مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

غربالگری فاکتورهای موثر در رشد باکتری *Paenibacillus polymyxa* با استفاده از طرح آزمایشی پلاکت-برمن

علیرضا وسیعی[۱]، محبوبه سرابی جماب[۲*]، فرشته فلاح[۳]، سید علی مرتضوی[۳]

۱-گروه ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

۲-گروه زیست فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

۳-گروه علوم ومهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۸/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۹/۲۱

کلمات کلیدی:

Paenibacillus polymyxa،

رشد سلولی،

پلاکت برمن

DOI:10.22034/FSCT.22.158.213.

* مسئول مکاتبات:

m.sarabi@rifst.ac.ir

چکیده

باکتری *Paenibacillus polymyxa* از جمله میکروارگانیسم‌های است که توانایی تولید اگزوپلی‌ساکاریدهای خارج سلولی و نیز آنتی‌بیوتیک‌ها را دارا می‌باشد. عوامل متعددی از جمله محتوای محیط کشت، منبع کربن و نیتروژن، pH، دما، سرعت هوا و شرایط کشت بر رشد و تولید توده سلولی بالاتر و نیز تولید متابولیت‌های میکروبی تأثیر دارند. هدف از این مطالعه بررسی میزان رشد باکتری *P. polymyxa* در محیط کشت حاوی ملاس و همچنین غربالگری ۵ جزء محیط کشت و ٤ فاکتور شرایط تخمیر با استفاده از روش پلاکت-برمن جهت به حداکثر رساندن میزان تولید توده سلولی بود. نتایج نشان داد از بین متغیرهای مورد بررسی بریکس ملاس مورد استفاده، زمان، درصد تلقیح، میزان سولفات آمونیوم، سرعت هم‌زدن، میزان گلوکز و اوره به‌صورت معادله درجه اول اثر مثبت معنی‌داری بر رشد باکتری و تولید زیست‌توده دارد که از این میان اثر بریکس ملاس مورد استفاده بیش از سایر متغیرها است؛ این درحالی است که pH و میزان عناصر کم مصرف مورد استفاده اثر منفی بر رشد سلولی داشتند. نتایج این مطالعه نشان داد محیط کشت برپایه ملاس می‌تواند به عنوان یک گزینه ارزان قیمت و مناسب برای رشد باکتری *P. polymyxa* مورد استفاده قرار گیرد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-23]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213]

۱-مقدمه

Paenibacillus polymyxa یک باکتری گرم مثبت متعلق به جنس Paenibacillus است. Paenibacillusها باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری و تشکیل‌دهنده آندوسپوراند که در ابتدا در جنس Bacillus قرار گرفته و سپس در سال ۱۹۹۳ به عنوان یک جنس جداگانه طبقه‌بندی شدند. *Paenibacillus polymyxa* که به طور طبیعی در خاک یافت می‌شود، به خاطر توانایی‌هایش در تولید مواد متابولیکی مفید مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و پلی‌ساکاریدها شناخته شده است [۱]. همچنین، این ارگانیسم به عنوان یک عامل بیوکنترلی و کاهنده آفات درکشاورزی مورد توجه قرار گرفته است. *P. polymyxa* قادر است به تثبیت نیتروژن و بهبود کیفیت خاک کمک کند و به عنوان یک محرک رشد گیاهی عمل کند. این خاصیت‌ها باعث شده است که بررسی عوامل مؤثر بر رشد این باکتری از اهمیت بالایی برخوردار باشد [۲-٤].

عوامل مختلفی نظیر منابع کربن، نیتروژن، مواد معدنی و شرایط محیطی همچون دما و pH تأثیر بسزایی در رشد باکتری‌ها دارند. منابع کربن مختلف مانند ساکارز، گلوکز و نشاسته برای رشد میکروبی استفاده می‌شوند و نسبت کربن به نیتروژن (C:N) در محیط‌های کشت برای تولید مقدار بالای متابولیت‌ها اهمیت دارد [۵, ٦]. نیتروژن نیز به عنوان یکی از عناصر ضروری در رشد میکروارگانیسم‌ها شناخته می‌شود و تأثیر آن به‌ویژه در هنگام ایجاد گرسنگی و در افزایش راندمان تولید پس از مرحله رشد بیشتر مشخص می‌گردد. علاوه بر این، برخی از مواد معدنی مانند فسفر، گوگرد و آهن کوفاکتورهای مهمی برای آنزیم‌ها هستند و در متابولیسم ثانویه نقش اساسی ایفا می‌کنند. دما و pH نیز از جمله عوامل محیطی مهمی هستند که تأثیر زیادی بر رشد میکروارگانیسم‌ها و تولید متابولیت‌ها دارند [۷, ۸].

