

بهینه‌سازی تولید ۶ و ۲ دی‌متوکسی بنزوکینون از جوانه گندم تخمیر شده توسط مخمر نانویی صنعتی در بیوراکتور آزمایشگاهی

سیده هاجر حسنی^۱، ولی‌الله بابایی پور^{۲*}، حسن فیروزی برشنه^۳

- ۱- کارشناسی ارشد مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، گروه زیست فناوری، تهران، ایران
 ۲- دانشیار، دکترای مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، گروه زیست فناوری، تهران، ایران
 ۳- کارشناسی ارشد مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، گروه زیست فناوری، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۵۸۷۵-۱۷۷۴، تهران، ایران

vbabaeipour@mut.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۲

دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۹

چکیده

در این مطالعه، تخمیر جوانه گندم با پودر مخمر نانویی صنعتی برای تولید FWGE با محتوای بالای 2,6-DMBQ (۲ و ۶-دی‌متوکسی بنزوکینون)، با رویکرد افزایش مقیاس در مقیاس بیوراکتور Bench انجام شد. محتوای 2,6-DMBQ جوانه گندم تخمیر شده با بهینه‌سازی سه متغیر pH اولیه، دمای تخمیر و سرعت هم‌زدن در دو سطح با استفاده از روش تاگوچی در بیوراکتور هم‌زمان‌دار افزایش داده شد. محتوای 2,6-DMBQ نمونه‌ها طی ۱۴، ۱۶ و ۱۸ ساعت پس از تخمیر تعیین شد و سپس نتایج توسط نرم‌افزار Qualitek تجزیه و تحلیل شد. سپس اثر دور سانتریفیوژ روی میزان کدورت و تعداد مخمر موجود در سوپرناتانت نهایی بررسی شد. در انتها، سوپرناتانت توسط خشک‌کن پاششی با دمای ورودی ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و دمای خروجی ۶۹-۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد و میزان ماده موثره 2,6-DMBQ، رطوبت و خاکستر تعیین شد. در شرایط بهینه معادل pH اولیه ۶، دمای تخمیر ۳۲ درجه سانتی‌گراد و سرعت هم‌زدن ۸۰ حداکثر ۱/۵۲۷ میلی‌گرم 2,6-DMBQ در هر گرم FWGE به دست آمد. نتایج جداسازی نشان داد که سرعت سانتریفیوژ تأثیر معنی‌داری بر کدورت نهایی و تعداد مخمرهای باقی‌مانده ندارد و بنابراین ۳۰۰۰ g به‌عنوان سرعت بهینه انتخاب شد. با این حال، به دلیل محتوای بالای مخمر در مایع رویی، فیلتراسیون پس از سانتریفیوژ مورد نیاز بود. به دلیل سرعت بالای خشک شدن نمونه، رطوبت کم محصول نهایی و راندمان بالا در مقیاس صنعتی، نمونه‌ها با استفاده از خشک‌کن اسپری خشک شدند. در نهایت رطوبت، پروتئین، خاکستر و pH محصول نهایی اندازه‌گیری شد.

کلید واژگان: ۲ و ۶-دی‌متوکسی بنزوکینون، مخمر نانویی، بیوراکتور، جوانه گندم تخمیر شده، تخمیر

۱- مقدمه

عصاره جوانه گندم تخمیر شده^۱ در دنیا تحت نام آومار^۲ نیز شناخته شده است. به طور استاندارد در هر گرم از آومار حدود ۴۰ میکروگرم ماده موثره طبیعی شامل ۲- متوکسیمی بنزوکینون (2-MBQ) و ۲ و ۶-دی متوکسیمی بنزوکینون (2,6-DMBQ) حضور دارد [۱]. اثر ماده موثره 2-MBQ و 2,6-DMBQ موجود در آومار، در درمان سرطان، اختلالات خود ایمنی و سیستم ایمنی بدن اثبات شده است. [۲-۴]. آومار به صورت تجاری تحت برندهای آومار (۱۹۹۸)، Ave' (۲۰۰۵)، AveUltra (۲۰۰۹)، AWGE (۲۰۱۰) و Metatrol (۲۰۱۵) در بازار عرضه شده است و تفاوت بین برندها، در میزان افزودنی های استفاده شده در محصول نهایی است. همچنین اخیراً آومار تحت برند Immunivent برای حیوانات خانگی سگ و گربه در بازار عرضه شده است.

برای اولین بار فرایند تخمیر عصاره جوانه گندم توسط بیوشیمیست مجارستانی Mate Hidvegi در اوایل دهه ۱۹۹۰ به ثبت رسید فرایند کلی تولید آومار شامل تخمیر مقدار ماده مشخصی از جوانه گندم به همراه آب و مقدار مشخصی از جوانه گندم است. سپس فاز جامد و مایع، حاصل از فرایند تخمیر طی فرایندهای جداسازی و سانتریفیوژ از همدیگر جدا شده و برای جداسازی کامل مخمر، فاز مایع تحت فرایند فیلتر پرس قرار می گیرد و در نهایت با اضافه کردن مقدار مشخصی از مالتودکستترین و سیلیکون دی اکسید به محصول حاصل از خروجی فیلتر پرس، با خشک کن پاششی خشک می شود. از جمله پارامترهای موثر در تولید FWGE با توجه به مطالعات انجام شده شامل دمای (۲۸-۳۴) [۱۶ و ۲۶]، pH (۴-۸) [۱۶]، سرعت همزدن (۲۰۰-۴۰) [۱۶]، اندازه ذرات (۳۰-۹۰ مش)، میزان ماده خشک به آب (۱:۱۲ - ۱:۶)، و میزان

جوانه گندم به مخمر (۱:۴ - ۲:۱) بوده است. میزان تولید ماده موثره مربوط به تخمیر جوانه گندم با مخمر ساکارومایسیس سرویزیه با میزان ۰/۴ میلی گرم 2,6-DMBQ به گرم ماده خشک بوده است [۵-۷]. به طور معمول FWGE از مخمر ساکارومایسیس سرویزیه تولید شده است. با این حال سویه های دیگری نیز در تولید 2,6-DMBQ مورد بررسی قرار گرفته اند که مهمترین عامل انتخاب نوع سویه، فعالیت آنزیم β -گلوکوزیداز^۵ و در دسترس بودن سویه است [۸-۱۰]. در سال ۲۰۲۰ پاراسازاد و همکاران بینه سازی تولید 2,6-DMBQ عصاره جوانه تخمیر شده با مخمر نانویی را در مقیاس آزمایشگاهی گزارش کردند. آنها توانستند با بینه سازی چهار عامل موثر محتوی 2,6-DMBQ جوانه گندم تخمیر شده را به حدود ۲/۵ میلی گرم به گرم ماده خشک افزایش دهند [۱۱].

