

غنی سازی مخمر ساکارومایسس سرویزیه با روی با رویکرد نوین

سعید رضا رضایی اهری^a، مهرداد قوامی^a، کیانوش خسروی دارانی^{b*}، مسعود هنرور^a

^a گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^b گروه تحقیقات صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتوی تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۱۱/۱۴

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۱۱/۰۳

چکیده

مقدمه: کمبود روی یکی از مشکلات تغذیه‌ای شایع است و غنی‌سازی زیستی با مخمر ساکارومایسس سرویزیه، می‌تواند راهکاری مؤثر باشد. هدف این پژوهش، بهینه‌سازی فرایند غنی‌سازی روی در مخمر با تولید زیست‌توده‌ای با محتوای بالای روی و کارایی بالای فرایند بود.

مواد و روش‌ها: از مخمر ساکارومایسس سرویزیه، منبع نمک روی، شکر به‌عنوان منبع کربن و دی‌هیدروژن فسفات پتاسیم (KH_2PO_4) به‌عنوان منبع فسفر استفاده شد. برای افزایش جذب روی و کاهش اثرات سمی، افزودن نمک روی پس از پایان فاز رشد انجام شد. طرح آزمایشی پلاکت – برمن برای غربالگری اثر متغیرهای اصلی و نرم‌افزار Design-Expert برای تحلیل آماری داده‌ها به کار گرفته شد. سپس روش سطح پاسخ (RSM) برای تعیین شرایط بهینه فرایند و زمان افزودن نمک مورد استفاده قرار گرفت. یافته‌ها: نتایج نشان داد که زمان فرایند، غلظت KH_2PO_4 و میزان شکر تأثیر معنی‌داری بر غنی‌سازی روی دارند. شرایط بهینه شامل زمان ۵۹/۱۵ دقیقه، غلظت KH_2PO_4 برابر با ۰/۱۳ گرم بر میلی‌لیتر و مقدار شکر ۰/۱۱ گرم تعیین شد. افزودن نمک روی پس از پایان فاز رشد، جذب روی در زیست‌توده مخمر را به طور قابل توجهی افزایش داد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان می‌دهد که ترکیب رویکرد آماری و افزودن نمک روی پس از پایان فاز رشد، روش نوینی برای غنی‌سازی زیستی مخمر با روی فراهم می‌کند. این روش با کاهش مصرف نمک فلزی و زمان فرایند، امکان تولید زیست‌توده‌ای با محتوای بالای روی را بدون استفاده از افزودنی‌های شیمیایی پیچیده فراهم می‌سازد و می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی نوآورانه در مطالعات غنی‌سازی عناصر ریزمغذی مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بهینه سازی، روی، ساکارومایسس سرویزیه، غنی سازی

مقدمه

روی یک کوفاکتور کاتالیزوری مهم برای بسیاری از انواع پروتئین‌ها است (Khairunnisa et al., 2021). کمبود روی^۱ یکی از مشکلات تغذیه‌ای عمده و جهانی است و به عنوان یک ریزمغذی اساسی در عملکرد طبیعی سیستم ایمنی نقش حیاتی دارد (Ryan Wessells et al., 2024). کمبود این عنصر موجب اختلال در عملکرد ایمنی سلولی و هومورال، افزایش حساسیت به عفونت‌ها، تأخیر در رشد کودکان، تأخیر در بهبود زخم، کاهش اشتها و اختلال در حس چشایی و بویایی می‌شود (Miller et al., 2024; Ryan Brown, 2023). این وضعیت به‌ویژه در گروه‌های آسیب‌پذیر و افرادی که از رژیم‌های غذایی نامتعادل یا جذب ناکافی ریزمغذی‌ها رنج می‌برند، از اهمیت بالینی بیشتری برخوردار است (Ryan Brown, 2023; Esfahani et al., 2023). برای مواجهه با کمبود روی در جمعیت‌های انسانی، متخصصان تغذیه پیشنهاد می‌کنند که غنی‌سازی گسترده مواد غذایی پایه یکی از مؤثرترین راهکارها برای افزایش دریافت ریزمغذی‌های ضروری است (Shah et al., 2016). در میان انواع موجودات زنده، ساکارومایسس سرویزیه، به دلیل قیمت مقرون به صرفه تولید و دسترسی آسان، می‌تواند یکی از بهترین منابع زیست توده باشد. علاوه بر این، توانایی این ارگانیسم در تجمع فلزات کاتیونی مانند Zn^{2+} در دهه‌های اخیر اثبات شده است (Naik et al., 2022). نتایج غنی‌سازی مخمر با مواد معدنی نشان داد که سلول مخمر قابلیت غنی‌سازی با آنها را دارد (Sheykhi et al., 2019). مخمرها می‌توانند فلزات را از طریق تجمع زیستی در ساختار سلولی خود جذب کنند (Volesky et al., 1995). جذب زیستی مخمر تا حد زیادی به پارامترهایی مانند pH، نسبت یون فلزی اولیه و غلظت اولیه زیست توده، شرایط کشت، حضور لیگاند‌های مختلف و یون‌های فلزی رقابتی در محلول و تا حد محدودی به دما بستگی دارد (Wang et al., 2006). همچنین تأثیر امواج فراصوت به عنوان ابزاری برای تحریک تجمع روی بررسی و در شرایط رشد بهینه گزارش شد که در آن تجمع کل روی در مقایسه با شرایط مشابه بدون تحریک فراصوت دو برابر افزایش یافت (Esmaeili

et al., 2012) یون روی از طریق سیستم‌های حمل‌کننده اختصاصی وارد سلول مخمر می‌شود و در داخل سلول به ساختارهایی مانند پروتئین‌ها و دیگر ماکرومولکول‌ها متصل می‌گردد، که این پیوندهای آلی می‌توانند زیست‌فراهمی و جذب روی را در مقایسه با منابع معدنی افزایش دهند. (Dodic et al., 2001). بنابراین زیست‌توده مخمر، ماده‌ای کم‌هزینه محسوب می‌شود که می‌تواند برای جذب زیستی یون‌های فلزی از محلول‌های آبی مورد استفاده قرار گیرد (Savastru et al., 2022).

مخمرها به عنوان قارچ‌های تک‌سلولی به عنوان ابزارهای مؤثر در بهبود کیفیت غذایی مدرن محسوب می‌شوند (Shah et al., 2016). گونه‌های ساکارومایسس از زمان‌های قدیم به دلیل ارزش غذایی بالا، ایمنی، عدم سمیت و فراهمی زیستی مطلوب، نقش محوری در تولید غذاهای تخمیری داشته‌اند (Gaensly et al., 2014). غنی‌سازی مواد غذایی با مخمر، باعث شده است به عنوان عامل غنی‌سازی مواد غذایی، به عنوان یک استراتژی مؤثر برای افزایش ارزش تغذیه‌ای شناخته شود (Maria et al., 2022). مخمرهای غنی‌شده با روی در نقش منابع آلی این ریزمغذی، می‌توانند به عنوان مکمل غذایی منجر به افزایش زیست‌دسترسی‌پذیری و کاهش تحریکات گوارشی می‌شود (Maria et al., 2022). روی عمدتاً درون سلول‌های مخمر، در واکوئل‌ها و دیواره سلولی انباشته می‌شود، جایی که با پلی‌فسفات‌ها و اسیدهای آلی کمپلکس تشکیل می‌دهد (De Nicola et al., 2009).

مخمرهای غنی‌شده با روی، می‌توانند به‌طور بالقوه به ایجاد نان‌هایی با ارزش تغذیه‌ای بالاتر کمک کنند، بدون اینکه به فعالیت تخمیری مخمر لطمه وارد شود (Maria et al., 2022). در سال‌های اخیر، به دلیل مزایای عملیاتی مانند امکان کشت در مقیاس بزرگ، ایمنی زیستی پایین، مقرون به صرفه بودن و سهولت در مدیریت فرآیند، مخمرها به‌طور گسترده به عنوان یک زیست‌جاذب مؤثر در مطالعات تصفیه زیستی معرفی شده است (Jena et al., 2022). زیست‌جاذب‌ها به عنوان مواد طبیعی توانایی جذب و حذف فلزات سمی از محلول‌های آبی در غلظت‌های پایین (ppm تا ppb) را دارند (Volesky et al., 1995). گروه‌های عاملی مختلف در ساختار زیست‌توده مخمر، از جمله

¹ Zinc deficiency

هنگامی که در فرآیندهای نانوایی به کار رود، می‌تواند به عنوان یک منبع غذایی مطمئن برای پیشگیری از عوارض ناشی از کمبود روی در انسان مطرح شود (Esfahani et al., 2023). در داروسازی، علاقه فزاینده‌ای به استفاده از ساکارومایسس سرویزیه، به عنوان یک عامل پروبیوتیک، نه تنها برای سلامت انسان، بلکه برای ارتقای رشد و سلامت حیوانات نیز وجود داشته است (Azizah et al., 2021).

این تحقیق با هدف طراحی و بهینه‌سازی یک فرآیند نوین غنی‌سازی مخمر ساکارومایسس سرویزیه با ریزمغذی‌روی، به منظور رفع شکاف تحقیقاتی در زمینه تولید این مکمل‌های زیستی در مقیاس بزرگ، انجام شد. استراتژی اصلی مورد استفاده، غنی‌سازی پس از مرحله رشد سلولی در شرایط قابل مقیاس‌گذاری صنعتی بود. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند زمینه‌ساز ارائه راهکارهای عملی برای تولید نان‌های غنی‌شده با ریزمغذی‌ها با زیست‌فراهمی بالا شده و بدین ترتیب به بهبود وضعیت تغذیه‌ای جمعیت‌های در معرض خطر کمبود روی کمک نماید.