با توجه به هزینه‌های بالای تولید متابولیت‌ها، استفاده از بسترهای ارزان‌قیمت و مواد جانبی صنایع غذایی و کشاورزی نظیر ملاس به عنوان منبع کربن مورد توجه قرار گرفته است. ملاس از محصولات جانبی کارخانه‌های تولید قند و شکر است و در پزشکی، صنعت، کشاورزی به‌عنوان ماده اولیه کاربرد دارد [۹, ۱۰]. ملاس چغندرقند محلولی از شکر، مواد آلی و معدنی در آب با ماده خشک ۷۷/۷٤ درصد (وزنی/وزنی) است. قند کل (عمدتاً ساکارز) تقریباً ٦۲/٤۸ درصد، خاکستر ۱۱/۹ درصد و کل ترکیبات حاوی نیتروژن (عمدتاً بتائین و اسید گلوتامیک) ۱۳/۱۲ درصد را تشکیل می‌دهند. استفاده از ملاس در کشت باکتری‌ها همچنین به دلیل هزینه پایین و دسترسی راحت به این ماده، به ویژه در کشورهای در حال توسعه، بسیار جذاب است. این ماده حاوی مقادیر قابل توجهی قند، پروتئین، و مواد معدنی است که می‌تواند به عنوان منبع انرژی و مواد مغذی برای باکتری‌ها عمل کند. وجود اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و عناصر کمیاب در ملاس، آن را به یک محیط کشت غنی تبدیل می‌کند که می‌تواند رشد باکتری‌ها را تسهیل کند [۱۱, ۱۲].

روش پلاکت-برمن یک تکنیک آزمایشی است که می‌تواند برای غربالگری و شناسایی فاکتورهای مؤثر در رشد میکروارگانیسم‌ها به کار می‌رود. استفاده از روش پلاکت-برمن به محققان کمک می‌کند تا به شکل نظام‌مند و برنامه‌ریزی شده، عوامل مؤثر در رشد میکروارگانیسم‌ها را بررسی کرده و به دلش بیشتری در مورد بیولوژی

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-23]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213]

ارگانیسم‌ها دست یابند این داده‌ها می‌توانند به پژوهشگران کمک کنند تا مشخص کنند که کدام شرایط و فاکتورها تأثیر بیشتری بر رشد باکتری دارند و بهینه‌سازی شرایط کشت را ممکن سازند. [۱۳, ۱٤].

با توجه به توضیحات فوق‌الذکر، هدف اصلی این مطالعه، بررسی اثر فاکتورهای مختلف (ملاس، گلوکز، سولفات آمونیوم، اوره، TES[1]، pH، زمان، هم‌زدن و میزان تلقیح) بر رشد باکتری *P. polymyxa* با استفاده از تکنیک پلاکت-برمن است.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱- فعال‌سازی میکروارگانیسم

به منظور فعال‌سازی میکروارگانیسم، ابتدا باکتری *P. polymyxa* PTCC 1021 لیوفلیزه که از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران خریداری شده بود، در شرایط استریل به محیط کشت تریپتکاز سوی براث منتقل و به مدت ۲٤ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. میکروارگانیسم فعال به سطح محیط کشت تریپکاز سوی آگار منتقل و گرمخانه‌گذاری مشابه شرایط قبلی انجام گردید (شکل ۱). از کلنی‌های بدست آمده در محیط کشت مذکور به منظور انجام فرایند تخمیر استفاده شد [۱۵].

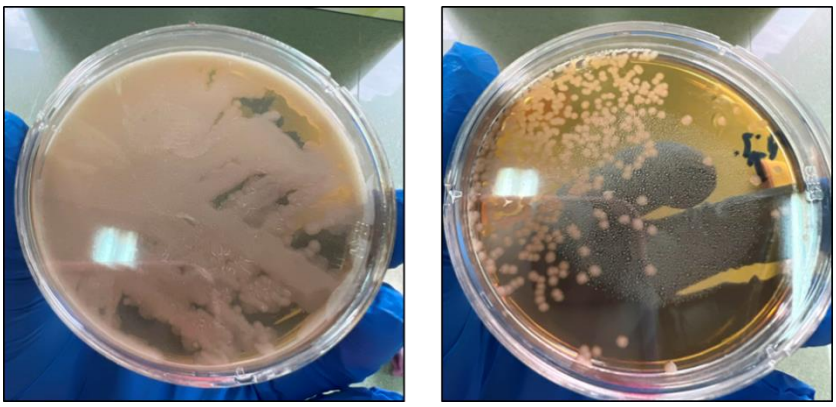


Fig. 1- *P. polymyxa* activated on the basic culture medium.

