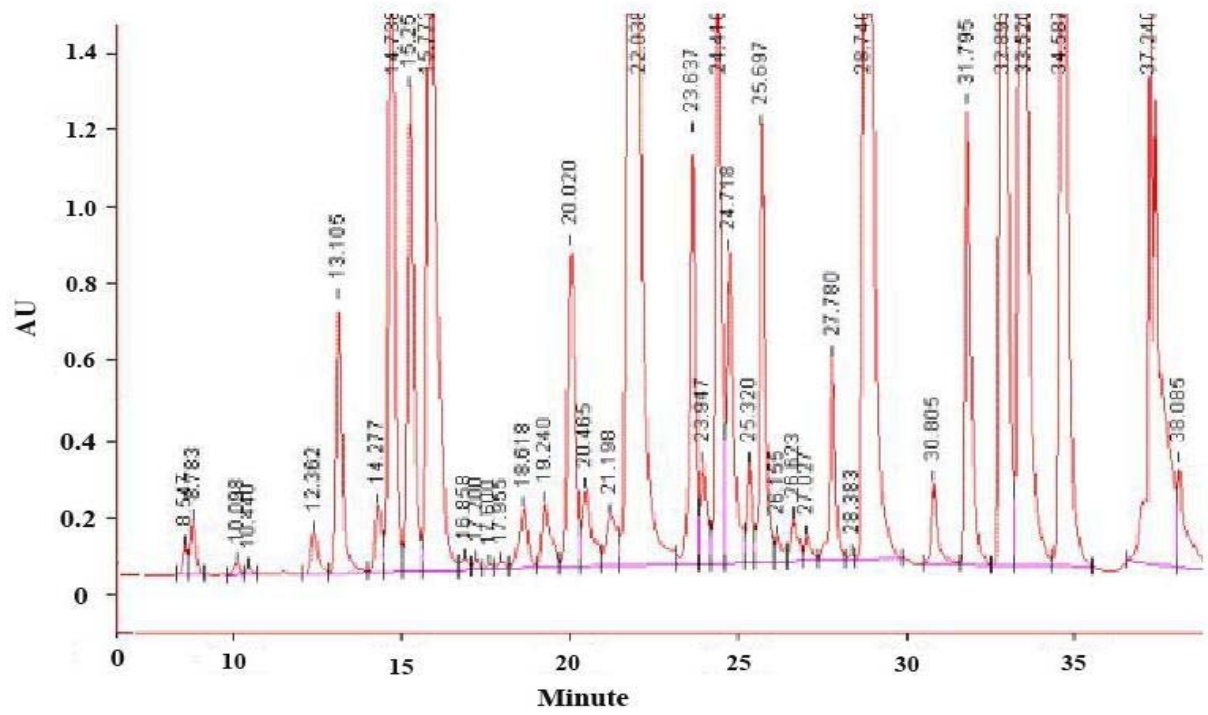
جدول٣ میزان اسید گلوتامیک و ترئونین تولید شده در آزمون های طراحی شده به روش غربالی

شماره آزمایش	نوع ریز سازواره	دمای کشت (C°)	نوع منبع ازت	فسفات (g/100ml) (	زمان افزایش پنی‌سیلین(h)	بیوتین(µg/l)	خرما (g/100ml)	میزان اسید گلوتامیک (g/l)	میزان اسید ترئونین (g/l)
١	A	٣٠	اوره	٠	٨	٠	١٠	١/٥	١/٦٨
٢	A	٣٠	اوره	٠/٢	١٦	١٠٠	٢٥	٠	٠
٣	A	٣٠	مخمر	٠	١٦	١٠٠	١٠	٠/٢٨	٠
٤	A	٣٠	مخمر	٠/٢	٨	٠	٢٥	٠	٠/١٢
٥	A	٣٩	اوره	٠	١٦	٠	٢٥	٠/٣٧	٠/٢٦٨
٦	A	٣٩	اوره	٠/٢	٨	١٠٠	١٠	٠/٣٥	٠/٦٢٦
٧	A	٣٩	مخمر	٠	٨	١٠٠	٢٥	٠/٤	٠/٣٥
٨	A	٣٩	مخمر	٠/٢	١٦	٠	١٠	٠/٥	٠/٦
٩	B	٣٠	اوره	٠	٨	١٠٠	٢٥	٠/٣٢	٠/٢٣
١٠	B	٣٠	اوره	٠/٢	١٦	٠	١٠	٠	٠
١١	B	٣٠	مخمر	٠	١٦	٠	٢٥	٠/٢٢	٠/٠٦
١٢	B	٣٠	مخمر	٠/٢	٨	١٠٠	١٠	٠/٦١	٠/٩
١٣	B	٣٩	اوره	٠	١٦	١٠٠	١٠	٠	٠
١٤	B	٣٩	اوره	٠/٢	٨	٠	٢٥	٠/٠٤	٠/٦١
١٥	B	٣٩	مخمر	٠	٨	٠	١٠	٠/٣٩	٠/٠٥٨
١٦	B	٣٩	مخمر	٠/٢	١٦	١٠٠	٢٥	٠	٠