مواد و روش‌ها

تمام مواد شیمیایی از شرکت مرک (آلمان) با خلوص شیمیایی بالا تهیه شدند و از خلوص آزمایشگاهی برخوردار بودند و به همان صورت دریافتی مورد استفاده قرار گرفتند، از جمله دی‌هیدروژن فسفات پتاسیم (KH_2PO_4) ۱۳۶/۱ گرم بر مول، هیدروکلریک اسید (HCl ۳۶/۵ گرم بر مول)، هیدروکسید سدیم (NaOH ۳۹/۵ گرم بر مول) و سولفات روی (ZnSO_4 ۱۶۱/۵ گرم بر مول). ملاس از شکت ملاس قزوین با بریکس ۴۵ و آب دیونیزه با برند زلال مصرف شد. همچنین مخمر ساکارومایسس سرویزیه، از مرکز تحقیقات زنجان تأمین شد.

- آماده‌سازی محلول آبی سولفات روی

محلول آبی سولفات روی با توزین مقادیر مورد نیاز و حل کردن آن‌ها در حجم مشخصی از آب تهیه شد. سپس محلول حاصل پیش از مصرف به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر در اتوکلاو استریل گردید.

گروه‌های آمینی، کربوکسیلی و هیدروکسیل در پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها، در فرایند به‌دام‌انداختن یون‌های فلز نقش کلیدی دارند (Jena et al., 2022). پارامترهای فیزیکوشیمیایی از جمله pH محلول، دما، غلظت فلز و زمان تماس زیست‌توده، باید در طراحی و بهینه‌سازی آزمایش‌ها و کاربردهای تجاری مدنظر قرار گیرند (Farhan et al., 2015). مطالعات نشان می‌دهند که ساکارومایسس سرویزیه می‌تواند یون‌های فلزی را از طریق چند مکانیسم جذب کند که شامل جذب سطحی، تبادل یونی و شلاته‌شدن است (Jena et al., 2022). جذب زیستی مخمر تا حد زیادی به پارامترهایی مانند حضور لیگاند‌های مختلف و یون‌های فلزی رقابتی در محلول بستگی دارد (Wang et al., 2006). نتایج غنی‌سازی مخمر با سایر مواد معدنی نشان داد که سلول مخمر قابلیت غنی‌سازی با آنها را دارد (Sheykhi et al., 2019). نوع لیگاند‌های در دسترس برای اتصال فلز، وضعیت فیزیولوژیک سلول‌های مخمر (زنده یا غیرزنده)، ویژگی‌های شیمیایی فلزات هدف و خصوصیات محیطی مانند pH و حضور یون‌های رقابتی می‌توانند بر ظرفیت و سرعت جذب فلزات تأثیرگذار باشند (Jena et al., 2022). محاسبات ترمودینامیکی نشان داد که جذب زیستی فلز یک فرآیند خودبه‌خودی است. گروه‌های OH ، $\text{C}=\text{C}$ ، $\text{C}=\text{O}$ ، $\text{C}-\text{H}$ و $\text{C}-\text{N}$ مکان‌های اصلی جذب زیستی یون‌های فلزی بودند (Zinicovscaia et al., 2020). چالش‌ها در بهبود ظرفیت جذب و اثر پیش‌تیمار یکی از چالش‌های اساسی در پژوهش‌های مربوط به زیست‌جذب، بهبود ظرفیت جذب مخمرهاست (Volesky et al., 1995). مدل ایزوترم جذب روی نشان‌دهنده تشکیل لایه تک‌سطحی جذب بر سطح زیست‌جاذب است (Farhan et al., 2015). زیست‌توده مخمر به دلیل ویژگی‌های ساختاری‌اش، ماده‌ای کم‌هزینه محسوب می‌شود که می‌تواند با موفقیت برای جذب زیستی یون‌های فلزی از محلول‌های آبی مورد استفاده قرار گیرد (Savastru et al., 2022).

نتایج ترمودینامیکی حاصل از مطالعه جاذب زیستی برای حذف فلزات سنگین نشان می‌دهد بهره‌برداری تجاری از ساکارومایسس سرویزیه، یا گونه‌های قارچی مشابه به عنوان جاذب‌های زیستی فلزی امکان‌پذیر است (Naeem et al., 2006). زیست‌توده مخمر غنی‌شده با یون روی،

– کشت مخمر و شرایط غنی سازی

کشت مخمر ساکارومایسس سرویزیه، برای مراحل بعدی غنی سازی با روی مطابق با روش های استاندارد انجام شد (Wang et al., 2014). غنی سازی در شرایط کنترل شده دما، pH و زمان تماس انجام شد تا تجمع بهینه روی در سلول ها حاصل شود (Jena et al., 2022). مخمر بعد از فاز رشد که شامل محیط کشت و مخمر بود با استفاده از سانتریفیوژ جدا شد. در مرحله بعد، ضمن همزدن مکانیکی، غلظت های مختلفی از محلول آبی سولفات روی به همزن افزوده شد و اختلاط با سرعت ثابت برای مدت زمان مشخص ادامه یافت. پس از سانتریفیوژ در ۱۰,۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، مخلوط نهایی سه بار با آب دیونیزه شستشو داده شد تا یون های روی جذب شده بر سطح مخمر حذف شوند. سپس محصول در آن در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد خشک و به مدت ۱۸ ساعت در دسیکاتور نگهداری شد تا به تعادل برسد. شرایط ویژه ای مانند دما، pH، غلظت، زمان و سرعت همزدن برای فرایند غنی سازی بهینه سازی شدند.

– اندازه گیری جذب کل روی در سلول های مخمر

برای تعیین میزان روی جذب شده توسط سلول های ساکارومایسس سرویزیه، در طول متابولیسم، از روش اسپکتروفتومتری جذب اتمی (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS) استفاده شد. به این منظور، نمونه ای شامل ۰,۲ گرم پودر مخمر غنی شده با روی در فلاسکی قرار داده شد و ۱۰ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ به آن اضافه گردید. مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۵ °C حرارت داده شد تا هضم اولیه انجام گیرد. پس از خنک شدن، ۲ میلی لیتر اسید هیدروکلریک غلیظ اضافه شده و مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ °C حرارت داده شد تا فرایند هضم تکمیل شود. محلول حاصل پس از خنک شدن از فیلتر ۰,۴۵ میکرومتر عبور داده شد و با آب دیونیزه به حجم ثابت رقیق گردید. در نهایت، میزان روی موجود در نمونه ها با تزریق محلول نهایی به اسپکتروفتومتر جذب اتمی اندازه گیری شد. این روش هضم اسیدی متوالی و رقیق سازی دقیق، امکان تعیین دقیق غلظت کل فلز در زیست توده مخمر را فراهم می کند و با پروتکل های

استاندارد اندازه گیری فلزات در سلول های مخمر مطابقت دارد (Sun et al., 2022).

محلول های هضم شده با استفاده از اسپکتروفتومتر جذب اتمی (AAS) تجزیه و غلظت کل روی در سلول های مخمر اندازه گیری شد. اندازه گیری ها در شرایط بهینه دستگاه (طول موج مناسب، جریان گازهای حامل و استانداردهای مرجع) انجام شد تا دقت و صحت داده ها تضمین گردد (Do Nascimento et al., 2019).

همه مراحل با کنترل دما و pH انجام شد. نمونه ها در شرایط استریل آماده شدند تا آلودگی های میکروبیایی اثرگذار نباشند.

– ایزوترم جذب^۱

برای بررسی تأثیر غلظت اولیه یون های روی بر روی ایزوترم های تعادلی، محلول های آبی سولفات روی با غلظت های متفاوت تهیه شد. pH هر نمونه با استفاده از pH متر اندازه گیری گردید و ۲۵ میلی لیتر از هر محلول به ارلن مایرهای جداگانه منتقل شد. به منظور بررسی پدیده جذب، ۸ گرم مخمر به عنوان جاذب به هر ارلن افزوده شد و مخلوط ها تحت همزدن با یک شیکر مکانیکی در دمای ۵-۰ °C قرار گرفتند، به گونه ای که غلظت مطلوب جاذب، مقدار KH_2PO_4 و سرعت همزدن ثابت نگه داشته شد. بر اساس نتایج حاصل از آزمایش های پیشین، زمان تماس ۶۰ دقیقه برای دستیابی به وضعیت تعادلی بین فاز محلول و سطح جاذب انتخاب گردید. این رویکرد امکان تعیین ایزوترم های تعادلی جذب را در شرایط ثابت فراهم می سازد و پیکربندی آزمایشی مطابق روش های متداول در مطالعات جذب بیوماس گزارش شده است (Do Nascimento et al., 2019). راندمان حذف روی از محلول با استفاده از رابطه (۱-۲) محاسبه شد:

معادله (۱-۲)

$$\% \text{ Removal Efficiency} = (\text{Ci} - \text{Ce}) / \text{Ci} * 100$$

که در آن Ci غلظت اولیه یون های Zn(II) (میلی گرم در لیتر) قبل از افزودن زیست توده و Ce غلظت تعادلی یون ها (میلی گرم در لیتر) پس از افزودن زیست توده است.