۲-۲-رسم منحنی رشد باکتری

پس از فعال‌سازی اولیه میکروارگانیسم در محیط تریپکاز سوی براث، سوسپانسیون میکروبی به محیط کشت پایه تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار گرمخانه گذاری گردید. تعداد کلنی باکتری در فواصل زمانی مختلف طی ٦ روز متوالی اندازه‌گیری و منحنی رشد باکتری رسم شد [١٦].

محیط کشت پایه تخمیر[2] شامل ۵۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۱ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۲ گرم بر لیتر مونوپتاسیم فسفات، ۰/۵ گرم بر لیتر دی‌پتاسیم فسفات، ۱ گرم بر لیتر کلرید آهن ٦ آبه، ۱ گرم بر لیتر کلرید منگنز ٤ آبه، ۱ گرم بر لیتر

1 -Trace Element Solution

2 -Fermentation culture

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-23]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213]

کلرید کلسیم ۲ آبه، ۰/۵ گرم بر لیتر سولفات منیزیوم ۷ آبه و ۱ گرم بر لیتر کلرید سدیم بود [۱۶].

۳-۲- غربالگری فاکتورهای مؤثر در رشد با استفاده از طرح آزمایشی پلاکت-برمن

با توجه به اهمیت فاکتورهای مختلف رشد بر افزایش توده سلولی غربالگری فاکتورهای مؤثر در رشد توده سلولی، براساس ۵ جزء محیط کشت شامل ملاس (بریکس)، گلوکز (درصد)، سولفات آمونیوم (گرم در لیتر)، اوره (گرم در لیتر) و TES[3] (حاوی روی (**II**)کلرید، منگنز (**II**) کلرید ٤آبه، نیکل (**II**) کلرید ٦آبه، مس (**II**) کلرید ٤آبه، کبالت (**II**) کلرید ٦ آبه و سدیم‌مولیبدات ۲آبه) (میکروگرم در لیتر) و ٤ پارامتر شرایط تخمیر شامل pH، زمان (ساعت)، هم‌زدن (دور در دقیقه) و میزان تلقیح (درصد) بر اساس طرح آزمایشی پلاکت-برمن با استفاده از نرم افزار آماری (Design-Expert 7.0.0 Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA) انجام شد. این متغیرها بر اساس بررسی تحقیقات گذشته و پیش تیمارهای انجام شده انتخاب و در قالب یک ماتریس با ۱۲ آزمایش طراحی شدند [۱۷].

٤-۲-اندازه‌گیری توده سلولی

پس از پایان دوره تخمیر، محیط کشت میکروبی در ۸۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ محیط کشت تخمیر، توده سلولی به دست آمده با سود ۲ مولار به صورت سوسپانسیون در آمده و به مدت یک ساعت روی شیکر قرار گرفت و سپس، مجدد سانتریفیوژ گردید. پلت به دست آمده در این مرحله به عنوان غلظت توده سلولی بر اساس وزن مرطوب و خشک (بر حسب گرم در لیتر) محاسبه شد [۱۸].

۵-۲-تجزیه تحلیل آماری

غربالگری اولیه جهت تولید بیومس سلولی براساس ٤ جزء محیط کشت و ۵ پارامتر شرایط تخمیر در شیکرفلاسک با استفاده از نرم‌افزار Design-Expert 7.0.0 Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA براساس آزمون پلاکت-برمن در قالب یک ماتریس با ۱۲ آزمایش انجام شد.

۳-نتایج و بحث

۳-۱ آنالیز منحنی رشد باکتری *Paenibacillus polymyxa*

به‌دست آوردن منحنی رشد میکروبی، اطلاعات متعددی راجع به مراحل فازی رشد میکروارگانیسم مانند زمان ورود به فاز لگاریتمی، طول مدت این فاز، زمان ورود به فاز سکون، طول مدت فاز سکون و زمان شروع فاز مرگ را در اختیار قرار می‌دهد. لذا می‌توان برحسب براساس تجزیه و تحلیل منحنی رشد میکروبی، فرایند کشت را در زمان مناسب متوقف و محصول را برداشت نمود.