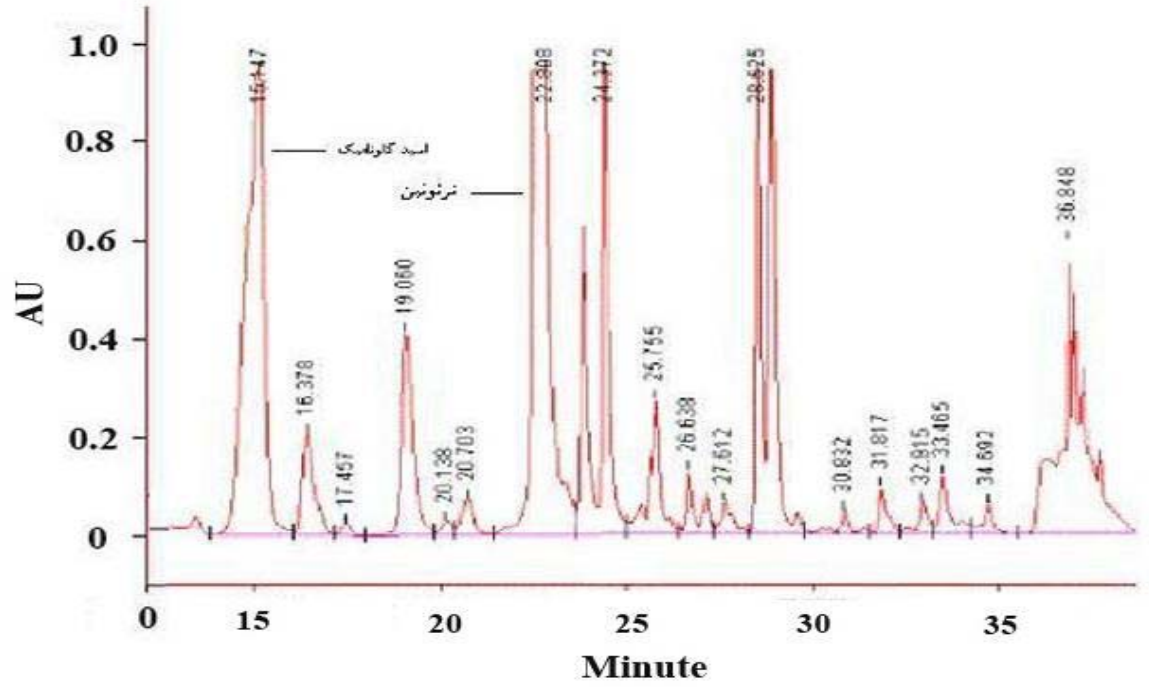


شکل۱ کروماتوگرام مخلوط استاندارد داخلی و خارجی اسیدهای آمینه

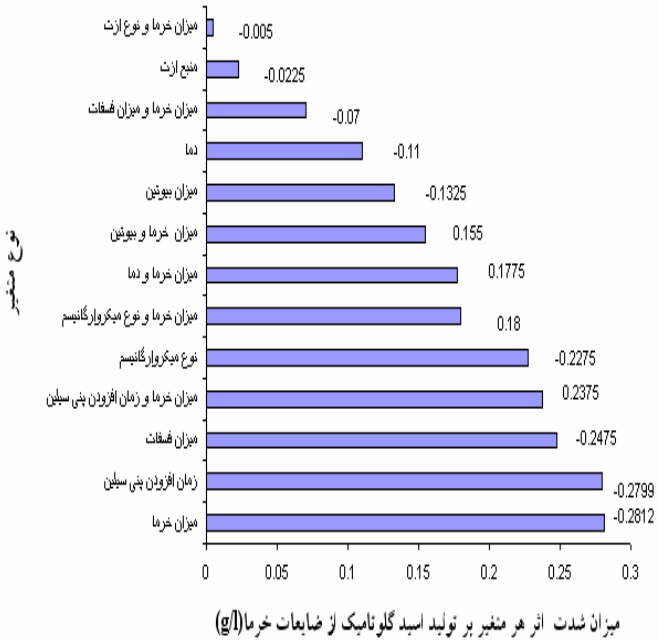
دقایق خروجی اسیدهای آمینه استاندارد: اسید آسپارتیک:۱۲/۹۳۵، سرین:۱٤، اسید گلوتامیک:۱٤/٤٦٥، گلایسین:۱۵/۷٦۳، هیستیدین:۱۷/۹۸۸، آمونیاک:۱۹، آرژنین۱۹/۷۵۸،ترئونین:۲۱/۵۸۲، پرولین:۲٤/۲۷۵، آلانین:۲٤/٦٦۳،آلفا–آمینوبوتریک اسید:۲۵/٦۳۳، سیستئین:۲۷/۲۲۵، تیروزین:۲۷/٦۸۸،والین:۲۸/٦٤۰، متیونین:۲۹/۳۰۸، لیزین:۳۱/۸۱۰، ایزولئوسین:۳۲/۹۲۸، لئوسین:۳۳/۵۵۳، فنیل آلانین:۳٤/۷٤۲.

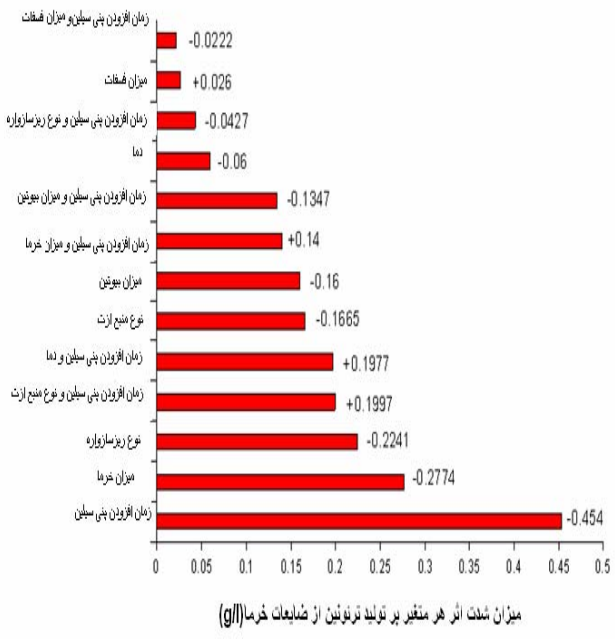


شکل۲ کروماتوگرام تولید سایراسید های آمینه از ضایعات خرما



شکل٣ کروماتوگرام اسیدهای آمینه حاصل از تخمیر درآزمون١





شکل٤ میزان اثر متغیرها بر تولید اسید گلوتامیک از ضایعات خرما **شکل٥** میزان اثر متغیرها بر تولید ترئونین از ضایعات خرما

همانطور که قبلا هم اشاره شد علاوه بر اسید گلوتامیک سایر اسیدهای آمینه نیز تولید می شود (شکل۲) که می توان به تولید ۲/۷ گرمی اسید آمینه آلانین و ۰/۸۸ گرمی اسید آمینه والین به ترتیب در آزمون های شماره ۲ و ١٤ اشاره کرد.

