بهینه‌سازی تولید پروتئین تک یاخته از آب پنیر توسط *K. marxianus* به روش تاگوچی

معصومه انوری*[۱]، عاطفه علیزاده[۲]، میترا صادقی پور[۳]

۱*- دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، رشت، ایران، صندوق پستی: ۳۵۱۶ -۴۱۳۳۵

۲ و۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، باشگاه پژوهشگران جوان، رشت، ایران، صندوق پستی: ۳۵۱۶ -۴۱۳۳۵

anvari@iaurasht.ac.ir

چکیده

بهینه‌سازی پارامترهای تولید توده‌زیستی (Biomass) توسط مخمر *Kluyveromyces marxianus* PTCC 5193 با استفاده از طراحی آزمایشات بر اساس پروتکل تاگوچی انجام و سطح مطلوب پارامترهای فیزیکی و اجزای محیط کشت نظیر میزان سولفات آمونیوم، میزان تلقیح و شدت اختلاط جهت تولید توده‌زیستی تعیین شد. از مجموع ۱۶ سری آزمایش‌های تخمیری، عوامل و سطوح انتخاب شده با استفاده از نرم‌افزار Qualitek – 4 پردازش شد. در شرایط بهینه غلظت سولفات آمونیوم ۰/۷ g/l، میزان اختلاط ۳۰۰ rpm و مقدار تلقیح ۷ g/l تولید توده‌زیستی ۳۸ درصد افزایش را نشان داد. روش طراحی تاگوچی منجر به ارزیابی عوامل اصلی و اثرات متقابل آزمایشات به صورت جداگانه و ترکیبی شد. این روش تجزیه و تحلیل داده‌های تجربی، درک نقش عوامل منفرد و ارزیابی نتایج در شرایط مطلوب به منظور دستیابی به شرایط بهینه فرایند را تسهیل نمود.

کلمات کلیدی: پروتئین تک یاخته، آب پنیر، روش تاگوچی، بهینه‌سازی.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

آب پنیر مایع زرد مایل به سبز و محصول فرآیند پنیرسازی است که در مقادیر بسیار زیاد در سراسر جهان تولید می‌شود. این ماده حدود ۹۵-۸۵ ٪ از حجم شیر و مقدار قابل توجهی (حدود ۵۵٪) مواد مغذی شیر را تشکیل می‌دهد. در میان این مواد مغذی، لاکتوز (۵-۴/۵ درصد) فراوان‌ترین جزء است که برای تولید محصولات با ارزش افزوده مورد استفاده قرار می‌گیرد. آب پنیر همچنین حاوی پروتئین‌های محلول (۰/۸-۰/۶ درصد)، چربی (۰/۵- ۰/۴درصد) و نمک‌های معدنی (۱۰- ۸ درصد وزن خشک) می‌باشد. از اجزای دیگر قابل ارزیابی می‌توان به اسید لاکتیک، اسید سیتریک، ترکیبات ازته غیرپروتئینی و ویتامین‌های گروه B اشاره کرد (۳).

افزایش نگرانی در مورد آلودگی ناشی از زباله‌های صنعتی و کشاورزی توجه به تبدیل مواد زائد به محصولات تجاری با ارزش را بیشتر کرده است. آب پنیر پساب خروجی صنایع لبنی موجب آلودگی جدی زیست محیطی می‌گردد. به علاوه، تقاضا برای منابع غذایی به علت عرضه ناکافی منابع پروتئینی سنتی مانند گوشت، ماهی و تخم‌مرغ توجه برای روش‌های جای‌گزین در تولید مواد غذائی را افزایش داده است. لذا توجه زیادی به تبدیل ضایعاتی نظیر شیر سویا، پساب سیب‌زمینی، نیشکر باگاس، پوست پرتقال، آب پنیر و ... به پروتئین تک سلولی (SCP) طی سال‌های اخیر صورت گرفته است (۲).