از آنجایی که تاکنون مطالعه ای مبنی بر تولید FWGE در مقیاس راکتور آزمایشگاهی انجام نگرفته است، این مطالعه با هدف افزایش مقیاس در ادامه پژوهش پاسازاد و همکاران در مقیاس انجام شد. عوامل تاثیر گذار در افزایش مقیاس فرایند تخمیر به عوامل فیزیکی، شیمیایی، و بیولوژیکی تقسیم می شود. با توجه به مطالعات انجام شده در مقیاس آزمایشگاهی بیشترین اثر در تولید FWGE شامل پارامترهای فیزیکی و شیمیایی بوده است [۶]. از جمله عوامل شیمیایی تاثیر گذار بر افزایش مقیاس، عوامل تنظیم کننده pH، کربوهیدرات ها، نیتروژن، فسفات و غلظت محصولات تولیدی، پتانسیل احیا و تشکیل کف اشاره کرد. عوامل فیزیکی تاثیر گذار بر افزایش مقیاس نیز شامل، شکل هندسی تانک همزن دار، میزان هوادهی، شکل و سرعت همزن، فشار هیدرواستاتیکی و فشار برگشتی است [۱۲ و ۱۳]. یکی از مهمترین عوامل در بیوراکتور ها برای تولید محصول،

^۴ 2,6-dimethoxy benzoquinone

^۵ β -glucosidase

^۱ Fermented Wheat Geram Extract

^۲ Avemar

^۳ 2-methoxy benzoquinone

24909) از شرکت رضوی تهیه شد. همچنین، 2,6-DMBQ از سیگما آلدردج و کلروفرم از مرک خریداری شد.

۲-۲ آنالیزها

۲-۲-۱ سنجش 2,6-DMBQ

مقدار ۰/۵ گرم از نمونه خشک شده جوانه گندم تخمیر شده وزن شد و در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر درون دکانتور به طور کامل حل شد. سپس، ۲۵ میلی لیتر کلرفرم در محلول نهایی ریخته شد و برای انجام عمل اختلاط، در شیکر با سرعت ملایم به مدت ۳۰ دقیقه شیک شد. در این حالت دو فاز آبی (فاز رویی) و فاز آلی (فاز زیرین) تشکیل شد که فاز زیرین جدا شد. پس از آن برای جداسازی بیشتر ماده موثره، ۲ بار دیگر کلرفرم طبق روش اشاره شده به فاز رویی افزوده شد و تمامی فازهای پایین جدا شده در انتها با هم مخلوط شد. محلول نهایی برای رسیدن به حجم نهایی ۱۰ میلی لیتر در آون تغلیظ شد. سپس، محلول نهایی برای سنجش میزان 2,6-DMBQ توسط HPLC در ۲۸۹ نانومتر [۱۵] آنالیز شد. در این پژوهش ستون HPLC با مشخصات BDS Hypersil C18 (۴,۶ mm × ۲۵۰ mm × ۵μm) ساخت شرکت امریکایی ThermoScientific همراه با مخلوطی از متانول و استیک اسید ۵ درصد در آب (۷۶:۲۴ v/v) به عنوان فاز متحرک با دبی ۱ میلی لیتر بر دقیقه و دتکتور UV-Vis استفاده شد.

۲-۲-۲ توسعه روش اسپکتروفتومتری uv-vis به جای

روش HPLC برای سنجش مقدار تولید 2,6-DMBQ

با توجه به تعداد زیاد آزمایش های بهینه سازی و همچنین محدودیت استفاده از آنالیز HPLC، می توان دستگاه اسپکتروفتومتری uv-vis را برای سنجش میزان تولید 2,6-DMBQ جایگزین کرد. از آنجایی که جذب نمونه ها در دستگاه HPLC در ۲۸۹ نانومتر اندازه گیری شده است، در اینجا نیز می توان با استفاده از روش ساده و سریع طیف سنجی در همین طول موج، غلظت 2,6-DMBQ را

سرعت همزدن است و با توجه به اینکه اثر سرعت همزدن در مقیاس آزمایشگاهی ارلن و بیوراکتور میتواند متفاوت باشد [۱۴]، بنابراین سرعت همزدن به عنوان اولین عامل در نظر گرفته شد. دومین عامل تاثیر گذار با توجه به مقیاس انجام شده، دما است. مسیرهای بیولوژیکی که در طول رشد سلول و تشکیل محصول فعال هستند به دما بسیار حساس می باشند. بنابراین حفظ درجه حرارت در مقدار ثابت بهینه برای فرآیندهای زیستی بسیار حیاتی هستند. از آنجا که متابولیسم رشد به طور مستقیم تحت تاثیر دمای فرآیند است، فعالیت های آنزیمی در شبکه واکنش داخل سلولیرا نیز تحت تاثیر قرار می دهد.

تشکیل و ترشح اسیدهای آلی و آمینواسیدها از طریق شبکه واکنش در سلول منجر به کاهش pH محیط کشت می شود. در مقابل، pH محیط کشت از طریق متابولیت هایی که منتقل شده و توسط سلول استفاده شده افزایش می یابد [۶]. بنابراین، به عنوان یک عامل اثر گذار pH به عنوان پارامتر سوم برای بهینه سازی در مقیاس بنج در نظر گرفته شد.

