مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
زمستان 1390، دوره سوم، شماره یازدهم، صفحه54 -47

بکار گیری روش تا گوچی به منظور بهینه سازی تولید پروتئین تک یاخته (SCP) در فرمانتور آزمایشگاهی

پروانه جعفری[1]، قدرت ا.. محمدزمانی[2]، فرزانه الماسیان[2]، مریم تاج آبادی ابراهیمی[3]

1. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
2. گروه شیمی پژوهشکده مهندسی جهاد
3. گروه سلولی ملکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی

نویسنده مسوول: دکتر پروانه جعفری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، p-jafari@iau-arak.ac.ir

دریافت: 90/10/23 پذیرش: 91/12/15

چکیده

زمینه و هدف: پروتئین تک یاخته واژه‌ای است که برای اولین بار در دهه **1960** برای تعریف زیست توده میکروبی تولیدی در فرایندهای تخمیری استفاده شد. به نظر می‌رسد تولید پروتئین تک یاخته راه حلی برای غلبه بر مشکل جهانی کمبود پروتئین باشد.تولید این نوع محصولات بر پایه تبدیل زیستی سوبستراهای ارزان قیمت و غالباً ضایعات، به مواد با ارزش غذایی می‌باشد. هدف از این تحقیق تعیین عوامل موثر بر تولید **SCP** در کشت غوطه‌ور با استفاده از متانول به عنوان تنها منبع کربن بود.

روش بررسی: در این تحقیق از طراحی تاگوچی برای بهینه سازی تولید پروتئین تک یاخته **(SCP)** توسط باکتری متیلوباکتریوم سویه **69** بهره برده شد. برای این منظور **4** عامل موثر شامل غلظت متانول آغازین، دور همزن، نرخ هوادهی و **pH** در **3** سطح و آرایه متعامد **L9**در نظر گرفته و بهینه شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بهینه تولید با این سویه متیلوتروف در کشت غوطه ور در غلظت متانول **18 g/L**، هوادهی **3 vvm**، دور همزن **800 rpm** و **pH** اولیه **8** حاصل می‌شود. تحت شرایط بهینه حداکثر غلظت بیومس تولیدی برابر **16 g/L** و حدوداً **2** برابر غلظت حاصله در کشت بسته ارلن آزمایشگاهی بود. پروتئین تام و واقعی محصول به ترتیب بالغ بر **74** و **62%** اندازه گیری شد.

نتیجه گیری: درصد پروتیئن، میزان زیست توده و الگوی اسید آمینه نشان داد که محصول حاصله از این باکتری به لحاظ اسیدهای آمینه ضروری غنی بوده و می‌تواند برای غنی سازی پروتئینی مکمل‌های غذایی حیوانات به کار گرفته شود. اما آزمون‌های میدانی بیشتری ضروری است تا ارزش غذایی این محصول را تعیین نماید.

