

## بهینه سازی تولید آگزوپلی ساکارید توسط باکتری *Rhizubium radiobacter* PTCC 1654 در لجن لبنی با استفاده از روش آماری سطح پاسخ

الهام اسکندری<sup>۱</sup>، فریده طباطبایی یزدی<sup>۲\*</sup>، سید علی مرتضوی<sup>۲</sup>، آرش کوچکی<sup>۲</sup>

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

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

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

### چکیده

در این پژوهش تولید آگزوپلی 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 اولیه با 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. نتایج نشان داد که سه متغیر درصد لجن لبنی، غلظت کربنات کلسیم و زمان گرمخانه گذاری اثر مثبت بر رشد *R. radiobacter* داشت ( $p < 0/05$ ). این سه متغیر همچنین اثر معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) بر تولید آگزوپلی ساکارید توسط *R. radiobacter* با استفاده از روش آماری سطح پاسخ دارند. حداکثر تولید آگزوپلی در غلظت ۱ g/l کربنات کلسیم، ۵۰ درصد لجن‌لبنی و زمان گرمخانه گذاری ۱۰۱/۶۹ ساعت حاصل شد که در این صورت تولید آگزوپلی ساکارید ۰/۶۸۶ g/100ml و تولید بیومس ۰/۲۸۸ g/100ml می‌باشد. نتایج FTIR نشان داد که آگزوپلی ساکارید تولید شده در محیط لجن لبنی دارای باقی‌مانده کربوهیدراتی و گروه‌های کربوکسیل روی زنجیره خود می‌باشد.

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

## ۱- مقدمه

آگزوپلی ساکاریدها (EPS)<sup>۱</sup> پلیمرهایی با وزن مولکولی بالا هستند که از واحدهای قندی تشکیل شده‌اند و توسط انواع ریزسازواره‌ها به محیط اطراف ترشح می‌شوند. آگزوپلی 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 آگزوپلی ساکاریدها مزایای بسیاری از جمله 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 [۴]. در تولید پلی ساکاریدهای فعال زیستی در مقیاس صنعتی، منابع میکروبی به دلیل پایداری و مقرون به صرفه بودن، نسبت به گیاهان و جلبک‌ها ترجیح داده می‌شود [۵ و ۶]. *Rhizobium radiobacter* باکتری گرم منفی، میله ای شکل و هوازی است که قبلاً جزء *Agrobacterium tumefaciens* *Agrobacterium radiobacter* طبقه بندی می‌شد و در بیوستز طیف وسیعی از آگزوپلی ساکاریدهای میکروبی نقش دارد. بسیاری از اعضای این‌گونه تولیدکننده آگزوپلی ساکاریدهای مهم مانند سوکسینو گلوکان و کوردلان می‌باشند [۷]. آگزوپلی 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 آگزوپلی ساکارید را دارد [۷ و ۹]. استفاده از پلیمرهای زیستیه هزینه تولید آن‌ها بستگی دارد که با ماده خام استفاده شده به‌عنوان محیط رشد در ارتباط می‌باشد [۱۰]. در حال حاضر هزینه تولید آگزوپلی 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 هزینه تولید پلیمرهای زیستی را شامل می‌شود بنابراین به‌منظور کاهش هزینه تولید استفاده از منبع کربن ارزان‌تر و 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 آگزوپلی ساکارید توسط پژوهشگران متعددی مورد مطالعه قرار گرفته است [۱۲، ۱۳ و ۱۴]. 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 آگزوپلی ساکاریدها، آنزیم‌ها، اسیدهای آلی و غیره می‌توان بهره برداری نمود. لجن لبنی حجمی بین ۱-۰/۰۵٪ حجم شیر را دارد که ۱۶-۱۴٪ آن ماده‌ی خشک است. لجن لبنی شامل ۸-۶٪ نیتروژن، ۳۵-۰/۲۵٪ چربی، ۴/۷٪ 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، نیتروژن مواد آلی برای رشد باکتری‌ها است، بنابراین می‌توان از آن به‌عنوان یک منبع ارزان و قابل دسترس جهت تولید میکروبی آگزوپلی ساکاریدها استفاده کرد که سبب کاهش هزینه تولید آگزوپلی ساکارید می‌شود.

فرآیند تولید آگزوپلی 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 [۱۶-۱۹]. 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 فاکتورها و جستجو شرایط بهینه، برای پاسخ مطلوب است. هدف از این پژوهش استفاده از درصدهای مختلف لجن لبنی جهت رشد و تولید آگزوپلی ساکارید توسط سویه *R. radiobacter* و همچنین بهینه سازی شرایط تولید آگزوپلی ساکارید بود.

## 1. Extracellular polysaccharides

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱ میکروارگانیزم

سویه *R. radiobacter* PTCC 1654 به صورت لیوفلیزه از مرکز کلکسیون کشت باکتری‌ها و قارچ‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد. به منظور آماده‌سازی میکروارگانیزم برای انجام عمل تخمیر ابتدا می‌بایست باکتری از حالت لیوفلیزه خارج کرده و فعال نمود، برای این کار از محیط نوترینت برات<sup>۱</sup> (شرکت مرک آلمان) استفاده گردید. باکتری لیوفلیزه به میزان لازم تحت شرایط استریل زیر هود به داخل محیط مغذی انتقال داده شد و در دمای ۲۸°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید. میکروارگانیزم فعال شده به سطح محیط کشت جامد ترپتیکاز سوی آگار<sup>۲</sup> (شرکت مرک آلمان) منتقل داده شد و در همان شرایط قبل گرمخانه گذاری شد. از این محیط کشت به عنوان محیط ذخیره برای تولید ماده مورد نظر استفاده گردید [۱۲].

## ۲-۲ آماده‌سازی محیط عصاره لبنی به عنوان

## منبع کربن محیط تخمیر

لجن لبنی مورد استفاده در این پژوهش، از کارخانه پگاه خراسان رضوی تهیه گردید. pH اولیه نمونه‌های لجن لبنی با استفاده از HCl در حدود ۵ تنظیم شد و ۵ دقیقه در دمای ۹۰°C به منظور رسوب پروتئین‌های غیر محلول حرارت داده شد. بعد از سرد شدن تا ۲۵°C به منظور حذف رسوبات از کاغذ صافی ۸ میکرومتر (واتمن شماره ۴۰) استفاده شد و سپس مایع زیر صافیدر دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۰ دقیقه استریل شد. عصاره جهت انجام آزمایش‌ها در مراحل بعدی، در دمای ۴°C در یخچال نگهداری شد [۲۰].