در این مطالعه بهینه سازی پارامترهای موثر در تخمیر و تولید FWGE، در مقیاس بیوراکتور آزمایشگاهی با طراحی آزمایش توسط تاگوچی انجام شد و بر اساس اثر زمان تخمیر نیز آنالیز نمونه طی زمان های مختلف انجام شد و نتایج بررسی شد. در ادامه محیط کشت تخمیر شده جوانه گندم در دوره های مختلف سانتریفیوژ شد و از لحاظ میزان کدورت و تعداد مخمر باقی مانده در دور های مختلف مقایسه شد و سوپرناتانت نهایی توسط خشک کن پاششی خشک و آنالیزهای خاکستر، میزان رطوبت نهایی و pH انجام و با پژوهش های دیگر مقایسه شد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱ مواد

جوانه گندم از شرکت آرد فرد تاکستان و پودر مخمر ساکارومایسیس سرویزیه (*S. cerevisiae* ATCC A,

اندازه گرفت. برای این کارف ابتدا سری رقت از ماده استاندارد تهیه کرده و در هر غلظت، جذب در ۲۸۹ نانومتر خوانده می‌شود.

۲-۲-۳ شمارش سلولی

پس از مراحل جداسازی نمونه‌ها، شمارش سلولی توسط لام نئوبار در زیر میکروسکوپ نوری انجام شد. برای شمارش سلولی، ابتدا میکروسکوپ برای دیدن مربع‌های لام نئوبار بر روی بزرگنمایی ۱۰۰۰ تنظیم شد. سپس، مقداری از نمونه‌ها بر روی لام نئوبار ریخته شد و روی آن برای عدم تحرک نمونه با لامل پوشانده شد و زیر میکروسکوپ قرار گرفت. تعداد سلول‌ها در هر خانه با بزرگنمایی ۱۰۰۰ شمارش و یادداشت شد.

۲-۳ سایر آنالیزها

خاکستر، رطوبت و pH محصول نهایی خشک شده بر اساس روش بهبود یافته انجمن شیمی غلات آمریکا (AACC، ۲۰۰۳) ارزیابی شد.

۲-۴ روش اجرای پژوهش

۲-۴-۱ بررسی تخمیر در ارلن

مقدار ۳ گرم پودر مخمر را به همراه ۶ گرم پودر جوانه گندم آسیاب شده در یک ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته و به آن ۹۹ میلی‌لیتر آب شهری اضافه شد و سپس در شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۱۵۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۸ ساعت قرار گرفت. سوسپانسیون حاصل از تخمیر در سرعت چرخش ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شده و مایع رویی در دستگاه لیوفیلیزه به مدت ۴۸ ساعت خشک شد [۱۱]. در نهایت، آنالیز مقدار 2,6-DMBQ با روش HPLC به ازای وزن خشک نمونه‌ی

جداسازی شده ارزیابی شد.

۲-۴-۲ بهینه‌سازی تخمیر در مقیاس بیوراکتور آزمایشگاهی

برای دستیابی به شرایط مطلوب برای تولید حداکثر مقدار ماده ضد سرطان 2,6-DMBQ بهینه‌سازی با روش آماری تاگوچی را انتخاب شد. ۳ عامل مهم و تأثیرگذار از جمله سرعت هم‌زدن، دمای تخمیر و pH اولیه در ۲ سطح در نظر گرفته شد (جدول ۱).

طراحی آزمایش توسط تاگوچی در دو سطح با آرایه متعامد L_4 پیشنهاد شد (جدول ۲). ۴ آزمایش در یک فرمانتور سه لیتری با حجم کاری یک لیتر استفاده شد. قبل از انجام هر آزمایش تانک هم‌زدار و تجهیزات همراه (از جمله سنسورهای دما و pH، کندانسور، ظرف‌های حاوی اسید و باز، شلنگ‌های ورود و خروج اکسیژن و نمونه) به همراه میزان آب مورد نیاز در اتوکلاو استریل شد. سپس دما و سرعت هم‌زدن مربوط به هر آزمایش را تنظیم و میزان هوای ورودی را روی ۱ VVM قرار داده شد. در هر آزمایش ۶۰ گرم پودر جوانه گندم آسیاب شده و ۳۰ گرم پودر مخمر رضوی (نسبت: ۲ به ۱) را به ۹۹۰ میلی‌لیتر آب اتوکلاو شده (نسبت آب به ماده خشک: ۱۱ به ۱) داخل تانک اضافه شد. سپس با اضافه کردن مقدار لازم از اسید و باز pH اولیه فرآیند تخمیر تنظیم شد. تخمیر به مدت ۱۸ ساعت در هر آزمایش انجام شد و سنجش میزان ماده موثره 2,6-DMBQ در زمان‌های ۱۴، ۱۶ و ۱۸ ساعت پس از شروع تخمیر توسط اسپکتروفوتومتر انجام شد.

جدول ۱ متغیرها و سطوح آزمایش شده

Type	Level 1	Level 2
Temperature (°C)	28	32
Stirring speed (rpm)	80	120
Initial pH	6	7

جدول ۲ آرایه متعامد L4 برای بهینه سازی تخمیر بیوراكتور آزمایشگاهی

Experiment number	Initial pH	Temperature (° C)	Stirring speed (rpm)
1	6	28	80
2	6	32	120
3	7	28	120
4	7	32	80

بررسی شد. شکل ۱ نمودار کروماتوگرام استاندارد و نمونه تخمیر شده در ارلن است. با توجه به غلظت و سطح زیر نمودار کروماتوگرام استاندارد و مقایسه با سطح زیر نمودار نمونه تخمیری، میزان 2,6-DMBQ تولید شده ۱/۴۸ بود.