¹ Adsorption isotherm

- مدل‌های تعادلی^۱

$$q_e = (q_e b C_e) / (1 + b C_e) \quad \text{معادله (۳-۲)}$$

این معادله ظرفیت بیشینه جذب به ازای واحد جرم جذب را برای پوشش کامل تک‌لایه‌ای سطح (میلی‌گرم بر گرم) توصیف می‌کند. ثابت موجود در معادله نشان دهنده انرژی یا تمایل جذب (لیتر بر میلی‌گرم) است. این معادله را می‌توان خطی‌سازی و طبق معادله (۴-۲) نشان داد:

$$C_e/q_e = C_e/(q_m) + 1/(b q_m) \quad \text{معادله (۴-۲)}$$

با رسم نمودار C_e/q_e در مقابل C_e ، یک خط مستقیم به دست می‌آید که شیب و عرض از مبدا آن به ترتیب مربوط به q_m و b است. یکی از ویژگی‌های مهم ایزوترم لانگمویر، عامل جداسازی بدون بعد (R_1) است که در معادله (۵-۲) تعریف می‌شود:

$$R_1 = 1/(1 + b C_i) \quad \text{معادله (۵-۲)}$$

رابطه بین مقدار R_1 و نوع ایزوترم لانگمویر به صورت زیر است:

اگر مقدار $R_1 = 0$ باشد، نوع ایزوترم غیرقابل برگشت

اگر مقدار $R_1 = 1$ باشد، نوع ایزوترم خطی

اگر مقدار $0 < R_1 < 1$ باشد، نوع ایزوترم مطلوب

اگر مقدار $R_1 > 1$ باشد، نوع ایزوترم نامطلوب است

- ایزوترم فروندلیچ^۲

یکی دیگر از مدل‌های کاربرد برای توصیف سیستم‌های جذب، ایزوترم فروندلیچ است. این مدل فرض می‌کند که مکان‌های جذب روی سطح جذب ناهمگن هستند، به این معنا که تمایل آن‌ها برای جذب ماده جذب شونده یکسان نیست و در نتیجه، انرژی‌های سطحی یکنواخت نمی‌باشند. یکی دیگر از مدل‌های رایج برای توصیف سیستم‌های جذب، ایزوترم فروندلیچ (Freundlich adsorption isotherm) است. این مدل بر این فرض استوار است که سطح جذب ناهمگن است و تمام مکان‌های جذب تمایل یکسانی برای جذب مولکول‌های حل شده ندارند. به عبارت دیگر، انرژی جذب در طول سطح جذب یکنواخت نبوده و متغیر است. ایزوترم فروندلیچ اغلب برای توصیف جذب چندلایه و فرآیندهای غیرخطی کاربرد

پدیده جذب در سیستم‌های جامد - مایع به صورت تجمع جزء حل شده بر روی سطح جذب^۳ تعریف می‌شود تا زمانی که بین فاز مایع و فاز جامد تعادل دینامیکی برقرار شود. در حالت تعادل، سرعت جذب و سرعت آزادسازی جزء حل شده از سطح جامد برابر می‌شود و غلظت آن در فاز مایع و مقدار جذب شده روی واحد جرم جذب در وضعیتی پایدار قرار می‌گیرد. این توزیع غلظت در شرایط تعادلی در قالب یک ایزوترم جذب^۴ بیان می‌شود که ارتباط بین مقدار جزء جذب شده و غلظت تعادلی در محلول در دمای ثابت را توصیف می‌کند. مدل‌های ایزوترم جذب، از جمله معادلات لانگمویر و فروندلیچ^۵، به طور گسترده‌ای برای مدل‌سازی و تفسیر داده‌های تعادلی به کار می‌روند و مبنای بسیاری از تحلیل‌های طراحی و تفسیر مکانیسم‌های جذب هستند (Norozzi et al., 2013) (Foo et al., 2010).

پس از فرایند جذب، غلظت باقی‌مانده بر سطح جذب در تعادل (q_e) با استفاده از رابطه (۶-۲) محاسبه می‌شود:

$$q_e = (C_i - C_e) / m * V \quad \text{معادله (۶-۲)}$$

که در آن m جرم جذب (گرم) و V حجم محلول (لیتر) است. این معادله مقدار جزء جذب شده در واحد وزن جذب در حالت تعادل (میلی‌گرم بر گرم) را تعیین می‌کند.

- ایزوترم لانگمویر^۶

ایزوترم جذب لانگمویر (Langmuir adsorption isotherm) بر این فرض استوار است که بیشینه جذب زمانی رخ می‌دهد که یک تک‌لایه از مولکول‌های جذب شونده سطح جذب را به طور کامل بپوشاند. این مدل فرض می‌کند که انرژی جذب در تمامی نقاط سطح ثابت است و مولکول‌های جذب شده تغییر مکان جانبی روی سطح جذب ندارند. رابطه ریاضی این ایزوترم امکان تعیین ظرفیت جذب ماکزیمم (q_{max}) و ثابت تعادل جذب (K_L) را فراهم می‌کند و به طور گسترده برای توصیف رفتار جذب در سیستم‌های جامد - مایع به کار می‌رود (Foo et al., 2010).

شکل کلی معادله لانگمویر به صورت معادله (۳-۲) بیان می‌شود:

¹ Adsorption equilibrium ² Adsorbent

⁴ Langmuir and Freundlich equations

³ Adsorption isotherm

⁵ Langmuir isotherm

⁶ Freundlich isotherm

دارد و به شکل تجربی رابطه بین غلظت تعادلی محلول (Ce) و مقدار جذب شده بر واحد جرم جاذب (qe) را بیان می‌کند (Norozi et al., 2013).

ایزوترم فروندلیچ را می‌توان به دو صورت غیرخطی و خطی بیان کرد که به ترتیب نشان داده می‌شوند:

$$q_e = Kf C_e^{\frac{1}{n}} \quad \text{معادله (۶-۲)}$$

$$\ln q_e = \ln Kf + \frac{1}{n} \ln C_e \quad \text{معادله (۷-۲)}$$

ثابت‌های Kf و n پارامترهای تجربی هستند که از طریق آزمایش تعیین می‌شوند و به ترتیب با ظرفیت جذب و شدت جذب مرتبط هستند. با رسم نمودار $\ln q_e$ در مقابل $\ln C_e$ یک خط مستقیم حاصل می‌شود که شیب آن برابر با $(1/n)$ و عرض از مبدأ آن برابر با Kf است.

طراحی آزمایش

به منظور شناسایی عوامل مؤثر بر فرایند غنی‌سازی مخمر با یون روی، از روش آماری طراحی پلاکت - برمن استفاده شد. این روش یک نوع طراحی عاملی دو سطحی است که امکان غربالگری مؤثر تعداد زیادی از متغیرها را با تعداد آزمایش‌های نسبتاً کم فراهم می‌کند و در آن فرض می‌شود که تعامل‌ها بین عوامل ناچیز هستند و فقط اثرهای اصلی عوامل مورد سنجش قرار می‌گیرد. در این مطالعه، متغیرهایی که ممکن است بر بازده نهایی رشد سلول، زیست‌تبدیلی و مقدار کل جذب روی در سلول‌های مخمر تأثیرگذار باشند شامل غلظت مخمر، غلظت یون روی، ویتامین B₁، KH₂PO₄، زمان افزودن، pH، مدت زمان

۲۲

غنی‌سازی، دما، شکر، نوع آب مصرفی و سرعت هم‌زدن بودند. هر متغیر در دو سطح (بالا و پایین) مورد بررسی قرار گرفت که در جدول ۱ ارائه شده است؛ سطوح بالا و پایین با علامت‌های «+» و «-» نشان داده شده‌اند. ماتریس ۱۲ مرحله‌ای پلاکت - برمن و کدگذاری مربوط به آن در جدول ۲ نشان داده شده است. انتخاب سطوح عوامل بر اساس آزمایش‌های پیشین یا منابع علمی معتبر انجام شد، به‌گونه‌ای که یکی از دو سطح به نقطه بهینه نزدیک باشد. داده‌های حاصل از این طرح با استفاده از نرم‌افزار Design Expert تحلیل شدند و پس از غربالگری، متغیرهای با اثرگذاری بالا شناسایی و اثرات مثبت و منفی آن‌ها تعیین گردید. از میان متغیرهای دارای اثر مثبت، آن‌هایی که احتمال اثرگذاری بیش از ۷۰٪ داشتند انتخاب شدند و مقادیر بهینه آن‌ها با استفاده از روش سطح پاسخ^۱ و بر اساس بهترین پیش‌بینی‌های نرم‌افزار تعیین شد. این رویکرد طراحی امکان شناسایی مؤثرترین پارامترها را در سیستم‌های پیچیده با عوامل زیاد فراهم می‌کند و در مطالعات بهینه‌سازی فرایندهای جذب و بیوسرام‌شدن به‌طور گسترده به‌کار رفته است (Jena et al., 2022).

طراحی پلاکت - برمن یک روش غربالگری آزمایش‌های عاملی دو سطحی است که اجازه می‌دهد تا تعداد زیادی متغیر را با حداقل تعداد آزمون‌ها بررسی شوند و متغیرهای دارای بیشترین اثر اصلی بر پاسخ شناسایی شوند، قبل از آن‌که به تحلیل‌های بهینه‌سازی دقیق‌تر مانند روش سطح پاسخ (RSM) پرداخته شود.