واژه‌های کلیدی: روش تاگوچی، بهینه سازی، پروتئین تک یاخته، فرمانتور

www.SID.ir

مقدمه

تولید غذا همواره به صورت تصاعد حسابی رو به افزایش است در حالی که این افزایش در جمعیت حیوانی از نرخ تصاعد هندسی پیروی می‌کند. تحقیقات صورت گرفته توسط سازمان غذا و کشاورزی (FAO) در مورد جمعیت انسانی و منابع پروتئینی در دسترس نیز همین الگو را نشان می‌دهد(1-3). کمیابی غذاهای غنی از پروتئین و وجود میلیون‌ها انسان فقیر سبب شده تا دانشمندان به دنبال دیگر منابع پروتئینی ارزان قیمت جایگزین منابع سنتی همانند سویا و پودر ماهی باشند(4-6). از این رو توجه روزافزونی به میکروب‌ها به عنوان یک منابع غذایی غنی از پروتئین می‌گردد که پروتئین تک یاخته نیز نامیده می‌شود. اگرچه ممکن است استفاده از میکروب‌ها به عنوان غذا برای انسان و حیوان زیاد قابل پذیرش نباشد اما به نظر می‌رسد که در آینده‌ای نه چندان دور، این محصولات برای حل مشکل غذا به میزان زیاد به کار گرفته شوند(7-9). امروزه تولید پروتئین‌های تک یاخته توسط جنس‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها صورت می‌گیرد. از جمله این میکروارگانیسم‌ها می‌توان به جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها اشاره کرد. میکروارگانیسم‌ها به واسطه رشد سریع و درصد بالای پروتئین، می‌توانند منابع غذایی مناسب با قیمت ارزان باشند(10-13). در زمینه تولید پروتئین تک یاخته، علاوه بر سویه مناسب میکروارگانیسم، انتخاب سوبسترای ارزان قیمت و فراوان نیز اهمیت به سزایی دارد. ترکیبات کربنی ارزان قیمت متعددی همچون ضایعات صنایع مختلف می‌توانند به عنوان سوبسترا برای رشد میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار گیرند(5 ,14-16). متانول به واسطه درجه خلوص بالا، انحلال مناسب در آب، قیمت نسبتاً پایین و دسترسی فراوان، از جمله سوبستراهای مناسب برای تولید پروتئین تک یاخته می‌باشد(17, 18). از این رو در این تحقیق سعی گردید تا تولید پروتئین تک یاخته با باکتری متیلوتروف بومی در فرمانتور آزمایشگاهی L 1 بهینه گردد. در ایران از پودر ماهی به منظور تکمیل سازی خوراک دام و به عنوان یک منبع غنی از پروتئین استفاده می‌کنند که بیشتر وارداتی است. متاسفانه به واسطه شرایط نامناسب نگهداری پورد ماهی وارداتی دارای آلودگی‌های شدید قارچی بوده که می‌توانند به شدت سرطان‌زا باشند. از اینرو جایگزین کردن این پودر با محصولی با ارزش افزوده دیگر یا همان پروتئین تک یاخته می‌تواند به لحاظ اقتصادی بسیار مقرون به صرف باشد. هدف نهایی این تحقیق نیز دستیابی به دانش فنی تولید پروتئین تک یاخته در مقیاس نیمه صنعتی است.

روش بررسی

کشت سویه باکتریایی متیلوتروف: سویه متیلوتروف کاربردی در این تحقیق، سویه 69 جدا شده توسط جعفری و همکارانش در پژوهشکده مهندسی جهاد بود. این سویه متلق به جنس متیلوباکتریوم بوده و متیلوتروف اختیاری صورتی رنگ می‌باشد. برای تهیه پیش کشت، باکتری لیوفیلیزه در محیط حداقل معدنی متانول (MSB) کشت داده و سپس در محیط جامد (MSA) از خالص بودن سویه اطمینان حاصل شد.

بهینه سازی رشد در فرمانتور آزمایشگاهی: برای بهینه سازی رشد باکتریاز فرمانتور گوچی با حجم کاری L 1، مجهز به سیستم کنترل دما، دور همزن و نرخ هوادهی بهره برده شد. پس از استریل نمودن محیط MSB موجود در فرمانتور، متانول استریل شده با فیلتر µm 0/2 به آن افزوده و سپس پیش کشت وارد فرمانتور (حجم نهایی برابر lit 1)گردید. در تمامی آزمون‌ها پیش کشت با جذب نوری ثابت (0/8) در طول موج nm 620 به محیط کشت افزوده شد. نتایج حاصله از رشد این سویه در ارلن آزمایشگاهی نشان داده بود که میزان هوادهی، دور همزن، غلظت متانول، درصد تلیقح و pH از جمله مهمترین عوامل موثر بر رشد این سویه می‌باشد از این رو رشد سویه مذکور در دامنه‌ای از هر عامل موثر ارزیابی گردید (جدول 1). برای این منظور فرمانتور در شرایط مورد نظر راه‌اندازی و در فواصل زمانی معین نمونه‌گیری از فرمانتور صورت گرفت و جذب نوری نمونه تعیین شد.بدین ترتیب سینتیک رشد باکتری در شرایط مختلف ترسیم گشت.

بهینه سازی رشد در فرمانتور lit 1 با روش تاگوچی: در آزمون‌های قبل، تاثیر عوامل موثر در رشد مورد بررسی قرار گرفت و برای هر عامل دامنه‌ای تعیین شد که رشد باکتری حداکثر باشد. برای بهینه سازی، غلظت آغازین متانول، دور همزن، هوادهی و pH به عنوان عوامل اصلی موثر در رشد در نظر گرفته شد و میزان رشد سویه در 3 سطح مختلف از این عوامل