۲-۳ بهینه سازی پارامترهای موثر

برای بهینه سازی شرایط تولید، سه عامل pH اولیه، دما و سرعت همزدن در دو سطح بررسی شد. برای این کار، طراحی آزمایش‌ها از طریق روش آماری تاگوچی بر اساس آرایه متعامد L₄ انجام شد. بر این اساس، چهار آزمایش در فرمانتور انجام شد. از فرمانتور در بازه‌های زمانی ۱۴، ۱۶ و ۱۸ ساعت نمونه‌گیری شده است. نتایج آزمایش‌ها به صورت مقدار 2,6-DMBQ تولید شده، به عنوان معیار مقایسه در جدول ۳ آمده است. برای اندازه‌گیری میزان تولید 2,6-DMBQ از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد و پس از انجام آزمایش‌ها، با آنالیز واریانس داده‌ها به کمک نرم‌افزار تاگوچی (Qualitek_4)، مقادیر بهینه عوامل مورد بررسی برای تولید بیشینه 2,6-DMBQ پیش‌بینی و تأیید شد. نمودار استاندارد طیف‌سنجی در طول موج ۲۸۰ نانومتر، برای اندازه‌گیری غلظت 2,6-DMBQ مطابق شکل ۲ بود. با توجه به شکل ۲، خطی با معادله ۱ به دست می‌آید که در این رابطه، y بیانگر میزان جذب در ۲۸۰ نانومتر و x برابر با غلظت 2,6-DMBQ است.

$$0/0045 + x \cdot 0/0853 = y \quad \text{معادله ۱}$$

۲-۴ بررسی سرعت چرخش مناسب سانتریفیوژ

برای سنجش میزان کدورت و سنجش تعداد سلول باقی مانده در خروجی از بیوراكتور، محلول تولید شده به مدت ده دقیقه در سرعت‌های چرخش ۳۰۰۰، ۶۰۰۰ و ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. میزان کدورت در طول موج ۶۲۰ نانومتر انجام شد.

۲-۴-۴ خشک کردن نمونه نهایی توسط خشک کن

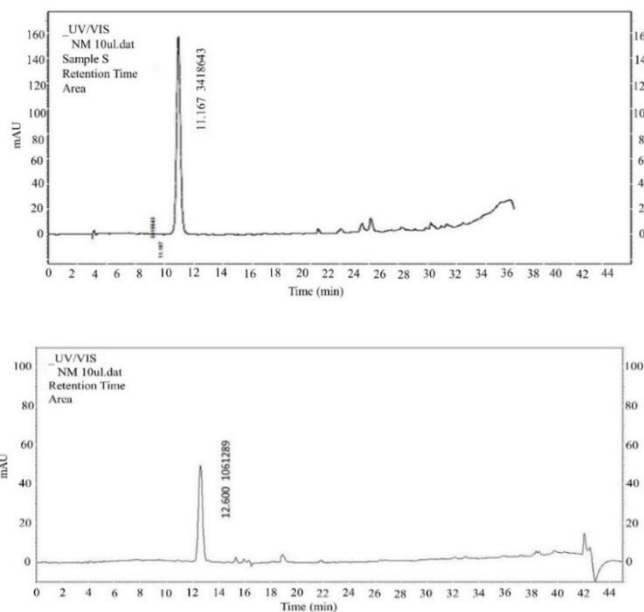
پاششی

عصاره جوانه گندم تخمیر شده و جداسازی شده با سانتریفیوژ، توسط خشک‌کن پاششی خشک شد. برای اسپری کردن این محلول توسط نازل ریز ساز دستگاه به محفظه هوای داغ، مالتودکستریز به عنوان عامل کمک‌کننده به محلول اضافه شد. ابتدا میزان ۸۰ گرم مالتودکستریز در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب جوش حل شد و پس از سرد شدن به ۸۰۰ میلی‌لیتر از مایع فیلتر شده اضافه شد. محلول حاصل توسط دستگاه خشک‌کن پاششی آزمایشگاهی با دمای ورودی هوای داغ ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و دمای خروجی ۷۰-۶۹ درجه سانتی‌گراد خشک شد. پودر خشک شده به دست آمده توزین شد و برای انجام آنالیزهای مربوطه ارسال شد.

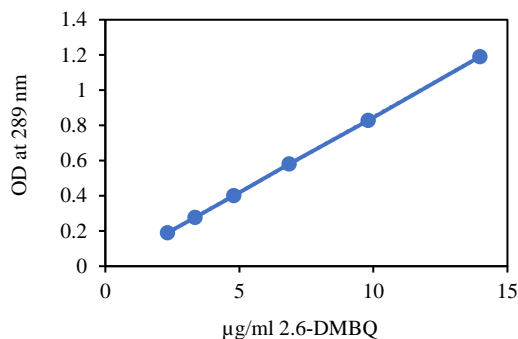
۳- نتایج

۳-۱ نتایج تولید در ارلن

برای بررسی تولید اولیه 2,6-DMBQ در ارلن، فرایند تخمیر انجام شد و میزان تولید ماده موثره با HPLC



شکل ۱ کروماتوگرام نمونه‌ها. a. استاندارد 2,6-DMBQ. b. نمونه تخمیر شده



شکل ۲ نمودار استاندارد 2,6-DMBQ در ۲۸۹ نانومتر

۳-۳ نتایج به دست آمده برای ۱۴ ساعت تخمیر

پیش‌بینی شرایط بهینه توسط نرم‌افزار برای ۱۴ ساعت پس از شروع تخمیر به صورت pH اولیه ۷، دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و سرعت هم‌زدن ۸۰ دور بر دقیقه تخمین زده (جدول ۳) و حداکثر میزان تولید 2,6-DMBQ تحت این شرایط ۱/۴۳۶ میلی‌گرم بر گرم برآورد شده است. طبق نتایج نشان داده شده در جدول ۳، میزان تولید 2,6-DMBQ تحت شرایط بهینه فوق‌برابر با ۱/۴۳۹ میلی‌گرم بر گرم به دست آمده است. مطابق با جدول ۴، در ۱۴ ساعت پس از شروع تخمیر، pH اولیه بیشترین تأثیر را بر افزایش تولید 2,6-DMBQ دارد. دما در درجه دوم اهمیت قرار دارد. طبق نتایج تغییر سرعت هم‌زدن از سطح یک به دو تأثیر ناچیزی روی تولید 2,6-DMBQ داشته است.

