فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۳، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۶۷- ۸۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۲۴ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۳۱

بهینه‌سازی فرآیند حذف زیستی کافئین توسط سلول‌های رویشی سویه بومی مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* با استفاده از روش تحلیلی تاگوچی

مراحم آشنگرف *: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، m.ashengroph@uok.ac.ir
مسعود حیدری زاده: استادیار فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، m.haidarizadeh@uok.ac.ir
مریم برچلویی: دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی مولکولی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، maryam_borchaluei@yahoo.com

چکیده

مقدمه: در سال‌های اخیر استفاده از ریزسازواره‌ها به عنوان زیست واکنشگرهای مبتنی بر شیمی سبز برای حذف کافئین سمی از پساب‌های صنعتی و محصولات غذایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش بهینه‌سازی فرآیند حذف زیستی کافئین توسط سلول‌های رویشی سویه بومی مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* با استفاده از رویکرد تحلیلی تاگوچی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: متغیرهایی که در فرآیند تجزیه کافئین به عنوان تأثیرگذار در نظر گرفته شده‌اند عبارتند از: غلظت کافئین، زمان واکنش، غلظت یون روی، غلظت گلوکز به عنوان منبع کربن کمکی و غلظت پپتون به عنوان منبع ازت کمکی. برای موارد متغیر یاد شده آرایه متعامد ($1^3 \times 4^4$) L16 طراحی شد. درصد حذف کافئین با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) تخمین زده شد.

نتایج: دستیابی به ترکیب بهینه عوامل یاد شده با استفاده از عملکرد تاگوچی نشان داد که در شرایط بهینه (میزان کافئین در غلظت ۵ گرم در لیتر، پپتون در غلظت ۳ گرم در لیتر، یون روی در غلظت ۵ میلی‌مولار و زمان گرماگذاری برای مدت ۴۸ ساعت)، میزان حذف زیستی کافئین توسط سویه بومی یاد شده، با درجه اطمینان ۹۵ درصد، ۸۲/۸ درصد بوده است. در حالی که قبل از آزمایش‌های بهینه‌سازی، سویه مخمری TFS9 تنها قادر به حذف ۲۵/۵ درصد از کافئین با غلظت اولیه ۵ گرم در لیتر بعد از ۴۸ ساعت گرماگذاری بوده است که با توجه به افزایش ۳/۲ برابری کارآیی بالای روش طراحی تاگوچی را به خوبی اثبات می‌کند.

بحث و نتیجه‌گیری: مطالعه پیش‌رو نخستین گزارش از کاربرد موفقیت آمیز روش بهینه‌سازی تاگوچی برای حذف زیستی کافئین است. براساس تحلیل آماری نتایج، این پژوهش پیشنهاد رویکرد تاگوچی در بهبود تجزیه زیستی کافئین توسط سویه بومی *ساکارومایسس سرویزیه* را پیشنهاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: بهینه‌سازی، حذف زیستی، کافئین، رویکرد تاگوچی، *ساکارومایسس سرویزیه*

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

کافئین ترکیب تجاری مهمی است که به خانواده آلکالوئیدهای پورینی ساخته شده در گیاهان تعلق دارد (۱). خاصیت محرک بودن کافئین باعث شده است که این ترکیب در ساخت نوشیدنی‌هایی مانند چای، قهوه و تعداد زیادی نوشیدنی غیر الکلی و سایر محصولات غذایی مصرف گسترده‌ای داشته باشد (۲). مکانسیم عمل کافئین به شکلی است که به عنوان آنتاگونیست رسپتور آدنوزین در مغز عمل کرده و در نتیجه آثار مهاری بر روی سیستم عصبی مرکزی دارد (۳). آدنوزین به عنوان یک کاهنده اضطراب عمل می‌کند و چون مولکول کافئین مشابه آن است می‌تواند با این آلکالوئید جایگزین شده و سبب افزایش اضطراب شود. مصرف طولانی مدت کافئین آثار جانبی مانند سردرد، کوفتگی، پوکی استخوان، تحریکات فوق‌کلیوی، فعالیت کلیوی، ماهیچه‌ای و قلبی نامنظم، تپش قلب، ناراحتی‌های معده‌ای، اضطراب، افزایش سطح هموسیستئین پلاسما، افزایش فشار خون، بی‌خوابی و بیشتر بیماری‌های حاد قلبی را ایجاد می‌کند (۲، ۴ و ۵). کافئین از سدهای خونی- مغزی عبور کرده و باعث ناهنجاری در جنین شده و احتمال سقط‌های خود به خودی را افزایش می‌دهد (۶). از طرف دیگر فرآیند تولید کافئین از دانه‌های قهوه دارای محصولات جانبی و فاضلاب‌هایی است که بخش اصلی ضایعات کشت و صنعت را در فرآیند تولید قهوه در کشورها تشکیل می‌دهد (۷ و ۸). اگرچه بخشی از این ضایعات به عنوان کمپوست در مزارع کشاورزی قهوه استفاده می‌شود اما بیشتر آن در طبیعت رها می‌شود. وجود کافئین در خاک بر زایایی خاک تأثیر گذاشته و مانع جوانه زنی و رشد سایر دانه‌ها می‌شود (۹). رها شدن ضایعات حاصل از کارخانه‌های قهوه و چای به درون دریاچه‌ها و رودخانه‌ها بر اکوسیستم آبی تأثیر نامطلوبی می‌گذارد (۱۰). از طرف دیگر به علت وجود کافئین و دیگر ترکیبات سمی، با وجود غنی بودن این ضایعات از کربوهیدرات و پروتئین، برای تغذیه حیوانات قابل استفاده نیستند (۸ و ۱۱). از آنجا که حذف کافئین به روش‌های مرسوم به علت استفاده از حلال‌های سمی و گران، مناسب نیست و همچنین، این روش‌ها برای کافئین اختصاصی نیستند و باعث حذف سایر طعم دهنده‌ها و ترکیبات معطر نیز می‌شوند، در نتیجه محصولات غذایی تولید شده دارای کیفیت پایینی هستند. بنابراین، توسعه روش‌های میکروبی و آنزیمی برای برداشت کافئین به علت داشتن صرفه اقتصادی، سازگاری با محیط زیست و اختصاصی بودن برای کافئین، مطلوب است (۲). از جمله باکتری ها و قارچ‌های تجزیه‌کننده کافئین می‌توان به سویه‌هایی از جنس *سراشیا*[۱] (۱۱)، *کلبسیلا*[۲] و *رودوکوکوس*[۳] (۱۲)، *آسپرژیلوس*[۴] (۱۳)، پنی سیلیوم[۵] (۷ و ۱۴)، *بروی باکتریوم*[۶] (۱۵)، *سودوموناس*[۷] (۱۶- ۱۸) و مخمر *تریکوسپورون*[۸] (۱۹) اشاره کرد. موفقیت در آزمایش‌ها اساساً به طراحی مناسب فرآیندها و محصولات وابسته است. روش سنتی بهینه‌سازی فرآیند شامل بررسی یک عامل در یک زمان است که به زمان، هزینه و کار فشرده نیاز است. در میان روش‌های مختلف آماری، روش تحلیلی تاگوچی برتری متمایزی نسبت به سایر