جدول ۱- متغیرهای تأثیرگذار بر غنی‌سازی مخمر با روی

Table 1- Variables affecting yeast enrichment with zinc

Number	Variable	Code	Unit	Low Level(-)	High Level(+)
X1	Yeast concentration	A	g/L	0.16	0.32
X2	Iron	B	g	2	3
X3	Vitamin B1	C	mg	0	5
X4	KH ₂ PO ₄	D	g/mL	0	0.2
X5	Addition time	E	min	0	+
X6	pH	F	-	0	-1
X7	Enrichment time	G	min	30	60
X8	Temperature	H	°C	0-5	10-15
X9	Sugar	I	g	0	25
X10	Type of water used	J	-	Deionized water	city water
X11	Stirring speed	K	rpm	200	400

¹ Response Surface Methodology

جدول ۲- طرح پلاکت - برمن با ۱۲ اجرا برای غنی سازی مخمر با روی

Table 2 - Plaqueette-Berman design with 12 runs for yeast enrichment with zinc

RUN	Variable										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
2	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
3	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
4	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
7	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

یافته‌ها

- فرایند تولید مخمر

فرایند تولید مخمر ساکارومایسس سرویزیه، شامل چندین مرحله کلیدی است: تکثیر، تخمیر، برداشت و خشک کردن که هر یک از این مراحل باید به دقت کنترل شوند تا هم بازده و هم کیفیت محصول نهایی بهینه شود. در فرایند تولید مخمر از یک همزن مغناطیسی استفاده شد و دمای آزمایشگاه در حدود ۲۶ درجه سانتی گراد ثابت نگه داشته شد. به منظور حفظ دما در بازه‌های ۵-۵ و ۵-۱۵ درجه سانتی گراد، از حمام آب یخ استفاده گردید. این پژوهش امکان غنی سازی مخمر نانویی با روی را بررسی کرد. بررسی‌های اولیه نشان دادند که آزمایش‌ها با موفقیت انجام شده‌اند. برای ارزیابی عوامل مؤثر بر فرایند زیست‌تبدیل روی در مخمر نانویی، از طرح آزمایشی پلاکت - برمن استفاده شد. شکل ۱ مقایسه میانگین پاسخ روی به مخمر (میلی گرم بر گرم) را در تیمارهای آزمایشی نشان می‌دهد. پس از ورود نتایج آزمایش‌ها به نرم افزار Design Expert، مدل اثرات اصلی انتخاب و تحلیل واریانس (ANOVA) انجام شد. مدل تحت شرایط ایده‌آل تأیید گردید، به طوری که مقدار R^2 برابر با ۱ و خطا صفر بود که نشان‌دهنده انطباق کامل نتایج پیش‌بینی شده مدل با نتایج واقعی بود. در نتیجه، هیچ یک از متغیرها دارای مقدار p معنی‌دار نبودند و نرم‌افزار هیچ مقدار عددی را گزارش نکرد.

- غربالگری متغیرها با اثرگذاری بالا

به منظور غربالگری متغیرهای مؤثر، از روش ارزیابی

تأثیر^۱ برای حذف متغیرهای خارج از محدوده مطلوب استفاده شد و نمودار نرمال برای تحلیل انتخاب گردید. با توجه به بررسی انجام یافته مسیر غربالگری برای متغیر وابسته روی به شرح زیر انجام و نتایج استخراج گردید:

پس از ورود نتایج آزمون‌ها در نرم‌افزار مدل main effects را انتخاب و (ANOVA) Analysis Of Variance بررسی و با تأیید مدل در شرایط ایده‌آل انتخاب گردید. از این طریق، متغیرهایی با اثرات مثبت و منفی شناسایی شدند. در میان متغیرهای دارای اثر مثبت، آن‌هایی که احتمال اثرگذاری بیش از ۷۰٪ داشتند انتخاب شدند. غربالگری نتایج آزمون‌های انجام یافته بر اساس طرح Plackett-Burman با استفاده از نرم افزار Design Expert استفاده شد. از یازده متغیر مستقل، ۹ مورد Numerical Variables و ۲ مورد Categorical Variables بودند و متغیر وابسته هم شامل Zn می‌باشد.

با توجه به مقادیر بهینه، متغیرهای با تأثیر مثبت با استفاده از روش سطح پاسخ و بر اساس بهترین ارقام انتخاب شده توسط نرم‌افزار، پیش‌بینی شدند. در این مسیر متغیرهای با تأثیر مثبت و تأثیر منفی مشخص و از متغیرهای با تأثیر مثبت، متغیرهای با تأثیر مثبت و احتمال بالای ۷۰ درصد برای طراحی آزمایش برای دستیابی به نتایج مطلوب سه متغیرقند، زمان و غلظت KH_2PO_4 انتخاب شد.

- روش سطح پاسخ

با استفاده از نرم‌افزار Design Expert، روش سطح پاسخ^۲ برای بهینه‌سازی فرایند به کار گرفته شد. این بهینه‌سازی بر سه متغیر منتخب از طراحی پلاکت-برمن

¹ Effect Method² Response Surface Methodology

مؤثر بر تولید مخمر غنی‌شده با روی در جدول ۴ خلاصه شده‌اند.

– تاثیر مقدار ثابت شکر

شکل ۲ نمودار تغییرات اثر متقابل زمان و غلظت KH_2PO_4 را زمانی که مقدار شکر در سه سطح ثابت است نشان می‌دهد.

– تاثیر زمان ثابت

شکل ۳ نمودار تغییرات اثر متقابل شکر و غلظت KH_2PO_4 را زمانی که در سه سطح ثابت است نشان می‌دهد.

نظیر زمان، غلظت KH_2PO_4 و مقدار شکر متمرکز بود. بر اساس جدول ۳، تعداد ۱۷ آزمایش برای روی انجام شد که شامل ۵ تکرار در نقطه مرکزی بودند. هدف، یافتن مقادیر بهینه برای هر یک از این ۱۷ آزمایش بر اساس تحلیل RSM و انتخاب بهترین نتایج مطابق پیشنهاد نرم‌افزار بود. پس از تحلیل داده‌ها، مقادیر بهینه تعیین شدند.

– نتایج اثرات متقابل و اصلی مؤثر بر تولید مخمر غنی شده با روی

پس از انجام آزمایش‌ها، غلظت‌های بهینه روی بر اساس تحلیل RSM و با هدف بیشینه سازی جذب یا زیست‌فراهمی این عنصر تعیین شد. اثرات متقابل اصلی

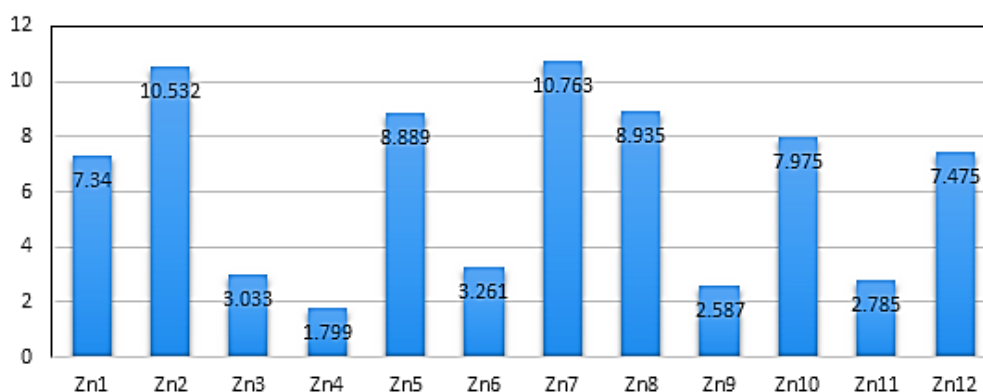


Figure 1 – Comparison of mean zinc response to yeast (mg/g) in experimental treatments

شکل ۱ – مقایسه میانگین پاسخ روی به مخمر (میلی-گرم بر گرم) در تیمارهای آزمایشی

جدول ۳- طراحی آزمایش با استفاده از RSM برای روی با ۱۷ آزمایش و ۵ تکرار در نقطه مرکزی

Table 3 - Experimental design using RSM for zinc with 17 experiments and 5 replications at the central point

Test	Standard Deviation Std	Time Minutes	KH_2PO_4 gr/l	Sugar gr	Response Zinc/Yeast(mg/g)
1	7	30	0.10	25	7.739
2	11	45	0	25	10.067
3	15	45	0.10	12.5	9.849
4	17	45	0.10	12.5	9.849
5	5	30	0.10	0	10.198
6	2	60	0	12.5	8.618
7	4	60	0.20	12.5	9.671
8	6	60	0.10	0	11.682
9	1	30	0	12.5	7.749
10	16	45	0.10	12.5	9.849
11	12	45	0.12	25	7.737
12	14	45	0.10	12.5	9.849
13	9	45	0	0	8.569
14	8	60	0.10	25	9.467
15	3	30	0.20	12.5	7.501
16	13	45	0.10	12.5	9.849
17	10	45	0.20	0	10.936

جدول ۴- اثرات متقابل و اصلی موثر بر تولید مخمر غنی شده با روی

Table 4 - Interactions and main effects affecting the production of zinc-enriched yeast

A-Time	Main effect	Important
B-KH ₂ PO ₄	Main effect	Unimportant
C-Sugar	Main effect	Important
AB	Interaction effect	Unimportant
AC	Interaction effect	Unimportant
BC	Interaction effect	Important
A ²	Quadratic effect (square term)	Important
B ²	Quadratic effect (square term)	Unimportant
C ²	Quadratic effect (square term)	Important