جدول ۳ نتایج به‌دست آمده از آزمایشات بر اساس آرایه متعامد L4

Experiment number	Initial pH	Temperature (°C)	Stirring speed (rpm)	2,6-DMBQ (mg/g)		
				14h	16h	18h
1	6	28	80	0.91	1.05	1.4
2	6	32	120	1.038	1.25	1.527
3	7	28	120	1.25	1.005	0.835
4	7	32	80	1.439	1.182	1.090

جدول ۴ شرایط تولید بهینه و آنالیز واریانس نتایج بر اساس آرایه متعامد L4 برای ۱۴ ساعت تخمیر

Type	Optimal level	Optimal value	sum of squares (s)	Variance	Impact percentage (p %)
Initial pH	2	7	0.137	0.137	84.13
Temperature (°C)	2	32	0.025	0.025	15.258
Stirring speed (rpm)	1	80	0	0	0.55

زند. نتیجه به‌دست آمده از آزمایش (مطابق با جدول ۳) در شرایط بهینه فوق مقدار ۱/۲۵ میلی‌گرم بر گرم را برای 2,6-DMBQ نشان می‌دهد. طبق جدول ۵ و نمودارهای، ۱۶ ساعت پس از شروع تخمیر، تغییر دما بیشترین تأثیر را روی تولید 2,6-DMBQ داشته و میزان تأثیرگذاری pH اولیه و سرعت هم‌زدن ناچیز بوده است.

۳-۴ نتایج به‌دست آمده برای ۱۶ ساعت تخمیر نرم‌افزار تاگوچی برای مدت زمان ۱۶ ساعت پس از شروع تخمیر، شرایط بهینه را به‌صورت pH اولیه ۶، دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و سرعت هم‌زدن ۱۲۰ دور بر دقیقه پیش‌بینی کرده است (جدول ۵) و در این شرایط مقدار ماده 2,6-DMBQ را برابر با ۱/۲۴۹ میلی‌گرم بر گرم تخمین می‌

جدول ۵ شرایط تولید بهینه و آنالیز واریانس بر اساس آرایه متعامد L4 پس از ۱۶ ساعت تخمیر

Type	Optimal level	Optimal value	sum of squares (s)	Variance	Impact percentage (p %)
Initial pH	1	6	0.137	0	84.13
Temperature (°C)	2	32	0.042	0.042	95.564
Stirring speed (rpm)	2	120	0	0	2.104

۳-۵ نتایج به دست آمده برای ۱۸ ساعت تخمیر

برای مدت زمان ۱۸ ساعت تخمیر، نرم افزار تاگوچی شرایط بهینه را به صورت pH اولیه ۶، دمای ۳۲ درجه سانتی گراد و سرعت هم زدن ۸۰ دور بر دقیقه پیش بینی کرده (جدول ۶) و در این شرایط مقدار ماده 2,6-DMBQ را برابر با ۱/۵۸ میلی گرم بر گرم تخمین می زند. بیشترین مقدار 2,6-DMBQ حاصل از آزمایش (جدول ۳)، پس از ۱۸ ساعت تخمیر به میزان ۱/۵۲۷ میلی گرم بر گرم به دست آمده است و به مقدار حاصل از نرم افزار نزدیک است.

۳-۶ نتایج بهینه سازی بر اساس بیشترین مقدار به دست آمده از هر آزمایش

با در نظر نگرفتن زمان نمونه گیری و با مقادیر بیشینه به دست آمده از هر آزمایش، بهینه سازی با استفاده از

نرم افزار تاگوچی انجام شد. این نتایج در جدول ۷ ارائه شده است. مطابق این جدول، نرم افزار برای این حالت، شرایط بهینه را به صورت pH اولیه ۶، دمای ۳۲ درجه سانتی گراد و سرعت هم زدن ۸۰ دور بر دقیقه و مقدار ماده 2,6-DMBQ برابر با ۱/۵۵۶ میلی گرم بر گرم پیش بینی می کند. نتایج حاصل از چهار آزمایش انجام شده (جدول ۳)، بیشترین مقدار 2,6-DMBQ تولیدی را ۱/۵۲۷ میلی گرم بر گرم نشان می دهد.

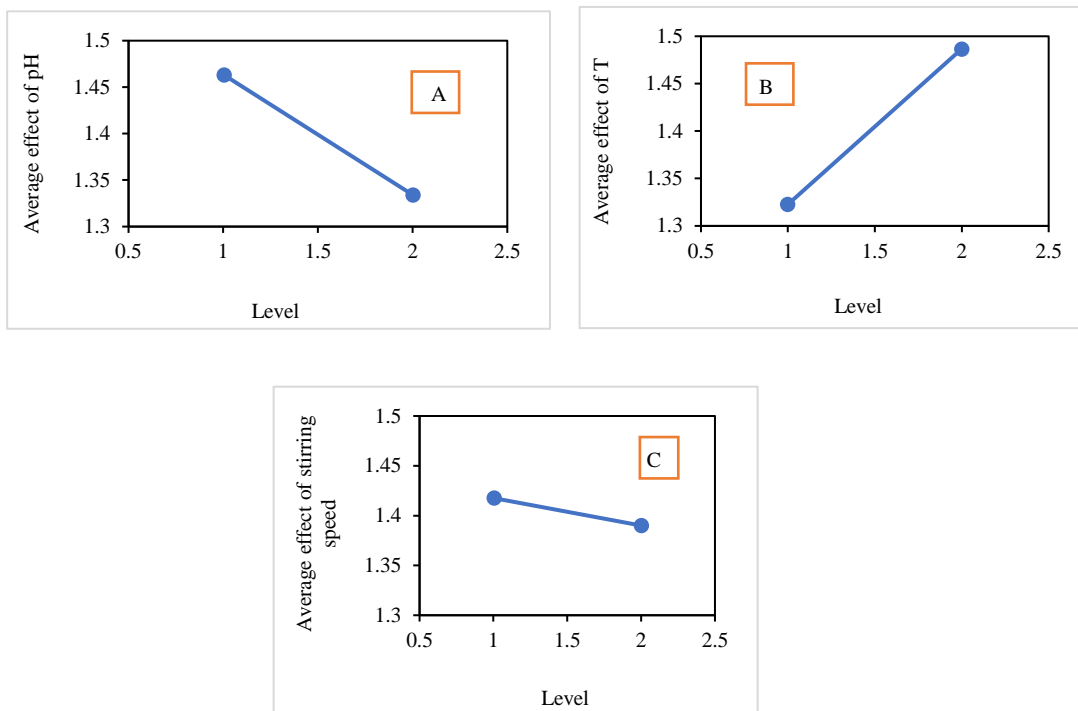
مطابق با جدول ۷ و نمودارهای نشان داده شده در شکل ۳، برای به دست آوردن بیشترین مقدار 2,6-DMBQ، تغییرات دما بیشترین تأثیر را داشته و تأثیرگذاری pH اولیه در مرتبه دوم قرار دارد. همچنین، تأثیر سرعت هم زدن ناچیز بوده است. نتایج میزان تغییرات pH و تولید 2,6-DMBQ در طول زمان در جدول ۸ قابل مشاهده است.