به لحاظ فنی تولید توده سلولی با استفاده از کشت میکروارگانیسم‌ها از ضایعات امکان‌پذیر می‌باشد. جلبک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌ها منابع ارزشمند پروتئین میکروبی هستند که می‌توانند به عنوان SCP مورد استفاده قرار گیرند. تولید بیومس میکروبی توسط فرایند تخمیر غوطه‌ور یا در بستر جامد می‌تواند انجام شود. پس از تخمیر، توده‌زیستی برداشت و به عنوان منبع پروتئین استفاده شده یا هدف فرایندهائی مانند استخراج و تخلیص پروتئین قرار می‌گیرد. به طور کلی، میزان تولید بالا و بازدهی پروتئین و نیز سهولت تولید SCP آن را در مقایسه با تولید منابع پروتئین گیاه و حیوانی حائز اهمیت بیشتر می‌سازد. عمومی‌ترین فرآیندها در این خصوص تولید اتانول و پروتئین تک‌سلولی از آب پنیر است با این حال، تنها تعداد معدودی از چند گونه میکروارگانیسمی قادر به متابولیسم لاکتوز می‌باشند. برخی از این گونه‌ها *Kluyveromyces fragilis*، *Trichosporon cutaneum*، *Marchella crassipes* و *M. hortensis* می‌باشند (۶و۱۱).

روش تاگوچی طراحی آزمایشات در واقع روشی است که طی آن آزمایشات متعددی در شرایط مختلف با طراحی ویژه (آرایه متعامد) انجام می‌شود تا از احتمال ایجاد خطا کاسته و کارائی قابلیت تصمیم نتایج افزایش یابد (۱). روش تاگوچی بسیاری از آرایه‌های متعامد استاندارد و متناظر با نمودار خطی را برای این منظور فراهم می‌کند (۸). در پژوهش حاضر، بهینه‌سازی عوامل موثر بر تولید توده‌زیستی تخمیری با استفاده از طراحی فاکتوریل جزئی از آرایه متعامد با استفاده از روش تاگوچی مورد بررسی قرار گرفت. بدیهی است دستیابی به شرایط تولید از نظر صنعتی حائز اهمیت فراوان است.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

آب پنیر از کارخانه‌های تولیدکننده لبنیات در شهرستان رشت تهیه شد. برخی از ویژگی‌های آب پنیر مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: برخی از مشخصات آب پنیر مورد استفاده در این تحقیق

وزن مخصوص (گرم بر لیتر)	۱/۰۲۸
درصد لاکتوز	۴/۹
درصد پروتئین	۰/۹
درصد چربی	۰/۰۵
pH	۵/۷

آماده‌سازی آب پنیر

برای حذف پروتئین‌ها آب پنیر در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد. پس از تنظیم pH به ۴/۶ (pH ایزوالکتریک) سوسپانسیون صاف گردید. مایع رویی که یک مایع زرد مایل به سبز بود در ۱۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه استریل شد (۵).

تخمیر

سویه مخمر مورد استفاده در این مطالعه *Kluyveromyces marxianus* PTCC 5193 بود که از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی واقع در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. جهت نگهداری از اسلنت محیط کشت PDA در ۴ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید.

محیط پیش کشت براث مغذی حاوی (در هر لیتر): ۵ گرم پپتون، ۳ گرم عصاره مالت و ۳ گرم عصاره مخمر بود که در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد. آزمایش‌های تخمیر غوطه‌ور در فلاسک‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری که حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر از آب پنیر پروتئین‌زدائی شده بود انجام گردید.

روش تاگوچی

در این روش در مرحله نخست عوامل مختلف که اثر مهم در بهینه‌سازی محیط کشت در تولید توده زیستی دارند می‌بایست تعیین شوند. عوامل انتخابی و دامنه آن‌ها می‌تواند بر اساس مطالعات سایر محققین استوار باشد. بر اساس اطلاعات به دست آمده، ۳ فاکتور قابل توجه تأثیرگذار در تولید توده زیستی شامل میزان سولفات آمونیوم، میزان تلقیح و شدت اختلاط انتخاب شدند (۷) (جدول ۲).

گام بعدی به طراحی ماتریس آزمایش‌ها برای تعریف و تجزیه و تحلیل داده‌ها اختصاص داشت و آرایه متعامد مناسب برای کنترل پارامترها انتخاب شد. در این مطالعه ۴ سطح از عوامل در نظر گرفته شد و تعداد ۱۶ آزمایش بدین منظور تعیین شد. ۳ عامل و ۴ سطح مورد استفاده در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است.

