بهینه سازیتولید اگزوپلی ساکارید توسط باکتری *Rhizubium radiobacter PTCC 1654* در لجن لبنی با استفاده از روش آماری سطح پاسخ

الهام اسکندری[۱]، فریده طباطبایی یزدی[۲*]، سید علی مرتضوی[۲]، آرش کوچکی[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۷)

چکیده

در این پژوهش تولید اگزوپلی ساکارید توسط باکتری *Rhizubium radiobacter PTCC 1654*از لجن لبنی در کشت غوطه‌وری به منظور کاهش ضایعات صنایع لبنی و استفاده به عنوان محیط سودمند برای رشد میکروارگانیسم‌ها مورد بررسی قرار گرفت.غربالگری اولیهبا استفاده از طرح فاکتوریل جزئی از میان ۷ متغیره، زمان، دما، غلظت کربنات کلسیم، غلظت سولفات آمونیوم،سرعت همزدن، درصد لجن لبنی و pH محیط کشت جهت شناسایی متغیرهای مؤثر بر رشد باکتری *R. radiobacter*انجام گرفت. نتایجنشان داد که سه متغیر درصد لجن لبنی، غلظت کربنات کلسیم و زمان گرمخانه گذاری اثر مثبت بر رشد *R. radiobacter*داشت (p<۰/۰۵). این سه متغیر همچنین اثر معنی‌داری (p<۰/۰۵) بر تولید اگزوپلی ساکارید توسط *R. radiobacter*با استفاده از روش آماری سطح پاسخ دارند.حداکثر تولید اگزوپلی درغلظتg/l ۱کربنات کلسیم، ۵۰ درصد لجنلبنی و زمان گرمخانه گذاری ۱۰۱/۶۹ ساعتحاصل شد که در این صورت تولید اگزوپلی ساکارید g/100ml۰٫۰۶۸۶و تولید بیومس g/100ml ۰/۲۸۸می‌باشد.نتایج FTIR نشان داد که اگزوپلی ساکارید تولید شده در محیط لجن لبنی دارای باقی‌مانده کربوهیدراتی و گروه‌های کربوکسیل روی زنجیره خود می‌باشد.

کلید واژگان: اگزوپلی ساکارید، *Rhizubium radiobacter PTCC 1654*، لجن لبنی، روش سطح پاسخ

*مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۱- مقدمه

اگزوپلی ساکاریدها (EPS)[1] پلیمرهایی با وزن مولکولی بالا هستند که از واحدهای قندی تشکیل‌شده‌اند و توسط انواع ریزسازواره‌ها به محیط اطراف ترشح می‌شـوند. اگزوپلی ساکاریدها کاربردهای فراوانی در پزشکی، کشاورزی و صنایع غذایی به‌عنوان امولسیفایر، تثبیت‌کننده، پیونددهنده، عامل تشکیل ژل، عامل انعقاد، مواد تشکیل‌دهنده فیلم، روان کننده و غلیظ کننده را دارند[۱-۳]. علاوه بر این اگزوپلی ساکاریدها مزایای بسیاری ازجمله غیر سمی و ایمن بودن، داشتن خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد، جداسازی آسان از باکتری‌ها و توانایی تولید از طریق تخمیر غوطه‌وری در محیط‌های صنعتی را دارا می‌باشند [٤]. در تولید پلی ساکاریدهای فعال زیستی در مقیاس صنعتی، منابع میکروبی به دلیل پایداری و مقرون‌به صرفه بودن، نسبت به گیاهان و جلبک‌ها ترجیح داده می‌شود [٥ و ٦]. *Rhizubium. radiobacter* باکتری گرم منفی، میله ای شکل و هوازی است که قبلا جزء *Agrobacterium tumefaciens*یا*Agrobacterium radiobacter*طبقه بندی می‌شد و در بیوسنتز طیف وسیعی از اگزوپلی ساکاریدهای میکروبی نقش دارد. بسیاری از اعضای این‌گونه تولیدکننده اگزوپلی ساکاریدهای مهم مانند سوکسینو گلوکان و کوردلان می‌باشند [۷]. اگزوپلی ساکاریدهای *R. radiobacter*به دلیل قابلیت افزایش ویسکوزیته مناسب، مورد توجه زیادی می‌باشند [۸]. همچنین این باکتری توانایی تجزیه لاکتوز و استفاده از آن به عنوان منبع کربن جهت رشد و تولید اگزوپلی ساکارید را دارد [۷ و ۹]. استفاده از پلیمرهای زیستیبه هزینه تولید آن‌ها بستگی دارد که با ماده خام استفاده شده به‌عنوان محیط رشد در ارتباط می‌باشد [۱۰]. در حال حاضر هزینه تولید اگزوپلی ساکارید یکی از علل عمده‌ای است که استفاده از آن‌ها رادر مقیاس‌های بزرگ با مشکل مواجه می‌نماید. از آنجایی که هزینه منبع کربن بیش از ۵۰٪ از هزینهتولید پلیمرهای زیستی را شامل می‌شود بنابرین به‌منظور کاهش هزینه تولید استفاده از منبع کربن ارزان‌ترو بهبود بازده محصول با استفاده از بهینه سازی شرایط تخمیر موردنیاز می‌باشد [۱۱]. استفاده از ملاس نیشکر، آب پنیر و دیگر محصولات جانبی کشاورزی و صنعت برای تولید اگزوپلی ساکارید توسط پژوهشگران متعددی مورد مطالعه قرار گرفته است [۱۲، ۱۳و ١٤]. صنایع لبنی به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین تولیدکننده پساب می‌باشد که حاوی مقادیر بالایی ترکیبات آلی مانند کربوهیدرات، پروتئین و غیره هستند پساب صنایع لبنی توسط ریزسازواره‌های مختلف می‌تواند به‌عنوان منبع کربن و نیتروژن مورد استفاده قرار بگیرد؛ بنابراین از این مواد به‌عنوان محیط کشت ارزان برای رشد ریزسازواره‌ها و تولید انواع فرآورده‌ها از قبیل اگزوپلی ساکارید ها، آنزیم‌ها، اسیدهای آلی و غیره می‌توان بهره برداری نمود.لجن لبنی حجمی بین۱- ۰/۰۵٪ حجم شیر را دارد که ١٦- ١٤٪ آن ماده‌ی خشک است. لجن لبنی شامل ۸- ٦٪ نیتروژن، ۰/۳۵- ۰/۲۵٪ چربی، ٤/۷٪ لاکتوز و ۳- ۱/۵٪ مواد غیر شیری می‌باشد[۱۵]. در یک کارخانه‌ی صنایع لبنی روزانه حجم بالایی لجن از باکتوفیوژ و سپراتور تولید می‌شود که حاوی ترکیبات مفید مثل فاکتورهای رشد، کربن، نیتروژنو مواد آلی برای رشد باکتری‌ها است، بنابراین می‌توان از آن به‌عنوان یک منبع ارزان و قابل دسترس جهت تولید میکروبی اگزوپلی ساکاریدها استفاده کردکه سبب کاهش هزینه تولید اگزوپلی ساکارید می‌شود.

فرآیند تولید اگزوپلی ساکاریدها به شدت تحت تأثیر فاکتورهای متعددی مانند ترکیبات محیط کشتاز جمله منبع کربن و نیتروژن، فاکتورهای رشد، نمک‌های معدنی، نوع سویه و شرایط تخمیر (pH، زمان، دما و هوادهی) می‌باشد[١٦-١٩]. به احتمال زیاد با استفاده از یک روش بهینه‌سازی مناسب می‌توان فاکتورهای مؤثر را تشخیص داد؛ علاوه براین امکان اثر متقابل بین فاکتورها باید به منظور تعیین شرایط بهینه در نظر گرفت. روش سطح پاسخ مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری برای طراحی آزمایش‌ها، مدل‌های ساخته شده، ارزیابی اثرات فاکتورهاو جستجو شرایط بهینه، برای پاسخ مطلوب است. هدف از این پژوهش استفاده از درصدهای مختلف لجن لبنی جهت رشد و تولید اگزوپلی ساکارید توسط سویه *R. radiobacter* و همچنین بهینه سازی شرایط تولید اگزوپلی ساکارید بود.

1. Extracellular polysaccharides

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ میکروارگانیسم

سویه *R.radiobacter PTCC 1654*به صورت لیوفلیزه از مرکز کلکسیون کشت باکتری‌ها و قارچ‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. به‌منظورآماده‌سازی میکروارگانیسم برای انجام عمل تخمیر ابتدا می‌بایست باکتری از حالت لیوفلیزه خارج کرده و فعال نمود، برای این کار از محیط نوترینت براث[2](شرکت مرک آلمان)استفاده گردید. باکتری لیوفلیزه به میزان لازم تحت شرایط استریل زیر هود به داخل محیط مغذی انتقال داده شد و در دمای۲۸°C به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه گذاری گردید. میکروارگانیسم فعال شده به سطحمحیط کشت جامد تریپتیکاز سوی آگار[3](شرکت مرک آلمان)منتقل داده شد و در همان شرایط قبل گرمخانه گذاری شد. از این محیط کشت به‌عنوان محیط ذخیره برای تولید ماده مورد نظر استفاده گردید [۱۲].