Design-Expert® Software

Zn/Yeast

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

11.682

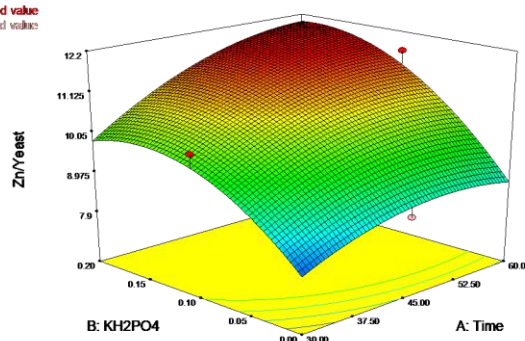
7.501

X1 = A: Time

X2 = B: KH₂PO₄

Actual Factor

C: Sugar = 0.00



Design-Expert® Software

Zn/Yeast

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

11.682

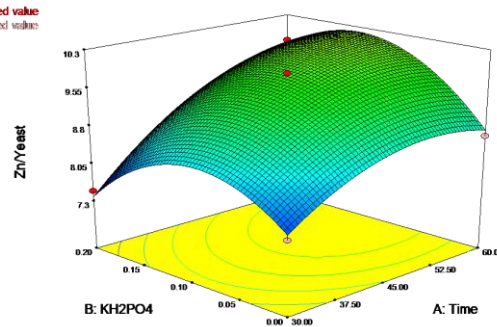
7.501

X1 = A: Time

X2 = B: KH₂PO₄

Actual Factor

C: Sugar = 12.50



Design-Expert® Software

Zn/Yeast

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

11.682

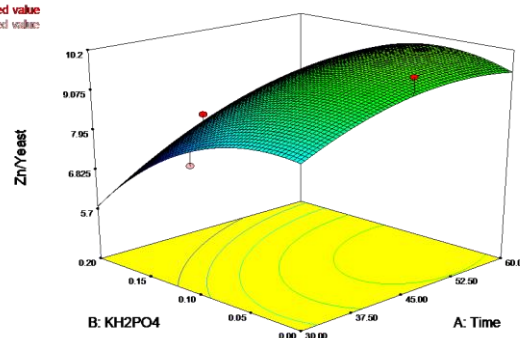
7.501

X1 = A: Time

X2 = B: KH₂PO₄

Actual Factor

C: Sugar = 25.00

Figure 2 – 3D plots for the effects of varying sugar on KH₂PO₄ concentration and timeشکل ۲ – نمودارهای سه بعدی برای اثرات متغیر شکر بر غلظت KH₂PO₄ و زمان

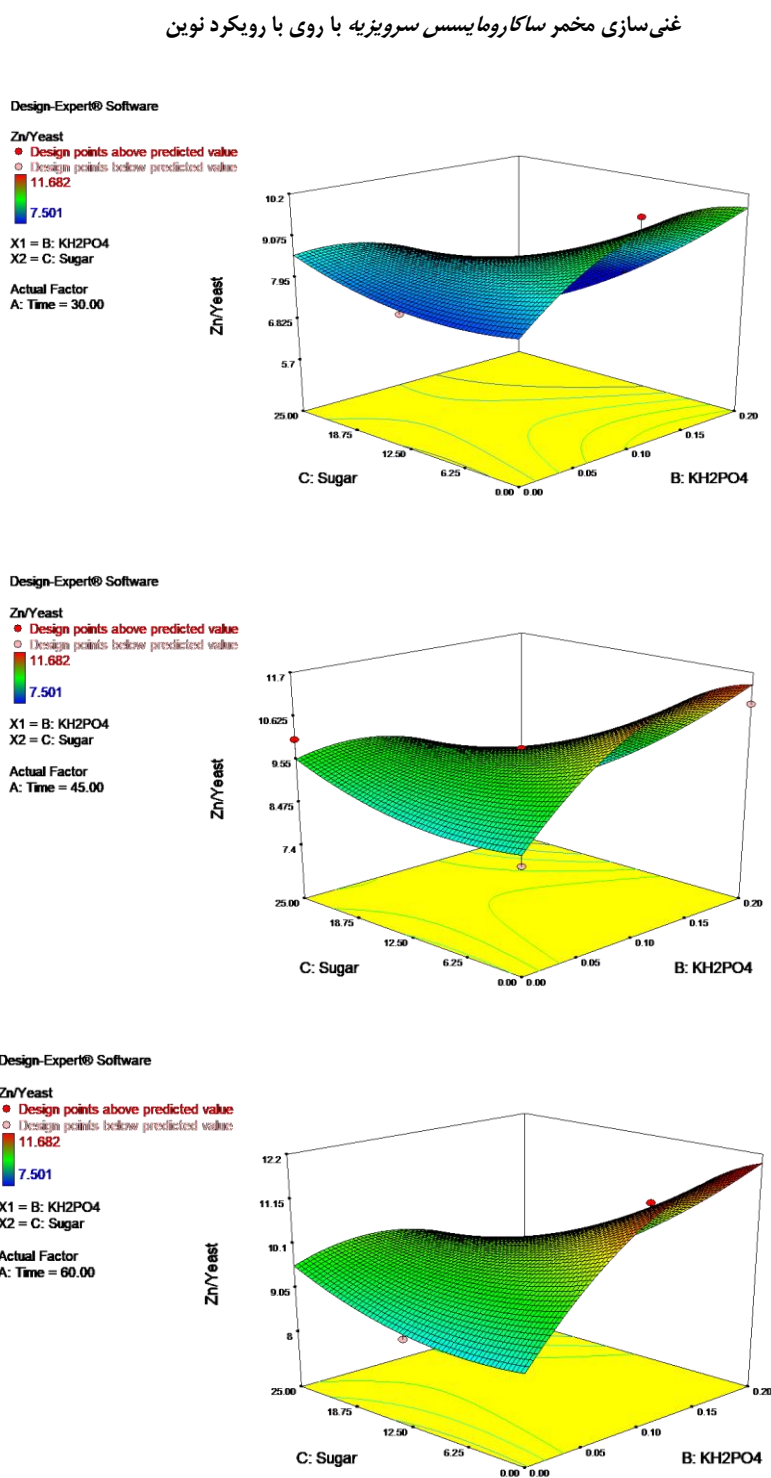


Figure 3 – 3D plots for time-varying effects on KH₂PO₄ and sugar concentrations
 شکل ۴ – نمودارهای سه بعدی برای اثرات متغیر زمان بر غلظت KH₂PO₄ و شکر

۵۹/۱۵ دقیقه، غلظت KH₂PO₄ برابر با ۰/۱۳ گرم بر میلی‌لیتر و شکر ۰/۱۱ گرم. پیش‌بینی می‌شود که تحت این شرایط بهینه، محتوای روی ۱۱/۷۲ با فاصله اطمینان ۹۵٪ از ۱۰/۹۰ تا ۱۲/۵۵ باشد، همانطور که در جدول ۵ و ۶ آمده است.

– بهینه‌سازی برای به حداکثر رساندن بازده روی انجام شد که منجر به چندین نقطه بهینه با عملکرد مطلوب گردید. با استفاده از یک تابع مطلوبیت، مقدار ایده‌آل یک تعیین شد. شرایط بهینه پیشنهادی به شرح زیر است: زمان

- نتایج ایزوترم جذب

هر دو مدل ایزوترم لانگمویر و فروندلیچ برای تجزیه و تحلیل داده‌های جذب تجربی مورد استفاده قرار گرفتند. همانطور که در جدول ۷ نشان داده شده است، ظرفیت حذف و مقادیر جذب Zn(II) در غلظت‌های اولیه مختلف

ارائه شده است. بر اساس این نتایج، شکل ۵ رابطه بین غلظت اولیه Zn(II) و ظرفیت جذب را نشان می‌دهد، در حالی که شکل ۶ همبستگی بین مقدار Zn(II) جذب شده و غلظت تعادلی آن در محلول را نشان می‌دهد. شکل ۵ نشان می‌دهد که افزایش غلظت اولیه Zn(II) با کاهش درصد ظرفیت حذف مطابقت دارد. در مقابل، شکل ۶ نشان

می‌دهد که با افزایش مقدار Zn(II) جذب شده، غلظت تعادلی Zn(II) در محلول نیز افزایش می‌یابد.

- مدل‌های تعادلی

شکل ۶ ایزوترم جذب فروندلیچ Zn(II) را بر روی زیست‌توده مخمر و شکل ۷ ایزوترم جذب لانگمویر Zn(II) را بر روی زیست‌توده مخمر نشان می‌دهند. همچنین جدول ۸ نتایج مقایسه و میزان مطابقت مدل لانگمویر و فروندلیچ با داده‌های جذب Zn(II) روی زیست‌توده مخمر مورد آزمایش را نشان می‌دهد.