## ۲-۳ اندازه گیری ترکیبات لجن لبنی

میزان پروتئین با استفاده از روش میکروکلدال با در نظر گرفتن ۶/۲۵ به عنوان ضریب تبدیل نیتروژن به پروتئین خام، قند کلو خاکستر لجن لبنی از لحاظ کمی براساس روش AOAC (۱۹۸۴) در سه تکرار تعیین شد [۲۱].

## ۲-۴ کشت میکروبی و شمارش میکروبی

یک لوپ کامل از *R. radiobacter* که قبلاً فعال شده بود به محیط ترپتیکاز سوی برات<sup>۱</sup> (شرکت مرک آلمان) اضافه گردید و به وسیله شیکر باکتری کاملاً در محیط یکنواخت شد. لوله‌های حاوی باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸°C 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 ۱۰۰ ml 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 ۱ ml از محیط تخمیر به ۹ ml سرم فیزیولوژی منتقل شده تا رقت ۱۰<sup>-۱</sup> حاصل شود و سپس از آن برای تهیه سریقت تا ۱۰<sup>-۱۰</sup> استفاده شد. به منظور شمارش کلنی از هر یک از رقت‌های ساخته شده به میزان ۱ ml روی محیط کشت ترپتیکاز سوی آگار منتقل و کشت سطحی داده شد و پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در ۲۸°C کلنی‌های حاصله مورد شمارش قرار گرفت و نسبت به محاسبه تعداد باکتری‌ها در هر ml اقدام شد. بدین نحو که پلیت‌های حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی به عنوان پلیت‌های استاندارد انتخاب و شمارش گردید [۲۲].

## ۲-۵ تولید اگزوپلی ساکارید

باکتری *R. radiobacter* در داخل محیط کشت ترپتیک از سوی برات<sup>۱</sup> در دمای ۲۸°C مدت ۲۴ ساعت تکثیر داده شد، سپس ۱ ml از مایه تلقیح را بهارلن مایر حاوی ۵۰ ml از محیط کشت اولیه استریل با ترکیب (g/l) ۲۰ ساکارز، ۵ (g/l) عصاره مخمر و (g/l) ۵ پپتون با pH=۷ انتقال داده شد. ارلن حاوی محیط کشت تلقیح شده در ۲۸°C به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکر دار (CFL مدل 3033) با سرعت (۱۵۰ rpm) قرار داده شد. سپس سانتریفیوژ (۵۰۰۰g، ۳۰ دقیقه در ۴°C) انجام پذیرفت. سوپرناتانت دور ریخته شد و ته‌نشست در ۲۵ ml از محلول نمکی ۰/۸۵ (سدیم کلرید) دوباره حل گردید و ۲ ml از آن به ۵۰ ml محیط تخمیر با pH=۶/۵ اضافه شد. محیط تخمیر (در یک حجم نهایی ۱L) حاوی کربنات کلسیم (۰/۷۵/۵g و ۱۰ ml، MgSO<sub>4</sub> ۰/۲۵ g، KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ۱g، (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> ۱g،

4. Tryptic soy broth

2. Nutrient broth  
3. Tryptic soy agar

استفاده از آلومین سرم گاوی به عنوان استاندارد به روش برادفورد اندازه گیری شد [۲۶].

## ۲-۹- طرح های آزمایشی

### ۲-۹-۱- طرح فاکتوریل جزئی (FFD)

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 طرح های تجربی است که در شناسایی فاکتورهای مهم و ارتباط بین فاکتورها، با تعداد آزمایش کمتری نسبت به تکنیک یک فاکتور در یک زمان مفید می باشد. در برخی آزمایش ها، تعداد فاکتورهای مورد بررسی زیاد می باشد. 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 عمده ای باشد. در این گونه شرایط، روش طراحی فاکتوریل جزئی الگوی بسیار مناسبی می باشد [۲۷]. مطابق جدول او بر اساس طرح فاکتوریل جزئی، ۷ فاکتور، همزدن، دمای انکوباسیون، غلظت لجن لبنی، کلسیم کربنات، pH،  $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$  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 آزمایش ها 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) $\text{CaCO}_3$	0/5	1
(g/l) $\text{NH}_4\text{SO}_4$	0/5	3
(%) Dairy sludge	5	30
pH	5	9
(rpm) Agitation	50	150
(°C) Temperature	24	37

5. Fractional factorial designs

از محلول حاوی فلزات کمیاب و عصاره استریل شده لجن لبنی (۳۰،۴۰ و ۵۰٪) بود. محلول فلزات کمیاب شامل:  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : ۲gr،  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : ۱gr،  $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ : ۱gr،  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ : ۱gr،  $\text{HCl}$ : ۰/۱ مولار حل گردیده است. تخمیر در انکوباتور شیکردار با سرعت (۱۵۰rpm) در زمان های ۲۴،۷۲ و ۱۲۰ ساعت و دمای  $28^\circ\text{C}$  انجام شد [۱۲ و ۲۳].

## ۲-۶- جداسازی آگزوپلی ساکارید از محیط

### تخمیر

بعد از کامل شدن زمان تخمیر ابتدا به منظور غیر فعال کردن سلول ها و کاهش ویسکوزیته محیط تخمیر از حرارت  $85^\circ\text{C}$  به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد بعد از اینکه مایع تا دمای اتاق ( $25^\circ\text{C}$ ) سرد گردید، غلظت ۵٪ (w/v) تری کلرو استیک اسید به مایع اضافه شد و در دمای  $4^\circ\text{C}$  برای ۱۲ ساعت نگهداری شد. سپس با استفاده از سانتریفیوژ  $5000\text{g}$  به مدت ۲۰ دقیقه سلول ها 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 آگزوپلی ساکارید حاصل رسوب نماید. رسوب حاصل با استفاده از سانتریفیوژ  $5000\text{g}$  برای ۳۰ دقیقه در  $4^\circ\text{C}$  جمع آوری و در آب مقطر حل شد و در دمای  $70^\circ\text{C}$  - انجماد و توسط خشک کن انجمادی (مدل CHRIST, BETA 2-8 LD) خشک گردید [۷ و ۲۴].