روش‌های آماری دارد زیرا روش تاگوچی در طراحی آزمایش‌ها، روش ساده‌ای بوده که شامل سیستم طراحی آرایه‌هاست که امکان بررسی حداکثر تعداد عوامل مؤثر بر فرآیند و میان کنش میان عوامل مختلف را با انجام تعداد کمی آزمایش تجربی فراهم می‌کند (۲۰) و در نهایت، عامل‌های مؤثری که دارای آثار اصلی بر فرآیند واکنش هستند را شناسایی می‌کند (۲۱). روش تاگوچی در تخمیر میکروبی، داروسازی، زیست تبدیلی میکروبی، فرآیندهای تغذیه‌ای و پالایش فاضلاب‌های آلوده کارآمد است (۲۱- ۲۵). با وجود اینکه گزارش‌های زیادی درباره بهینه‌سازی فرآیندهای زیستی توسط روش آماری تاگوچی وجود دارد، مطالعه پیش‌رو نخستین گزارش از کاربرد روش بهینه‌سازی تاگوچی برای حذف زیستی کافئین است. در این پژوهش از روش تاگوچی برای بهینه‌سازی فرآیند برای دستیابی به میزان بیشتری از حذف کافئین توسط سویه بومی مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و سویه مخمری: کافئین با خلوص بالای ۹۹ درصد از شرکت سیگما[۹] خریداری شد. گلوکز و پپتون از شرکت دیفکو[۱۰] تهیه شد. سولفات روی از شرکت مرک[۱۱] خریداری شد. استونیتریل و متانول با خلوص بالا به عنوان حلال‌های HPLC از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. سایر مواد شیمیایی استفاده شده با درجه خلوص بالا[۱۲] بودند. سویه بومی مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* TFS9 با قابلیت تجزیه‌کنندگی کافئین پیش‌تر توسط آشنگرف و برچلویی[۱۳] از خاک زیر کشت چای در مناطق شمالی ایران جداسازی و شناسایی فنوتیپی و مولکولی شده بود (۲۶). برای نگهداری سویه بومی TFS9 از محیط جامدAgar YPD (گلوکز ۲۰ گرم در لیتر، پپتون ۲۰ گرم در لیتر، عصاره مخمر ۱۰ گرم در لیتر و آگار ۲۰ گرم در لیتر) استفاده شد.

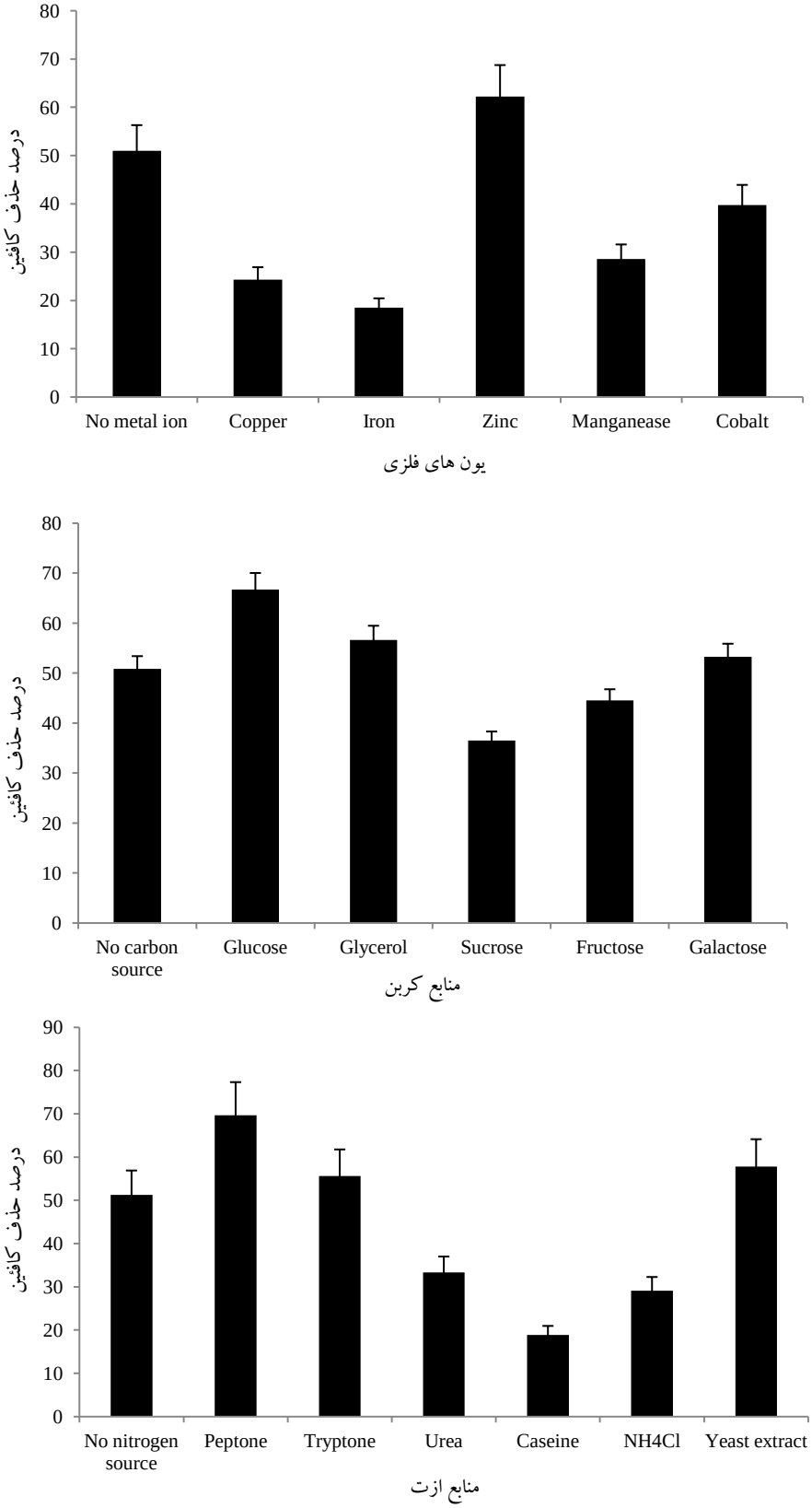
طراحی آزمایش به روش تاگوچی: در این پژوهش، طراحی آزمایش به روش آماری تاگوچی انجام شده است. قبل از طراحی آزمایش، عامل‌های مؤثر بر میزان تجزیه کافئین توسط سویه مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* TFS9با استفاده از روش تک عاملی شناسایی و سطوح مورد نظر آن‌ها تعیین شد. برای این منظور در بخش اول این پژوهش اثر منابع کربن مختلف شامل گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز، سوکروز و گلیسرول با غلظت نهایی یک گرم در لیتر، اثر منابع ازتی مختلف شامل کلریدآمونیوم، پپتون، تریپتون، اوره، عصاره مخمر و کازئین با غلظت نهایی یک گرم در لیتر و همچنین، اثر یون‌های روی، منگنز، مس، آهن وکبالت در غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌مولار بر حذف کافئین (با غلظت اولیه ۳/۵ گرم در لیتر) بر روی حذف کافئین در محیط بافر نمکی M9 (۲۷) پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری بررسی شد. در مرحله دوم بهینه‌سازی طراحی آزمایش به روش آماری تاگوچی انجام شد. متغیرهایی که در فرآیند تجزیه کافئین توسط سویه مخمری TFS9 به عنوان عوامل تأثیرگذار در نظر گرفته