جدول ۵- نقاط بهینه پیشنهادی

Table 5- Proposed optimal points

Factor	Name	Level	Low Level	High Level	Standard Deviation	Coding
A	Time (minutes)	59.15	30	60	0	Actual
B	KH ₂ PO ₄ (g/mL)	0.13	0	0.20	0	Actual
C	Sugar (grams)	0.11	0	25	0	Actual

جدول ۶- مقدار روی پیش بینی شده

Table 6 - Predicted zinc content

Response	Prediction	Lower 95% CI	Upper 95% CI	Lower 95% PI	Upper 95% PI
Zinc/Yeast(mg/g)	11.7216	10.90	12.55	10.44	13.00

جدول ۷- ظرفیت حذف و مقادیر جذب Zn(II) در غلظت‌های اولیه مختلف

Table 7- Removal capacity and adsorption values of Zn (II) at different initial concentrations

RUN	Initial concentration Zn ²⁺ (g/L) C _i	Equilibrium concentration of Zn ²⁺ (g/L) C _e	Adsorbed Zn (II) (mg/g) q _e	Percentage of removal efficiency
A	18.10	11.26	13.60	37.80
B	13.40	8.29	10.90	38.10
C	7.90	4.82	7.90	38.50
D	4.10	2.50	4.30	39.01

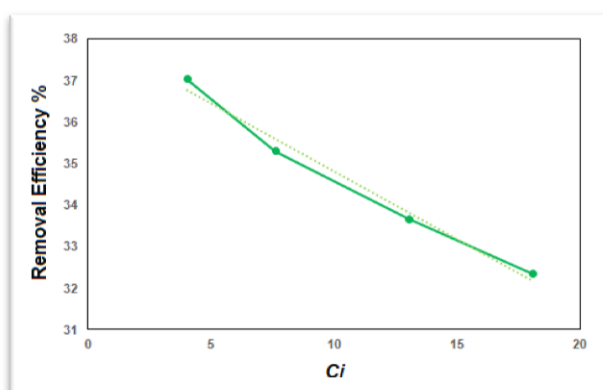


Figure 5 – Relationship between initial zinc concentration and adsorption capacity

شکل ۵ - رابطه بین غلظت اولیه روی و ظرفیت جذب

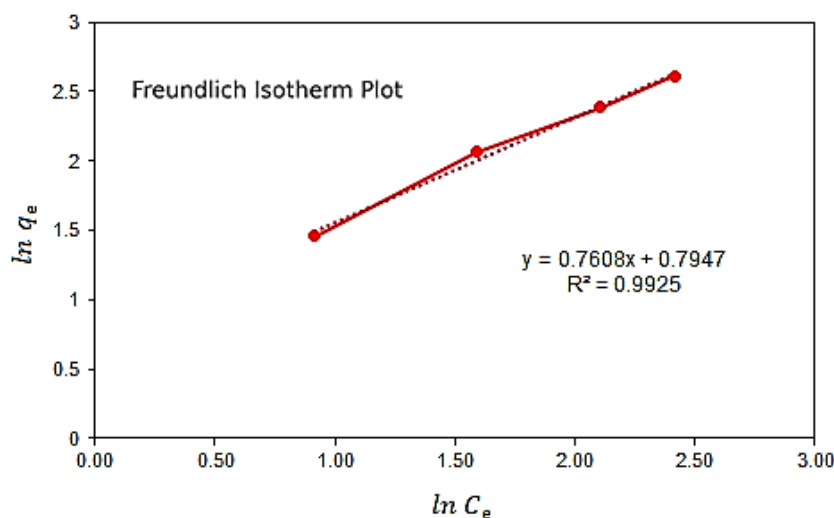


Figure 7 – Freundlich adsorption isotherm of Zn (II) on yeast biomass
 شکل ۶- ایزوترم جذب فروندلیچ Zn(II) روی زیست‌توده مخمر

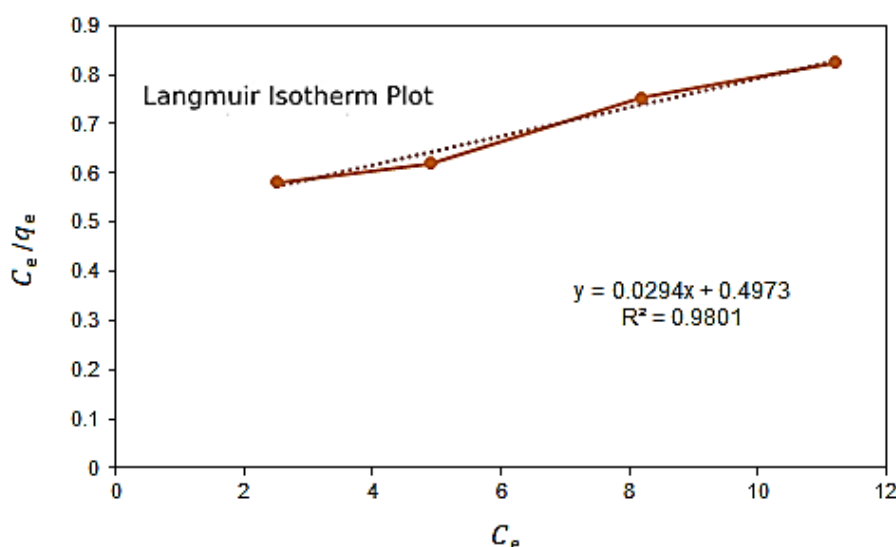


Figure 8 – Langmuir adsorption isotherm of Zn (II) on yeast biomass
 شکل ۷- ایزوترم جذب لانگمویر Zn(II) روی زیست‌توده مخمر

جدول ۸- مطابقت مدل لانگمویر و فروندلیچ با داده‌های جذب Zn(II) روی زیست‌توده مخمر

Table 8- Matching of Langmuir and Freundlich models with Zn (II) adsorption data on yeast biomass

Metal ion	Isotherm model	Parameter	Adsorbent
Zn (II)	Langmuir	Rl	0.245
		qm	34.11
		R2	0.9801
	Freundlich	Kf	0.7947
		1/n	0.7608
		R2	0.9925

تحلیل رگرسیونی داده‌ها رابطه بین متغیرهای عملیاتی و میزان جذب روی را توصیف می‌کند. داده‌ها با استفاده از تحلیل آماری معتبر بررسی شده و اثرات اصلی و متقابل

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از رویکرد طراحی آزمایش، امکان شناسایی شرایط بهینه با حداقل تعداد آزمایش را فراهم کرده است. مدل ریاضی حاصل از

بحث

مقدار صفر شکر می‌باشد که به لحاظ اقتصادی مطلوب است.

در تحلیل اثرات متقابل زمان و شکر، غلظت KH_2PO_4 در سه سطح ثابت نگه داشته شد. شکل ۳ نشان می‌دهد که وقتی غلظت KH_2PO_4 در صفر نگه داشته می‌شود، کمترین مقادیر محصول در بازه زمانی ۳۰ الی ۳۵ دقیقه و مقادیر شکر از ۰ تا ۲۰ گرم به دست می‌آید. وقتی غلظت KH_2PO_4 در ۰/۱ گرم بر میلی‌لیتر است، کمترین مقادیر محصول در بازه زمانی ۳۰ الی ۳۵ دقیقه و مقادیر شکر از ۱۲ تا ۲۵ گرم و بیشترین مقادیر محصول در بازه زمانی ۴۰ الی ۶۰ دقیقه و مقادیر شکر از ۰ تا ۳۰ گرم به دست می‌آید. با غلظت ثابت KH_2PO_4 در ۰/۲ گرم بر میلی‌لیتر، کمترین مقادیر محصول در بازه زمانی ۳۰ الی ۶۰ دقیقه و مقادیر شکر از ۶/۵ تا ۲۵ گرم و بیشترین مقادیر محصول در بازه زمانی ۴۰ الی ۶۰ دقیقه و مقادیر شکر از ۰ تا ۵۰ گرم به دست می‌آید که به لحاظ اقتصادی مطلوب است.

در تحلیل اثرات متقابل شکر و غلظت KH_2PO_4 ، زمان در سه سطح ثابت نگه داشته شد. شکل ۴ نشان می‌دهد که وقتی زمان در ۳۰ دقیقه ثابت نگه داشته می‌شود، کمترین مقادیر محصول در یک طرف نمودار در بازه غلظت KH_2PO_4 ۰ الی ۰/۰۲ گرم بر میلی‌لیتر و مقدار شکر ۰ الی ۱۵ گرم و در طرف دیگر نمودار در بازه غلظت KH_2PO_4 ۰/۱۲ الی ۰/۲ گرم بر میلی‌لیتر و مقدار شکر ۷ الی ۲۵ گرم به دست می‌آید. وقتی زمان در ۴۵ دقیقه ثابت نگه داشته می‌شود، کمترین مقادیر محصول در نمودار در بازه غلظت KH_2PO_4 ۰/۱۸ الی ۰/۲ گرم بر میلی‌لیتر و مقدار شکر ۱۸/۷۵ الی ۲۵ گرم و بیشترین مقادیر محصول در بازه غلظت KH_2PO_4 ۰/۱ الی ۰/۲ گرم بر میلی‌لیتر و مقدار شکر ۰ الی ۳۰ گرم به دست می‌آید. وقتی زمان در ۶۰ دقیقه ثابت نگه داشته می‌شود، کمترین مقادیر محصول در نمودار در بازه غلظت KH_2PO_4 ۰/۱۸ الی ۰/۲ گرم بر میلی‌لیتر و مقدار شکر ۱۸/۷۵ الی ۲۵ گرم و بیشترین مقادیر محصول در بازه غلظت KH_2PO_4 ۰/۱ الی ۰/۲ گرم بر میلی‌لیتر و مقدار شکر ۰ الی ۳۰ گرم به دست می‌آید که به لحاظ اقتصادی مطلوب است.

متغیرها شناسائی شده اند. این تحلیل امکان می‌دهد تا شرایط بهینه برای افزایش میزان عناصر مغذی تعیین شود. مدل آماری از برازش مناسبی برخوردار بود، مقدار R^2 نشان می‌دهد که تغییرات جذب روی به خوبی توسط متغیرهای فرایند تبیین شده است و نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) نشان داد که مدل در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنادار است همچنین غیرمعنادار بودن عدم برازش مدل (Fit of Lack) تأیید می‌کند که مدل ریاضی قادر به پیش‌بینی دقیق عملکرد فرایند در محدوده طراحی شده است؛ موضوعی که برای انتقال فرایند به مقیاس صنعتی اهمیت بالایی دارد.

با بررسی اثرات متقابل و اصلی موثر بر تولید مخمرغنی شده با روی مشخص شد که مدل پیشنهادی نرم‌افزار از نوع درجه دوم بود و اعتبار آن با استفاده از چندین شاخص ارزیابی شد:

معنی‌داری مدل: آزمون عدم برازش^۱ نباید معنی‌دار باشد. از آنجا که خطای خالص صفر بود، مقدار p برای عدم برازش قابل محاسبه نبود که این موضوع اعتبار مدل را تأیید کرد.