در طراحی آرایه متعامد، هر ستون متشکل از مجموعه‌ای از شرایط (بسته به سطح اختصاص یافته به هر یک از فاکتورها) است. آزمایش‌های تخمیر غوطه‌ور برای تولید توده زیستی با مخمر *K.marxianus* با به کارگیری ۱۶ سری آزمایش (جدول ۳) ترکیبی از ۳ عامل در ۴ سطح (جدول ۲) انجام شد و نتایج به دست آمده از هر مجموعه آزمایش‌ها به صورت غلظت توده‌زیستی در جدول ۳ نشان داده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: انتخاب عوامل تخمیر و تعیین سطح

شماره	عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۴
a	$(NH_4)_2SO_4$ (گرم بر لیتر)	۰/۰	۰/۳	۰/۷	۱/۰
b	میزان تلقیح (گرم بر لیتر)	۱/۰	۳/۰	۵/۰	۷/۰
c	شدت اختلاط (دور بر دقیقه)	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰

آنالیزها

غلظت سلولی مایع تلقیح با اندازه‌گیری تراکم نوری (OD) در ۶۲۰ نانومتر و توسط منحنی کالیبراسیون که تراکم نوری را به وزن خشک توده سلولی مربوط می‌ساخت، تعیین شد. وزن خشک سلولی با استفاده از سانتریفوژ، حجم معینی از مایع تخمیر در ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه مشخص شد. به این منظور رسوب با سرم رینگر مجدداً شستشو، سپس برای اندازه‌گیری وزن خشک توده، به مدت ۳-۲ ساعت در $100\pm1^{o}C$ در آون قرار داده شد.

نرم‌افزار

نرم‌افزار Qualitek-4 برای طراحی خودکار آزمایش‌ها با استفاده از روش تاگوچی در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفت. این نرم‌افزار مجهز به استفاده از L-4 تا L-64 آرایه به همراه مجموعه‌ای از ۲ تا ۶۳ فاکتور با ۲، ۳ و ۴ سطح در هر عامل می‌باشد (۸).

نتایج به دست آمده برای شناسایی عوامل موثر و منحصر بفرد بر تولید توده‌زیستی و برآورد عملکرد تخمیر در شرایط مطلوب استفاده گردید.

نتایج

مطالعات تخمیر غوطه‌ور با طراحی آزمایشگاهی، تنوع قابل توجهی در تولید توده‌زیستی نشان داد (جدول ۳). تأثیر متوسط عوامل همراه با فعل و انفعالات در سطح اختصاص داده شده بر تولید توده‌زیستی توسط مخمر *K.marxianus* در جدول ۴ نشان داده شده است. نمودار ۱ تأثیر هر عامل منفرد در تولید توده زیستی را به صورت جداگانه نشان می‌دهد. به عنوان مثال مقدار نمک سولفات آمونیوم در سطح سوم و فاکتورهای میزان تلقیح و شدت اختلاط به ترتیب در سطوح ۴ و ۳ بالاترین تأثیر را بر تولید توده‌زیستی نشان دادند.