۳-۲- نتایج حاصل از ارزیابی آماری

به منظور ارزیابی آماری آزمایشات از کد ۱- برای کمترین سطح و از کد ۱+ برای بیشترین سطح هر متغیر استفاده گردید و متغیر هایی که نوع را مشخص می کردند نظیر نوع ریزسازواره و منبع ازت اختصاص کد به صورت زیر صورت گرفت:

بطوریکه برای *کرینه باکتریوم گلوتامیکوم* CECT690 کد ۱- ، *کرینه باکتریوم گلوتامیکوم* CECT77 کد۱+ و برای اوره کد ۱- ، عصاره مخمر کد ۱+ در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل این متغیرها برای تولید اسید گلوتامیک و ترئونین به ترتیب در شکل٤ و۵ نشان داده شده است.

همانطور که در شکل ٤ مشاهده می شود به ترتیب میزان ضایعات خرما، زمان افزودن پنی سیلین، میزان فسفات و نوع ریزسازواره بیشترین اثر را بر تولید اسید گلوتامیک داشته است و منبع ازت دارای کمترین اثر بر تولید می باشد. علامت منفی در کنار هر میله نشان دهنده موثر بودن کد منفی (سطح پایینی هر متغیر) نسبت به کد مثبت (سطح بالایی هر متغیر) می باشد.