شدند عبارتند از: کافئین، پپتون به عنوان منبع ازت کمکی، گلوکز به عنوان منبع کربن کمکی، یون فلزی روی و زمان گرماگذاری. برای موارد متغیر یاد شده آرایه متعامد L16 طراحی شد. برای انجام آزمایش‌های پیش‌بینی شده توسط نرم افزار، ۵۰ میلی‌لیتر از محیط‌های بافر نمکی M9 را که حاوی ۰/۵ گرم در لیتر سولفات منیزیم هفت آبه، ۰/۰۱۵ گرم در لیتر کلرید کلسیم، ۰/۵ گرم در لیتر نمک سدیم کلراید و بافر فسفات نمکی (K_2HPO_4/KH_2PO_4) ۱۰۰ میلی‌مولار بود را در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس، سوسپانسیون مخمری معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شد و به میزان ۵ درصد حجمی/ حجمی به منظور تلقیح به محیط‌های یاد شده استفاده شد. تمام ارلن ها تحت شرایط دمایی ۲۸ درجه سانتی گراد با دور شیکر ۱۵۰ rpm گرماگذاری شد. آزمایش‌ها سه بار تکرار، تجزیه و تحلیل تمامی نتایج با استفاده از نرم‌افزار Qualitek-4[۱۴] انجام و شرایط بهینه مشخص شد.

سنجش تجزیه کافئین در مخلوط واکنش با استفاده از HPLC: سنجش میزان حذف کافئین با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا[۱۵]، مجهز به آشکارساز جذب UV انجام شد. در دستگاه HPLC از ستون نوع C18 (اندازه قطر ذرات فاز ثابت ۵ میکرون) به طول ۲۵ سانتی‌متر و قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر استفاده شد. نوع فاز متحرک به کار گرفته شده مخلوطی از آب و استونیتریل به نسبت ۸۵ به ۱۵ بود که به شکل ایزوکراتیک با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه روی ستون فرستاده شد. طول موج استفاده شده ۲۷۸ نانومتر و حجم تزریق شده ۲۰ میکرولیتر بود. همه مراحل آزمایش در دمای اتاق انجام گرفت. تحت شرایط کروماتوگرافی یاد شده، زمان بازداری برای کافئین در زمان ۷/۴ دقیقه به دست آمد.

نتایج

بهینه‌سازی شرایط حذف کافئین با کمک رویکرد تاگوچی: با توجه به اینکه در روش تاگوچی، گام نخست تعیین عوامل تأثیرگذار و سطوح آن‌هاست، بنابراین، در ابتدا با استفاده از روش تک عاملی متغیرهای مؤثر بر حذف زیستی کافئین توسط سویه مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* TFS9 تشخیص داده شد. بر این اساس اثر چندین عامل شامل منابع کربن (گلوکز، سوکروز، فروکتوز، گالاکتوز و گلیسرول)، منابع ازت (عصاره مخمر، تریپتون، اوره، کازئین و کلرید آمونیوم) و یون‌های فلزی (آهن، مس، روی، کبالت و منگنز) بر روی تجزیه کافئین بررسی شد (شکل ۱). براساس نتایج به دست آمده بهترین ترکیب عوامل برای حذف کافئین در سویه بومی TFS9 عبارتند از: گلوکز، پپتون و یون فلزی روی.



شکل ۱-اثر منابع کربن، منابع ازت و یون‌های فلزی بر روی حذف زیستی کافئین توسط سلول‌های رویشی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* سویه TFS9

پس از انتخاب بهترین ترکیب عوامل، بهینه‌سازی با روش آماری تاگوچی انجام شد. هدف از طراحی آزمایش به روش تحلیلی تاگوچی، دست‌یابی به اهدافی از جمله تشخیص تأثیر هر یک از عوامل فردی بر روی حذف زیستی کافئین، بررسی تأثیر جفت عامل روی حذف کافئین، تعیین شرایط بهینه و در نهایت، ارزیابی میزان حذف کافئین تحت شرایط بهینه پیش‌بینی شده است. در این راستا پنج عامل غلظت گلوکز، غلظت پپتون، غلظت یون دو ظرفیتی روی، غلظت کافئین و زمان گرماگذاری در نظر گرفته شد. در جدول ۱ عوامل و سطوح مورد بررسی نشان داده شده است.

جدول ۱ - عوامل مؤثر و سطوح مورد بررسی در طراحی آزمایش‌ها به روش آماری تاگوچی

عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۴
گلوکز (گرم در لیتر)	۰	۱	۳	۵
پپتون (گرم در لیتر)	۰	۱	۳	۵
یون فلزی روی (میلی مولار)	۰	۱	۳	۵
کافئین (گرم در لیتر)	۱	۳	۵	۷
زمان گرماگذرای (ساعت)	۲۸	۳۸	۴۸	-

با توجه به تعداد عامل‌ها، سطوح و تأثیر جفت عامل، درجه آزادی برابر ۱۵ است که لزوم انتخاب آرایه متعامد L16 (انجام ۱۶ آزمایش مختلف) را به عنوان یک آرایه استاندارد ایجاب می‌کند (جدول ۲).

جدول ۲- عوامل و سطوح مورد بررسی در آرایه متعامد L16 و نتایج حاصل از حذف کافئین به شکل میانگین سه تکرار

شماره آزمایش	گلوکز	پپتون	یون Zn^{+2}	کافئین	زمان گرماگذاری	درصد حذف کافئین
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۲۹/۵
۲	۱	۲	۲	۲	۲	۵۰/۲
۳	۱	۳	۳	۳	۳	۸۸/۸
۴	۱	۴	۴	۴	۱	۵۱/۳
۵	۲	۱	۲	۳	۱	۳۳/۲
۶	۲	۲	۱	۴	۳	۳۶/۷
۷	۲	۳	۴	۱	۲	۶۶/۶
۸	۲	۴	۳	۲	۱	۴۹/۳
۹	۳	۱	۳	۴	۲	۴۷/۷
۱۰	۳	۲	۴	۳	۱	۳۸/۹
۱۱	۳	۳	۱	۲	۱	۴۱/۲
۱۲	۳	۴	۲	۱	۳	۵۱/۳
۱۳	۴	۱	۴	۲	۳	۶۱/۱
۱۴	۴	۲	۳	۱	۱	۲۲/۱
۱۵	۴	۳	۲	۴	۱	۳۹/۷
۱۶	۴	۴	۱	۳	۲	۵۵/۵