www.SID.ir

جدول ۳: مجموعه آزمایش‌ها بر حسب سطوح فاکتورهای مختلف

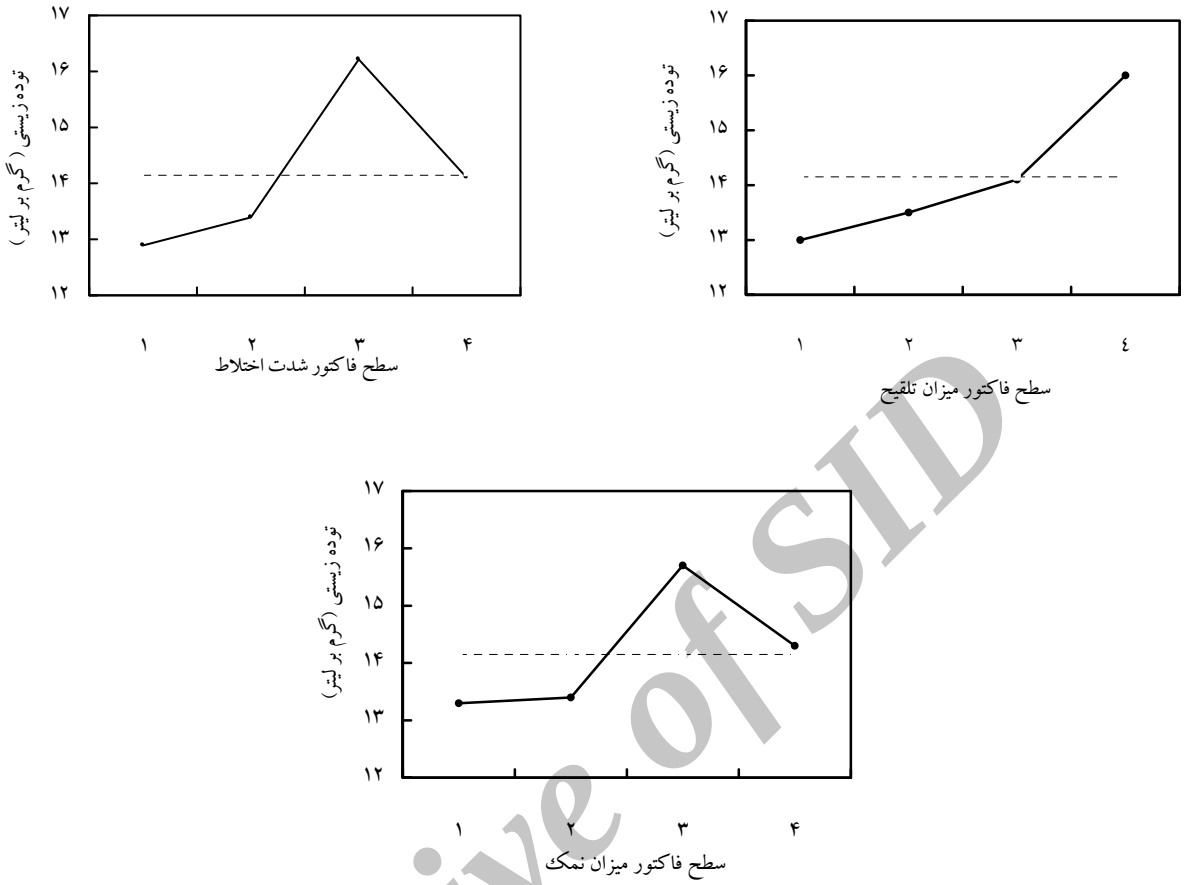
شماره آزمایش	سطح فاکتورها			توده زیستی (گرم بر لیتر)
	a	b	c	
۱	۱	۱	۱	۱۰/۱۲ ± ۰/۳۲
۲	۱	۲	۲	۱۲/۱۲ ± ۰/۷۸
۳	۱	۳	۳	۱۵/۱۲ ± ۰/۴۷
۴	۱	۴	۴	۱۵/۷۸ ± ۰/۶۲
۵	۲	۱	۲	۱۱/۹۸ ± ۰/۷۵
۶	۲	۲	۱	۱۱/۵۶ ± ۰/۶۵
۷	۲	۳	۴	۱۳/۱۲ ± ۰/۰۱
۸	۲	۴	۳	۱۷/۱۲ ± ۰/۹۳
۹	۳	۱	۳	۱۶/۹۸ ± ۰/۹۰
۱۰	۳	۲	۴	۱۴/۶۷ ± ۰/۳۷
۱۱	۳	۳	۱	۱۴/۹۸ ± ۰/۴۴
۱۲	۳	۴	۲	۱۶/۲۳ ± ۰/۷۳
۱۳	۴	۱	۴	۱۳/۱۲ ± ۰/۰۱
۱۴	۴	۲	۳	۱۵/۸۹ ± ۰/۶۵
۱۵	۴	۳	۲	۱۳/۵۶ ± ۰/۱۱
۱۶	۴	۴	۱	۱۴/۹۸ ± ۰/۴۴

جدول ۴: اثرات اصلی عوامل در تعیین سطوح تولید توده زیستی توسط *K. marxianus* PTCC 5193

عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۴	$L_3 - L_1$	$L_1 - L_4$
$(NH_4)_2SO_4$ (گرم بر لیتر)	۱۳/۲۵	۱۳/۴۰	۱۵/۶۵	۱۴/۳۳	۲/۴۰	-۱/۰۷۵
میزان تلقیح (گرم بر لیتر)	۱۳/۰۰	۱۳/۵۰	۱۴/۱۵	۱۵/۹۸	۱/۱۵	-۲/۹۷۵
شدت اختلاط (دور بر دقیقه)	۱۲/۸۵	۱۳/۴۳	۱۶/۲۳	۱۴/۱۳	۳/۳۸	-۱/۲۷۶

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۱: تأثیر سطح انتخاب فاکتورها بر تولید توده زیستی توسط مخمر . محور x سطح انتخاب عامل و محور y نشان دهنده میزان تولید توده زیستی، (.....) متوسط تولید و (___) سهم هر فاکتور منحصربفرد در تولید