چون میزان سوبسترا بیشترین اثر را بر تولید اسید گلوتامیک داشته است تنها اثر متقابل این متغیر با سایر متغیرها نشان داده شده است که با توجه به شکل ٤ اثر متقابل میزان خرما و زمان افزودن پنی سیلین بر میزان تولید اسید گلوتامیک دارای بیشترین اثر در بین سایر متغیرها می باشد.

با توجه به شکل ۵ زمان افزودن پنی سیلین بیشترین اثر را بر تولید ترئونین داشته است و در بین متغیرهای اصلی میزان فسفات کمترین اثر را بر تولید ترئونین داشته است. از آنجاییکه زمان افزودن پنی سیلین بیشترین تاثیر را بر تولید ترئونین داشته است در این تحقیق تنها اثر متقابل این متغیر با سایر متغیرهانشان داده شده است که با توجه به شکل ۵ اثر متقابل زمان افزودن پنی سیلین و منبع ازت در بین سایر اثرات متقابل بیشترین تاثیر را بر تولید ترئونین داشته است. علامت میله ها نشان می دهد که تنها در مورد متغیر فسفات سطح بالایی متغیر دارای اثر مطلوب بر تولید ترئونین می باشد و برای سایر متغیرها مانند شکل ٤ (تولید اسید گلوتامیک) سطح پایینی متغیر برای تولید ترئونین مطلوب می باشد.

بنابراین با توجه به نتایج شکل ٤ و۵ می توان گفت میزان ضایعات خرمای ۱۰ گرم نسبت به ۲۵ گرم مطلوب تر می باشد، بهترین زمان افزودن پنی سیلین ۸ ساعت بعد از تلقیح می باشد و باکتری *کرینه باکتریوم گلوتامیکوم*CECT690 نسبت به *کرینه باکتریوم گلوتامیکوم* CECT77 توانایی بیشتری در زمینه تولید اسید آمینه دارد.

علت بهتر بودن میزان ضایعات ۱۰ گرم به۲۵ گرم را می توان به اثر بازدارندگی غلظت بالای سوبسترا(قند) بر رشد باکتری و تولید نسبت داد. زمانی در سال ۱۳۷۷ در تحقیقی که پیرامون اثر هوادهی بر تولید اسید گلوتامیک داشته بود به این نکته اشاره کرده است او همچنین در تحقیق خود به بهتر بودن زمان افزودن پنی سیلین در اوایل فازلگاریتمی باکتری اشاره کرده است [۳] با توجه به نتایج این تحقیق زمان افزودن پنی سیلین بعد از۸ ساعت از تلقیح بهتر از ١٦ ساعت می باشدکه می توان چنین نتیجه گرفت که اوایل فاز لگاریتمی ۸ ساعت بعد از تلقیح می باشد.

٤- نتیجه گیری

با توجه به نتایج این تحقیق امکان تولید میکروبی اسیدهای آمینه به خصوص اسید گلوتامیک و ترئونین از ضایعات خرما وجود دارد. البته با توجه به میزان تولید پایین اسید آمینه ترئونین نسبت به اسید گلوتامیک در دنیا و اهمیت بیشتر اسید گلوتامیک در صنعت [۱] باید به بهینه سازی بیشتر شرایط جهت افزایش تولید اسید گلوتامیک نسبت به اسید آمینه ترئونین و سایر اسیدهای آمینه پرداخت.

می توان با شناخت متغیرهای موثرتر بر تولید در این تحقیق به منظور رسیدن به شرایط بهینه رشد و تولید، از نتایج حاصل در مطالعات بعدی استفاده کرد.

البته سایر اسید های آمینه تولیدی نظیرلیزین، فنیل آلانین و آلانین نیز در صنعت مطلوب می باشند که با توجه به تولید این اسیدهای آمینه در این تحقیق می توان مطالعاتی را نیز جهت افزایش تولید یکی از این اسیدهای آمینه انجام داد. از جمله

عواملی که در افزایش تولید بسیار موثر می باشد هوادهی می باشد که بهتر است در مطالعات بعدی بررسی شود.