## ۲-۷- اندازه گیری بیومس و تعیین میزان رشد

برای تشخیص محتوای بیومس، محیط تخمیر شده با سرعت  $5000\text{g}$  برای ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. ته نشست سلولی ۳ بار با آب مقطر شسته و در آن در دمای  $90^\circ\text{C}$  تا زمان رسیدن به وزن ثابت خشک شد [۱۱].

## ۲-۸- تعیین میزان کل کربوهیدرات و پروتئین

محتوای کربوهیدرات کل آگزوپلی ساکارید تولید شده با روش فنل- اسید سولفوریک با استفاده از گلوکز به عنوان استاندارد تعیین شد [۲۵]. اندازه گیری پروتئین آگزوپلی ساکارید تولیدی با

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

Independent variable	Symbol	Range and levels		
		-1	0	+1
Dairy (%) sludge	X <sub>1</sub>	30	40	50
CaCO <sub>3</sub> (g/l)	X <sub>2</sub>	0/5	0/75	1
Time(h)	X <sub>3</sub>	24	72	120

## ۱۰-۲- طیف‌سنجی مادون قرمز<sup>۸</sup> 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 برومید پتاسیم (KBr) مخلوط گردید و تحت فشار از آن قرص به ضخامت ۲mm تهیه گردید و با استفاده از دستگاه طیف‌سنج (spectrometer Shimadzu Japan.4300) با رزولوشن ۴cm<sup>-1</sup> در بازه ۴۰۰۰-۴۰۰ مورد بررسی قرار گرفت [۱۲].

## ۳- نتایج و بحث

### ۱-۳- آنالیز شیمیایی لجن لبنی

میزان پروتئین، خاکستر و قند کل موجود در لجن لبنی به ترتیب شامل ۰/۳ ± ۳/۲، ۰/۲ ± ۰/۶ و ۰/۲ ± ۴/۲ 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 میانگین متغیر با ۸ آزمایش انجام گرفت. پاسخ‌های بهبود یافته 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 ۴) نشان داد که از بین متغیرهای مورد بررسی چهار متغیر، زمان، غلظت کربنات کلسیم،

## ۲-۹-۲- طرح مرکب مرکزی (CCD)<sup>۶</sup>

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 بهینه‌سازی متغیرهای مؤثر بر متغیر وابسته (راندمان تولید اگزوپلی ساکارید) استفاده شد. روش سطح پاسخ<sup>۷</sup> مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری است و در بهینه‌سازی فرایندهایی به کار می‌رود که پاسخ مورد نظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تأثیر قرار می‌گیرد. 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<sub>1</sub>، X<sub>2</sub> و X<sub>3</sub> مورد 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:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

در معادله مذکور Y پاسخ پیش‌بینی شده،  $\beta_0$  ضریب ثابت،  $\beta_1, \beta_2, \beta_3$  اثرات خطی،  $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$  اثرات مربعی و  $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$  اثرات متقابل است. به منظور آنالیز داده‌ها و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ و همچنین طرح فاکتوریل جزئی، از نرم‌افزار 7.0.3 Design Expert استفاده گردید [۲۸].

8. Fourier transform Infrared Spectroscopy

6. Central composite designs

7. Response Surface Methodology

انتخاب گردیدند. مدل پیشنهادی حاصل از آنالیز آزمایش‌های انجام شده از طرح FFD توسط نرم افزار در زیر آورده شده است.

$$\text{Growth(CFU/ml)} = -1E+13 + 5/22E10 + \text{Time} + 7/37E+12 \text{Caco}_3 - 10+8/73\text{NH}_4\text{SO}_4 + 1/55 E+11 \text{Sludge}$$

سولفات آمونیوم و در صد لجن لبنی به صورت معادله درجه اول اثر معنی داری ( $p < 0/01$ ) بر رشد *R.radiobacter* دارد. با توجه به ضرایب معادله (۱) مشخص گردید سولفات آمونیوم اثر منفی بر رشد *R.radiobacter* دارد در حالی که زمان، غلظت کربنات کلسیم کربنات و درصد لجن لبنی اثر مثبتی در رشد *R.radiobacter* در محیط لجن لبنی داشت؛ و بر این مبنای فاکتور فوق جهت بهینه سازی تولید آگزوپلی ساکارید و بیومس

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

Run	Temperature (°C)	Agitation rat (rpm)	pH	Dairy sludge (%)	NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub> (g/l)	CaCO <sub>3</sub> (g/l)	Time (h)	Cell count (cfu)
1	30	50	5	30	3	0/5	47	2/1×10 <sup>9</sup>
2	24	50	9	5	3	0/5	120	9/9×10 <sup>9</sup>
3	24	150	5	5	3	1	48	1/1×10 <sup>10</sup>
4	30	150	5	5	0/5	0/5	120	1/7×10 <sup>11</sup>
5	30	50	9	5	0/5	1	48	1/2×10 <sup>10</sup>
6	30	150	9	30	3	4	120	7/5×10 <sup>12</sup>
7	24	50	5	30	0/5	1	120	7/8×10 <sup>12</sup>
8	24	150	9	30	0/5	0/5	48	4/1×10 <sup>11</sup>

**Table 4** Analysis of variance for the growth of *R.radiobacter* as the response using coded values

source	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
NH4SO4	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 <sup>2</sup> adjusted=0/99873			R-Squared =0/999456		

مقادیر R<sup>2</sup> و R<sup>2</sup> اصلاح شده، مدل چند جمله‌ای درجه دوم برای بررسی روند تغییرات پاسخ هایندازه گیری 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 آگزوپلی ساکارید و بیومس و متغیرهای مستقل با اعداد حقیقی را نشان می‌دهد:

$$\text{EPS(g/100ml)} = 0/614511 - 0/3122X_1 + 0/44227X_2 + 0/3705X_3 - 0/25X_1X_2 - 0/05X_1X_3 + 0/002396X_2X_3 + 0/000586X_1^2 - 0/2182X_2^2 - 7/1E-06X_3^2$$