www.SID.ir
Archive of SID

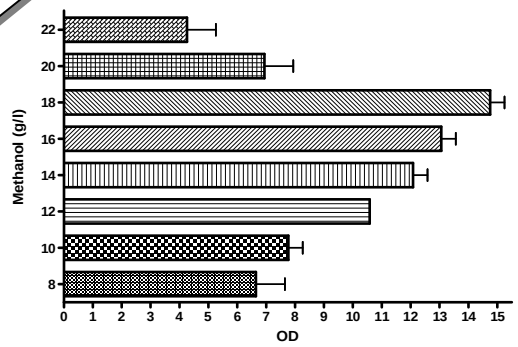
سنجیده گردید (جدول 2)(19-21). سیستم نرم افزاری Qualitek-4 و آرایه متعامد L9 برای بهینه سازی تولید با روش تاگوچی به کار گرفت شد که آزمون‌های طراحی شده در جدول 3 آورده شده است. در تمامی آزمون‌ها حجم تلقیح و دما ثابت به ترتیب برابر 20% و 30°Cدر نظر گرفته شد. فرمانتور در شرایط ذکر شده برای هر آزمون راه‌اندازی و در فواصل زمانی معین نمونه‌گیری از آن صورت گرفت. سپس جذب نوری و pHهر نمونه تعیین و در نهایت سینتیک رشد باکتری در هر آزمون ترسیم شد. در نهایت نتایج حاصله از 9 آزمون فوق با سیستم نرم افزاریQualitek-4 تجزیه و تحلیل و شرایط بهینه رشدی مشخص شد. فرمانتور در شرایط مذکور راه‌اندازی و سینتیک رشد باکتری در این شرایط نیز تعیین گشت.

درصد پروتئین و الگوی اسید آمینه محصول: برای اندازه‌گیری میزان پروتئین موجود در محصول، ابتدا 4 عنصر اصلی کربن، ازت، هیدروژن و اکسیژن موجود در محصول با دستگاه CHNO (CHN-O- rapide-Heraeus) آزمایشگاه استاندارد پژوهشکده صنعت نفت تعیین شد. میزان پروتئین خام به صورت زیر تعیین گردید (22, 23). پروتئین خام %= مقدار ازت×6/25×100

برای تعیین میزان پروتئین واقعی موجود در محصول از معرف بیوره استفاده شد. نمونه‌های مورد آزمایش پس از اختلاط با معرف بیوره به مدت نیم ساعت در دمای 25 °C گرماگذای گردیدند. مس موجود در معرف با پروتئین‌ها کمپلکس رنگی ایجاد می‌کند که در طول موج برابر 540 nm قابل سنجش می‌باشد(24, 25). الگوی اسید آمینه محصول توسط شرکت Deggusa و با استفاده از آنالیز HPLC در آلمان تعیین گشت. در این آنالیز علاوه بر انواع اسیدهای آمینه موجود، درصد وزن خشک و پروتئین خام موجود نیز تعیین گردید.

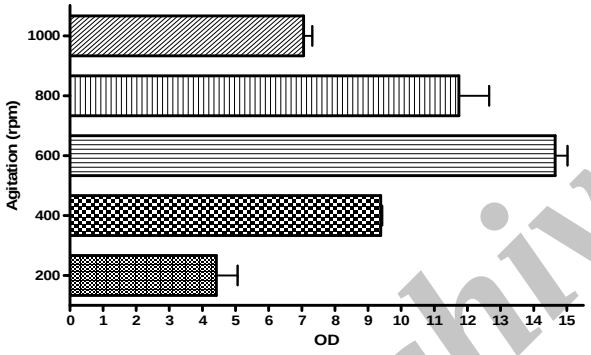
یافته ها

میزان رشد در فرمانتور: نمودارهای1 تا 4 نشان دهنده میزان رشد باکتری در شرایط مختلف می‌باشند. همان طور که شکل 1 دیده می‌شود غلظت متانول در دامنه 12 تا 18 g/l برای رشد مناسب بوده و در غلظت‌های بالاتر و کمتر از آن به ترتیب اثر ممانعت کنندگی و محدود کنندگی متانول بر رشد اعمال می‌شود.