۲-۲- آماده‌سازی محیط عصاره لبنی به‌عنوان منبع کربن محیط تخمیر

لجن لبنی مورد استفاده در این پژوهش، از کارخانه پگاه خراسان رضوی تهیه گردید. pH اولیه نمونه‌هایلجن لبنی با استفاده HClدر حدود ۵ تنظیم شدو۵ دقیقه در دمای ۹۰°C به منظور رسوب پروتئین‌های غیر محلول حرارتداده شد. بعد از سرد شدن تا ۲۵°C به منظور حذف رسوبات از کاغذ صافی۸ میکرومتر (واتمن شماره ٤۰) استفاده شد و سپسمایع زیر صافیدر دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۰ دقیقه استریل شد. عصاره جهت انجام آزمایش ها در مراحل بعدی، در دمای ٤ °C در یخچال نگهداری شد [۲۰].

۲-۳- اندازه گیری ترکیبات لجن لبنی

میزان پروتئین با استفاده از روش میکروکلدال با در نظر گرفتن ٦/۲۵ به عنوان ضریب تبدیل نیتروژن به پروتئین خام، قند کلو خاکستر لجن لبنی از لحاظ کمی براساس روش (AOAC(۱۹۸٤ در سه تکرار تعیین شد [۲۱].

2. Nutrient broth
3.Tryptic soy agar

۲-٤- کشت میکروبی و شمارش میکروبی

یک لوپ کامل از *R.radoibacter*که قبلاً فعال شده بود به محیط تریپتیکاز سوی براث[4](شرکت مرک آلمان) اضافه گردید و به وسیله شیکر باکتری کاملاً در محیط یکنواخت شد. لوله‌های حاوی باکتری به مدت ۲٤ ساعت در دمای °C ۲۸ درجه گرمخانه گذاری شدند. سپس کدورت لوله‌های حاوی TSB و باکتری بررسی شد و غلظت باکتری روی نیم مک فارلند تنظیم شد.۱ میلی‌لیتر از محیط TSB به ۱۰۰ml محیط کشت لجن لبنی با توجه به طرح آماری (جدول ۳) اضافه شد و در دما و زمان‌های تعیین شده گرمخانه گذاری گردید. جهت رقت سازی ۱ml از محیط تخمیر به۹ml سرم فیزیولوژی منتقل شدهتا رقت 10^{-1} حاصل شود و سپس از آن برای تهیه سریرقت تا 10^{-10} استفاده شد. به منظور شمارش کلنی از هر یک از رقت‌های ساخته شده به میزان ۱ml روی محیط کشت تریپتیکاز سوی آگار منتقل و کشت سطحی داده شد و پس از ۲٤ تا٤۸ساعت گرمخانه گذاری در۲۸°C کلنی‌های حاصله مورد شمارش قرار گرفت و نسبت به محاسبه تعداد باکتری‌ها در هرmlاقدام شد. بدین نحو که پلیت‌های حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی به‌عنوان پلیت‌های استاندارد انتخابو شمارش گردید [۲۲].

۲-۵- تولید اگزوپلی ساکارید

باکتری *R.radiobacter*در داخل محیط کشت تریپتیک از سوی براث، در دمای °C ۲۸ مدت ۲٤ ساعت تکثیر داده شد، سپس ۱ml از مایه تلقیح را بهارلن مایر حاوی ۵۰ml از محیط کشت اولیه استریل با ترکیب(g/l) ۲۰ ساکارز، (g/l)۵عصاره مخمر و(g/l) ۵ پپتون با pH=۷ انتقال داده شد. ارلن حاوی محیط کشت تلقیح شده در°C ۲۸ به مدت ۲٤ ساعتدر انکوباتور شیکر دار (CFL مدل 3033) با سرعت (۱۵۰rpm)قرار داده شد. سپس سانتریفیوژ (۵۰۰۰g، ۳۰ دقیقه در°C٤) انجام پذیرفت.سوپرناتانت دور ریخته شد و ته‌نشست در۲۵ml از محلول نمکی ۰/۸۵ (سدیم کلرید) دوباره حل گردید و ۲ml از آن به ۵۰ml محیط تخمیر با pH=٦/۵ اضافه شد. محیط تخمیر (در یک حجم نهایی ۱L) حاوی کربنات کلسیم (۰/۰،۷۵/۵g و ۱۰ml،MgSO4۰/۲۵ gو$KH_2PO_4$۱g، $(NH_4)_2$ $PO_4$۱g،۱)

4.Tryptic soy broth

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

از محلول حاوی فلزات کمیاب و عصاره استریل شده لجن لبنی (۳۰،۴۰ و ۵۰٪) بود. محلول فلزات کمیاب شامل: $FeSO_4.H_2O$ ۵gr، $MnSO_4.H_2O$ ۲gr، $CoCl_2.H_2O$ ۱gr، $ZnCl_2$ ۱gr که در ۱ لیتر HCl، ۰/۱ مولار حل گردیده است. تخمیر در انکوباتور شیکردار با سرعت (۱۵۰rpm) در زمان‌های ۲۴،۷۲ و۱۲۰ساعت و دمای ۲۸°C انجام شد [۱۲ و ۲۳].

۲-۶- جداسازی اگزوپلی ساکارید از محیط تخمیر

بعد از کامل شدن زمان تخمیر ابتدا به منظور غیر فعال کردن سلول‌ها و کاهش ویسکوزیته محیط تخمیر از حرارت°C ۸۵ به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد بعد از اینکه مایع تا دمای اتاق (°C ۲۵) سرد گردید، غلظت ۵٪ (w/v) تری کلرو استیک اسید به مایع اضافه شد و در دمای°C ٤ برای ۱۲ ساعت نگهداری شد. سپس با استفاده از سانتریفیوژ ۵۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سلول‌ها و رسوب پروتئینی از محیط تخمیر خارج شد و به مقدار ۲/۵ برابر حجمی محیط تخمیر،اتانول سرد به مایع فوقانی سانتریفیوژ اضافه شد تا اگزوپلی ساکارید حاصل رسوب نماید. رسوب حاصل با استفاده از سانریفیوژ ۵۰۰۰g برای ۳۰ دقیقه در °C ٤ جمع‌آوری و درآب مقطر حل شد و در دمای °C ۷۰- انجماد و توسط خشک کن انجمادی(مدل CHRIST, BETA 2-8 LD) خشک گردید [۷ و ۲٤].

۲-۷- اندازه گیری بیومس و تعیین میزان رشد

برای تشخیص محتوای بیومس،محیط تخمیر شدهبا سرعت ۵۰۰۰g برای ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. ته نشست سلولی ۳ باربا آب مقطر شسته و در آون در دمای °C۹۰ تا زمان رسیدن به وزن ثابت خشکشد [۱۱].

۲-۸- تعیین میزان کل کربوهیدرات و پروتئین

محتوای کربوهیدرات کل اگزوپلی ساکارید تولید شده با روش فنل- اسید سولفوریک با استفاده از گلوکز به عنوان استاندارد تعیین شد [۲۵]. اندازه‌گیری پروتئین اگزوپلی ساکارید تولیدی با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد به روش برادفورد اندازه‌گیری شد [۲٦].

۲-۹- طرح های آزمایشی

۲-۹-۱- طرح فاکتوریل جزئی (FFD)[5]

هدف از اولین گام بهینه سازی، شناسایی فاکتورهایی از محیط بود که اثر قابل توجهی بر رشد سویه*PTCC1654R.radiobacter* در محیط لجن لبنی داشت. طرح فاکتوریل یک نوع از طرح‌های تجربی است که در شناسایی فاکتورهای مهم و ارتباط بین فاکتورها، با تعداد آزمایش کمتری نسبت به تکنیک یک فاکتور در یک زمان مفید می‌باشد. در برخی آزمایش‌ها، تعداد فاکتورهای مورد بررسی زیاد می‌باشد. با وجود اینکه ممکن است مطالعه تعداد زیادی از فاکتورها لازم باشد، ولی این امر واقع بینانه است که انتظار داشته باشیم، تنها تعداد محدودی از فاکتورها (P) دارای تأثیر چشمگیر و عمده‌ای باشد. در این‌گونه شرایط، روش طراحی فاکتوریل جزئی الگوی بسیار مناسبی می‌باشد[۲۷]. مطابق جدول ۱و بر اساس طرح فاکتوریل جزئی،۷ فاکتور، همزدن، دمای انکوباسیون، غلظت لجن لبنی، کلسیم کربنات، pH، $NH_4(SO_4)_2$ و زمان گرمخانه گذاری و هر کدام در ۲ سطح در نظر گرفته شد. بر این اساس تعداد ۸ آزمایش برای غربالگری شناسایی متغیرهای مستقل مؤثر بر رشد سویه*PTCC 1654R. radiobacter* در محیط لجن لبنی انجام پذیرفت. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد.