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

#### پاسخ

جهت تعیین روند تغییرات تولید آگزوپلی ساکارید و بیومس و بررسی اثر هر یک از متغیرهای مستقل در ابتدا نیاز به تعیین مناسب ترین مدل جهت برازش داده های آزمون می‌باشد. از نظر آماری مدلی مناسب است که آزمون عدم برازش آن معنی دار نبوده و R<sup>2</sup> و R<sup>2</sup> اصلاح شده دارای بالاترین مقدار باشد. با توجه به غیر معنی دار بودن آزمون عدم برازش برای تولید آگزوپلی ساکارید و بیومس (0/1035 و 0/2310 به ترتیب) و همچنین

9. Lack of fit

اساس روش سطح پاسخ انتخاب شد. همان‌طور که در جدول ۶ 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 دوم درصد لجن لبنی، اثر معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) بر تولید آگزوپلی ساکارید داشت. همچنین، جملات خطی درصد لجن لبنی، کربنات کلسیم، جمله اثر متقابل غلظت لجن لبنی و زمان و جمله درجه دوم درصد لجن لبنی، اثر معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) بر تولید بیومس نشان داد.

Biomass (g/100ml) =  $0/3396681 -$

$$0/3396682 - 0/02555 X_1 + 0/185636 X_2 + 0/004509 X_3 -$$

$$0/004 X_1 X_2 - 8/3E -$$

$$0/5 X_1 X_3 + 0/000417 X_2 X_3 + 0/000482 X_1^2 + 0/000909 X_2^2 -$$

$$9/5E - 0/6 X_3^2$$

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 گرمخانه‌گذاری برای بهینه‌سازی تولید آگزوپلی ساکارید و بیومس بر

**Table 5** Experimental design (conditions and responses) for EPS production and biomass

Biomass (g/100ml)	EPS (g /100ml)	Dairy sludge (%)	CaCO <sub>3</sub> (g/l)	Time (h)	Run	Biomass (g/100ml)	EPS (g/100ml)	Dairy sludge (%)	CaCO <sub>3</sub> (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	source
< 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		

Table 7 Analysis of variance biomass production using coded values

P value	F value	Df	Mean square	Sum of squares	source
< 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=0/935271 Adj R-Squared=0/877014

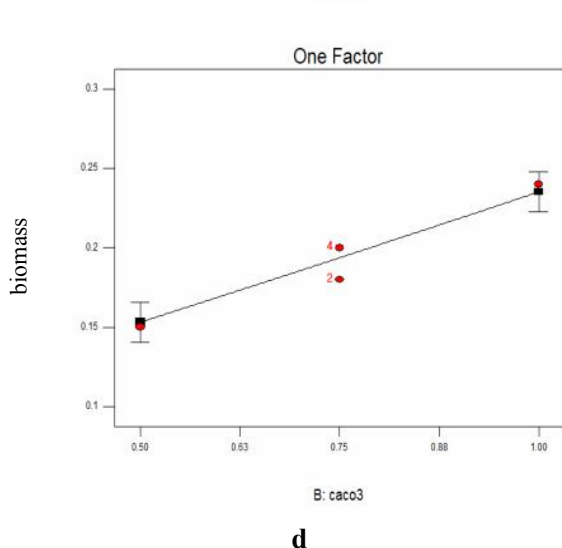
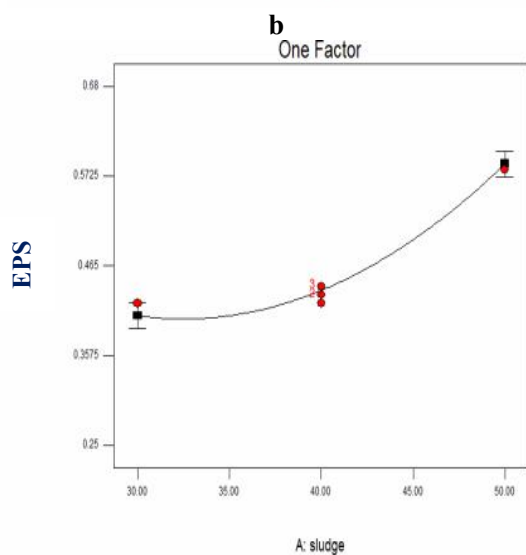
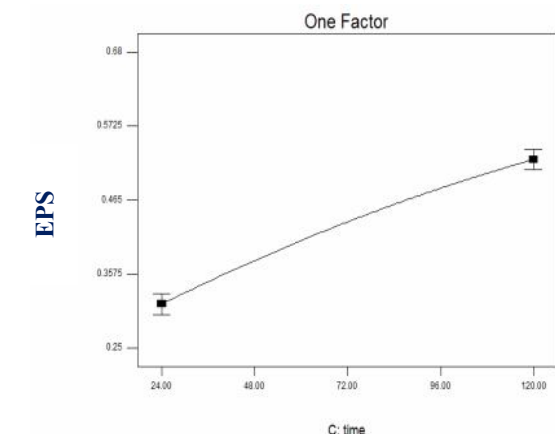
ملاس و لجن فاضلاب که قبلاً برای رشد *Rhizobium* استفاده شده بود، دارای سطح پایین تری از فلزات و ترکیبات مضر است [۲۹]. رویز و همکاران (۲۰۱۵)، با رشد *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 در غلظت‌های مختلف ملاس، لاکتوز، گلوکز و ساکارز نشان دادند که افزایش در غلظت تمام سویستراها منجر به افزایش تولید آگزوپلی ساکارید گردید [۹]. موسوی نسب و همکاران (۲۰۱۲) تولید آگزوپلی ساکارید در ۱۰ درصد شیر خرمای به‌عنوان منبع کربن جایگزین با *R. radiobacter* مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تولید آگزوپلی ساکارید با استفاده از شیر خرمای پس از ۶ روز سه برابر بیشتر از ساکارز بود [۲۴]. رشد سلول و تولید آگزوپلی 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 افزایش کلسیم از ۰/۵g/l تا ۱ تولید آگزوپلی ساکارید و بیومس افزایش یافت. با این حال نتایج نشان داد که اثر کربنات کلسیم بر تولید بیومس بیشتر از تولید آگزوپلی ساکارید است (شکل ۱a). برای بسیاری از گونه‌های میکروبی کلسیم در مقدار کم جهت حفظ استحکام دیواره سلولی، پایداری پروتئین‌های الیگومری و کمپلکس