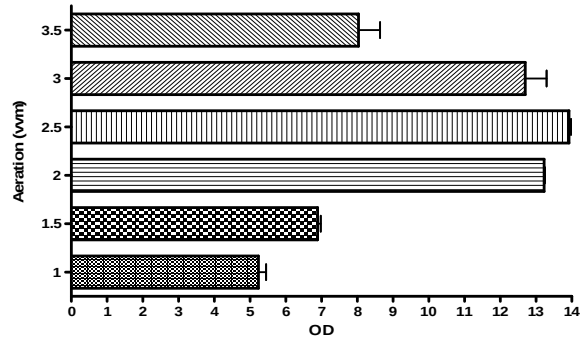
شکل 1. رشد سویه 69 در مقادیر مختلف متانول در فرمانتور lit 1

نتایج نشان داد که رشد باکتری در دامنه همزدن بین 400 تا 800 rpm مناسبو در600 rpm رشد حداکثر بود(شکل 2). رشد باکتری در دورهای همزدن 200 و 1000 rpm مناسب نبود و کاهش قابل ملاحظه‌ای داشت. از سوی دیگر فاز تاخیری در این شرایط بسیار طولانی بود و تا حدود 14 h به طول می‌انجامید که این امر خود می‌تواند دلیلی برای کاهش تولید باشد.



شکل 2. رشد سویه 69 در دورهای مختلف همزن در فرمانتور lit 1

در محدوده هوادهی 2-3 vvm، رشد باکتری تقریباً مشابه و در حد بهینه قرار داشت (شکل 3). در مقادیر هوادهی خارج از دامنه مذکور، کاهش رشد باکتری به وضوح قابل تشخیص بود.

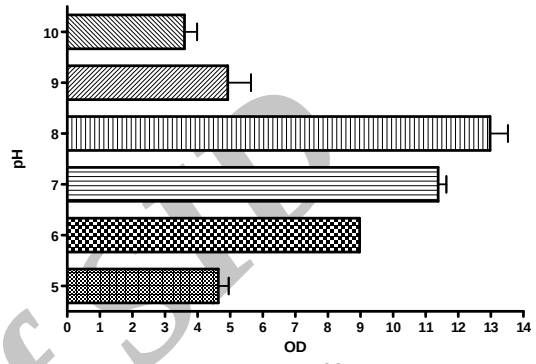


شکل3.رشد سویه 69 در نرخ مختلف هوادهی در فرمانتور lit 1

Archive of SID

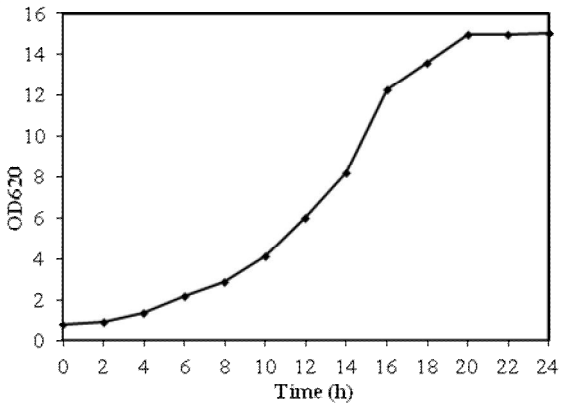
www.SID.ir

بررسی تاثیر pHهای مختلف بر رشد باکتری نشان داد که این باکتری نوتروفیل بوده و در pHهای خنثی بیشترین رشد را دارد. با انحراف از این محدوده، یعنی با اسیدی و قلیایی شدن محیط، رشد باکتری به شدت کاهش یافت. از سوی دیگر نتایج حاصله از این آزمون‌ها نشان داد که رشد سویه با 20% تلقیح اولیه در حالت بهینه قرار داد.



شکل 4. رشد سویه 69 در pH مختلف در فرمانتور lit 1

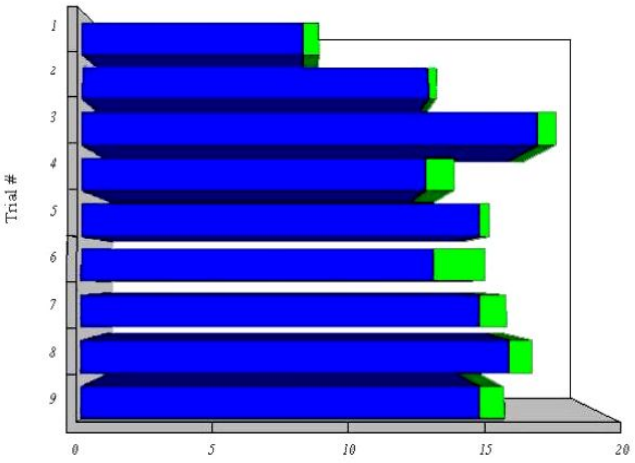
سینتیک رشد در فرمانتور در شرایط بهینه: شکل 5 نشان دهنده سینتیک رشد باکتری در شرایط بهنیه یعنی دور همزدن 600 rpm، هوادهی 2/5 vvm، 18 g/l متانول، pH برابر 8 و 20% پیش کشت می‌باشد.