Table 1 Variables in real values, for screening by the 2-level fractional factorial design

Variable	Range and levels	
	-1	+1
(h) Time	48	120
(g/l) $CaCO_3$	0/5	1
(g/l) NH_4SO_4	0/5	3
(%) Dairy sludge	5	30
pH	5	9
(rpm)Agitation	50	150
(°C) Temperature	24	37

5. Fractional factorial designs

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۲-۹-۲- طرح مرکب مرکزی(CCD)[6]

در این پژوهش پس از استفاده از طرح فاکتوریل جزئی برای شناسایی متغیرهای مؤثر بر رشد*R. Radiobacter* در محیط لجن لبنی، از روش سطح پاسخ با استفاده از طرح مرکب مرکزی به منظور بهینه سازی متغیرهای مؤثر بر متغیر وابسته (راندمان تولید اگزوپلی ساکارید) استفاده شد. روش سطح پاسخ[7] مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری است و در بهینه سازی فرایندهایی به کار می‌رودکه پاسخ مورد نظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تأثیر قرار می‌گیردبه دلیل اینکه در این پژوهش بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورها مدنظر بود، از این رو طرح آماری سطح پاسخ انتخاب شد. در این مطالعه اثر متغیرهای مستقل در سه سطح شامل X_1، X_2و X_3مورد ارزیابی قرار گرفت. جداول ۲ و ۵ متغیرهای مستقل فرآیند و مقادیر آن‌ها، همچنین طرح آزمایشی مورد استفاده را نمایش می‌دهد. شش نقطه مرکزی برای تخمین خطای آزمایش استفاده شد. میانگین وزن خشک اگزوپلی ساکارید تولید شده و بیومس از دو مرتبه تکرار هر آزمایش به عنوان متغیرهای وابسته یا پاسخ(Y)در نظر گرفته شد.مرحله دوم طرح آماری گزینش شده و رابطه مدل مورد استفاده برای پیش‌بینی، برازش شده و مورد ارزیابی قرار گرفت. مدل مورد استفاده در RSM عموماً رابطه‌ی درجه دوم است. در RSM برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می‌نماید. مدل چند متغیره به صورت زیر می‌باشد:

$$Y=\beta_0+\beta_1X_1+\beta_2X_2+\beta_3X_3+\beta_{11}X_1^2+\beta_{22}X_2^2+\beta_{33}X_3^2+\beta_{12}X_1X_2+\beta_{13}X_1X_3+\beta_{23}X_2X$$

در معادله مذکور Y پاسخ پیش بینی شده، β_0 ضریب ثابت β_1، β_2، β_3 اثرات خطی، β_{11}، β_{22}،β_{33} اثرات مربعات و β_{12}، β_{13}، β_{23} اثرات متقابل است.به منظور آنالیز داده‌ها و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ و همچنین طرح فاکتوریل جزئی، از نرم‌افزار Design Expert 7.0.3 استفاده گردید [۲۸].

6. Central composite designs
7. Response Surface Methodology

Table 2 Independent variable values of the process and their corresponding levels

Independent variable	Symbol	Range and levels		
		-1	0	+1
Dairy (%) sludge	X_1	30	40	50
$CaCO_3$ (g/l)	X_2	0/5	0/75	1
Time(h)	X_3	24	72	120

۲-۱۰- طیف‌سنجی مادون قرمز[8] اگزوپلی ساکارید

برای مطالعه ساختار اگزوپلی ساکارید تولید شده از آزمون FTIR استفاده شد. مقدار ۵ mg از پودر اگزوپلی ساکارید به دست آمده با مقدار مناسبی از پودر بروميد پتاسیم (KBr) مخلوط گردید و تحت فشار از آن قرص به ضخامت۲mm تهیه گردید و با استفاده از دستگاه طیف سنج (spectrometer Shimadzu Japan،4300) با رزولوشن ٤cm^{-1} در بازه ٤٠٠٠-٤٠٠ مورد بررسی قرارگرفت [۱۲].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آنالیز شیمیایی لجن لبنی

میزان پروتئین، خاکستر و قند کل موجود در لجن لبنی به ترتیب شامل۰/۳ ± ۳/۲، ۰/۰۲ ± ۰/٦ و ۰/۲ ± ٤/۲ درصد بود.

۳-۲-۱- نتایج غربال‌گری متغیرهای مؤثر بر رشد *R.radiobacter* در محیط لجن لبنی

طرح FFD به منظور شناسایی متغیرهای مؤثر بر رشد *R.radiobacter*در محیط لجن لبنی از میانهفت متغیر با ۸ آزمایش انجام گرفت. پاسخ‌های بهدست آمده از رشد *R.radiobacter* در محیط لجن لبنی بر اساس طرح FFD در جدول ۳ آورده شده است. تجزیه آماری پاسخ‌های به دست آمده، بر اساس طرح فاکتوریل جزئی (جدول ٤) نشان داد که از بین متغیرهای مورد بررسی چهار متغیر، زمان، غلظت کربنات کلسیم،

8. Fourier ransform Infrared Spectroscopy

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

سولفات آمونیوم و در صد لجن لبنی به‌صورت معادله درجه اولاثر معنی‌داری (p<۰/۰۱) بر رشد *R.radiobacter*دارد. با توجه به ضرایب معادله (۱) مشخص گردید سولفات آمونیوم اثر منفی بر رشد *R.radiobacter*دارد در حالی کهزمان،غلظت کربنات کلسیم کربنات و درصد لجن لبنیاثر مثبتی در رشد *R.radiobacter*در محیط لجن لبنی داشت؛و بر این مبنا سه فاکتور فوق جهت بهینه سازی تولید اگزوپلی ساکاریدو بیومس انتخاب گردیدند. مدل پیشنهادی حاصل از آنالیز آزمایش‌های انجام شده از طرح FFDتوسط نرم افزار در زیر آورده شده است.

معادله (۱): Growth(CFU/ml) = -۱E+۱۳ +۵/۲۲E۱۰+Time+۷/۳۷E+۱۲Caco$_3$-۱۰+۸/۷۳NH$_4$SO$_4$+۱/۵۵ E+۱۱Sludge

Table 3 Two-level fractional factorial design of variables (in coded levels) with Growh *R.radiobacter* as the response

Run	Temperature (°C)	Agitation rat (rpm)	pH	Dairy sludge (%)	NH_4SO_4 (g/l)	$CaCO_3$ (g/l)	Time (h)	Cell count (cfu)
1	30	50	5	30	3	0/5	47	$2/1\times10^{9}$
2	24	50	9	5	3	0/5	120	$9/9\times10^{9}$
3	24	150	5	5	3	1	48	$1/1\times10^{10}$
4	30	150	5	5	0/5	0/5	120	$1/7\times10^{11}$
5	30	50	9	5	0/5	1	48	$1/2\times10^{10}$
6	30	150	9	30	3	4	120	$7/5\times10^{12}$
7	24	50	5	30	0/5	1	120	$7/8\times10^{12}$
8	24	150	9	30	0/5	0/5	48	$4/1\times10^{11}$

Table 4 Analysis of variance for thegrowth of*R.radiobacter* as the responseusing coded values

sourse	Sum of squares	Mean square	Df	f_{value}	p_{value}
Model	8/56E+25	2/14E+25	4	1376/986	< 0/0001
Time	2/83E+25	2/83E+25	1	1820/962	< 0/0001
Caco3	2/71E+25	2/71E+25	1	1745/792	< 0/0001
NH4SO42	9/44E+22	9/44E+22	1	6/075299	0/0905
Dairy sludge	3/01E+25	3/01E+25	1	1935/115	< 0/0001
Residual	4./66E+22	1/55E+22	3		
Cor Total	8/56E+25		7		
	R^2adjusted=0/99873			R-Squared =0/999456	

۳-۲- نتایج بهینه سازی با استفاده از روش سطح پاسخ

جهت تعیین روند تغییراتتولید اگزوپلی ساکارید و بیومس و بررسی اثر هر یک از متغیرهای مستقل در ابتدا نیاز به تعیین مناسب تربن مدل جهت برازش داده های آزمون می‌باشد. از نظر آماری مدلی مناسب است که آزمون عدم برازش[9] آن معنی‌دار نبوده وR^2و R^2اصلاح شدهدارای بالاترین مقدار باشد. با توجه به غیر معنی‌دار بودن آزمون عدم برازش برای تولید اگزوپلی ساکارید و بیومس (۰/۱۰۳۵ و ۰/۲۳۱۰ به ترتیب)و همچنین مقادیر R^2 و R^2 اصلاح‌شده،مدل چندجمله‌ای درجه دوم برای بررسی روند تغییرات پاسخ هایاندازه‌گیری شده در این پژوهش انتخاب شد. برای تعیین مدل سطح پاسخ از برآیند پاسخ‌های خطی، درجه دوم و اثر متقابل متغیرهای مستقل استفاده شد. معادله های زیر ارتباط تجربی میان راندمان تولید اگزوپلی ساکارید وبیومس و متغیرهای مستقل با اعداد حقیقی را نشان می‌دهد:

معادله (۲): EPS(g/100ml) =۰/٦١٤٥١١- ۰/۰۳۱۲۲X_1+۰/۰٤٤۲۲۷X_2+۰/۰۳۷۰۵X_3-۰/۰۲۵X_1X_2 -٦E-۰۵X_1X_3+ ۰/۰۰۰۲۳۹٦X_2X_3+۰/۰۰۰۵۸٦ X_1^2-۰۲۱۸۲ X_2^2-۷,۱E-۰٦X_3^2

9. Lack of fit

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

معادله (۳): Biomass (g/100ml)= ۰/۳۳۹٦٦۸۱- ۰/۳۳۹٦٦۸۲-۰/۰۲۵۵۵ X_1+۰/۱۸۵٦۳٦X_2+۰/۰۰٤۵۰۹X_3 - ۰/۰۰٤X_1X_2- ۸/۳E-۰۵X_1X_3+۰/۰۰۰٤۱۷X_2X_3+۰۰۰٤۸۲X_1^2+۰/۰۵۰۹۰۹X_2^2- ۹/۵E-۰٦X_3^2

با توجه به نتایج غربال‌گری عوامل مؤثر بر رشد*R.radiobacter*بر اساس طرح فاکتوریل جزئی دوسطحی، سه فاکتور غلظت لجن لبنی، کلسیم کربنات و زمان گرمخانه گذاری برای بهینه‌سازی تولید اگزوپلی ساکارید وبیومس بر اساس روش سطح پاسخ انتخاب شد. همان‌طور که در جدول ٦ و ۷ مشاهده شد، جملات خطی غلظت لجن لبنی، کربنات کلسیم، زمان، جملات اثر متقابل درصد لجن لبنی و زمان، کلسیم کربنات و زمان و جمله درجه دومدرصد لجن لبنی، اثر معنی‌داری (p< ۰/۰۵) بر تولید اگزوپلی ساکارید داشت. همچنین، جملات خطیدرصد لجن لبنی، کربنات کلسیم، جمله اثر متقابل غلظت لجن لبنی و زمان و جمله درجه دومدرصد لجن لبنی،اثر معنی‌داری (p< ۰/۰۵) بر تولید بیومس نشان داد.

Table5 Experimental design (conditions and responses) for EPS production and biomass

Biomass (g/100ml)	EPS (g /100ml)	Dairy sludge (%)	$CaCO_3$g/l ()	Time (h)	Run	Biomass (g/100ml)	EPS (g/100ml)	Dairy sludge (%)	$CaCO_3$ (g/l)	Time (h)	Run
0/3	0/5	50	1	24	11	0/2	0/44	40	0/75	72	1
0/18	0/3	40	0/75	24	12	0/18	0/42	40	0/75	72	2
0/1	0/26	30	0/5	24	13	0/2	0/44	40	0/75	72	3
0/28	0/52	50	0/5	24	14	0/18	0/46	40	1	72	4
0/18	0/25	30	1	24	15	0/2	0/43	40	0/75	72	5
0/15	0/42	40	0/5	72	16	0/24	0/6	50	0/5	120	6
0/3	0/58	50	0/75	72	17	0/2	0/55	40	0/75	120	7
0/18	0/42	30	0/75	72	18	0/2	0/56	30	1	120	8
0/2	0/44	40	0/75	72	19	0/16	0/68	50	1	120	9
0/18	0/43	40	0/75	72	20	0/28	0/48	30	0/5	120	10

Table 6 Analysis of variance EPS production using coded values

P value	F value	Df	Mean square	Sum of squares	sourse
< 0/0001	87/98878	9	0/024515	0/220634	Model
< 0/0001	323/9253	1	0/09025	0/09025	A-dairy sludge
0/0026	15/82837	1	0/00441	0/00441	B-caco3
< 0/0001	358/92	1	0/1	0/1	C-time
0/3145	1/121625	1	0/000312	0/000312	AB
0/0006	23/73358	1	0/006612	0/006612	AC
0/0006	23/73358	1	0/006613	0/006613	BC
0/0002	33/93629	1	0/009455	0/009455	A^2
0/8949	0/018354	1	5/11E-06	5/11E-06	B^2
0/1351	2/642956	1	0/000736	0/000736	C^2
		10	0/000279	0/002786	Residual
0/1035	2/358409	5	0/000691	0/000953	Lack of Fit
		5	6/67E-05	0/000333	Pure Error
R-Squared=0.98753			Adj R-Squared=0/97630		

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

Table 7 Analysis of variance biomass production using coded values

P value	F value	Df	Mean square	Sum of squares	sourse
< 0/0001	16/0544	9	0/005476	0/049284	Model
< 0/0001	46/90832	1	0/016	0/016	A-dairy sludge
0/0002	31/92697	1	0/01089	0/01089	B-caco3
0/3285	1/055437	1	0/00036	0/00036	C-time
0/1567	2/345416	1	0/0008	0/0008	AB
0.0001	37/5266	1	0/0128	0/0128	AC
0/4615	0/586354	1	0/0002	0/0002	BC
0/0015	18/71668	1	0/006384	0/006384	A^2
0/7809	0/081623	1	2/78E-05	2/78E-05	B^2
0/0786	3/837953	1	0/001309	0/001309	C^2
		10	0/003411	0/003411	Residual
0/2310	2/009626	5	0/000456	0/002278	Lack of Fit
		5	0/000227	0/001133	Pure Error

R-Squared=0/935271Adj R-Squared=0/877014

۳-۳-تأثیر متغیرهای مستقل بر تولید اگزوپلی ساکارید و بیومس

همانطور که در شکل (۱c و ۱f) مشاهده می‌شود با افزایش درصدهای مختلف لجن لبنی از ۳۰ تا ۵۰٪تولید اگزوپلی ساکاریدو بیومس افزایش یافت. منبع کربن به دلیل اثر مستقیم آن بر بازده تولید، ترکیبات، ساختار وخصوصیات اگزوپلی ساکاریدهای باکتریایی، مهم‌ترین ترکیب محیط کشت مورد استفاده برای تولید اگزوپلی ساکارید است. لاکتوز کربوهیدرات اصلی موجود در لجنلبنی است که اصلی‌ترین عامل مغذی برایرشد و تولید اگزوپلی ساکارید است و به‌عنوان منبع کربن جایگزین جهت رشد و تولید اگزوپلی ساکارید می‌باشد. به نظر می‌رسد علت اثر منبع کربن بر تولید اگزوپلی ساکارید نیازمندی زیاد سویه *R.radiobacter*به منبع کربن می‌باشد.تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد استفاده از لجن لبنی جهت تولید اگزوپلی ساکارید انجام نشده است. سینگ و همکاران (۲۰۱۳) لجن لبنی را به‌عنوان یک محیط کشت جایگزین برایرشد *Rhizobium*مورد بررسی قرار دادند.حداکثر رشد همه سویه‌ها در غلظت لجن‌لبنی ٦٥٪ مشاهده شد. با توجه به نتایج به دست آمده این پژوهشگران بیان کردند، لجن لبنی شامل کازئین، لاکتوز، چربی، فسفر، نیتروژن، پتاسیم و مواد آلی می‌باشد و نسبت به ملاس و لجن فاضلاب که قبلاً برای رشد *Rhizubium*استفاده شده بود، دارای سطح پایین‌تری از فلزات و ترکیبات مضر است [۲۹]. رویز و همکاران (۲۰۱۵)، با رشد *Agrobacteriumradiobacter NBRC 12665* در غلظت‌های مختلف ملاس، لاکتوز، گلوکز و ساکارز نشان دادند که افزایش در غلظت تمام سوبستراها منجر به افزایش تولید اگزوپلی ساکارید گردید [۹]. موسوی نسب و همکاران (۲۰۱۲) تولید اگزوپلی ساکارید در ۱۰ درصد شیره خرما به‌عنوان منبع کربن جایگزین با*R.radiobacter*مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تولید اگزوپلی ساکارید با استفاده از شیره خرما پس از ٦ روز سه برابر بیشتر از ساکارز بود [٢٤]. رشد سلول و تولید اگزوپلی ساکارید معمولاً به نوع منبع کربن بستگی دارد که بر کیفیت جزء قندی و وزن مولکولی نیز مؤثر است[۳۰].