در تحلیل اثرات متقابل زمان و غلظت KH_2PO_4 ، مقدار شکر ثابت در نظر گرفته شد شکل ۲ نشان می‌دهد که با ثابت نگه داشتن مقدار شکر در صفر، بیشترین مقادیر محصول در بازه زمانی ۴۰ الی ۶۰ دقیقه با مقادیر غلظت KH_2PO_4 از ۰/۱ تا ۰/۲ گرم بر میلی‌لیتر و کمترین مقادیر محصول در بازه زمانی ۳۰ الی ۳۷/۵ دقیقه با مقادیر غلظت KH_2PO_4 از ۰ تا ۰/۰۲۵ گرم بر میلی‌لیتر به دست می‌آید. همچنین با ثابت نگه داشتن مقدار شکر در ۱۲/۵ گرم، کمترین مقادیر محصول در یک طرف نمودار در بازه زمان ۳۰ الی ۳۷/۵ دقیقه با مقادیر غلظت KH_2PO_4 از ۰/۰۴ الی ۰/۲ گرم بر میلی‌لیتر و در طرف دیگر نمودار در بازه زمان ۳۰ الی ۳۷/۵ دقیقه با مقادیر غلظت KH_2PO_4 از ۰/۱۴ الی ۰/۲ گرم بر میلی‌لیتر به دست می‌آید. شکل ۲ نشان می‌دهد با ثابت نگه داشتن مقدار شکر در ۲۵ گرم، کمترین مقادیر محصول در یک طرف نمودار در بازه زمان ۳۰ الی ۵۲ دقیقه با مقادیر غلظت KH_2PO_4 از ۰/۱ تا ۰/۲ گرم بر میلی‌لیتر به دست می‌آید. در بررسی اثرات متقابل زمان و غلظت KH_2PO_4 ، مشخص شد بهترین نتیجه در

¹ Lack of Fit

برای تجزیه و تحلیل داده‌های جذب تجربی، از دو مدل ایزوترم استفاده شد. یافته‌ها نشان می‌دهند که با افزایش غلظت اولیه ماده جذب‌شونده، ظرفیت جذب کاهش می‌یابد. ایزوترم‌های جذب معمولاً برای توصیف فرآیندهای جذب و ارائه بینش‌های ارزشمند در مورد رفتارها و مکانیسم‌های مرتبط به کار می‌روند. مقادیر ضریب تعیین R^2 نشان می‌دهد که هر دو مدل لانگمویر و فروندلیچ به طور مؤثر با داده‌های جذب $Zn(II)$ بر روی زیست‌توده مخمر مطابقت دارند. علاوه بر این، نتایج رگرسیون برای جذب مخمر نشان می‌دهد که داده‌های ایزوترم $Zn(II)$ همبستگی قوی با مدل لانگمویر دارند و فرایند جذب احتمالاً تک‌لایه‌ای است.

پارامترهای K_f و $1/n$ فروندلیچ که به ترتیب نشان‌دهنده ظرفیت و شدت جذب هستند، در جدول ۸ نشان می‌دهند که زیست‌توده مخمر ظرفیت جذب بالایی برای $Zn(II)$ دارد. مدل فروندلیچ، جذب ناهمگن را در نظر می‌گیرد که ممکن است ناشی از تنوع مکان‌های جذب یا ماهیت متفاوت یون‌های فلزی جذب شده، شامل گونه‌های آزاد و هیدرولیز شده باشد. علاوه بر این، ضریب جداسازی لانگمویر R_1 نشان‌دهنده افزایش ظرفیت جذب $Zn(II)$ توسط مخمر است. با توجه به اینکه مقدار $0 < R_1 < 1$ است، نوع ایزوترم مطلوب می‌باشد. علاوه بر این، R^2 برابر با ۰/۹۸۰۱، برازش خوبی با داده‌های جذب $Zn(II)$ نشان می‌دهد. مقدار q_m نشان می‌دهد که فرآیند جذب می‌تواند در دماهای بین ۰ تا ۵ درجه سانتیگراد امکان‌پذیر باشد.

رابطه بین غلظت اولیه روی و ظرفیت نشان می‌دهد چه درصدی از یون موجود در محلول حذف شده است، نه اینکه چه مقدار روی جذب نشده است کاهش راندمان حذف با افزایش غلظت اولیه، علی‌رغم افزایش ظرفیت جذب تعادلی، بیانگر محدود بودن سایت‌های فعال جذب و حرکت سیستم به سمت اشباع بوده و نشان‌دهنده ضعف جذب نیست، بلکه رفتار کلاسیک ایزوترم جذب را تأیید می‌کند.

نتایج نشان داد که غلظت یون روی مهم‌ترین پارامتر مؤثر بر میزان غنی‌سازی است، با این حال افزایش بیش از حد آن باعث کاهش فعالیت زیست‌توده می‌شود. اثر متقابل غلظت زیست‌توده و زمان تماس از نظر صنعتی حائز اهمیت است، زیرا افزایش زیست‌توده در زمان تماس بهینه موجب افزایش ظرفیت جذب بدون نیاز به افزایش غلظت یون

روی و آهن می‌شود که این موضوع از نظر اقتصادی و ایمنی محصول نهایی مزیت قابل توجهی دارد. نمودارهای سه‌بعدی سطح پاسخ نشان دادند که محدوده بهینه جذب روی در ناحیه‌ای قرار دارد که هم از نظر زیستی پایدار و هم از نظر صنعتی قابل اجرا است. امکان نوسانات جزئی پارامترها بدون افت معنی‌دار کیفیت محصول را فراهم می‌کند؛ ویژگی‌ای که برای تولید نیمه‌صنعتی و صنعتی ضروری است.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مدل ارائه‌شده نه تنها برای بهینه‌سازی آزمایشگاهی، بلکه برای طراحی و کنترل فرایند تولید مخمر غنی‌شده با روی در مقیاس نیمه‌صنعتی و صنعتی نیز کاربردی است که روش‌های غنی‌سازی در پیشینه تحقیق علی‌رغم میزان غنی‌سازی قابل قبول امکان کاربری در مقیاس نیمه‌صنعتی و صنعتی را نداشتند.

نتایج نشان داد که رفتار جذب زیستی یون‌های روی در غلظت‌های متفاوت توسط مخمر تفاوت‌های معنی‌داری دارد. این تفاوت را می‌توان به اختلاف در مکانیزم‌های انتقال یونی، ظرفیت اتصال سطحی و نقش‌های متابولیکی متفاوت این دو عنصر در سلول مخمر نسبت داد. جذب روی عمدتاً از طریق اتصال به گروه‌های عاملی موجود در دیواره سلولی مخمر انجام می‌شود. به نظر می‌رسد تفاوت رفتار این عنصر در شعاع یونی و میل اتصال آنها باز می‌گردد.

نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که متغیرهای فرایندی انتخاب شده تأثیر معناداری بر پاسخ‌های مورد بررسی (میزان غنی‌سازی زیست‌توده مخمر) داشته‌اند. تحلیل داده‌ها حاکی از آن است که تغییر در سطوح متغیرها منجر به تغییرات مشخص و قابل تفسیر در شاخص‌های عملکردی سیستم شده است.

در مقایسه با سایر روش‌های غنی‌سازی در مطالعات پیشین، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که استفاده از مخمر به عنوان حامل زیستی، کارایی بالاتری در انتقال روی به محصول نهایی دارد.

در نمودارهای لانگمویر و فروندلیچ خط راست صعودی یعنی داده‌های تجربی با مدل انتخابی همخوانی دارد و فرایند جذب قابل توجه است. چون در حالت خط صعودی با افزایش غلظت تعادلی، میزان جذب افزایش یافته و مکانیسم جذب فعال و معتبر است و خط راست تأیید

تولید محصول سپاسگزاری می‌شود.

منابع

Azizah, N. & Suryadi, H. (2021). Production of Organically Selenium Yeast by Fermentation and Analysis by Atomic Absorption Spectrophotometry. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 11(3), 278–282. <https://doi.org/10.5530/ijpi.2021.3.49>.

Brown, R. (2023). Zinc deficiency: Effects on health and ways to improve intake. *Insights Nutr Metab.*, 7(3), p. 145. <https://doi.org/10.35841/aainm-7.3.145>.

Do Nascimento, J. M., De Oliveirab, J. D., Rizzoc, A.C.L. & Leite, S. G. F. (2019). Biosorption Cu (II) by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Jéssica. *Biotechnology Reports*, 20, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00315>.

De Nicola, R. & Walker, G. M. (2009). Accumulation and cellular distribution of zinc by brewing yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, 44, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.11.008>.

Dodic, S.N., Popov, S.D. & Markov, S.L. (2001). Investigation of kinetics of zinc biosorption by *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Nahrung/Food*, 45(1), 59–61. <https://doi.org/10.1002/1521-3803>

Esfahani, Z. C., Salimi, M., Alijan, M.S. & Khosravi-Darani, K. (2023). Production of Zn-Enriched Yeast. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 13(5), p. 452. <https://doi.org/10.33263/BRIAC135.452>.

Esmaili, S., Khosravi-Darani, K., Pourahmad, R. & Komeili, R. (2012). An Experimental Design for Production of Selenium-Enriched Yeast. *World Applied Sciences Journal*, 19, 31–37. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.19.01.2634>.