### ۳-۳- تأثیر متغیرهای مستقل بر تولید آگزوپلی ساکارید و بیومس

همانطور که در شکل (۱c و ۱f) مشاهده می‌شود با افزایش درصدهای مختلف لجن لبنی از ۳۰ تا ۵۰٪ تولید آگزوپلی ساکارید و بیومس افزایش یافت. منبع کربن به دلیل اثر مستقیم آن بر بازده تولید، ترکیبات، ساختار و خصوصیات آگزوپلی ساکاریدهای باکتریایی، مهم‌ترین ترکیب محیط کشت مورد استفاده برای تولید آگزوپلی ساکارید است. لاکتوز کربوهیدرات اصلی موجود در لجن‌لبنی است که اصلی‌ترین عامل مغذی برایش و تولید آگزوپلی ساکارید است و به‌عنوان منبع کربن جایگزین جهت رشد و تولید آگزوپلی ساکارید می‌باشد. به نظر می‌رسد علت اثر منبع کربن بر تولید آگزوپلی ساکارید نیازمندی زیاد سویه *R. radiobacter* به منبع کربن می‌باشد. تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد استفاده از لجن لبنی جهت تولید آگزوپلی ساکارید انجام نشده است. سینگ و همکاران (۲۰۱۳) لجن لبنی را به‌عنوان یک محیط کشت جایگزین برایش *Rhizobium* مورد بررسی قرار دادند. حداکثر رشد همه سویه‌ها در غلظت لجن لبنی ۶۵٪ 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

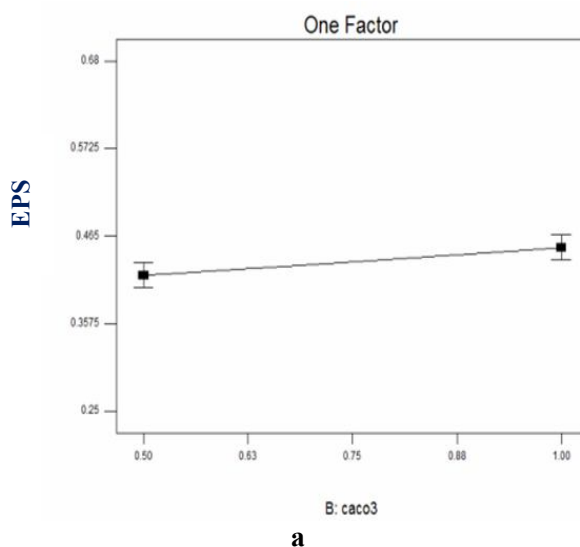




پیتیدوگلیکان- پروتئین در غشای خارجی مورد نیاز است. استفاده از کلسیم کربنات از اسیدی شدن محیط مایع باکتریایی جلوگیری می‌کند [۳۱].

جوردن (۱۹۸۴)، استفاده از  $4\text{g/l}$  کربنات کلسیم برای کنترل pH در محیط کشت جهت رشد *Rhizobium* را پیشنهاد داد [۳۲]. استفاده از یون‌های کلسیم نقش پایداری پروتئین‌های درگیر در فرآیند سنتز آگزوپلی ساکارید را نشان می‌دهد [۳۳]. در این پژوهش حداکثر تولید آگزوپلی ساکارید در محیط محتوی  $1\text{g/l}$  بود که این نتایج مطابق با نتایج حاصل از پژوهش پریا دوتا و همکاران (۲۰۰۶) بود [۳۴]. در تولید آگزوپلی ساکارید با *A. radiobacter* در اتانول، در محیط کشت بدون کلسیم کربنات، مقدار جزئی از اتانول به آگزوپلی ساکارید تبدیل شد در حالی که در محیط دارای کربنات کلسیم تبدیل اتانول به آگزوپلی ساکارید ۱۰ برابر بیشتر بود [۳۵].

دلواچی و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند، سویه *SEMIA 6144 Bradyrhizobium.sp* تغییراتی در محتوای آگزوپلی ساکارید در غلظت‌های مختلف کلسیم و pH نشان داد. یک توضیح احتمالی برای نتایج به‌دست آمده به این صورت بود که اثر کلسیم می‌تواند در رشد باکتری با سنتز یک یا تعداد بیشتری از اجزای سلولی مانند آگزوپلی ساکارید اعمال شود که اجازه مقاومت سلول در برابر شرایط اسیدی را می‌دهد [۳۶].