یکی از ویژگی‌های طراحی آزمایش با روش تاگوچی، تعیین شرایط بهینه عملیاتی برای متغیرهای مورد مطالعه است. بر اساس پیش‌بینی نرم‌افزاری، متوسط عملکرد این سویه در تولید محصول ۱۴/۱۶ گرم بر لیتر از آزمایش‌های طراحی شده بود (جدول ۳). تخمین شاخص دقت ((Severity Index (SI) فاکتورهای مورد مطالعه، به آگاهی از تأثیر دو فاکتور منحصربفرد در سطوح مختلف تأثیر متقابل کمک می‌کند(جدول ۵). در این جدول ستون‌ها (Columns) موقعیت فاکتورهای واکنش‌دهنده را مشخص می‌نماید. جدول ۵ تأثیرات متقابل فاکتورهای مورد نتایج مطالعه را نشان می‌دهد. مقادیر این تأثیر متقابل بر اساس شاخص دقت توسط برنامه نرم‌افزاری محاسبه شده، اندازه‌گیری گردید. این مقدار در محدوده ۴۸ – ۵ درصد از فاکتوری به فاکتور دیگر متفاوت بود (جدول ۵).

Archive of SID

www.SID.ir

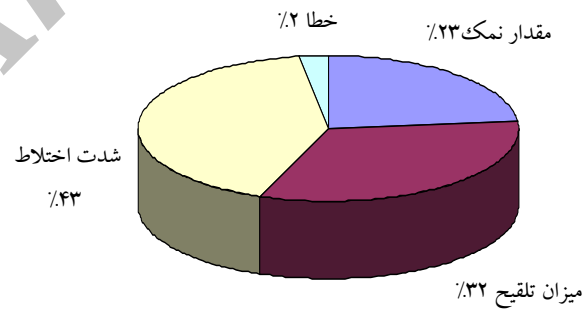
جدول ۵: تخمین شاخص دقت برحسب عوامل مختلف

تداخل عوامل	column	SI (%)
میزان نمک * میزان تلقیح	(a, b)	۴۸/۱۸
میزان نمک * میزان اختلاط	(a, c)	۱۵/۴۴
میزان اختلاط * مایه تلقیح	(b, c)	۴/۴۹

در روش تاگوچی از آنالیز واریانس (Analysis of Variance (ANOVA) برای تجزیه و تحلیل نتایج آزمایش‌ها و همچنین جهت تعیین اینکه چه مقدار از تغییر هر عامل در فرایند سهیم است، استفاده می‌شود (جدول ۶). دانستن اهمیت هر عامل نقش کلیدی در کنترل فرآیند تخمیر دارد. با توجه به نسبت‌های محاسبه شده دو واریانس بین و داخل نمونه‌ها (F) و محدوده اطمینان (Confidence Limit) ۹۵ درصد لحاظ شده، نتایج آنالیز واریانس بهمراه درصد اهمیت هر عامل که توسط نرم‌افزار Qualitek-4 محاسبه شده در جدول ۷ نشان داده شده است. همچنین نمودار ۲ نیز اثر نسبی عوامل را نشان می‌دهد.

جدول ۶: آنالیز واریانس (ANOVA) بر حسب عوامل مختلف

عامل	DOF	sum of squares	variance	F – ratio	pure sum	precent
$(NH_4)_2SO_4$ (گرم بر لیتر)	۳	۱۴/۶۱۲	۴/۸۷۰	۱۳/۶۶۵	۱۳/۵۴۲	۲۳/۴۴۸
میزان تلقیح (گرم بر لیتر)	۳	۲۰/۳۰۱	۶/۷۶۷	۱۸/۹۸۶	۱۹/۲۳۲	۳۲/۴۶۰
شدت اختلاط (دور بر دقیقه)	۳	۲۶/۰۸۶	۸/۶۹۵	۲۴/۳۹۶	۲۵/۰۱۷	۴۱/۶۲۲
خطا و سایر عوامل	۶	۲/۱۳۸	۰/۳۵۶			۲/۴۷۰



نمودار ۲: اثر نسبی عوامل مختلف بر تولید توده زیستی توسط مخمر

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۷: شرایط بهینه و میزان کارائی در فرآیند تولید توده زیستی توسط *K. marxianus* PTCC 5193