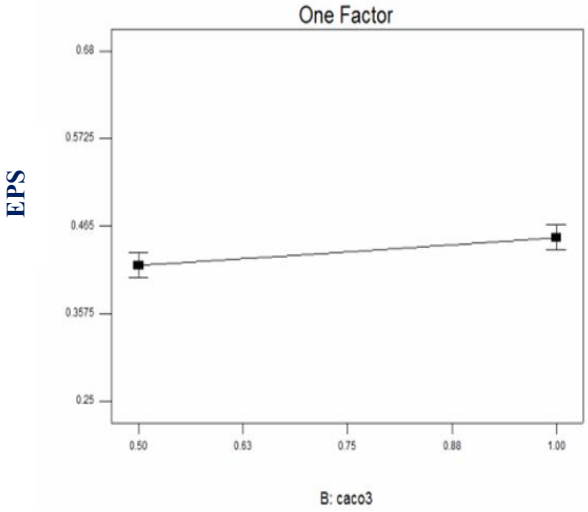
همانطور که در شکل (۱a و ۱d) مشاهده می‌شود،با افزایشکلسیم از ۰/۵g/l تا ۱ تولید اگزوپلی ساکارید و بیومس افزایش یافت. با این حال نتایج نشان داد که اثر کربنات کلسیم بر تولید بیومس بیشتر از تولید اگزوپلی ساکارید است (شکل ۱a). برای بسیاری از گونه‌های میکروبی کلسیم در مقدار کم جهت حفظ استحکام دیواره سلولی، پایداری پروتئین‌های الیگومری و کمپلکس

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

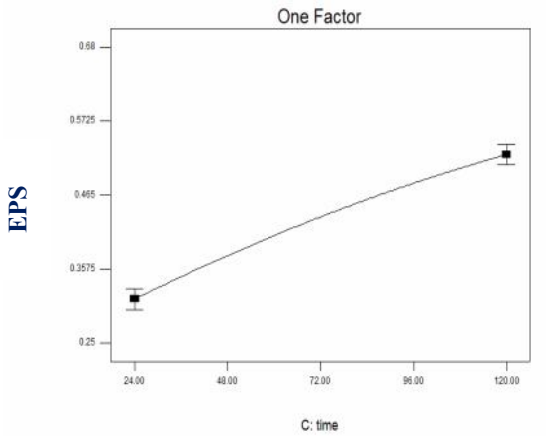
پپتیدوگلیکان- پروتئین در غشای خارجی مورد نیاز است.استفاده از کلسیم کربنات از اسیدی شدن محیط مایع باکتریایی جلوگیری می‌کند [۳۱].

جوردن (۱۹۸٤)، استفاده از ٤g/l کربنات کلسیم برای کنترل pHدر محیط کشت جهت رشد*Rhizobium*را پیشنهاد داد[۳۲]. استفاده از یون‌های کلسیمنقش پایداری پروتئین‌های درگیر در فرآیند سنتز اگزوپلی‌ساکارید را نشان می‌دهد [۳۳].در این پژوهش حداکثر تولید اگزوپلی ساکارید در محیط محتوی ۱g/l بود که این نتایج مطابق با نتایج حاصل از پژوهش پرریا دوتا و همکاران (۲۰۰٦)بود [۳٤]. در تولید اگزوپلی ساکارید با *A. radiobacter* در اتانول، در محیط کشت بدون کلسیم کربنات، مقدار جزئی از اتانول به اگزوپلی ساکارید تبدیل شد در حالی که در محیط دارای کربنات کلسیم تبدیل اتانول به اگزوپلی ساکارید ۱۰ برابر بیشتر بود [۳۵].

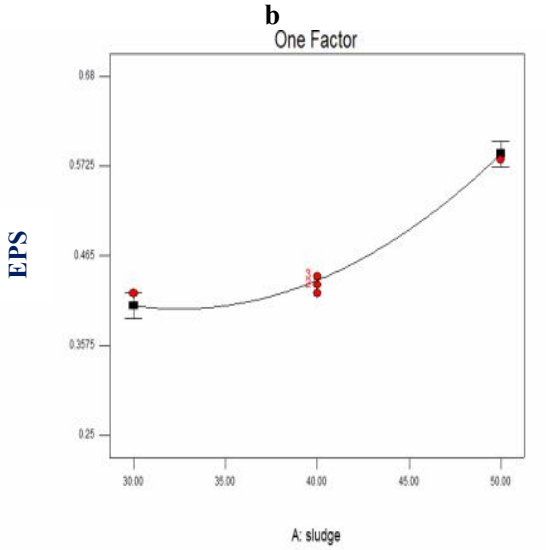
دلاوچی و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند،سویه *SEMIA 6144Bradyrhizobium.sp* تغییراتی در محتوای اگزوپلی ساکارید درغلظت‌های مختلف کلسیم و pH نشان داد. یک توضیح احتمالی برای نتایج بهدست آمده به این صورت بود که اثر کلسیم می‌توان در رشد باکتری با سنتز یک یا تعداد بیشتری از اجزای سلولی مانند اگزوپلی ساکارید اعمال شود که اجازه مقاومت سلول در برابر شرایط اسیدی را می‌دهد [۳٦].



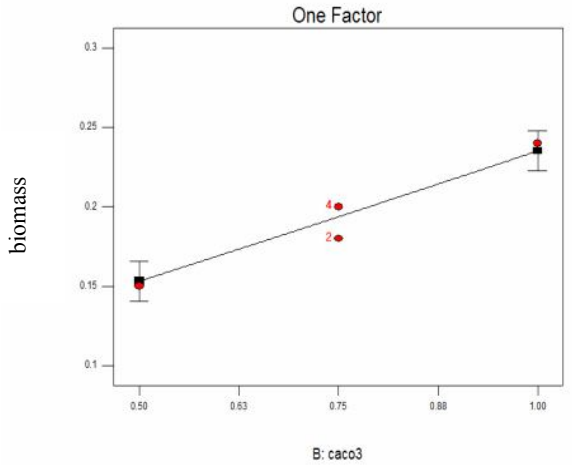
a



b

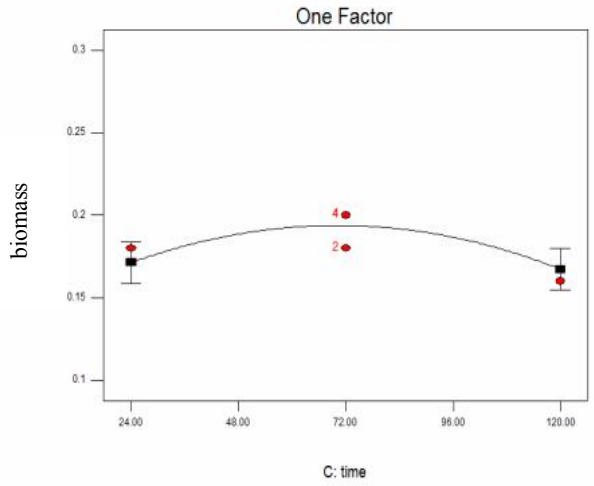


c

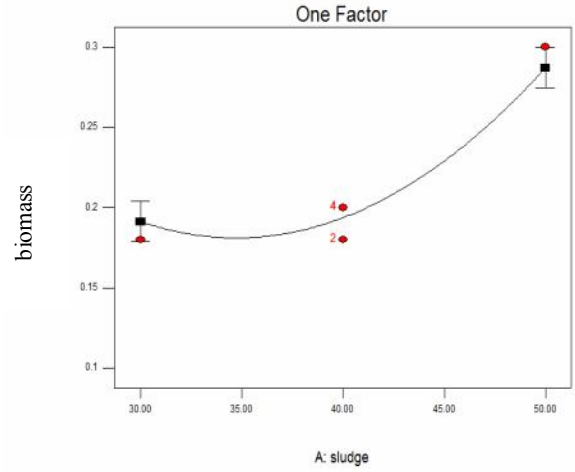


d

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]



e



f

fig 1 The effect of independent variables on the production of EPS(a:$CaCo_3$,b:Time and c:Sludge) and Biomass(d:$CaCO_3$,e:Time and f:Sludge).