جدول ۶ شرایط تولید بهینه و آنالیز واریانس نتایج بر اساس آرایه متعامد L4 پس از ۱۸ ساعت تخمیر

Type	Optimal level	Optimal value	sum of squares (s)	Variance	Impact percentage (p %)
Initial pH	1	6	0.251	0.251	86.153
Temperature (°C)	2	32	0.036	0.036	12.431
Stirring speed (rpm)	1	80	0.004	0.004	1.381

جدول ۷ بهینه سازی بر اساس حداکثر مقدار به دست آمده از هر آزمایش بدون در نظر گرفتن زمان

Type	Optimal level	Optimal value	sum of squares (s)	Variance	Impact percentage (p %)
Initial pH	1	6	0.014	0.251	32.212
Temperature (°C)	2	32	0.024	0.036	62.204
Stirring speed (rpm)	۱	80	0	0	2.331



شکل ۳ میانگین اثر عوامل مختلف بر اساس حداکثر مقدار به دست آمده از هر آزمایش

A **: حداکثر pH موثر در سطح ۱ برابر با ۶؛ B: حداکثر دمای موثر در سطح ۲ برابر با ۳۲ درجه سانتی گراد؛ C: حداکثر دمای موثر در سطح ۱ برابر با ۸۰ درجه سانتی گراد.

جدول ۹، مایع حاصل از سانتریفیوژ در سرعت‌های چرخش ۳۰۰۰، ۶۰۰۰ و ۸۰۰۰ از لحاظ شفافیت و حجم به دست آمده تفاوتی باهم ندارند. از طرفی در نمونه‌های حاصل از هر سه سرعت چرخش سلول‌های مخمر به مقدار زیادی حضور دارند.

طبق پتنت دکتر Hidvegi عصاره جوانه گندم تخمیر شده باید عاری از مخمر باشد و یا در هر ۱۰ خانه لام نئوبار نباید بیش‌تر از یک سلول مخمر وجود داشته باشد [۵]. بنابراین، سانتریفیوژ به تنهایی در جدا سازی عصاره جوانه گندم تخمیر شده کارآمد نیست و استفاده از آن نیازمند حداقل یک مرحله فیلتراسیون می‌باشد. همچنین، با توجه به یکی بودن نتیجه هر سه آزمایش، استفاده از سرعت ۳۰۰۰g به دلیل مصرف کمتر انرژی پیشنهاد می‌شود.

مطابق با نتایج در زمان‌های ۱۴ و ۱۸ ساعت، بعد از pH اولیه، دما دومین عامل تأثیرگذار در تولید بوده است. همچنین، بر اساس بیشترین مقدار 2,6-DMBQ تولید شده در هر آزمایش و نمونه ۱۶ ساعت، دما مهم‌ترین عامل تأثیرگذار بوده است.

طبق نتایج، افزایش سرعت هم‌زدن از ۸۰ به ۱۲۰ دور بر دقیقه تأثیر زیادی روی تولید ندارد که احتمالاً به دلیل کم بودن فاصله این دو سرعت می‌باشد.

۳-۷ استفاده از سانتریفیوژ برای جداسازی

جدول ۹، نتایج سانتریفیوژ ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت جوانه گندم تخمیر شده را در مدت زمان ۱۰ دقیقه و در سه سرعت چرخش متفاوت نشان می‌دهد. بر اساس نتایج

جدول ۸ میزان تغییرات pH و تولید 2,6-DMBQ در طول زمان

Type	Time(h)	pH	2,6-DMBQ (mg/g)
Experiment 1 with initial pH 6 Temperature 28 °C and rpm80	14	6.1	0.910
	16	5.6	1.015
	18	5	1.400
Experiment 2 with initial pH 6 Temperature 32 °C and rpm120	14	4.5	1.038
	16	4.4	1.250
	18	4.4	1.527
Experiment 3 with initial pH 7 Temperature 28 °C and rpm 120	14	5	1.251
	16	4.7	1.005
	18	4.6	0.835
Experiment 4 with initial pH 7 Temperature 32 °C and rpm 80	14	5.7	1.439
	16	5.6	1.182
	18	5.4	1.089

جدول ۹ نتایج سانتریفیوژ ۵۰ میلی لیتری محیط کشت جوانه گندم تخمیر شده

Rotational speed (g)	The volume of filtered liquid (ml)	Turbidity (OD ₆₀₀)	The presence of yeast
3000	42	0.439	Too much
6000	42	0.413	Too much
8000	42	0.410	Too much