عامل	شرایط بهینه	سطح	سهم
سولفات آمونیوم (g/L)	۰/۷	۳	۱/۴۹
میزان اختلاط (rpm)	۳۰۰	۳	۲/۰۷
میزان مایه تلقیح (g/L)	۷	۴	۱/۸۲

نتایج این جدول نشان داد که سطوح بهینه عامل‌های مورد مطالعه میزان نمک، میزان اختلاط و میزان مایه تلقیح به ترتیب ۰/۷g/l، ۷g/l و ۳۰۰ rpm بود. همچنین جدول فوق سهم هر یک از عوامل را در تولید نشان می‌دهد به طوری‌که سهم تمام عوامل در سطوح مناسب، جهت تولید توده‌زیستی مورد انتظار در شرایط بهینه ۵/۳۸ گرم بر لیتر است.

بحث

در این تحقیق که سطح تولید بسیار وابسته به شرایط کشت بود. تفاوت بین مقدار متوسط هر عامل در سطح بالاتر و پایین‌تر بیانگر تأثیر نسبی ظرفیت‌های منحصربفرد هر فاکتور می‌باشد. علائم مثبت یا منفی جهت تغییرات میزان تولید از سطح ۱ به ۲ یا ۲ به ۳ و ... را نشان می‌دهد.

تفاوت بین سطح ۳ و سطح ۱ $(L_3 - L_1)$ از هر عامل نفوذ نسبی تأثیر هر فاکتور را نشان می‌دهد. همانگونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود در میان عوامل مورد مطالعه شدت اختلاط قوی‌ترین اثر در مقایسه با سایر عوامل و به دنبال آن میزان غلظت نمک سولفات آمونیوم و میزان تلقیح در تولید توده‌زیستی، نشان می‌دهد. تأثیر اندازه مقدار تلقیح برای بهبود سرعت تولید توده‌زیستی قبلاً نیز گزارش شده است، اما این فاکتور در بازدهی مصرف منبع کربن تأثیر ندارد (۹).

این نتایج موید اهمیت هر یک از عوامل مورد مطالعه در تولید توده زیستی می‌باشند و اگر چه هر یک از اثر مختلف در سطوح منحصربفرد خود را نشان می‌دهند اما اثر هر فاکتور به شرایط عوامل دیگر در زمینه بهینه‌سازی تولید توده‌زیستی بستگی دارد (۱۰). در مورد شدت اختلاط، افزایش به سطح ۳ منجر به افزایش تولید و متعاقب آن افزایش به سطح ۴ کاهش در میزان توده‌زیستی را نشان داد. این ممکن است به دلیل آشفتگی بیش از اندازه سیستم تخمیر باشد.

شناخت از تأثیر متقابل بین دو فاکتور دیدگاه بهتری جهت آنالیز کلی فرایند می‌دهد. هر فاکتور به طور منحصر بفرد ممکن است با یک یا همه فاکتورهای دیگر دارای اثر متقابل مختلف و متعددی را ایجاد نماید. بررسی این نوع تأثیرات متقابل در روش طراحی تاگوچی امکان‌پذیر است. به این ترتیب مطالعه تعداد زیادی از تأثیرات متقابل فراهم می‌شود. نرم‌افزار Qualitek-4 به صورت خودکار تأثیرات متقابل ممکن را مورد بررسی قرار می‌دهد. این نرم‌افزار به ازای n فاکتور، n(n- ۱)/۲ تأثیر متقابل را در نظر می‌گیرد (۴).

شاخص دقت وقتی زاویه بین خطوط ۹۰ درجه باشد صد درصد و هنگامی که خطوط موازی باشند این

Archive of SID

www.SID.ir

شاخص صفر درصد را نشان می‌دهد. شاخص دقت هر فاکتور تحت مطالعه، به درک تأثیر متقابل دو فاکتور مجزا در سطوح مختلف کمک می‌کند. SI شدت اثر متقابل بین هر دو فاکتور را نشان می‌دهد که می‌توانند تأثیر متقابل داشته باشند. هر چه مقدار SI بیشتر باشد تأثیر متقابل بین دو فاکتور مذکور بیشتر است.

باتوجه به اینکه تأثیر متقابل میزان نمک سولفات آمونیوم و میزان تلقیح بیشترین واکنش SI را بخود اختصاص دادند (۴۸/۱۸٪) و فاکتورهای میزان تلقیح و شدت اختلاط با شاخص دقت ۴/۴۹ درصد، کمترین تأثیر متقابل را در این فرایند از خود نشان دادند نتیجه گیری می گردد که این تغییرات مستقل از هم بوده و هیچ تداخلی با یکدیگر نشان نمی‌دهند.