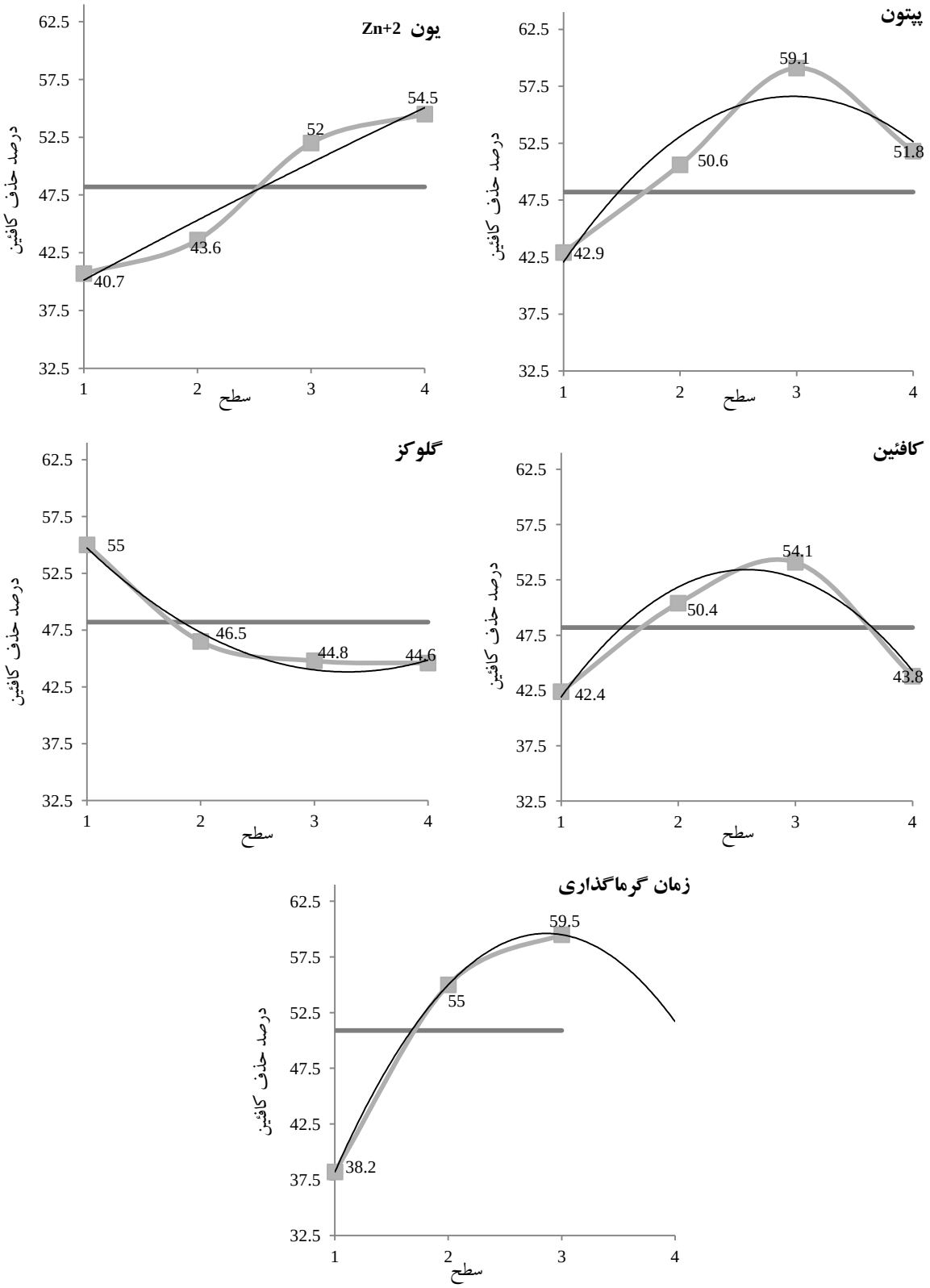
همان گونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، درصد حذف کافئین براساس اثر ترکیبی عامل‌های انتخاب شده در محدوده بین ۲۲/۱ تا ۸۸/۸ است. در ادامه، اثر تغییر سطح هر یک از عوامل بر روند حذف زیستی کافئین توسط سویه مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* TFS9 بررسی شده است. همان گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است مقادیر بالاتر درصد حذف کافئین در سطح چهار یون روی یعنی ۵ میلی‌مولار، سطح سه پپتون یعنی ۳ گرم در لیتر، سطح سه کافئین یعنی ۵ گرم در لیتر و سطح زمان گرماگذاری یعنی ۴۸ ساعت و همچنین، در سطح یک گلوکز مشاهده شده است. در واقع با بررسی آثار اصلی هر کدام از عامل‌های مورد مطالعه می‌توان روند کلی تأثیر عامل‌ها را بر روی حذف زیستی کافئین توسط سویه مخمری یاد شده، تشخیص داد.

به کمک روش تاگوچی می‌توان آثار متقابل بین دو عامل مختلف را بررسی کرد که نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است. در واقع با مطالعه آثار متقابل بین جفت عامل می‌توان نتیجه گرفت که اثر یک عامل در فرآیندهای بهینه‌سازی بسته به شرایط عامل‌های دیگر دارد (۲۸). همان‌گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود در مجموع ۱۰ میان‌کنش مشاهده شده که بالاترین میزان میان‌کنش (۲۸/۴۸ درصد) بین گلوکز و کافئین است. عامل گلوکز دارای کم‌ترین تأثیر بر روی حذف زیستی کافئین به شکل فردی است در حالی که کم‌ترین میان‌کنش (۲/۶۲) بین پپتون و کافئین بوده است. جالب است که پپتون به شکل فردی تأثیرگذاری بسیار بالایی در حذف زیستی کافئین داشته است که خود بیانگر این مطلب است که اثر یک عامل روی حذف کافئین کاملاً وابسته به شرایط عامل‌های دیگر در فرآیند بهینه‌سازی حذف زیستی کافئین توسط سویه بومی *ساکارومایسس سرویزیه* TFS9 است.

جدول ۳- ارزیابی آثار متقابل بین جفت عامل‌های مختلف بر میزان حذف زیستی کافئین توسط مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* سویه TFS9

تأثیر جفت عامل	شدت تأثیر متقابل (درصد)	شرایط بهینه (سطوح)
کافئین × گلوکز	۲۸/۴۸	(۱ و ۳)
زمان گرماگذاری × کافئین	۲۸/۴۵	(۳ و ۳)
یون روی × گلوکز	۱۸/۱۴	(۱ و ۳)
زمان گرماگذاری × گلوکز	۱۳/۴۲	(۱ و ۳)
پپتون × گلوکز	۱۲/۸۹	(۱ و ۳)
کافئین × یون روی	۹/۵۹	(۳ و ۳)
یون روی × پپتون	۷/۳۴	(۳ و ۳)
زمان گرماگذاری × یون روی	۵/۹۸	(۳ و ۳)
زمان گرماگذاری × پپتون	۲/۸۷	(۳ و ۳)
کافئین × پپتون	۲/۶۲	(۳ و ۳)

رویکرد تحلیلی تاگوچی دارای ابزار قدرتمند دیگری به نام تحلیل واریانس (ANOVA) است که از این جدول به منظور تحلیل آرایه‌های متعامد و همچنین، با هدف تعیین واریانس خطا و اهمیت نسبی هر یک از عوامل تأثیرگذار استفاده می‌شود. در جدول ۴ تحلیل واریانس نتایج حاصل از حذف زیستی کافئین توسط سویه مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* TFS9 با ۹۵ درصد اطمینان و پس از عمل روش آماری ادغام خطاها[۱۶] ارایه شده است.