نهایی به دست آمده مطابق آنالیز نهایی ۶/۶۴ درصد بود. بر اساس پژوهش پارسازاد و همکاران (۲۰۲۰) میزان رطوبت پودر نهایی خشک شده توسط خشک کن انجمادی، در حدود ۲۱/۶۶ درصد بود. این مقدار نشان دهنده کاهش قابل توجه رطوبت نهایی با خشک کردن توسط خشک کن پاششی است که موجب پایداری بیشتر محصول و همچنین کاهش هزینه خشک کردن می شود. میزان خاکستر پودر خشک شده در مطالعه حاضر در حدود ۱۱/۲۱ بود

۳-۸ خشک کردن توسط خشک کن پاششی و آنالیز نهایی

پودر نهایی خشک شده توسط خشک کن پاششی به ازای ۱۰۰ میلی لیتر شامل زمان ۱۲ دقیقه با مقدار ۶/۲ گرم وزن خشک بود. بنابراین، زمان خشک شدن یک لیتر محلول برابر با ۱۲۰ دقیقه است و از خشک کردن یک لیتر از محلول، ۶۲ گرم پودر به دست آمد. میزان رطوبت پودر

که در مقایسه با پژوهش پارسازاد و همکاران (۲۰۲۰) اندکی افزایش داشته است و دلیل آن استفاده از مالتودکسترین در مرحله خشک کردن توسط خشک کن پاششی است. pH محصول نهایی در حدود ۵/۱ اندازه گیری شد که در پژوهش پارسازاد و همکاران (۲۰۲۰) در حدود ۴/۹ اندازه گیری شده بود و عدد به دست آمده با منابع دیگر نیز همخوانی دارد [۱۱]

۴- بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه تولید عصاره جوانه گندم تخمیر شده در مقیاس فرمتور آزمایشگاهی انجام شد. بهینه سازی فرایند در این مقیاس با در نظر گرفتن پارامترهای موثر دما، pH و سرعت همزدن انجام شد که بر اساس آن بیشترین میزان تولید ماده موثره 2,6-DMBQ در بهینه ترین شرایط به دست آمد.

تحت شرایط بهینه ی تخمیر شامل pH اولیه ۶، دمای ۳۲ درجه سانتی گراد و سرعت همزدن ۸۰ rpm و مقدار ۱/۵۵۶ میلی گرم بر گرم 2,6-DMBQ تولید شد که این میزان در حدود نشانه افزایش ۳/۸ برابری نسبت به مقدار ۰/۴ میلی گرمی ذکر شده در پتنت دکتر Hidvegi [۵] است. براساس نتایج حاصل از بهینه سازی، pH اولیه بیشترین تأثیر را روی افزایش تولید ماده 2,6-DMBQ داشته است. همچنین، دما نیز در درجه دوم اهمیت قرار دارد. این نتایج نشان می دهد که سرعت همزدن تأثیر زیادی روی تولید ندارد. در مطالعه Zheng و همکاران [۶]، افزایش pH ابتدا باعث افزایش تولید 2,6-DMBQ شده و سپس باعث کاهش آنها شده است. این ویژگی نشان می دهد که pH اولیه تخمیر ممکن است فعالیت آنزیم پراکسیداز و β -گلوکزیداز را افزایش دهد. جدول ۸ میزان تغییرات pH را در چهار آزمایش انجام شده، در بازه های زمانی ۱۴، ۱۶ و ۱۸ ساعت و میزان تولید 2,6-DMBQ در این زمان ها را نشان می دهد. بر اساس این نتایج، برای مقدار pH اولیه ۷، میزان تولید در ساعت ۱۴ از ساعت ۱۶

و ۱۸ بیشتر است که با نتایج مطالعات Zheng و همکاران [۶] همخوانی دارد.

در مطالعه Zheng و همکاران (۲۰۱۶)، افزایش دما ابتدا باعث افزایش تولید متوکسی بنزوکینون و 2,6-DMBQ شده و سپس باعث کاهش آنها می شود. این ویژگی نشان می دهد که درجه حرارت تخمیر ممکن است فعالیت آنزیم پراکسیداز و β -گلوکزیداز را افزایش دهد؛ بنابراین منجر به افزایش تولید بنزوکینون ها شود. در این مطالعه برای بهینه سازی دما، دمای تخمیر بین ۴۰-۲۵ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شده بود که دمای بهینه آن ۳۱/۶ درجه سانتی گراد به دست آمده بود [۶]. دمای پیشنهادی در پتنت دکتر Hidvegi برابر با ۳۰ درجه سانتی گراد است [۵]. دمای بهینه در این مطالعه برابر با ۳۲ درجه سانتی گراد به دست آمد با پژوهش پارسازاد و همکاران (۲۰۲۰) مطابقت دارد [۱۱].

Zheng و همکاران [۶] در مطالعه خود بیان کردند که تولید بنزوکینون ها با افزایش سرعت همزدن افزایش می یابد و مقدار بهینه سرعت همزدن را ۱۴۲ دور بر دقیقه به دست آوردند [۶]. در مطالعه انجام شده توسط پارسازاد و همکاران (۲۰۲۰) نیز سرعت همزدن بیشترین تأثیر را روی تولید داشته است و مقدار بهینه آن ۱۵۰ دور بر دقیقه به دست آمده بود [۱۱]. اما در این دو مطالعه بهینه سازی در ارلن انجام شده و همزدن توسط شیکر انکوباتور انجام شده است و مکانیسم همزدن آن با همزدن در فرمانتور متفاوت است. در پتنت دکتر Hidvegi سرعت همزدن در مقیاس صنعتی بسیار آهسته و برابر با ۳۰ دور بر دقیقه بیان شده است [۵]. از آنجایی که شعاع فرمانتور استفاده شده در آزمایشگاه با شعاع فرمانتور صنعتی ذکر شده در پتنت دکتر Hidvegi متفاوت هستند، نمی توان سرعت همزدن در این دو مقیاس را مقایسه کرد.

در ادامه برای جداسازی کامل مخمر از نمونه نهایی سانتریفیوژ در دوره های مختلف انجام شد که بر اساس

of peptides obtained from defatted wheat germ by fermentation. *Journal of food science and technology*, 50(1), 53-61.