شکل5. سینتیک رشدی باکتری در فرمانتور lit 1

همان طور که در شکل 5 نیز ملاحظه می‌شود در شرایط بهینه فاز تاخیری و لگاریتمی به ترتیب تا ساعت 6 و 20 ادامه یافته و در این شرایط حداکثر جذب نوری حاصله برابر 14 معادل g/l 12 بیومس خشک باکتری بود.

بهینه سازی رشد در فرمانتور با روش تاگوچی: در جدول 4 نتایج مربوط به 9 آزمایش تاگوچی با 3 بار تکرار و میانگین نتایج حاصله نمایش داده شده است. در شکل 6 میانگین 3 تکرار هر آزمایش با میزان خطای هر آزمایش نمایش داده شده است. در این سری از آزمون‌ها سعی شد با یکسان سازی شرایط، تکرار پذیری افزایش یابد و از خطا به میزان قابل توجهی کاسته شود.



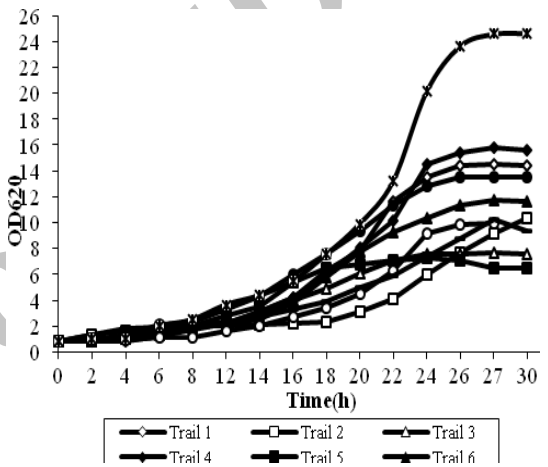
شکل 6. میانگین نتایج حاصله از هر آزمایش تاگوچی

نتایج نشان داد که میزان P-Value برای عوامل موثر در رشد متفاوت بوده و بیشترین میزان P به هوادهی تعلق دارد. به عبارت دیگر هوادهی اصلی‌ترین عامل موثر بر تولید پروتئین تک یاخته در دامنه عوامل به کار گرفته می‌باشد (جدول 5). عوامل موثر بعدی به ترتیب اهمیت عبارتند بودند از: دور همزن، pH اولیه محیط کشت و متانول. از این آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که متانول در غلظت به کار گرفته شده در آزمایش کمترین تاثیر را بر تولید دارد. لازم به ذکر است که P-Value کمتر از 5% در این آزمایش‌ها قابل قبول نیست و می‌تواند بیان‌گر اختلاف تصادفی ناشی از تغییر در شرایط آزمایش باشد و نمی‌توان آن را به تاثیر عامل موثر مورد آزمایش نسبت داد. در آزمایش فوق تمامی مقادیر P-Value بیش از 5% و قابل قبول بودند. پس از اتمام آزمایش‌ها و بررسی نتایج با نرم‌افزار شرایط بهینه جدیدی پیشنهاد شد که عبارت بود از g/L 18 متانول، نرخ هوادهی vvm 3، دور همزدن rpm 800 و pH برابر 8. میانگین جذب نوری در

Archive of SID

www.SID.ir

9 آزمون قبل برابر 14/409 بود ولی با به کارگیری سطوح جدید پیشنهادی می‌توان جذب نوری برابر 20/18 را انتظار داشت. در عمل پس از راه‌اندازی فرمانتور در شرایط پیشنهادی، میزان جذب نوری برابر با 22/49 بود. به لحاظ آماری تا 15% اختلاف بین نتیجه مورد انتظار و نتیجه حاصله از آزمون، قابل قبول می‌باشد و اختلاف بیش از 15% نشان دهنده خطا در آزمایش و روند طراحی آن است. در این آزمون میزان اختلاف بین دو نتیجه برابر 12/36% بود بنابراین نتیجه حاصله قابل پذیرش و استناد می‌باشد.در شکل 9 سینتیک رشد در 10 آزمون فوق با یکدیگر مقایسه گردیده است.



شکل 9. مقایسه سینتیک رشد سویه 69 در 10 آزمایش صورت گرفته برای بهینه سازی با روش تاگوچی

درصد پروتئین و الگوی اسید آمینه محصول تولیدی: آزمون‌ها نشان داد که محصول تولیدی دارای 74/75% پروتئین خام و62% پروتئین واقعی می‌باشد. در جدول 6 نیز الگوی اسید آمینه موجود در محصول نمایش داده شده است. این بررسینیز نشان داد که محصول تولیدی دارای 72/34 پروتئین خام می‌باشد که نتیجه حاصله از آنالیز CHNO را تایید می‌نماید.