با افزایش زمان تخمیراز ۲٤ تا ۷۲ساعت میزان تولید بیومس در محیط تخمیر افزایش یافتو بعد از ۷۲ ساعت به تدریج به علت ورود باکتری به فاز سکون میزان تولید بیومس کاهش یافت؛اما تولید اگزوپلی ساکارید با افزایش زمان تخمیر از ۲٤ تا ۱۲۰ ساعت همچنان افزایش یافت(شکل۱b و ۱e). در این پژوهش تولید اگزوپلی ساکارید در زمان‌های بالاتر تخمیر (۱۲۰ساعت) مورد توجه بود، در نتیجه سبب افزایش ویسکوزیته مایع گردید که ممکن است به دلیل کاهش نیتروژن باشد [۳۷]. میکروارگانیسم‌های تولیدکننده اگزوپلی ساکارید معمولاً در ۲٤ ساعت اولیه از گرمخانه گذاری به رشد بهینه خود می‌رسند در حالیکه حداکثر تولید اگزوپلی ساکارید در مراحل بعدی از رشد رخ می‌دهد (به طور مثال در فاز سکون) [۳۸]. رویز و همکاران (۲۰۱۵)، زمان مورد نیاز برای حداکثر اگزوپلی ساکارید تولید شده توسط *Agrobacterium radiobacter NBRC 12665*با استفاده از سلول‌های آزاد و بی‌حرکت در ۵ درصد ساکارز به‌عنوان منبع کربن را ۸ روز گزارش دادند[۹]. حداکثر تولید سوکسینوگلوکان توسط *PTCC 1654A. radiobacter*با استفاده از شیره خرما به‌عنوان منبع کربن در ٦ روز گرمخانه گذاری گزارش شد [۲٤]. زمان تولید حداکثر اگزوپلی ساکارید محلول در آب تولید شده توسط *A. radiobacter*با *استفاده* از ساکارز به‌عنوان منبع سوبسترا ٤ روز بود [۲۳].بنابراین ممکن است بتوان چنین استنباط نمود که زمان ایده آل برای تولید اگزوپلی‌ساکارید بستگی به عواملی مانند سوبسترا، شرایط رشد و نوع میکروارگانیسم دارد.

۳-٤-اثر متقابل زمان و لجن لبنی بر تولید اگزوپلی ساکارید

شکل ۲a تأییدی بر داده های جدول است که بیان می‌کنداثر متقابلزمان و غلظت لجن لبنی بر تولید اگزوپلی ساکارید معنی‌دار (P <۰/۰۱)است.همان طور که در شکل (۲a)مشاهده می‌شود در شرایط زمان و غلظت لجن لبنی پایین، میزان راندمان اگزوپلی ساکارید به طور قابل‌توجهی پایین می‌باشد درحالی‌کهافزایش زمان و غلظت لجن لبنی،سبب افزایش تولید اگزوپلی ساکارید شد به‌گونه‌ای که حداکثر تولید اگزوپلی ساکارید در این حالت در حداکثر زمان تخمیر (۱۲۰ ساعت) وحداکثر درصد لجن لبنی (۵۰)درصد مشاهده شد. نتایج نشان داد فاز تولید اگزوپلی ساکارید طولانی گردید و تولید آن با افزایش درصد لجن لبنی بهبود یافت. با توجه به اینکه لجن لبنی انرژی و جزء اصلی برای تولید اگزوپلی ساکارید را فراهم می‌نمایدبه نظر می‌رسد تولید بالاتر اگزوپلی ساکارید با افزایش درصد لجن لبنی و زمان به مصرف لجن لبنی در بخش بعدی از کشت (فاز سکون) مرتبط می‌باشد.

۳-۵- اثر متقابل زمان و کربنات کلسیم بر تولید اگزوپلی ساکارید

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

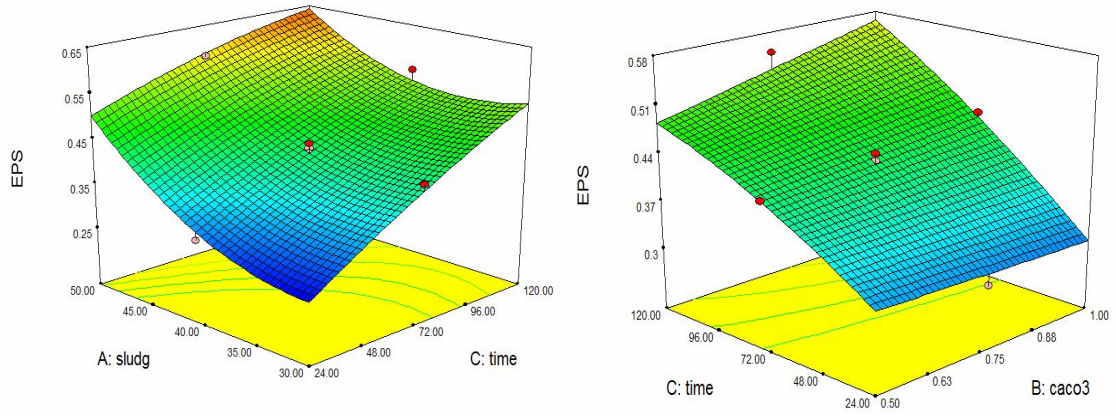
در شکل۲c، اثر متقابل زمان و کربنات کلسیمآورده شده است. به کار گیری این دو متغیر، اثر مثبتی بر تولید اگزوپلی ساکارید دارد، به طوری که در زمان‌های پایین (۲٤-۷۲) ساعتو غلظت‌های بالای کربنات کلسیم راندمان تولید اگزوپلی ساکارید پایین می‌باشد. افزایش زمان و کربنات کلسیمسبب افزایش معنی‌دار در تولید اگزوپلی ساکارید شد. بیشترین میزان تولید اگزوپلی ساکارید در زمان‌های انتهایی تخمیر (حدود ۱۲۰ ساعت)و غلظت کربنات کلسیم ۱g/l مشاهده گردید. ازآنجایی‌کهتأثیر زمان بسیار بیشتر از غلظت کربنات کلسیم بود، بنابراین برای افزایش بازدهی تولید، کنترل زمان و درصد لجن لبنی باید صورت بگیرد.

۳-٦- اثر متقابل زمان و لجن لبنی بر تولید بیومس

براساس نتایج بدست آمده بر هم کنش زمان و غلظت لجن لبنی تاثیر معنی داری (P <۰/۰۱)در تولید بیومس داشت.مطابق شکل ۳، با افزایش غلظت لجن لبنی در محدوده ۵۰-۳۰ درصد و افزایش زمان در محدوده ۷۲-۲٤ ساعت میزان تولید بیومس افزایش می‌یابد. به طوری که حداکثر تولید بیومس در درصدهای بالای لجن لبنی و زمان ۲٤-۷۲ ساعت حاصل شد. همان طور که بیان شد به نظر می رسد بعد از زمان ۷۲ ساعت به دلیل اینکه باکتری وارد فاز سکون شده است حتی با افزایش غلظت لجن لبنی میزان بیومس افزایش نیافت.

۳-۷- بهینه سازی

نتایجفرآیند بهینه سازی نشان داد حداکثر تولید اگزوپلی ساکاریدg/100ml ۰/٦٥٦ و بیومسg/100ml۰/۲۸۸بود که ازشرایط بهینه لجن لبنی ۵۰٪، غلظت کربنات کلسیم ۱g/l و زمان ۱۰۱/٦۹ ساعت به دست آمد. شو و همکاران (۲۰۱۵)، از آب‌پنیر ۱۰ درصد برای تولید اگزوپلی ساکارید توسط *Rhizobium radiobacter S10*استفاده کردند بیشینه تولید اگزوپلی ساکارید این سویه به۰/۲۸g/100ml رسید [۷]. حداکثر تولید اگزوپلی ساکارید از سویه*R.radiobacter PTCC 1654*در ملاس و ساکارز به عنوان منبع کربن به ترتیب۲/۲۷g/100ml و ۱/۰۳ بود [۱۲]. حداکثر تولید اگزو پلی ساکارید به‌وسیله سویه*Rhizobium leguminosarum*رشد داده شده در فاضلاب تولید شده صنعت فرآیند ماهی بعد از ۷۲ ساعت به g/l ۱۱/۱ رسید [۱۰].



a b

Fig 2 Response surface for the effect of (a) time- dairy sludge and (b) $caco_3$- time on EPS production

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

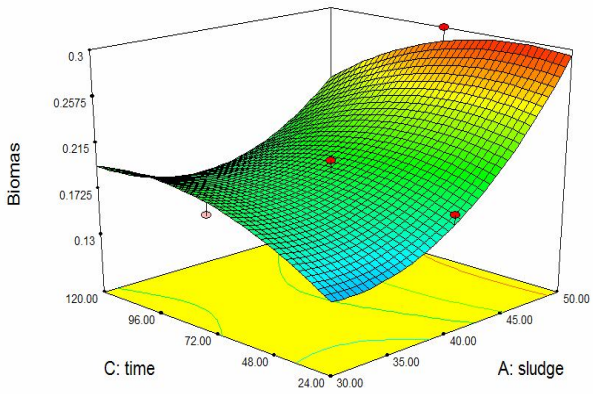


Fig 3 Response surface for the effect of (a) time-dairy sludge on biomas production.