شکل ۲- اثر تغییر سطح هر یک از عوامل بر روند حذف زیستی کافئین توسط سویه مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* TFS9

جدول ۴- تحلیل واریانس نتایج حاصل از حذف زیستی کافئین توسط سویه مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* TFS9 با ۹۵ درصد اطمینان و پس از عمل POOLING

ستون عامل	درجه آزادی	مجموع مربعات	واریانس	نسبت واریانس	مجموع مربعات خالص	درصد تأثیر هر عامل
گلوکز	۳	۲۸۹/۶۲		POOLED	۶۹/۸۵CL=	۰/۰۰۰
پپتون	۳	۱۱۳۹/۶۷۵	۳۷۹/۸۹۱	۳۲/۹۶۰	۱۱۰۵/۰۹۷	۲۸/۹۰۵
یون روی	۳	۵۱/۵۴۵	۱۷۲/۸۴۸	۱۴/۹۹۶	۴۸۳/۹۶۸	۱۲/۶۵۹
کافئین	۳	۳۶۶/۷۹۹	۱۲۲/۲۶۶	۱۰/۶۰۸	۳۳۲/۲۲۱	۸/۶۸۹
زمان گرماگذاری	۲	۱۴۹۷/۳۸۱	۷۴۸/۶۹۰	۶۴/۹۵۷	۱۴۷۴/۳۳۰	۳۸/۵۶۳
عوامل دیگر/ خطاها	۴	۳۰۰/۶۸۷	۷۵/۱۷۱			۱۱/۱۸۴
کل	۱۵	۳۸۲۳/۰۸۹				۱۰۰/۰۰۰

واریانس خطا باید پس از تشکیل جدول ANOVA و انجام آزمون معناداری انجام بگیرد که این عمل در روش تاگوچی با استفاده از روش آماری ادغام خطاها انجام می‌شود. در واقع به کمک این روش عامل‌هایی که دارای تأثیر ناچیز بوده‌اند را به عنوان منبع خطا در نظر گرفته و حذف می‌شوند. بدین ترتیب عامل‌هایی که pool نشده باشند به عنوان عوامل با تأثیر معناداری معرفی می‌شوند. در ارتباط با آزمایش بالا، به دنبال عمل ادغام و حذف عامل گلوکز که دارای کم‌ترین تأثیرپذیری بود، فاصله اطمینان برای عامل‌های زمان انکوباسیون، پپتون، یون فلزی روی و کافئین به ترتیب به ۹۹/۹۰، ۹۹/۷۰، ۹۸/۷۶ و ۹۷/۷۴ درصد افزایش یافته است. ستون آخر جدول ۴ سهم هر یک از عوامل را در حذف کافئین مشخص کرده است. عامل زمان انکوباسیون مؤثرترین عامل و پس از آن غلظت پپتون و یون روی و در پایان غلظت کافئین بیش‌ترین اهمیت را داشته‌اند.

تعیین شرایط بهینه پیش بینی شده توسط روش آماری تاگوچی: برای تعیین شرایط بهینه از تحلیل آماری "هرچه بزرگتر بهتر"[۱۷] استفاده شد. به طور کلی برای تحلیل نتایج حاصل از بهینه‌سازی با کمک نرم افزار تاگوچی سه روش آماری "هر چه بزرگتر بهتر"، "هر چه کمتر بهتر"[۱۸] و "هر چه به مقدار اسمی تر نزدیک، بهتر"[۱۹] وجود دارد که اگرچه از هر سه روش می‌توان استفاده کرد اما در این پژوهش با توجه به این‌که از میانگین سه تکرار برای تحلیل نتایج در نرم افزار تاگوچی استفاده شده است، از روش "هرچه بزرگتر بهتر" استفاده شده است. سطح بهینه، میزان تأثیرپذیری و همچنین، بیش‌ترین میزان حذف زیستی کافئین پیش‌بینی شده تحت شرایط بهینه در جدول ۵ ارایه شده است. همان گونه که در جدول مشاهده می‌شود عامل‌هایی مانند زمان انکوباسیون و غلظت پپتون نسبت به غلظت یون روی دارای تأثیرپذیری بیشتری در بهبود تجزیه زیستی کافئین توسط سویه مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* TFS9 بوده‌اند. براساس شرایط پیش‌بینی شده توسط روش تاگوچی انتظار می‌رود که میزان پاسخ پیش‌بینی شده (درصد حذف زیستی کافئین) براساس ترکیب بهینه عامل‌های مورد آزمایش ۸۴/۰۴۲ درصد باشد.

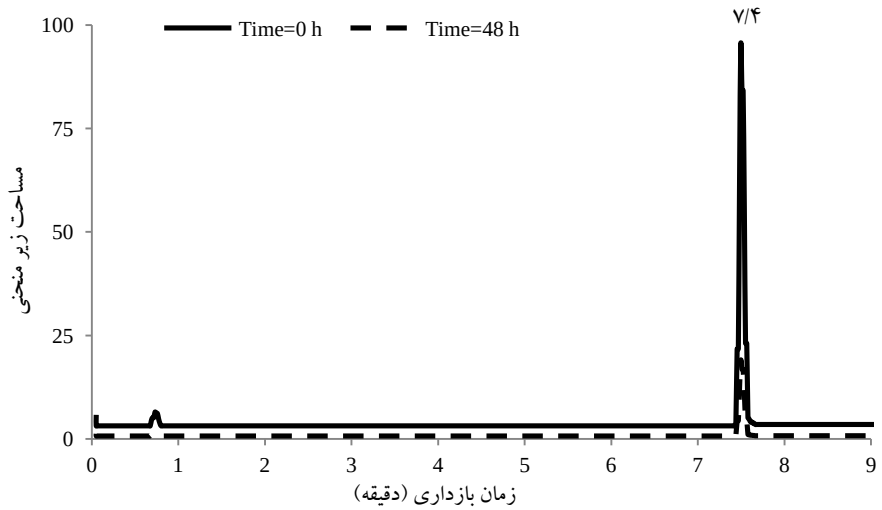
جدول ۵- شرایط بهینه پیش‌بینی شده برای دستیابی به حداکثر حذف زیستی کافئین توسط سویه مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* TFS9