بحث

تولید پروتئین تک یاخته راه حل‌های پیشنهادی برای جبران کمبود مواد غذایی پروتئینی مورد نیاز دام و انسان است. برای تولید این محصول، اولین قدم دستیابی به سویه‌ای سریع‌الرشد با درصد پروتئین بالا و الگوی مناسب اسید آمینه می‌باشد. در بین میکروارگانیسم‌ها، باکتری‌ها سرعت رشد بیشتر و در نتیجه میزان پروتئین بالاتری دارند. در ایران نیز عدم دسترسی به منابع پروتئین به خصوص در زمینه دام‌پروی معضلی رو به رشد است. از این رو در طرح ملی تصویب شده در پژوهشکده مهندسی جهاد مبادرت به تولید نیمه صنعتی پروتئین تک یاخته بر پایه سوبسترای متانول گردید. برای این منظور ابتدا سویه‌های متیلوتروف از منابع مختلف جدا و پس از بهینه سازی رشد در ارلن، رشد آن‌ها در فرمانتور آزمایشگاهی با روش تاگوچی بهینه گردید. نتایج نشان داد که نرخ هوادهی، دور همزن، pH و غلظت متانول از مهمترین عوامل کنترل کننده رشد باکتری متیلوتروف به کار گرفته می‌باشند.اکسیژن در دسترسمهمترین عامل کنترل کننده میزان رشد این باکتری به شدت هوازی بود که برای متابولیسم فعال نیاز بالایی به اکسیژن دارد. کاهش دسترسی به اکسیژن سبب می‌شد که باکتری توانایی اکسیداسیون سریع و کامل متانول را نداشته و در این شرایط اکسیداسیون ناقص متانول منجر به تولید متابولیت‌های سمی می‌گردید که کاهش رشد را در پی داشت. در فرمانتورها دو عامل دور همزن و نرخ هوادهی تعیین کننده میزان اکسیژن در دسترس می‌باشند. نتایج نشان داد که نرخ رشد باکتری همگام با افزایش نرخ هوادهی افزایش می‌یافت. البته لازم به ذکر است که با افزایش هوادهی بیش از 3 vvm، با ایجاد شرایط اکسیدی در محیط کشت، تولید به نحو چشمگیری کاهش می‌یافت. آزمون‌های صورت گرفته نشان داد که در دورهای پایین همزن، اختلاط و هوادهی به خوبی صورت نگرفته و از این رو رشد به شدت کاهش پیدا می‌نمود. در دورهای همزن بیش از 1000 rpm نیز کاهش قابل ملاحظه‌ای در رشد باکتری دیده می‌شد که احتمالاً ناشی از استرس بالای وارده به باکتری بود. به نظر می‌رسد با استفاده از دورهای همزن متغیر در فازهای مختلف یک دوره تخمیری، می‌توان رشد و تکثیر باکتری را بهبود بخشید. یعنی کشت باکتری‌ها را با دور پایین همزن شروع کرد و با ورود باکتری‌ها به فاز لگاریتمی دور همزن را بالا برد تا علاوه بر کاهش مدت زمان فاز تاخیری، حداکثر رشد را نیز در دورهای بالای همزن بدست آورد. غلظت آغازین متانول از عوامل موثر دیگر در رشد باکتری‌های متیلوتروف می‌باشد که می‌تواند محدود کننده (در غلظت‌های کم) یا ممانعت کننده رشد (در غلظت‌های بالا) باشد. از این رو فراهم آوردن غلظت‌های مناسب متانول می‌تواند میزان رشد را به حداکثر برساند.