[8]. Rizzello, C. G., Mueller, T., Coda, R., Reipsch, F., Nionelli, (2013). Synthesis of 2-methoxy benzoquinone and 2, 6-dimethoxybenzoquinone by selected lactic acid bacteria during sourdough fermentation of wheat germ. *Microbial cell factories*, 12(1), 1-9.

[9]. Zhang, J. Y., Xiao, X., Dong, Y., Wu, J., Yao, F., & Zhou, X. H. (2015). Effect of fermented wheat germ extract with *lactobacillus plantarum* dy-1 on HT-29 cell proliferation and apoptosis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(9), 2449-2457.

[10]. Yoo, J. G., & Kim, M. D. (2010). Production of 2-methoxy-1, 4-benzoquinone (2-MBQ) and 2, 6-dimethoxy-1, 4-benzoquinone (2, 6-DMBQ) from wheat germ using lactic acid bacteria and yeast. *Food Engineering Progress*, 14(4), 292-298.

[11]. Parsazad, M., Babaeipour, V., MalekSabet, N., (2020). Optimization of 2, 6-dimethoxy benzoquinone production through wheat germ fermentation by *S. cerevisiae*. *Applied Food Biotechnology*, 7(3), 161-169.

[12]. Crater J.S., & Lievens J.C. (2018). Scale-up of industrial microbial processes. *FEMS Microbiology Letters*, 365(13), fny138.

[13]. Enfors, S. O., Jahic, M., Rozkov, A., Xu, B., Hecker, M., Jürgen, B., ... & Manelius, Å. (2001). Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *Journal of biotechnology*, 85(2), 175-185.

[14]. Oldshue, J. Y. (1966). Fermentation mixing scale-up techniques. *Biotechnology and Bioengineering*, 8(1), 3-24.

[15]. Huang, J. X., Stuart, J. D., Melander, W. R., & Horvath, C. (1984). High-performance liquid chromatography of substituted p-benzoquinones and p-hydroquinones: I. Interplay of on-column redox reaction and the chromatographic retention process. *Journal of Chromatography A*, 316, 151-161.

نتایج به دست آمده پس از سانتریفیوژ نیاز به یک مرحله فیلتراسیون بود. در نهایت محصول خروجی از سانتریفیوژ توسط خشک کن پاششی خشک شد که از نظر زمان خشک شدن و میزان رطوبت نهایی نسبت به مطالعات انجام شده مناسبتر بود که موجب کاهش هزینه خشک شدن در فرایندهای بالاتر می شود.

۵- منابع

[1]. Tuscano J., Lau, D., O'donnell R, (2016), Fermented wheat germ proteins (FWGP) for the treatment of cancer, U.S. Patent No. 9,480,725. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

[2]. Telekes, A., Hegedűs, M., Chae, C. H., & Vékey, K. (2009). Avemar (wheat germ extract) in cancer prevention and treatment. *Nutrition and cancer*, 61(6), 891-899.

[3]. Boros, L. G., Nichelatti, M., & Shoenfeld, Y. (2005). Fermented wheat germ extract (Avemar) in the treatment of cancer and autoimmune diseases, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1051(1), 529-542.

[4]. Đorđević, T. M., Šiler-Marinković, S. S., Dimitrijević-Branković, S. I. (2010). Effect of fermentation on antioxidant properties of some cereals and pseudo cereals. *Food chemistry*, 119(3), 957-963.

[5]. M. Hidvegi, R.F. Tomoskozine, K. Lapis, E. Raso, B. Szende, (2002). U.S. Patent No. 6,355,474. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

[6]. Zheng, Z., Guo, X., Zhu, K., Peng, W., & Zhou, H. (2016). The optimization of the fermentation process of wheat germ for flavonoids and two benzoquinones using EKF-ANN and NSGA-II. *RSC advances*, 6(59), 53821-53829.

[7]. Niu, L. Y., Jiang, S. T., & Pan, L. J. (2013). Preparation and evaluation of antioxidant activities

Optimization of 2, 6- Dimethoxy benzoquinone production of wheat germ fermented with industrial bakery yeast at Laboratory bioreactor

Seyedeh Hajar Hassani, Valiollah Babaeipour, Hassan Firoozi Bereshneh

1. Master of Chemical Engineering - Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology
2. Doctor of Chemical Engineering - Biotechnology, Associate Professor, Malek Ashtar University of Technology
3. Master of Chemical Engineering - Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology

vbabaeipour@mut.ac.ir

Receipt: 2022/02/08

Accepted: 2022/10/24

Abstract

In this study, the wheat germ was fermented with industrial bakery yeast powder to produce FWGE with high 2, 6-DMBQ content in a Bench-scale bioreactor by scale-up approach. The 2, 6-DMBQ content of FWGE was increased by optimizing the three initial variables of pH, fermentation temperature, and agitation rate at two levels using the Taguchi method. The 2, 6-DMBQ content of the samples was determined at 14, 16, and 18 hours of the fermentation process. Then, the results were analyzed by Qualitek software. The effect of centrifugation speed on turbidity and the yeast's number in the final supernatant was then investigated. Finally, the supernatant was dried by spray dryer with an inlet temperature of 120 °C and outlet temperature of 70°C, and the amount of active 2,6-DMBQ, pH, moisture, and ash was determined. Under optimal conditions: initial pH of 6, fermentation temperature of 32 °C, and agitation rate of 80 rpm, maximum 1.527 mg of 2,6-DMBQ per gram of FWGE obtained. The separation results showed that the centrifugation rate doesn't have a significant effect on the final turbidity and the number of yeasts left, and thus 3000 g was selected as the optimal speed. However, because of the high content of yeast in the supernatant, filtration was required after centrifugation. Due to the high speed of sample drying, the low moisture of the final product, and high efficiency on an industrial scale, the samples were dried using a spray dryer. Finally, the moisture, protein, ash, and pH of the final product were measured.

Keywords: 2, 6-DMBQ, Baker yeast, Bioreactor, Fermented Wheat Germ, Fermentation