عامل	بهترین سطح	مقدار بهینه	میزان سهم در بهبود پاسخ (درصد)
پپتون	۳	۳ گرم در لیتر	۱۱/۳۸۱
یون روی	۴	۵ میلی‌مولار	۶/۷۸۱
کافئین	۳	۵ گرم در لیتر	۶/۴۰۶
زمان گرماگذاری	۳	۴۸ ساعت	۱۱/۷۸۱
سهم کل عوامل در بهبود پاسخ			۳۶/۳۴۸
متوسط پاسخ‌های فعلی در آزمایش انجام شده			۴۷/۶۹۳
پاسخ پیش بینی شده در شرایط بهینه			۸۴/۰۴۲
پاسخ مشاهده شده در شرایط بهینه			۸۲/۸۰

انجام آزمایش تاییدی: در این مرحله میزان حذف کافئین پیش‌بینی شده تحت شرایط بهینه، با میزان حذف کافئین به‌دست آمده در همین شرایط با یکدیگر مقایسه می‌شود و چنانچه در فاصله مطلوب قرار گیرد طراحی آزمایش درست و بهینه‌سازی به پایان می‌رسد. به همین علت آزمایشی بر مبنای ترکیب بهینه عامل‌های بدست آمده در جدول ۵ انجام و درصد حذف کافئین به دست آمده تخمین زده شد. همان‌گونه که در جدول مشخص است درصد حذف کافئین به‌دست آمده (۸۲/۸۰) با درصد حذف کافئین پیش‌بینی شده (۸۴/۰۴۲) در فاصله مطلوب قرار گرفته است. شایان ذکر است که درصد حذف کافئین با استفاده از دستگاه HPLC و طبق فرمول زیر محاسبه شده است:

درصد حذف کافئین= غلظت اولیه کافئین- غلظت کافئین باقیمانده/ غلظت اولیه کافئین×۱۰۰ (۱۶).

کروماتوگرام‌های HPLC حاصل از تجزیه کافئین تحت سلول‌های رویشی سویه TFS9 در محیط بهینه به‌دست آمده توسط روش تاگوچی در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳- کروماتوگرام های HPLC به دست آمده از تجزیه کافئین توسط سویه مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* TFS9. خطوط توپر مربوط به ساعت صفرم از تلقیح و نقطه چین مربوط به ساعت ۴۸ ام بعد از تلقیح سوسپانسیون مخمری در محیط کشت بهینه شد.

بحث و نتیجه‌گیری

کافئین ترکیبی است که دارای آثار زیان‌بار فیزیولوژیک بر روی سیستم‌های انسانی بوده و همچنین، به عنوان یک آلاینده زیست محیطی شناخته می‌شود. اگرچه از نیم قرن پیش روش‌های فیزیکی و شیمیایی متنوعی از جمله استخراج به کمک حلال‌های آلی[۲۰] (۲۹)، روش آب داغ[۲۱] (۳۰) و روش دی اکسیدکربن فوق بحرانی[۲۲] (۳۱) برای حذف کافئین مطرح شدند اما این روش‌ها نتوانستند راندمان کافی برای حذف کافئین را داشته باشند و مشکلاتی مانند سمیت بالا، گران بودن و حذف غیراختصاصی کافئین، همواره استفاده از این روش‌ها را با محدودیت روبرو ساخته است. با توجه به عدم کارایی مناسب روش‌های سنتی کافئین‌زدایی، حذف زیستی کافئین توسط ریزسازواره‌ها[۲۳] روشی است که لزوم آن روز به روز بیشتر احساس می‌شود. نخستین تجزیه میکروبی کافئین با استفاده از سویه‌های قارچی *پنی سیلیوم راکی فورتی*[۲۴] و *استمفیلیوم*[۲۵] گزارش شده است (۱۴). با این حال گزارش‌ها حاکی از آن است که این سویه‌ها قادرند کافئین را در غلظت ۰/۱۹ گرم در لیتر بعد از ۲۹ ساعت گرماگذاری حذف کنند. مزافرا[۲۶] و همکارانش فرآیند تجزیه کافئین را با استفاده از گونه باکتری *سراشیا مارسه سنس*[۲۷] که قادر به تجزیه کافئین در غلظت ۰/۶ گرم در لیتر با بازده ۱۰۰ درصد بعد از ۷۲ ساعت بود، را توسعه دادند (۱۱). در مطالعه انجام شده دیگری، سویه‌ای از *سودوموناس پوتیدا*[۲۸] که نسبت به کافئین مقاوم است جداسازی شده و پس از بررسی‌های انجام شده مشخص شد که سویه یاد شده قادر به حذف ۹۵ درصدی کافئین با غلظت ۵ گرم در لیتر بعد از ۹۵ ساعت گرماگذاری است (۳۲). تجزیه زیستی کافئین همچنین، به وسیله سویه‌ای از *سودوموناس استاتزری*[۲۹] گزارش شده است، به‌طوری که حذف ۵۹ درصدی کافئین (غلظت اولیه کافئین ۱/۲ گرم در لیتر) بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری مشاهده شده است (۱۸). کوشش‌هایی برای بهبود بخشیدن به حذف زیستی کافئین از طریق فرآیندهای بهینه‌سازی و با استفاده از تغییر شاخص‌های محیطی مختلف (اسیدیته، دما، دور شیکر، زمان گرماگذاری و غیره) و تغییر شرایط تغذیه‌ای (اضافه کردن منابع کربن و نیتروژن به عنوان سوبستراهای کمکی) انجام شده است. مادیاستا[۳۰] و اسریدهار[۳۱] بهینه‌سازی فرآیند حذف کافئین را با استفاده از سویه‌های باکتری *کلبسیلا* و *ردوکوکوس* توسعه دادند. آن‌ها نشان دادند که افزودن گلوکز به حذف ۱۰۰ درصدی کافئین با غلظت اولیه ۰/۵ گرم در لیتر، بعد از گذشت ۱۰ ساعت از گرماگذاری منجر می‌شود (۳۳). در مطالعه انجام شده توسط دش[۳۲] و همکارانش شاخص‌های فیزیکی درگیر در فرآیند تجزیه زیستی کافئین توسط سویه باکتری *سودوموناس* NCIM 5235 مانند اسیدیته، دما و دور شیکر به روش آماری پاسخ سطحی[۳۳] بهینه‌سازی شد و به کمک این روش تجزیه کافئین از ۰/۱۸ به ۰/۲۹ گرم در لیتر در ساعت افزایش یافت (۳۴). در تنها مطالعه انجام شده در ارتباط با بهینه‌سازی حذف کافئین در مخمرها، قابلیت گونه مخمری *تریکوسپورون آسای*[۳۴] با توانایی ۱۰۰ درصد حذف کافئین در مدت زمان ۹۶ ساعت و در حضور ۵ گرم در لیتر سوکروز تحت شرایط بهینه گزارش شده است (۱۹). در این پژوهش، که برای نخستین بار کاربرد روش آماری تاگوچی در بهینه‌سازی تجزیه زیستی کافئین مطالعه شده است، در طی دو مرحله،