Archive of SID

www.SID.ir

pH از دیگر عوامل موثر در رشد باکتری به کار گرفته بود. نتایج حاصله نشان داد که رشد باکتری در محدوده pH خنثی تا کمی قلیایی مناسب‌تر می‌باشد. تعیین سینتیک pH نشان داد که در طی تخمیر pH محیط کشت به دلیل تولید متابولیت‌های اسیدی به تدریج کاهش می‌یابد. از این رو میزان رشد باکتری به کار گرفته در pH کمی قلیایی بهینه بود زیرا در این شرایط حتی پس از تولید متابولیت‌های اسیدی، pH محیط چندان اسیدی نشده و در حد خنثی باقی می‌ماند. از این رو به نظر می‌رسد که در صورت کنترل pH در طی دوره تخمیری تولید پروتئین تک یاخته با این باکتری، می‌توان محصول بیشتری را انتظار داشت. پس از بهینه سازی میزان رشد در فرمانتور L 1 با روش تاگوچی، حداکثر جذب نوری حاصله بالغ بر 23 و معادل 16g/L بود که در مقایسه با نتیجه حاصله در ارلن آزمایشگاهی یعنی 8 g/L افزایش قابل توجه‌ای داشت.این نتیجه قابل قیاس با نتایج حاصله از تحقیق سایر محققان می‌باشد. فرشاد زمانی در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی شهرکرد در کشت بسته به حداکثری تولیدی معادل5/19g/L دست یافته است. در مصر نیز در سال 1990 تولید پروتئین تک یاخته توسط مخمر پی‌شیاو سوبسترای متانول توسط Rashad و همکارانش صورت گرفت. حداکثر محصول تولیدی آنان معادل g/L 3/6 با 52/2% پروتئین خام، 36% پروتئین واقعی و 14/2% اسید نوکلئیک بود(26). در حال حاضر تنها شرکتی که به تولید تجاری پروتئین تک یاخته از سوبسترای تک یاخته مبادرت می‌ورزد شرکت دانمارکی نورفرم است که تولید تجاری خود را از سال 1998 آغاز نموده است. محصول تولیدی آن‌ها با نام بیوپروتئین دارای تاییدیه اتحادیه اروپا و با کشت متیلوکوکوس‌کپسولاتوس بر روی متان حاصل می‌شود. برای تولید بیوپروتئین از فرمانتور پیوسته و لوپ به ارتفاع m 90 بهره برده می‌شود. راندمان تولید آن‌ها برابر 3-2% بر پایه وزن خشک و محصول تولیدی حاوی 60 تا 80% پروتئین خام است (27-29). با مقایسه نتایج حاصله می‌توان بیان داشت که کسب این مقدار بیومس خشک از سویه متیلوتروف در کشت بسته بسیار جالب توجه می‌باشد. در تمام گزارش‌های داخلی و خارجی ارائه شده تا کنونی چنین راندمان تولیدی در کشت بسته گزارش نشده است. از سوی دیگر آنالیز محصول تولیدی نمایش‌گر تناسب الگوی اسید آمینه و پروتئین خام موجود در محصول بود. تحقیقات نشان داد که این محصول با محصول پرونین تولیدی توسط شرکت نورفرم و پودر ماهی قابل قیاس است(جدول 7)(29, 30).

نتیجه‌گیری

همان طور که دیده می‌شود ارزش غذایی محصول تولیدی توسط سویه 69 به لحاظ ترکیب اسید آمینه قابل قیاس با دو محصول فوق می‌باشد که بیان‌گر ارزش غذایی محصول تولیدی است.از این رو می‌توان انتظار داشت که استفاده از این محصول به عنوان جایگزین پودر ماهی در خوراک دام مورد توجه قرار گیرد. البته نکته شایان ذکر است که در این ارتباط باید به انجام آزمون‌های میدانی توجه ویژه داشت. آزمایش‌های چندی لازم است تا تاثیر استفاده از این محصول بر روی موجود مصرف کننده تعیین شود. تنها پس از اثبات عدم بیماری‌زایی و اثرات نامناسب است که می‌توان این محصول را در جیره غذایی دام جایگزین نمود.

References:

1. Chae S, Hwang E, Shin H. *Single cell protein production of< i> Euglena gracilis</i> and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor*. Bioresource technology. 2006;97(2):322-9.
2. Nigam J. *Cultivation of Candida langeronii in sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate for the production of single cell protein.* World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2000;16(4):367-72.
3. Gefen O, Gabay C, Mumcuoglu M, Engel G, Balaban NQ. *Single-cell protein induction dynamics reveals a period of vulnerability to antibiotics in persister bacteria.* Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008;105(16):6145.
4. Steinkraus KH. *Industrialization of indigenous fermented foods*: CRC; 2004.
5. Daramwal N, GAUR R. *Single Cell Protein.* Environmental microbiology and biotechnology. 2004:218.
6. Krishna C, Moo-Young M, Pandey A. *Single-cell protein.* Concise encyclopedia of bioresource technology. 2004:293-304.
7. Ravindra P. *Value-added food: Single cell protein.* Biotechnology advances. 2000;18(6.٧٩-۴۵٩:(
8. Taylor J, Lucas E, Gable D, Graber G. *Evaluation of single cell protein for non-ruminants.* Single Cell Protein Academic Press, New York. 1974:179-86.
9. Ghaly A, Kamal M, Correia L. *Kinetic modelling of continuous submerged fermentation of cheese whey for single cell protein production.* Bioresource technology. 2005;96(10):1143-52.