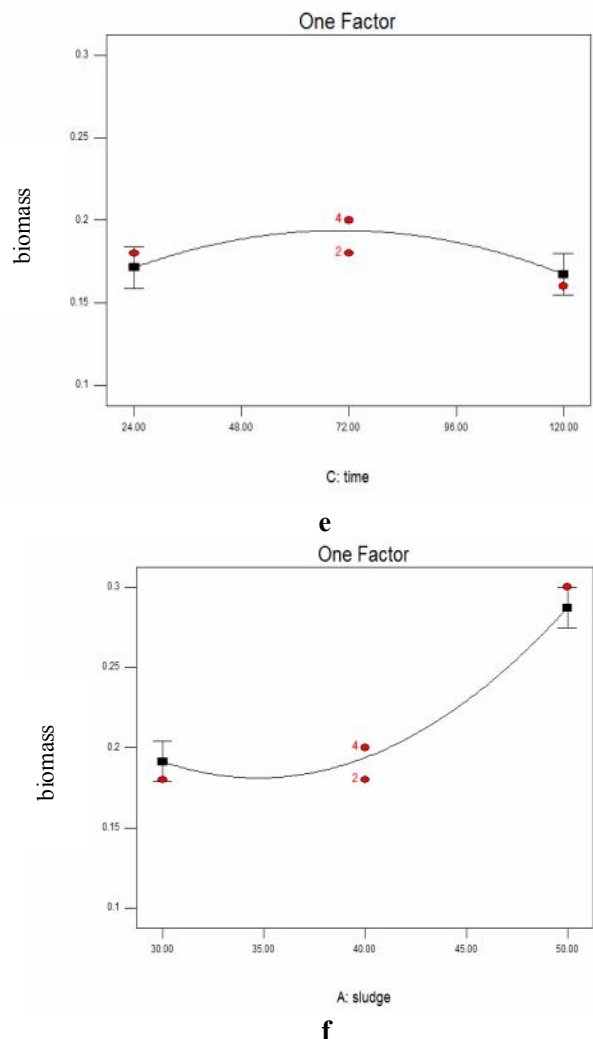


رخ می‌دهد (به طور مثال در فاز سکون) [۳۸]. رویز و همکاران (۲۰۱۵)، زمان مورد نیاز برای حداکثر آگزوپلی ساکارید تولید شده توسط *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 با استفاده از سلول‌های آزاد و بی‌حرکت در ۵ درصد ساکارز به‌عنوان منبع کربن را ۸ روز گزارش دادند [۹]. حداکثر تولید سوکسینوگلوکان توسط *PTCC 1654A*. *radiobacter* با استفاده از شیر خرم به‌عنوان منبع کربن در ۶ روز گرمخانه گذاری گزارش شد [۲۴]. زمان تولید حداکثر آگزوپلی ساکارید محلول در آب تولید شده توسط *A. radiobacter* با استفاده از ساکارز به‌عنوان منبع سوستر ۴ روز بود [۲۳]. بنابراین ممکن است بتوان چنین استنباط نمود که زمان ایده آل برای تولید آگزوپلی ساکارید بستگی به عواملی مانند سوستر، شرایط رشد و نوع میکروارگانیسم دارد.

### ۳-۴- اثر متقابل زمان و لجن لبنی بر تولید آگزوپلی ساکارید

شکل ۲ا تأییدی بر داده های جدول است که بیان می‌کند اثر متقابل زمان و غلظت لجن لبنی بر تولید آگزوپلی ساکارید معنی‌دار ( $P < 0/01$ ) است. همان‌طور که در شکل (۲ا) مشاهده می‌شود در شرایط زمان و غلظت لجن لبنی پایین، میزان راندمان آگزوپلی ساکارید به طور قابل توجهی پایین می‌باشد در حالی که افزایش زمان و غلظت لجن لبنی، سبب افزایش تولید آگزوپلی ساکارید شد به‌گونه‌ای که حداکثر تولید آگزوپلی ساکارید در این حالت در حداکثر زمان تخمیر (۱۲۰ ساعت) و حداکثر درصد لجن لبنی (۵۰) درصد مشاهده شد. نتایج نشان داد فاز تولید آگزوپلی 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 آگزوپلی ساکارید را فراهم می‌نماید به نظر می‌رسد تولید بالاتر آگزوپلی 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 آگزوپلی ساکارید



**fig 1** The effect of independent variables on the production of EPS (a: CaCO<sub>3</sub>, b: Time and c: Sludge) and Biomass (d: CaCO<sub>3</sub>, e: Time and f: Sludge).

با افزایش زمان تخمیر از ۲۴ تا ۷۲ ساعت 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 آگزوپلی ساکارید با افزایش زمان تخمیر از ۲۴ تا ۱۲۰ ساعت همچنان افزایش یافت (شکل ۱b و ۱e). در این پژوهش تولید آگزوپلی ساکارید در زمان‌های بالاتر تخمیر (۱۲۰ ساعت) مورد توجه بود، در نتیجه سبب افزایش ویسکوزیته مایع گردید که ممکن است به دلیل کاهش نیتروژن باشد [۳۷]. میکروارگانیسم‌های تولیدکننده آگزوپلی ساکارید معمولاً در ۲۴ ساعت اولیه از گرمخانه گذاری به رشد بهینه خود می‌رسند در حالیکه حداکثر تولید آگزوپلی ساکارید در مراحل بعدی از رشد

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.

### ۷-۳- بهینه سازی

نتایج فرآیند بهینه سازی نشان داد حداکثر تولید آگروپولی ساکارید  $0.7656 \text{ g}/100\text{ml}$  و بیومس  $0.288 \text{ g}/100\text{ml}$  بود که از شرایط بهینه لجن لبنی ۵۰٪، غلظت کربنات کلسیم  $1 \text{ g}/\text{l}$  و زمان  $101/69$  ساعت به دست آمد. شو و همکاران (۲۰۱۵)، از آب پنی *Rhizobium* ۱۰ درصد برای تولید آگروپولی ساکارید توسط *Radiobacter S10* استفاده کردند بیشینه تولید آگروپولی ساکارید این سویه به  $0.288 \text{ g}/100\text{ml}$  رسید [۷]. حداکثر تولید آگروپولی ساکارید از سویه *R. radiobacter PTCC 1654* در ملاس و ساکارز به عنوان منبع کربن به ترتیب  $2/27 \text{ g}/100\text{ml}$  و  $1/03$  بود [۱۲]. حداکثر تولید آگرو پلی ساکارید به وسیله سویه *Rhizobium leguminosarum* رشد داده شده در فاضلاب تولید شده صنعت فرآیند ماهی بعد از ۷۲ ساعت به  $11/1 \text{ g}/\text{l}$  رسید [۱۰].

در شکل ۲c، اثر متقابل زمان و کربنات کلسیم آورده شده است. به کار گیری این دو متغیر، اثر مثبتی بر تولید آگروپولی ساکارید دارد، به طوری که در زمان های پایین (۲۴-۷۲) ساعت غلظت های بالای کربنات کلسیم راندمان تولید آگروپولی ساکارید پایین می باشد. افزایش زمان و کربنات کلسیم سبب افزایش معنی دار در تولید آگروپولی ساکارید شد. بیشترین میزان تولید آگروپولی ساکارید در زمان های انتهایی تخمیر (حدود ۱۲۰ ساعت) و غلظت کربنات کلسیم  $1 \text{ g}/\text{l}$  مشاهده گردید. از آنجایی که تأثیر زمان بسیار بیشتر از غلظت کربنات کلسیم بود، بنابراین برای افزایش بازدهی تولید، کنترل زمان و درصد لجن لبنی باید صورت بگیرد.