آزمایش‌های بهینه‌سازی با استفاده از روش‌های تک عاملی و تاگوچی بررسی شده است. در مرحله اول تأثیر عوامل مختلف شامل منابع کربن (گلوکز، سوکروز، فروکتوز، گالاکتوز و گلیسرول)، منابع ازت (عصاره مخمر، تریپتون، اوره، کازئین و کلرید آمونیوم)، یون‌های فلزی (آهن، مس، روی، کبالت و منگنز) و عواملی مانند دما، اسیدیته، دور شیکر و همچنین، میزان تلقیح[۳۵] بر روی تجزیه کافئین توسط سویه بومی مخمری *ساکارومایسس سرویزیه* TFS9، که پیش‌تر جداسازی و شناسایی شده بود، بررسی شد. براساس نتایج به‌دست آمده، سه شاخص غلظت گلوکز، غلظت پپتون و غلظت یون روی دارای بیش‌ترین تأثیرپذیری در حذف کافئین بودند که تأیید کننده فعالیت بیشتر آنزیم‌های احتمالی مسئول تجزیه زیستی کافئین توسط سویه بومی یاد شده در این شرایط بوده‌اند. متغیرهای یاد شده به عنوان شاخص‌های تأثیرگذار برگزیده شده و همراه با دو عامل تأثیرگذار غلظت اولیه کافئین و زمان گرماگذاری در طی مرحله دوم با استفاده از روش تاگوچی برای دستیابی به ترکیب بهینه عوامل یاد شده استفاده شد. شایان ذکر است که سایر عامل‌ها شامل اسیدیته، دور شیکر و همچنین، میزان تلقیح با وجود این‌که تأثیر معناداری بر روی رشد و دانسیته سلولی داشتند اما تأثیر معناداری بر روی حذف کافئین نداشتند و بنابراین، با وجود حذف آن‌ها به عنوان متغیرهای کمتر تأثیرپذیر در مرحله دوم بهینه‌سازی با استفاده از روش تاگوچی، از دمای ۲۸ درجه، دور شیکر ۱۵۰ و اسیدیته ۵/۵ و همچنین، ۵ درصد حجمی/ حجمی میزان تلقیح، که در مرحله اول مطلوب گزارش شدند، در آزمایش‌های بهینه‌سازی استفاده شد. اما طراحی تاگوچی تنها بر مبنای عامل‌های با بیش‌ترین تأثیرپذیری انجام شده است. روش تاگوچی یکی از روش‌های کارآمد در طراحی آزمایش بوده به گونه‌ای که با این روش تعداد آزمایش‌ها کاهش یافته که این عمل باعث کاهش هزینه و زمان آزمایش‌ها می‌شود. همچنین، با استفاده از این روش می‌توان میانکش‌های احتمالی بین عامل‌های مختلف را مطالعه کرد (۲۲). تحت شرایط بهینه در سطوح انتخاب شده این متغیرها، حداکثر حذف زیستی کافئین با غلظت اولیه ۵ گرم در لیتر توسط سلول‌های رویشی سویه بومی *ساکارومایسس سرویزیه* TFS9 در سطح معناداری ۵ درصد ($P\ value<0.05$)، ۸/۸۲ درصد پس از ۴۸ ساعت گرماگذاری تخمین زده شد. این در حالی است که قبل از آزمایش‌های بهینه‌سازی سویه TFS9 تنها قادر به حذف ۲۵/۵ درصد از کافئین با غلظت اولیه ۵ گرم در لیتر بعد از ۴۸ ساعت گرماگذاری بوده است (۲۶) که با توجه به افزایش ۳/۲ برابری کارآیی بالای روش طراحی تاگوچی را به خوبی اثبات می‌کند. براساس یافته‌های حاصل از این پژوهش، چنانچه بهینه‌سازی ترکیبات محیط کشت برای دستیابی به حداکثر حذف کافئین در سویه‌های مختلف میکروبی انجام گیرد می‌توان به راندمان های قابل قبول، قبل از کاربرد سویه‌های میکروبی در مقیاس صنعتی، دست یافت. بنابراین، استفاده از روش بهینه‌سازی انجام شده در این پژوهش را می‌توان برای سویه‌های میکروبی مشابه نیز پیشنهاد کرد.

References

(1) Heckman MA., Weil J., Mejia G. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *Journal of Food Science* 2010; 75 (3): 77- 87.

(2) Gokulakrishnan S., Chandraraj K., Gummadi SN. Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. *Enzyme and Microbial Technology* 2005; 37 (2): 225- 32.

(3) Strappaghetti G., Corsano S., Barbaro R., Giannaccini G., Betti L. Structure-activity relationships in a series of 8-substituted xanthines as A1-adenosine receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2001; 9 (3): 575- 83.

(4) Greenberg JA., Dunbar CC., Schnoll R., Kokolis R., Kokolis S., Kassotis J. Caffeinated beverage intake and the risk of heart disease mortality in the elderly: a prospective analysis. *American Journal of Clinical Nutrition* 2007; 85 (2): 392–8.

(5) Dash SS., Gummadi SN. Degradation kinetics of caffeine and related methylxanthines by induced cells of *Pseudomonas* sp. *Current Microbiology* 2007; 55 (1): 56- 60.

(6) Srisuphan W., Bracken MB. Caffeine consumption during pregnancy and association with late spontaneous abortion. *American Journal* of *Obstetrics and Gynecology* 1986; 154 (1): 14- 20.

(7) Brand D., Pandey A., Roussos S., Soccol C R. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme and Microbial Technology* 2000; 27 (1-2): 127-33.

(8) Mazzafera P. Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding. *Scientia Agricola* 2002; 59 (4): 815- 21.

(9) Batish DR., Singh HP., Kaur M., Kohli RK., Yadav SS. Caffeine affects adventitious rooting and causes biochemical changes in the hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.). *Acta physiologiae plantarum* 2008; 30 (3): 401-5.

(10) Pandey A., Soccol CR., Nigam P., Brand D., Mohan R., Roussos S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 2000; 6 (2): 153- 62.

(11) Mazzafera P., Olsson O., Sandberg G. Degradation of caffeine and related methyl xanthenes by *Serratia marcescens* isolated from soil under coffee cultivation. *Microbial Ecology* 1996; 31 (2): 199- 207.

(12) Madyastha KM., Sridhar GR. A novel pathway for the metabolism of caffeine by a mixed culture consortium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 249 (1): 178- 81.

(13) Hakil M., Denis S., Viniegra-Gonzalez G., Augur C. Degradation and product analysis of caffeine and related dimethylxanthines by filamentous fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998; 22: 355-9.

(14) Schwimmer S., Kurtzman RH. Caffeine metabolism by *Penicillium roqueforti*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1971; 147 (1): 109- 13.

(15) Nayak S., Harshitha MJ., Sampath MC., Anilkumar HS., Rao CV. Isolation and characterization of caffeine degrading bacteria from coffee pulp. *Indian Journal of Biotechnology* 2012; 11 (1): 86- 91.

(16) Sayed Baker., Sahana S. ., Rakshith D., Kavitha HU., Kavitha KS., Satish S. Biodecaffeination by endophytic *Pseudomonas* sp. isolated from *Coffee arabica* L. *Journal of Pharmacy Research* 2012; 5 (7): 3654-7.