www.SID.ir
Archive of SID

10. Wong P, Chan K. *Algal single cell protein production from sewage effluent with high salinity*. Cellular and Molecular Life Sciences. 1980;36(9):1065-6.
11. AJELLOL, MUKERJI K. *Handbook of applied mycology*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1993;35(4):314.-
12. Singh A, Abidi A, Agrawal A, Darmwal N. S*ingle cell protein production by Aspergillus niger and its evaluation*. Zentralblatt für Mikrobiologie. 1991;146(3):181.
13. Shipman R, Kao I, Fan L. *Single-cell protein production by photosynthetic bacteria cultivation in agricultural by-products*. Biotechnology and Bioengineering. 1975;17(11):1561-70.
14. Paraskevopoulou A, Athanasiadis I, Kanellaki M, Bekatorou A, Blekas G, Kiosseoglou V. *Functional properties of single cell protein produced by kefir microflora*. Food research international. 2003;36(5):431-8.
15. Gao L, Chi Z, Sheng J, Ni X, Wang L. *Single-cell protein production from Jerusalemartichoke extract by a recently isolated marine yeast Cryptococcus aureus G7a and its nutritive analysis*. Applied microbiology and biotechnology. 2007;77(4):825-32.
16. Rajoka MI, Khan SH, Jabbar M, Awan M, Hashmi A. *Kinetics of batch single cell proteinproduction from rice polishings with< i> Candida utilis</i> in continuously aerated tank reactors*. Bioresource technology. 2006;97(15):1934-41.
17. Wegner GH. *Emerging applications of the methylotrophic yeasts*. FEMS Microbiology Letters. 1990;87(3-4):279.-283.
18. Tanaka M, Matsuno R. C*onversion of lignocellulosic materials to single-cell protein (SCP): recent developments and problems*. Enzyme and microbial technology. 1985;7(5):197-206.
19. Yazdian F, Hajizadeh S, Shojaosadati SA, Khalilzadeh R, JahanshahiM, Nosrati M. *Production of single cell protein from natural gas: Parameter optimization and RNA evaluation*. Iranian J Biotech. 2005;3:235.
20. Taguchi G, Cariapa V. *Taguchi on robust technology development. Journal of pressure vessel technology*. 1993;11(5):336.
21. Taguchi G, Konishi S. *Taguchi methods*. Research and development. 1994;1.
22. Davies S, Wareham H. *A preliminary evaluation of an industrial single cell protein in practical diets for tilapia (Oreochromis mossambicus Peters)*. Aquaculture. 1988;7. 4(1):189-99.
23. Litchfield JH. *Single-cell proteins*. Science. 1983;219(4585):740.
24. Ohnishi ST, Barr JK. *A simplified method of quantitating protein using the biuret and phenol reagents*. Analytical biochemistry. 1978;86(1):193-200.
25. Hiller A, Greif RL, Beckman WW. *Determination of protein in urine by the biuret method*. J Biol Chem. 1948;176(3):1421-9.
26. Jwanny EW, Rashad MM. *Metabolism of methanol by yeast and SCP production*. Journal of basic microbiology. 1985;25(10):645-51.
27. Johannessen A ,Kleppe G, Larsen J, Moen E. *Method of extracting proteins from a cell*. Google Patents; 2006.
28. Bothe H, Møller Jensen K, Mergel A, Larsen J, Jørgensen C, Jørgensen L. *Heterotrophic bacteria growing in association with Methylococcus capsulatus (Bath) ina single cell protein production process*. Applied microbiology and biotechnology. 2002;59(1):33-9.
29. Marit Berge G, Baeverfjord G, Skrede A, Storebakken T. *Bacterial protein grown on natural gas as protein source in diets for Atlantic salmon, Salmo salar, in saltwater*. Aquaculture. 2005;244(1-4):233-40.
30. Øverland M, Skrede A, Matre T. *Bacterial protein grown on natural gas as feed for pigs. Acta Agriculturae Scandinavica*. Section A-Animal Science. 2001;51(2):97-106.

Archive of SID

www.SID.ir