۳-۸- آنالیز کنیتیک رشد میکروبی در فرایند تولید اگزوپلی ساکارید

مطابق شکل ٤، تولید اگزوپلی ساکارید به طور هم‌زمان با شروع رشد سلولی تحت شرایط بهینه مشاهده گردید؛ اما همچنان تولید اگزوپلی ساکارید در طول فاز سکون رشد سلول نیز، افزایش یافت. ماکزیمم تولیداگزوپلی ساکارید در زمان ۱۲۰ ساعت بود در حالی که ماکزیمم رشد سلولی در زمان ۷۲ ساعت مشاهده شد و بعد از آن باکتری وارد فاز سکون شدو در نهایت در زمان ۱۲۰ ساعت بیومس سلولی کاهش یافت. به طور مشابه نتایج تحقیق آلوز و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند تولیداگزوپلی ساکارید توسط *Enterobacter sp*در فاز نمایی رشد آغاز گردیداما بعد از ورود باکتری به فاز سکون همچنان تولید اگزوپلی ساکارید ادامه داشت [۳۹]. رشد و تولید اگزوپلی ساکارید با *Rhizubium*به طور همزمان شروع شد و حداکثر تولید اگزوپلی ساکارید بعد از رسیدن باکتری به فاز سکون حاصل گردید[٤٠]. در یک تخمیرغیر مداومبا باکتری *Alteromonasmacleodii subsp. Fijiensis*ایزوله شده از اعماق دریا، تولید اگزوپلی ساکارید در پایان فاز نمایی شروع شد و در سراسر فاز سکون ادامه داشت و مقدار آن به٦g/l رسید [٤١].

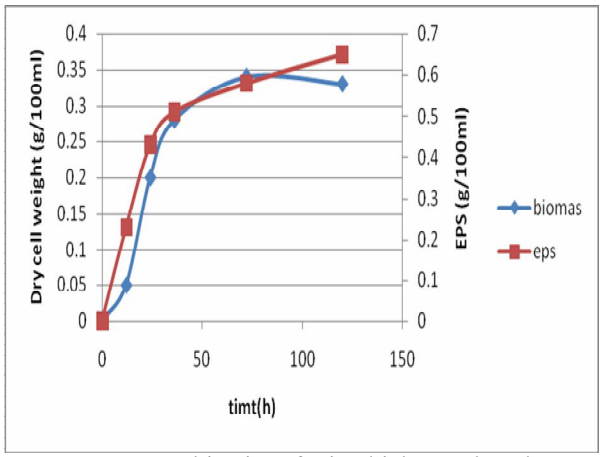


Fig 4 Curve kinetics of microbial growth and exopolysaccharide production by *R.radiobacter* in optimum conditions.

۳-۹- مشخصات ترکیبات اگزوپلی ساکارید در شرایط بهینه

اگزوپلی ساکارید به دست آمدهتحت شرایط بهینه متشکل از کربوهیدرات (۲/۱±۷۸) درصد، خاکستر (۰/۱٤±۰/٤۱) درصد و پروتئین (۰/۳۲±۱/٦)درصد بود؛که ممکن است به دلیل رسوب پروتئین محیط کشت در طی بازیافت اگزوپلی ساکاریدباشد و اتصال محکمی با اگزوپلی ساکارید ندارد.

۳-۱۰- آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز[10]

شکل ٥، اسپکتروم طیف مادون قرمز اگزوپلی ساکارید تولید شده در سوبسترای لجن لبنی را نشان می‌دهد. اسپکتروم حاوی باندهای متعددی در عدد طول موج cm^{-1}٤٠٠-٤٠٠٠می‌باشد. اگزوپلی ساکارید بهدست آمده یک باند پهنی در فرکانس cm^{-1} ۳۳۸۳ نشان داد که مربوط به ارتعاش کششی اتصال O-H است.

10. Fourier ransform Infrared Spectroscopy

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

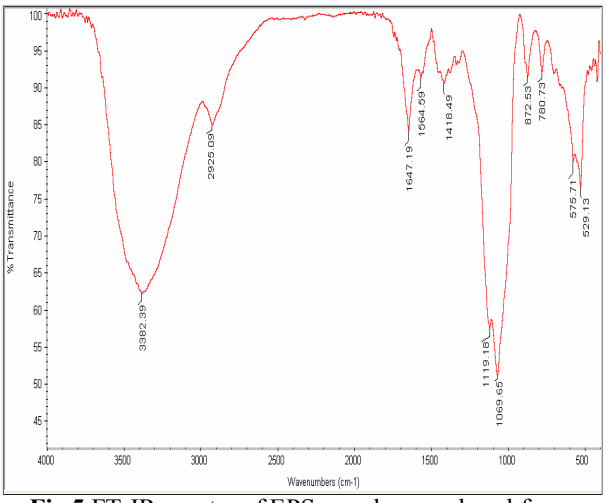


Fig 5 FT-IR spectra of EPS powders produced from fermentation mediumcontaining dairy sludge.

ارتعاش کششیC-O در فرکانس$1069cm^{-1}$دارای جذب می‌باشد. جذب قوی C=O ایجاد شده در فرکانس$1647\ cm^{-1}$ مربوط به گروه کربونیل می‌باشد. سه اتصال (C-O، C=Oو O-H) سه اتصال موجود در اسید کربوکسلیک می‌باشد که در اسپکتروم اگزوپلی ساکارید تولید شده دیده شده است [۱۲]. همچنین فرکانس$2925cm^{-1}$ به تغیر شکل محوری باندهای C-Hدر ساختار کربوهیدرات‌ها اختصاص داده می‌شود. باند در فرکانس$1418cm^{-1}$ ممکن است به دلیل ارتعاش کششی متقارن C=Oباشد[۱۲]. بنابراین نتایج این آزمون نشان دهنده این است که اگزوپلی ساکارید تولید شده دارای باقی‌مانده کربوهیدراتی و گروه‌های کربوکسیل بر روی زنجیره خود است.یک طیف مشابه ای قبلا برای اگزوپلی ساکارید تولید شده با *NBRC 12665A.* *radiobacter*گزارش شد [۹].

٤- نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش بیانگر کارایی مفید روش سطح پاسخ در بهینه سازی تولید اگزوپلی ساکارید توسط *R.radiobacter* در لجن لبنی بود. نتایج بهینه سازی زمان گرمخانه گذاری، غلظت کربنات کلسیم و درصدهای مختلف لجن لبنی در تولید اگزوپلی ساکارید توسط *R. radiobacter*نشان داد که هر سه متغیر تأثیر معنی‌داریبر تولید اگزوپلی ساکارید توسط این سویه دارند (P <۰/۰۱). حداکثر تولید اگزوپلی ساکارید۰/٦٨٦ g/100ml و بیومس ۰/۲۸۸ g/100mlدرغلظت۱g/l کربنات کلسیم، ۵۰ درصد لجنیلبنی و زمان گرمخانه گذاری ۱۰۱/٦۹ ساعت حاصل شد. همچنین نتایج نشان داد که لجن لبنی محیطی مناسب برای رشد و تولید اگزوپلی ساکارید می‌باشد و با استفاده از آن می‌توان هزینه تولید اگزوپلی ساکارید راکاهش داد؛ و با بررسی خصوصیات این اگزوپلی ساکارید می‌توان از آن در صنایع غذایی بهره برد. علاوه بر این استفادهمنطقی از پسماند صنعتی می‌تواند به کاهش اثرات زیست محیطی ناشی از صنایع لبنی کمک کند.

۵- قدردانی و تشکر

از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بهعلت کمک‌های مادی و معنوی صورت گرفته در راستای انجام طرح پژوهشی پایاننامه با کد ۳۹۸٦۲تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

٦- منابع

[1] Nicolaus B, Kambourova M, Toksoy Öner E. 2010.Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. Environ Technol 31:1145-1158.
[2] Donot F, Fontana A, Baccou JC et al. 2012. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohyd Polym 87:951-962
[3] Freitas F, Alves VD, Reis MAM. 2011. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. Trends Biotechnol 29:388-398
[4] Czaczyk, K. & Myszka, K. 2007. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Polish Journal of Environmental Studies*, *16*(6), 799.
[5] Wang K, Wang Y, Zhang R et al. 2012 Preparation and characterization of microbial biodegradable poly (3-hydroxybutyrate-co-4hydroxybutyrate)/organocla.
[6] Villano M, Valentino F, Barbetta A et al. 2013. Polyhydroxyalkanoates production with mixed microbial cultures: Fromculture selection to polymer recovery in a high-rate continuous process. New biotechnol in press
[7] Zhou, F., Wu, Z., Chen, C., Han, J., Ai, L., & Guo, B. 2014. Exopolysaccharides produced by Rhizobium radiobacter S10 in whey and their

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

rheological properties. *Food Hydrocolloids*, *36*, 362-368.

[8] Salah, R. B., Jaouadi, B., Bouaziz, A., Chaari, K., Blecker, C., Derrouane, C., ... & Besbes, S. 2011. Fermentation of date palm juice by curdlan gum productionfrom Rhizobium radiobacter ATCC 6466™: Purification, rheological and physico-chemical characterization. *LWT-Food Science and Technology*, *44*(4), 1026-1034.