با مطالعه اثرهای اصلی هر یک از عوامل امکان تعیین تأثیر و اهمیت عوامل در فرایند فراهم می‌شود.

این نتیجه گیری که میزان اختلاط با ۴۱/۶۲ درصد، تأثیرگذارترین عامل مورد مطالعه در تولید توده‌زیستی و میزان مایه تلقیح و مقدار نمک سولفات آمونیوم به ترتیب با ۳۲/۴۶ و ۲۳/۴۵ درصد از عوامل مهم دیگر در تولید توده‌زیستی می‌باشند توسط سایر محققان نیز تائید شده است (۳).

در مجموع چنین نتیجه گیری شد که با استفاده از روش تاگوچی عوامل مورد مطالعه در شرایط بهینه می‌توانند متوسط تولید را از ۱۴/۱۶ گرم بر لیتر به ۱۹/۵۴ گرم بر لیتر یعنی تقریباً ۳۸ درصد افزایش دهند.

مطالعه اثر عوامل ارتباط منحصربفردبین آنها را با یکدیگر نشان می‌دهد. از سوئی امکان دارد عاملی که در یک سطح خاص کمترین اثر را بر تولید داشته باشد از بیشترین شاخص دقت برخوردار باشد، این مسئله اهمیت بهینه‌سازی عوامل در تولید هر محصول و نقش عوامل فیزیکو- شیمیائی مختلف نظیر غلظت نمک و میزان اختلاط را در متابولیسم میکروبی نشان می‌دهد (۱۰).

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری بیدریغ و مساعدت‌های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت آقای دکتر امیر تیموری و مدیریت محترم امور پژوهشی واحد آقای دکتر ترکاشوند و ریاست محترم باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت آقای دکتر اسلامی و نیز کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروبشناسی آقای مهندس صفری و خانم مهندس پورخلیلی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمائیم.

منابع

1. Eriksson, L.; Johanson, E.; Kattane-Wold, N.; Wilkstrom, C. and Wold, S., 2000. Design of Expriments: principles and Applications. *Umetrics Academy, Umea* pp. 63-114.
2. Ghaly, A.E.; Kamal, M.A. and Avery, A., 2003. Influence of temperature rise on kinetic parameters during batch propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey under ambient conditions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 19, 741–749.
3. Ghaly, A.E. and Kamal, M.A., 2004. Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research* 38, 631–644.
4. Hocalar, E.; Boran, S.; Turker, M.; Kapucu, H. and Hocalar, A., 2006. The use of Taguchi Method For the optimization of Bakers Yeast Drying. *proceeding of 5th International symposium on Inteligent Manufacturing systems* 105-111.

Archive of SID

www.SID.ir

5. Hosseini, M.; Shojaosadati, S.A. and Towfighi, J., 2003. Application of a Bubble-Column Reactor for the Production of a Single-Cell Protein from Cheese Whey. *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 764-766
6. Koutinas, A.A.; Athanasiadis, I.; Bekatorou, A.; Psarianos, C.; Kanellaki, M.; Agouridis, N. and Blekas, G., 2007. Kefir-yeast technology: Industrial scale-up of alcoholic fermentation of whey, promoted by raisin extracts, using kefir-yeast granular biomass. *Enzyme and Microbial Technology* 41, 576–582.
7. Moeini, H.; Nahvi, I. and Tavassoli, M., 2004. Improvement of SCP production and BOD removal of whey with mixed yeast culture. *Electronic Journal of Biotechnology* 7, 249-255.
8. Montgomery, D.C., 2004. Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons, New York ISBN 0-471-48735-X pp. 254-384.
9. Moresi, M; Colicchio, A; Sansovini, F., 1980. Optimization of Whey Fermentation in a Jar Fermenter. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9,173-183
10. Prakasham, R.S.; Subba-Rao, C.; Sreenivas-Rao, R. and Sarma, P.N., 2007. Enhancement of acid amylase production by an isolated *Aspergillus awamori*. *J. Appl. Microbiol.* 102, 204–211.
11. Schultz, N.; Chang, L.; Hauck, A.; Reuss, M. and Syldatk, C., 2006. Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69, 515–520.

Archive of SID

www.SID.ir