### ۶-۳- اثر متقابل زمان و لجن لبنی بر تولید

#### بیومس

بر اساس نتایج بدست آمده بر هم کنش زمان و غلظت لجن لبنی تاثیر معنی داری ( $P < 0.01$ ) در تولید بیومس داشت. مطابق شکل ۳، با افزایش غلظت لجن لبنی در محدوده ۳۰-۵۰ درصد و افزایش زمان در محدوده ۲۴-۷۲ ساعت میزان تولید بیومس افزایش می یابد. به طوری که حداکثر تولید بیومس در درصدهای بالای لجن لبنی و زمان ۷۲-۲۴ ساعت حاصل شد. همان طور که

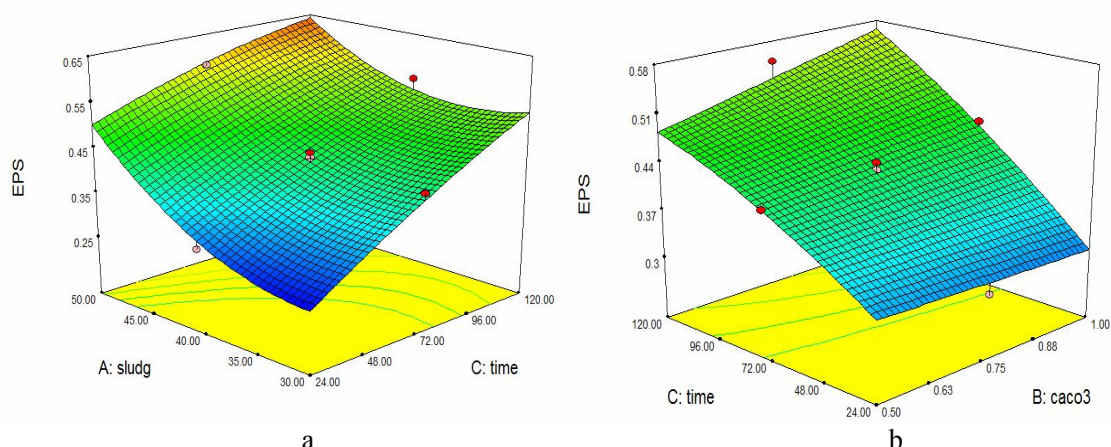
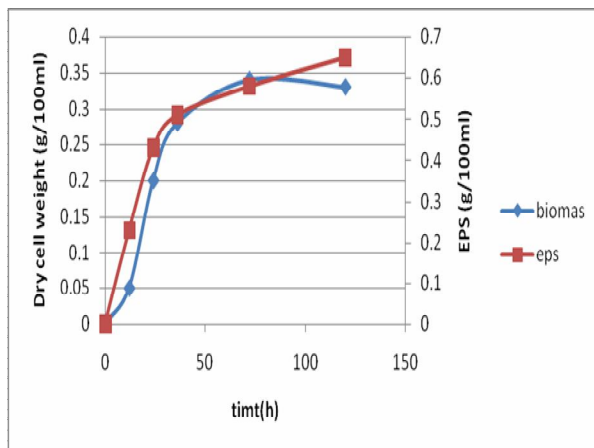


Fig 2 Response surface for the effect of (a) time- dairy sludge and (b)  $\text{CaCO}_3$ - time on EPS production



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

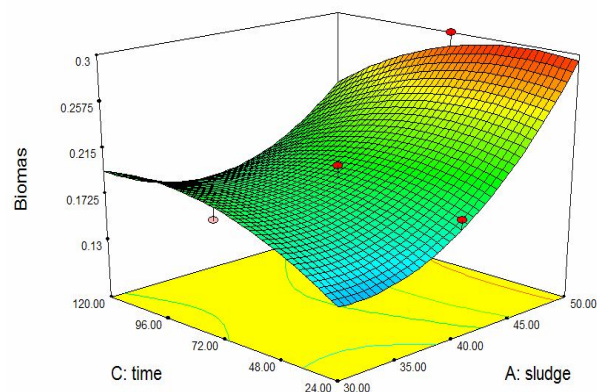
### ۳-۹- مشخصات ترکیبات آگزوپلی ساکارید در

#### شرایط بهینه

آگزوپلی ساکارید به دست آمده تحت شرایط بهینه متشکل از کربوهیدرات (۷۸±۲/۱) درصد، خاکستر (۰/۴۱±۰/۱۴) درصد و پروتئین (۱/۶±۰/۳۲) درصد بود؛ که ممکن است به دلیل رسوب پروتئین محیط کشت در طی بازیافت آگزوپلی ساکارید باشد و اتصال محکمی با آگزوپلی ساکارید ندارد.

### ۳-۱۰- آنالیز طیف سنجی مادون قرمز

شکل ۵، اسپکتروم طیف مادون قرمز آگزوپلی ساکارید تولید شده در سوپسترای لجن لبنی را نشان می دهد. اسپکتروم حاوی باندهای متعددی در عدد طول موج  $4000-400 \text{ cm}^{-1}$  می باشد. آگزوپلی ساکارید به دست آمده یک باند پهنی در فرکانس  $3383 \text{ cm}^{-1}$  نشان داد که مربوط به ارتعاش کششی اتصال O-H است.