[9] Ruiz, S. P., Martinez, C. O., Noce, A. S., Sampaio, A. R., Baesso, M. L., & Matioli, G. 2015. Biosynthesis of succinoglycan by Agrobacterium radiobacter NBRC 12665 immobilized on loofa sponge and cultivated in sugar cane molasses. Structural and rheological characterization of biopolymer. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *122*, 15-28

[10] Sellami, M., Oszako, T., Miled, N., & Ben Rebah, F. 2015. Industrial wastewater as raw material for exopolysaccharide production by Rhizobium leguminosarum. *Brazilian Journal of Microbiology*, *46*(2), 407-413

[11] Devi, E. S., Vijayendra, S. V. N., & Shamala, T. R. 2012. Exploration of rice bran, an agro-industry residue, for the production of intra-and extra-cellular polymers by Sinorhizobium meliloti MTCC 100. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *1*(1), 80-84.

[12] Bakhtiyari, M., Moosavi-Nasab, M., & Askari, H. 2015. Optimization of succinoglycan hydrocolloid production by Agrobacterium radiobacter grown in sugar beet molasses and investigation of its physicochemical characteristics. *Food Hydrocolloids*, *45*, 18-29

[13] Silva, M. F., Fornari, R. C., Mazutti, M. A., de Oliveira, D., Padilha, F. F., Cichoski, A. J., ... & Treichel, H. 2009. Production and characterization of xantham gum by Xanthomonas campestris using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, *90*(1), 119-123.

[14] Lee, I. Y., Seo, W. T., Kim, G. J., Kim, M. K., Park, C. S., & Park, Y. H. 1997. Production of curdlan using sucrose or sugar cane molasses by two-step fed-batch cultivation of Agrobacterium species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *18*(4), 255-259.

[15] McCarthy, O. J. 2011. Plant and Equipment. Centrifuges and Separators: Applications in the Dairy Industry. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 175-183.

[16] PINTO, E., MOREIRA, A., & VENDRUSCOLO, C. T. 2002. Influence of pH, addition of salts and temperature in the viscosity of biopolimers produced by Beijerinckia sp. 7070 and UR4. *Revista Brasileira de Agrociência*, *8*(3), 247-251.

[17] Duta, F. P., De França, F. P., Sérvulo, E. F. C., Lopes, L. M. D. A., Da Costa, A. C. A., & Barros, A. 2004. Effect of Process Parameters on Production of a Biopolymer by Rhizobium sp. In *Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO* (pp. 639-652). Humana Press.

[18] Weuster-Botz, D. 2000. Experimental design for fermentation media development: statisticaldesign or global random search?. *Journal of bioscience and bioengineering*, *90*(5), 473-483.

[19] Moreira, A. D. S., Souza, A. D. S., & Vendruscolo, C. 1998. Determinação da composição de biopolímero por cromatografia em camada delgada: metodologia. *Current Agricultural Science and Technology*, *4*(3).

[20] Macedo, M. G., Lacroix, C., Gardner, N. J., & Champagne, C. P. 2002. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by Lactobacillus rhamnosus RW-9595M in whey permeate. *International Dairy Journal*, *12*(5), 419-426

[21] A.O.AC. 1984. Official methods of analysis (vol.14). Association of Official Analytical Chemists.

[22] James GC.1978. Native Sherman Rockland Community College, State University of New York. The Benjamin/Coming Publishing Company Inc, 75–80

[23] McKellar, R. C., Van Geest, J., & Cui, W. 2003. Influence of culture and environmental conditions on the composition of exopolysaccharide produced by Agrobacterium radiobacter. *Food hydrocolloids*, *17*(4), 429-437

[24] Moosavi-Nasab, M., Taherian, A. R., Bakhtiyari, M., Farahnaky, A., & Askari, H. 2012. Structural and rheological properties of succinoglycan biogums made from low-quality date syrup or sucrose using Agrobacterium radiobacter inoculation. *Food and bioprocess technology*, *5*(2), 638-647.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[25] Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. T., & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, *28*(3), 350-356.

[26] Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2), 248-254.

[27] Box, G. E. P., & Hunter, J. S. 2000. The 2 k—p Fractional Factorial Designs Part I. *Technometrics*, *42*(1), 28-47.

[28]Milani.E.,Golimovahhed.Q.A., and Hosseini.F.2011.Application of response surface methodology for optimization of Inulin extraction from SalsifypPlant.Iranian Food Science and Technology Research Journal.21(1):35-43.

[29] Singh, A. K., Singh, G., Gautam, D., & Bedi, M. K. 2013. Optimization of dairy sludge for growth of rhizobium cells. *BioMed research international*, *2013*.

[30] Wachenheim, D. E., & Patterson, J. A. 1992. Anaerobic production of exopolysaccharide by Butyrivibrio fibrisolvens nyx. Applied and Environmental Microbiology, 58(1), 385–391.

[31] Macedo, M. G., Lacroix, C., Gardner, N. J., & Champagne, C. P. 2002. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by Lactobacillus rhamnosus RW-9595M in whey permeate. *International Dairy Journal*, *12*(5), 419-426.

[32] Jordan, D. C. 1984. Family III. Rhizobiaceae. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, *1*, 234-242

[33] Soto, M. J., van Dillewijn, P., Martínez-Abarca, F., Jiménez-Zurdo, J. I., & Toro, N. 2004. Attachment to plant roots and nod gene expression are not affected by pH or calcium in the acid-tolerant alfalfa-nodulating bacteria Rhizobium sp. LPU83. *FEMS Microbiology Ecology*, *48*(1), 71-77.

[34] Pereira Duta, F., Pessôa de França, F., & de Almeida Lopes, L. M. 2006. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in Rhizobium sp. using the response surface method. *Electronic Journal of Biotechnology*, *9*(4), 0-0.

[35] Klekner, V., Šímová, E., Řičica, J., & Panoš, J. 1984. Production of exopolysaccharide from ethanol in Agrobacterium radiobacter. *Folia microbiologica*, *29*(2), 138-147.

[36] Delavechia, C., Hampp, E., Fabra, A., & Castro, S. 2003. Influence of pH and calcium on the growth, polysaccharide production and symbiotic association of Sinorhizobium meliloti SEMIA 116 with alfalfa roots. *Biology and Fertility of soils*, *38*(2), 110-114.

[37] Morin, A. 1998. Screening of polysaccharide-producing microorganisms, factors influencing the production and recovery of microbial polysaccharides. *Polysaccharides–Structural Diversity and Functional Versatility. New York: Marcel Dekker Inc*, 275-296

[38] Sutherland, I.W., 1982. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. In: Advances in Microbial Physiology. Dans A.H.R. and Morris, J.G. (Eds.), Academic Press, New York, USA, pp. 80–150.

[39] Alves, V.D. et al. 2010. Rheological and morphologicalcharacterization of the culture broth during exopolysaccharideproduction by Enterobacter sp. Carbohydr. Pol. 81, 758 –764

[40] Datta, C., & Basu, P. S. 1999. Production of extracellular polysaccharides by a Rhizobium species from the root nodules of Melilotus alba. *Acta biotechnologica*, *19*(4), 331-339.

[41] Raguenes, G., Pignet, P., Gauthier, G., Peres, A., Christen, R., Rougeaux, H., ... & Guezennec, J. 1996. Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, Alteromonas macleodii subsp. fijiensis, and preliminary characterization of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology*, *62*(1), 67-73.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

Optimization of exopolysaccharide production by *Rhizobium radiobacterPTCC 1654* in the sludge dairy usingresponse surface methodology

Eskandari, E.[1] , Tabatabaee Yazdi, F. [2*], Mortazavi, S. A. [2] ,Koocheki, A.[2]

1. M Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Profe, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 2016/11/30 Accepted: 2017/02/15)

In this study, exopolysaccharide production by *Rhizubium radiobacter PTCC 1654* in Submergedfer mentation to reduce waste sludge from dairy Industries as well as used as Beneficial medium for the growth kind of microorganisms, were studied. Initial screening was used fractional factorial designs with 7 variables of time, temperature, concentration of calcium carbonate, ammonium sulfate concentration, Agitation rate, the percentage of dairy sludge and pH medium for the identification of variables affecting the growth of *R. radiobacter* Was performed. The results showed that three variables of dairy sludge, calcium carbonate concentration and time of incubation had positive effect on the growth *of R.radiobacter*(p<0/05). Moreover, that all variables, have a significant effect on the production of exopolysac charide Exopoly saccharides by *R. radiobacter* using response surface methodology(p<0/05).The maximum production of EPS was in concentration 1g/l calcium carbonate, 50% of dairy sludge and incubation time 101/69 hours, in which case exopolysaccharide production 0/686 g/100 ml and biomass production0/288 g/100 ml is. FTIR results showed that the exopolysaccharides produced in the dairy sludge has residues of carbohydrate, and carboxyl groups on its chain.

Keywords: Exopolysaccharide, *Rhizobium radiobacter* ,Sludge dairy, Response surface methodology

* Corresponding Author E-Mail Address: tabatabai@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]