(17) Fan FY., Xu Y., Liang YR., Zheng XQ., Borthakur D., Lu JL. Isolation and characterization of high caffeine-tolerant

bacterium strains from the soil of tea garden. *African Journal of Microbiology Research* 2011; 5 (16): 2278- 86.

(18) El-Mched F., Olama Z., Holail H. Optimization of the environmental and physiological factors affecting microbial caffeine degradation and its application in caffeinated products. *Basic Research Journal of Microbiology* 2013; 1 (3): 17- 27.

(19) LakshmiV., Das N. Caffeine degradation by yeasts isolated from caffeine contaminated samples. *International Journal of Natural Sciences* 2010; 1 (1): 47- 52.

(20) Houng JY., Liao JH., Wu JY., Shen SC., Hsu HF. Enhancement of asymmetric bioreduction of ethyl 4-chloro acetoacetate by the design of composition of culture medium and reaction conditions. *Process Biochemistry* 2006; 42 (1): 1- 7.

(21) Stone RA., Veevers A. The Taguchi influence on designed experiments. *Journal of Chemometrics* 1994; 8 (2): 103–10.

(22) Rao RS., Kumar GC., Prakasham SR., Hobbs PJ. The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications: a critical appraisal. *Biotechnology Journal* 2008; 3 (4): 510- 23.

(23) Mohapatra PKD., Maity C., Rao RS., Pati BR., Mondal KC. Tannase production by *Bacillus licheniformis* KBR6: optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. *Food Res*earch *International* 2009; 42 (4): 430- 5.

(24) Ashengroph M., Nahvi I., Zarkesh-Esfahani H., Momenbeik F. Optimization of media composition for improving conversion of isoeugenol into vanillin with *Pseudomonas* sp. strain KOB10 using the Taguchi method. *Biocatalaysis and Biotransformation* 2010; 28 (5-6): 339- 47.

(25) Taran M., Froedin N. Decolorization of Remazol Black-B by *Halomonas sp*. PTCC1417 isolated from Urmia lake: Optimization by Taguchi methodology. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 2 (6): 1- 10.

(26) Ashengroph M., Borchaluei M. *Saccharomyces cerevisiae* TFS9, a novel isolated yeast capable of high caffeine-tolerant and its application in biodecaffeination approach. *Progress in Biological Sciences* 2013; 3 (2): 145- 56.

(27) Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

(28) Venkata Dasu V., Panda T., Chidambaram M. Determination of significant parameters for improved griseofulvin production in a batch bioreactor by Taguchi's method. *Process Biochemistry* 2003; 38 (6): 877- 80.

(29) Udayasankar K. ., Raghavan CV., Rao PNS., Rao KL., Kuppuswamy S., Ramanathan PK. Studies on the extraction of caffeine from coffee beans. *Journal of Food Science and Technology* 1983; 20 (3): 64- 7.

(30) Li B., Yang Y., Gan Y., Eaton CD., He P., Jones AD. On-line coupling of subcritical water extraction with high-performance liquid chromatography via solid-phase trapping. *Journal of Chromatography A* 2000; 873 (2): 175- 84.

(31) Hyong SP., Nam GI., Kyoung HKim. Extraction behaviors of caffeine and chlorophylls in supercritical decaffeination of green tea leaves. *LWT - Food Science and Technology* 2012; 45 (1): 73- 8.

(32) Woolfolk CA. Metabolism of *N*-methylpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on caffeine as the sole source of carbon and nitrogen. *Journal of Bacteriology* 1975; 123 (3): 1088-106.

(33) Madyastha KM., Sridhar GR. A novel pathway for the metabolism of caffeine by a mixed culture consortium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 249 (1): 178- 81.

(34) Dash SS., Gummadi N. Optimization of physical parameters for biodegradation for of caffeine by *Pseudomonas* sp.: A statistical approach. *American Journal of Food Technology* 2007; 1 (2): 21- 9.

[1]- *Serratia*
[2]- *Klesiella*
[3]- *Rhodococcus*
[4]- *Aspergillus*
[5]- *Penicillium*
[6]- *Brevibacterium*
[7]- *Pseudomonas*
[8]- *Trichosporon*
[9]- St. Louis, Missouri, USA
[10]- Detroit, MI, USA
[11]- E. Merck, Darmstadt, Germany
[12]- Analytical grade
[13]- Ashengroph M and Borchaluei M
[14]- W32b, Nutek, Inc. , Michigan, USA
[15]- Jasco Model PU-980, UK
[16]- Pooling-up technique
[17]- Bigger to Better
[18]- Smaller to better
[19]- Nominal the best
[20]- Organic Solvent extraction
[21]- subcritical water diffusion
[22]- super critical carbon dioxide extraction
[23]- Microorganisms
[24]- *Penicillium roqueforti*
[25]- *Stemphylum* sp.
[26]- Mazzafera
[27]- *Serratia marcescens*
[28]- *Pseudomonas putida*
[29]- *Pseudomonas stutzeri*
[30]- Madyastha
[31]- Sridhar
[32]- Dash
[33]- Response surface methodology
[34]- *Trichosporon asahii*
[35]- Inoculation size

Optimization of caffeine bioremoval by growing cells of *Saccharomyces cerevisiae* using Taguchi analysis methodology

Morahem Ashengroph *
Assistant Professor of Microbiology, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, m.ashengroph@uok.ac.ir
Masoud Haidarizadeh
Assistant Professor of Plant Physiology, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, m.haidarizadeh@uok.ac.ir
Maryam Borchaluei
M.Sc. Student of Molecular Cell Biology, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, maryam_borchaluei@yahoo.com

Abstract

Introduction: In the recent years, application of microorganisms as green biocatalysts for removing caffeine pollution from industrial wastes and food caffeinated have been extensively considered. This investigation reports on optimization of bio-decaffeination process under growing cells of *Saccharomyces cerevisiae* by using the Taguchi statistical approach.

Materials and methods: Five variables, i.e. caffeine, Zn^{+2}, glucose, peptone concentrations and time incubation, which have significant effects on bio-decaffeination process, were selected and L16 ($4^4\times 1^3$) orthogonal array was determined for experimental trials. Caffeine degradation was estimated by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analysis.

Results: Use of Taguchi approach for optimization of design parameters resulted in about 82.8 % reduction of caffeine in 48 h incubation when 3g/l peptone, 5mM Zn^{+2} ion and 5 g/l of caffeine are present in the designed media. Under the optimized conditions, the yield of degradation of caffeine (5 g/l) by the growing cells of yeast strain TFS9 has been increased from 25.5 to 82.8 % which is 3.2 fold higher than the normal yield. The improvement of caffeine removal after best conditions were made shows the efficiency of Taguchi experimental design in such studies.

Discussion and conclusion: The current investigation is the first report for successful application of the Taguchi experimental approach to the bio-decaffeination process. According to the analysis of experimental results, the present study proposes the potentiality of the Taguchi approach to enhance the bio-decaffeination performance with the native strain of *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words: Bio-removal, Caffeine, Optimization, *Saccharomyces cerevisiae*, Taguchi approach

* Corresponding author
Received: December 15, 2013 / **Accepted:** June 21, 2014