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

### ۳-۸- آنالیز کینتیک رشد میکروبی در فرایند

#### تولید آگزوپلی ساکارید

مطابق شکل ۴، تولید آگزوپلی ساکارید به طور همزمان با شروع رشد سلولی تحت شرایط بهینه مشاهده گردید؛ اما همچنان تولید آگزوپلی ساکارید در طول فاز سکون رشد سلول نیز، افزایش یافت. ماکزیمم تولید آگزوپلی 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 شد و در نهایت در زمان ۱۲۰ ساعت بیومس سلولی کاهش یافت. به طور مشابه نتایج تحقیق آلوز و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند تولید آگزوپلی ساکارید توسط *Enterobacter sp* در فاز نمایی رشد آغاز گردید اما بعد از ورود باکتری به فاز سکون همچنان تولید آگزوپلی ساکارید ادامه داشت [۳۹]. رشد و تولید آگزوپلی ساکارید با *Rhizubium* به طور همزمان شروع شد و حداکثر تولید آگزوپلی ساکارید بعد از رسیدن باکتری به فاز سکون حاصل گردید [۴۰]. در یک تخمیر غیر مداوم با باکتری *Alteromonas macleodii subsp. Fijiensis* ایزوله شده از اعماق دریا، تولید آگزوپلی ساکارید در پایان فاز نمایی شروع شد و در سراسر فاز سکون ادامه داشت و مقدار آن به  $6 \text{ g/l}$  رسید [۴۱].

بیومس  $288 \text{ g}/100\text{ml}$  در غلظت  $1 \text{ g}/\text{l}$  کربنات کلسیم، ۵۰ درصد لجنیلینی و زمان گرمخانه گذاری  $101/69$  ساعت حاصل شد. همچنین نتایج نشان داد که لجن لبنی محیطی مناسب برای رشد و تولید آگزوپلی ساکارید می باشد و با استفاده از آن می توان هزینه تولید آگزوپلی ساکارید راکاهش داد؛ و با بررسی خصوصیات این آگزوپلی ساکارید می توان از آن در صنایع غذایی بهره برد. علاوه بر این استفاده منطقی از پسماند صنعتی می تواند به کاهش اثرات زیست محیطی ناشی از صنایع لبنی کمک کند.

## ۵- قدردانی و تشکر

از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به علت کمک های مادی و معنوی صورت گرفته در راستای انجام طرح پژوهشی پایان نامه با کد ۳۹۸۶۲ تشکر و قدردانی به عمل می آید.

## ۶- 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. *Carbohydr 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-4-hydroxybutyrate)/organocla.
- [6] Villano M, Valentino F, Barbetta A et al. 2013. Polyhydroxyalkanoates production with mixed microbial cultures: From culture 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

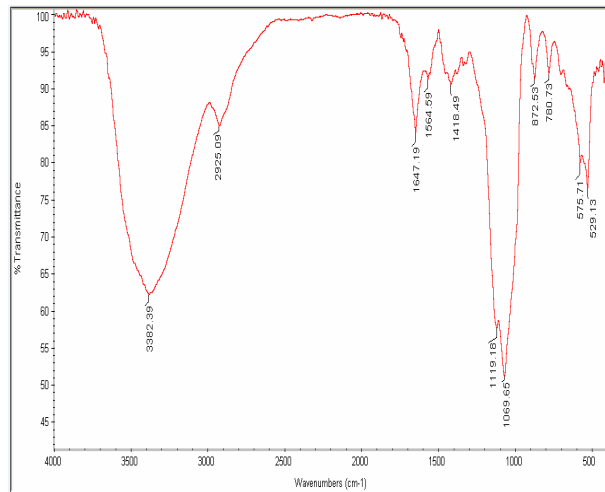


Fig 5 FT-IR spectra of EPS powders produced from fermentation medium containing dairy sludge.

ارتعاش کششی C-O در فرکانس  $1069 \text{ cm}^{-1}$  دارای جذب می باشد. جذب قوی C=O ایجاد شده در فرکانس  $1647 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه کربونیل می باشد. سه اتصال (C-O), C=O و O-H سه اتصال موجود در اسید کربوکسیلیک می باشد که در اسپکتروم آگزوپلی ساکارید تولید شده دیده شده است [۱۲]. همچنین فرکانس  $2925 \text{ cm}^{-1}$  به تغییر شکل محوری باندهای C-H در ساختار کربوهیدرات ها اختصاص داده می شود. باند در فرکانس  $1416 \text{ cm}^{-1}$  ممکن است به دلیل ارتعاش کششی متقارن C=O باشد [۱۲]. بنابراین نتایج این آزمون نشان دهنده این است که آگزوپلی ساکارید تولید شده دارای باقی مانده کربوهیدراتی و گروه های کربوکسیل بر روی زنجیره خود است. یک طیف مشابه ای قبلا برای آگزوپلی ساکارید تولید شده با *NBRC 12665A radiobacter* گزارش شد [۹].

## ۴- نتیجه گیری

نتایج این پژوهش بیانگر کارایی مفید روش سطح پاسخ در بهینه سازی تولید آگزوپلی ساکارید توسط *R. radiobacter* در لجن لبنی بود. نتایج بهینه سازی زمان گرمخانه گذاری، غلظت کربنات کلسیم و درصد های مختلف لجن لبنی در تولید آگزوپلی ساکارید توسط *R. radiobacter* نشان داد که هر سه متغیر تأثیر معنی داری بر تولید آگزوپلی ساکارید توسط این سویه دارند ( $P < 0.01$ ). حداکثر تولید آگزوپلی ساکارید  $288 \text{ g}/100\text{ml}$  و

- 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 biopolymers 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: statistical design 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.A.C. 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.
- 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 production from *Rhizobium radiobacter* ATCC 6466<sup>TM</sup>: 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 xanthan 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

- [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., Šimová, 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 morphological characterization of the culture broth during exopolysaccharide production 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] Raguene, 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.
- [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<sup>k</sup>—p Fractional Factorial Designs Part I. *Technometrics*, 42(1), 28-47.
- [28] Milani, E., Golimovahed, Q.A., and Hosseini, F. 2011. Application of response surface methodology for optimization of Inulin extraction from Salsify Plant. *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* nxy. *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.

## Optimization of exopolysaccharide production by *Rhizobium radiobacter* PTCC 1654 in the sludge dairy using response surface methodology

Eskandari, E.<sup>1</sup>, Tabatabaee Yazdi, F.<sup>2\*</sup>, Mortazavi, S. A.<sup>2</sup>, Koocheki, A.<sup>2</sup>

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 *Rhizobium radiobacter* PTCC 1654 in Submerged fermentation 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 exopolysaccharide 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 production 0/288 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