با توجه به شرایط محدودکننده تولید در ارلن نظیر تولید مواد مضر و کاهش pH که یکی از عوامل مهم در کاهش تولید می باشد ضرورت انجام این تحقیق در فرمانتور در مرحله بهینه سازی عوامل آشکار می شود. در زمینه مقایسه این تحقیق با سایر تحقیقات انجام شده در دنیا می توان به مطالعات انجام شده در زمینه استفاده از سایر منابع کربنی دیگر از جمله تولید اسید گلوتامیک از نشاسته آبکافت شده کاساوا [٨] و همچنین تولید این ماده از ضایعات آبکافت شده پالم (نخل روغنی) [٧] اشاره کرد. با توجه به اینکه نتایج گزارش شده در دو مطالعه اشاره شده حاصل تولید در فرمانتور می باشد و از طرف دیگر در این تحقیق که به صورت آزمایشگاهی در ارلن انجام شده است هدف فقط بررسی امکان تولید اسیدهای آمینه از ضایعات خرما بوده است بنابراین جهت مقایسه نتایج آن با سایر مطالعات انجام شده در دنیا در زمینه استفاده از سوبستراهای مختلف انجام این تحقیق در فرمانتور ضروری می باشد.

٥-منابع

[1] Burkovski, A and Kramer, R. 2002. Mini-Review, Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. Applied Microbiology and Biotechnology. 58: 256-274

[٢]امتیازی، گ; (١٣٧٨)، میکروبیولوژی کاربردی و مهندسی ژنتیک، انتشارات دانشگاه اصفهان، چاپ اول، صفحه٨٥-١٠٠.

[٣] زمانی، ج ; (١٣٧٧)، مطالعه ارتباط بین هوادهی و تولید اسید گلوتامیک در باکتری *کرینه باکتریوم گلوتامیکوم*، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه شریف.

[4] Calik, G., Unlutabak, F. and H. Ozdamar, T. 2001. Product and by-product distributions in glutamic acid fermentation by *Brevibacterium flavum*: Effects of the oxygen transfer. Biochemical Engineering Journal. 9: 91-101.

[5] Nampoothiri. K,M. and Pandey, A., 1998. Membrane permeability and glutamate excretion by Brevibacterium sp. Journal of Scientific and Industrial Research. 57: 640-643.

[6] Hirasawa, T., Wachi, M. and Nagai, K. 2001. L-glutamate production by lysozyme-sensitive *Corynebacterium glutamicum* ITSA mutant strains. BMC Biotechnology, 1: 9.

[7] Das, K., Anis, M., Mohd, M. and Ismail, N. 1995. Fermentation and recovery of glutamic acid from palm waste hydrolysate by ion-exchange resin column. Biotechnology and Bioengineering, 48: 551-555.

[8] Nampoothiri, K.M., and Pandey, A., 1999. Fermentation and recovery of L-glutamic acid from cassava starch hydrolysate by ion exchange resin column. Revista de Microbiologya. 30 :258-264.

[9] Moo-Young, M., Alant, B. and Dalton, H. 1985. Comprehensive Biotechnology University of Waterloo, Ontario, Canada,Vol. 3, pp: 593-600.

[١٠] فائز، م و حمیدی ،ز; (١٣٨٤)، حفظ کیفیت خرما در مقابل عوامل بیولوژیکی و فیزیکوشیمیایی، پانزدهمین کنگره صنایع غذایی، دانشگاه شهید بهشتی، انستیتو تغذیه ایران.

[١١] ایرانمنش، م ; (١٣٧٩)، خرما (مقدمه‌ای بر کاربرد تکنولوژی نگهداری، فرآوری، بسته‌بندی و صادرات)، مجموعه آثار علمی تحقیقاتی، سازمان چاپ کتابخانه ملی ایران المهدی (عج)، چاپ اول، صفحه ٣٤-٤٢، ١٧٢و٢٠٧-٢١٦.

[12] Ogaidi, A., Kalifa, S. and Al-Nakash, S. 1985. Production of protein from date stones by Aspergillus oryza (carabic). Journal of Agriculture and Water Resources Research, 4 (3).

[13] Halaland, D. D. 1989. Experimental Design in Biotechnology. Becton Dickinson and Company Research Center, Research Triangle Park, North Carolina, Marcel Dekker, pp: 20-27.

[١٤] امامی، ع ; (١٣٧٥)، روش‌های تجزیه گیاه، وزارت کشاورزی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات خاک وآب، جلد اول، شماره ٩٨٢.

[15] Wang, N.S. 1999. Glucose assay by dinitrosalicylic colorimetric method. Department of Chemical Engineering University of Maryland College Park, Available in: www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab4a.htm.

[16] Stahl, E. 1969. Thin-Layer Chromatography. Institute pur Organishe Chemie. Heidelberg. New York, printed in Singapore., vol. 1, pp: 734- 748.