Farhan, S. N. & Khadom, A.A. (2015). Biosorption of heavy metals from aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Industrial Chemistry*, 6, 119–130. <https://doi.org/10.1007/s40090-015-0038-8>.

Foo, K.Y. & Hameed, B.H. (2010). Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chemical Engineering Journal*, 156, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.09.013>.

می‌کند که مدل ایزوترم انتخاب شده توانائی توصیف رفتار جذب و درصد حذف فلز را درسیستم دارد

روش‌های مورد استفاده در روش‌های پیشینه، اگرچه در مقیاس کوچک کارآمد هستند، اما در تولید صنعتی از نظر اقتصادی به صرفه نمی‌باشند؛ چرا که درصد زیادی از روی جذب نشده و بخش عمده‌ای از آن دفع می‌شود. علاوه بر این، نمک‌های اضافه شده در طول فرآیند، هزینه‌ها و پیچیدگی تصفیه فاضلاب پایین‌دست و مدیریت پسماند را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهند و چالش‌های عمده‌ای را برای اجرا در مقیاس صنعتی ایجاد می‌کنند. این مشکلات با نیاز به تصفیه پساب و مدیریت پسماندهای اضافی که موجب افزایش هزینه‌ها و پیچیدگی‌های عملیاتی می‌شود، بیشتر می‌شود. که نکات برتری این تحقیق به تحقیقات پیشین می‌باشد.

نتیجه‌گیری

هدف این مطالعه، بهینه سازی فرایند غنی سازی روی در مخمر شناخته شده ساکارومایسس سرویزیه، با رویکرد نوین بود. از این رو، آزمایش‌های جذب ناپیوسته برای حذف یون‌های Zn(II) از محلول‌های آبی با استفاده از زیست‌توده مخمر به عنوان جاذب انجام شد. مدل ایزوترم لانگمویر به خوبی فرایند جذب روی را توصیف کرد و در شرایط بهینه، مخمر نرخ جذب سریعی از خود نشان داد. نتایج نشان دادند که زمان، غلظت دی‌هیدروژن فسفات پتاسیم (KH_2PO_4) و مقدار شکر تأثیر معنی‌داری بر فرایند دارند. به طور مشخص، شرایط بهینه شامل زمان ۵۹/۱۵ دقیقه، غلظت KH_2PO_4 برابر با ۰/۱۳ گرم بر میلی‌لیتر و شکر ۰/۱۱ گرم بود. شرایط بهینه استخراج شده می‌تواند در تولید محصولات نانوائی و مکمل‌های غذایی مورد استفاده قرار گیرند. غنی سازی روی پس از مرحله رشد مخمر، راهکاری مؤثر برای افزایش پایداری روی در محصول نهایی محسوب می‌شود. این رویکرد می‌تواند به عنوان جایگزینی ایمن و کم هزینه برای ترکیبات شیمیایی روی در صنایع غذایی پیشنهاد شود.

سپاسگزاری

از همکاری‌های هسته فناور خاورمیانه سبز ویونا (محل انجام تحقیق) و مجموعه نان سحر و گلنان پوراتوس برای

- Gaensly, F., Picheth, G., Brand, D. & Bonfim, T. M.B. (2014). The uptake of different iron salts by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 491–494. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000200016>.
- Jena, P.S., Pradhan, A., Nanda, S.P., Dash, A. & Naik, B. (2022). Biosorption of heavy metals from wastewater using *Saccharomyces cerevisiae* as a biosorbent: A mini review. *Materials Today: Proceedings journal*, 67, 1140–1146. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.07.306>.
- Khairunnisa, S. & Suryadi, H. (2021). Production of Zinc-Yeast from *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation and Determination of Zinc Content by Atomic Absorption Spectrophotometry. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 11(3), 274–277. <https://doi.org/10.5530/ijpi.2021.3.48>.
- Miller, C. H., Sheyholislami, H., Burns, J. L. & Connor, K.L. (2024). Sensory evaluations of a novel iron and zinc-enriched powder for the potential treatment and prevention of iron deficiency in women of reproductive age. *Matern Child Nutrition*, 20, 1–11. <https://doi.org/10.1111/mcn.13575>.
- Maria, P., Keil, C., Pallasdies, L., Schmach, M., Senz, M., Nissen, J., Kieserling, H., Drusch, S. & Haase, H. (2022). Zinc availability from zinc-enriched yeast studied with an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 71. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.126934>.
- Naem, A., Woertz, J.R. & Fein, J.B. (2006). Experimental Measurement of Proton, Cd, Pb, Sr, and Zn Adsorption onto the Fungal Species *Saccharomyces cerevisiae*. *Environmental Science & Technology*, 40(18), 5724–5729. <https://doi.org/10.1021/es0606935>.
- Naik, R. P., Preetam, V. C., Kumari, N.N., Raju, M. V. L. N., Prakash, B. & Reddy, M. R. (2022). Effect of Different Zinc Sources and Concentrations on the Biomass Yield of *Saccharomyces cerevisiae* Yeas. *Biological Trace Element Research*, 200, 4171–4174. <https://doi.org/10.1007/s12011-021-02998-3>.
- Noroozi, B. & Sorial, G. A. (2013). Applicable models for multi-component adsorption of dyes: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 25(3), 419–429. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60194-6](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60194-6).
- Ryan Wessells, K., Manger, M. S., Tsang, B. L. & McDonald, C. M. (2024). Mandatory large-scale food fortification programmes can reduce the estimated prevalence of inadequate zinc intake by up to 50% globally. *Nature Food*, 5, 625–637. <https://doi.org/10.1038/s43016-024-00997-w>.
- Savastru, E., Bulgariu, D., Zamfir, C. & Bulgariu, L. (2022). Application of *Saccharomyces cerevisiae* in the Biosorption of Co (II), Zn (II) and Cu (II) Ions from Aqueous Media. *Water*, 14(976), 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/w14060976>.
- Shah, D., Sachdev, H.S., Gera, T., De-Regil, L.M. & Peña-Rosas, J.P. (2016). Fortification of staple foods with zinc for improving zinc status and other health outcomes in the general population (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 6. <https://doi.org/10.1002/2F14651858.CD010697.pub2>.
- Sheykhi, F., Ahmadifard, N., Samadi, N. & Nematzadeh, K. (2019). The effect of different concentrations of organic and inorganic zinc on the growth and zinc content in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biological Journal of Microorganism*, 7(28), 103–110. <https://doi.org/10.22108/bjm.2018.107135.1090>.
- Sun, J., Xu, S., Du, Y., Yu, K., Jiang, Y., Weng, H. & Yuan, W. (2022). Accumulation and Enrichment of Trace Elements by Yeast Cells and Their Applications: A Critical Review. *Microorganisms*. MDPI, p. 1746. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091746>.
- Volesky, B. & Holan, Z.R. (1995). Biosorption of Heavy Metals. *Biotechnol. Prog*, 11(3), 235–250. <https://doi.org/10.1021/bp00033a001>.
- Wang, J. & Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5), 427–451. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.03.001>.
- Wang, Y., Lilley, K. S. & Oliver, S.G. (2014). A protocol for the subcellular fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* using nitrogen cavitation and density gradient centrifugation. *YEAST*, 31, 127–135. <https://doi.org/10.1002/yea.3002>.

Zinikovskaia, I., Yushin, N., Abdusamadzoda, D., Grozdov, D. & Shvetsova, M. (2020). Efficient Removal of Metals from Synthetic and Real Galvanic

Zinc-Containing Effluents by Brewer's Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Materials Article*, 13, p. 3624.
<https://doi.org/10.3390/ma13163624>.

A Novel Approach to Zinc Enrichment of *Saccharomyces cerevisiae* Yeast

S.R. Rezaee-Ahary^a, M. Ghavami^a, K. Khosravi-Darani^{b*}, M. Honarvar^a

^a Department of Food Science and Technology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

^b Department of Food Technology Research, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology/National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 23 January 2026

Accepted: 3 February 2026

Abstract

Introduction: Zinc deficiency is a prevalent nutritional problem worldwide, and biological fortification using *Saccharomyces cerevisiae* yeast represents a promising strategy to improve zinc intake. The aim of this study was to optimize the zinc enrichment process in yeast by achieving high zinc-containing biomass with improved process efficiency.

Materials and Methods: *Saccharomyces cerevisiae* yeast was used along with a zinc salt as the zinc source, sugar as the carbon source, and potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) as the phosphorus source. To enhance zinc uptake and minimize toxic effects, zinc salt was added after completion of the growth phase. A Plackett–Burman experimental design was employed to screen the effects of the main variables, and statistical analysis was performed using Design-Expert software. Subsequently, response surface methodology (RSM) was applied to determine the optimal process conditions and the appropriate timing of zinc salt addition.

Results: The results indicated that process time, KH_2PO_4 concentration, and sugar content had significant effects on zinc enrichment. The optimal conditions were identified as a process time of 59.15 minutes, a KH_2PO_4 concentration of 0.13 g/mL, and a sugar content of 0.11 g. Post-growth addition of the zinc salt significantly enhanced zinc accumulation in the yeast biomass.

Conclusion: This study demonstrates that combining statistical optimization approaches with post-growth zinc salt addition provides a novel and efficient method for the biological enrichment of yeast with zinc. By reducing metal salt consumption and process duration, this approach enables the production of zinc-rich biomass without the use of complex chemical additives and may serve as an innovative strategy for micronutrient biofortification studies.

Keywords: Biofortification, Optimization, *Saccharomyces cerevisiae*, Zinc.

* Corresponding Author: k.khosravi@sbmu.ac.ir, kiankh@yahoo.com