براین اساس رشد *P. polymyxa* در محیط کشت پایه مورد بررسی قرار گرفت و فازهای رشد با توجه به نتایج به‌دست آمده رسم گردید (شکل ۲) .

همان‌طور که در منحنی رشد شکل ۲ مشاهده می‌شود، در طی ۱۲ و ٢٤ ساعت اول تعداد باکتری *P. polymyxa* به

3- Trace Element Solution

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-23]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213]

ترتیب به حدود ۳ و ۷ سیکل لگاریتمی رسید. جوان‌بودن سوسپانسیون میکروبی تلقیحی و توانایی باکتری در متابولیزه نمودن مشتقات کربنی و نیتروژنی در سرعت خروج از فاز تأخیری[٤] بسیار حائز اهمیت می‌باشند. کوتاه بودن زمان رسیدن میکروارگانیسم به فاز لگاریتمی و افزایش حداکثری رشد از فاکتورهای بسیار مهم در بازده تولید زیستی در مقایس صنعتی بوده، به‌طوری که تعداد دفعات فرایند تولید را افزایش داده و بهره‌وری تخمیر را در واحد حجم افزایش می‌دهد [۱۹]. فاز لگاریتمی تا روز سوم ادامه یافته و سپس فاز سکون[٥] آغاز گردید؛ به عبارتی دیگر ماکزیمم رشد در محیط پایه در زمان ۷۲ ساعت بدست آمده است. افزایش فعالیت باکتری *P. polymyxa* تا روز سوم محیط را با کاهش منابع غذایی و ریز مغذی روبرو می‌نماید؛ همچنین در روز سوم با ترشح و فعال شدن آنزیم‌های هیدرولیزکننده تخریب سلولی شروع می‌شود؛ لذا همراه با رشد سلولی، مرگ سلولی نیز رخ داده و به این ترتیب فاز سکون شروع می‌شود. هرچند اثر دما و فاکتورهای محیطی نظیر pH نیز می‌تواند بر آغاز فاز سکون تأثیر گذاشته و تولید توده سلولی را باکاهش روبرو سازد [۲۰]. براساس نتایج به‌دست آمده از منحنی رشد باکتری *P. polymyxa* در محیط کشت پایه، باکتری پس از ۱۲۰ ساعت (پس از روز پنجم) وارد فاز مرگ خود گردیده است.

Lee و همکاران (۲۰۲۲) منحنی رشد دو نوع واریته *P. polymyxa* E681 جداشده از ریشه جو زمستانه را که در محیط کشت سوی تریپتیک براث[٦] تلقیح و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته تحت شرایط تکان دادن در ۱۸۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری شده بود ارزیابی کردند. شمارش تعداد میکروارگانیسم هر ٢٤ ساعت انجام شد. بیشترین میزان رشد در هر دو واریته پس از ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری مشاهده شد که به بیش از ۸ سیکل لگاریتمی رسید. در خصوص واریته نوع B تا روز چهارم میزان میکروارگانیسم به حدود ٥ سیکل لگاریتمی کاهش یافت ولی پس از آن مجددا میکروارگانیسم رشد نمود و تا روز هفتم به حدود ۷ سیکل لگاریتمی رسد؛ درحالی که روند کاهشی میزان رشد واریته F تا روز هفتم همچنان ادامه یافت؛ به‌طوری که در آخرین روز نگهداری به حدود ٤ سیکل لگاریتمی رسید [۲۱]. Zhao و همکاران (۲۰۲٤) *Paenibacillus polymyxa* B7 را از شلتوک برنج جداسازی نموده و با بررسی جذب در طول موج ٦۰۰ نانومتر، مراحل رشد میکروارگانیسم شناسایی شده را بررسی نمودند. فاز لگاریتمی سویه پس از ٤ ساعت آغاز شد و تا ١٤ ساعت ادامه یافت [۲۲]. Grinev و همکاران (۲۰۲۰) به منظور تولید اگزوپلی‌ساکارید از گونه *P. polymyxa* 92 از محیط‌کشت‌های حاوی ۳ درصد ساکارز، گلوکز یا فروکتوز استفاده نمودند. حداکثر غلظت سلولی (حدود 10^8 cfu/ml) پس از ٤٨ ساعت رشد و در محیط حاوی ۳ درصد ساکارز، مشاهده شد.

4 -Lag phase

5 -Stationery Phase

6 -Soy Tryptic Broth

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-23]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213]

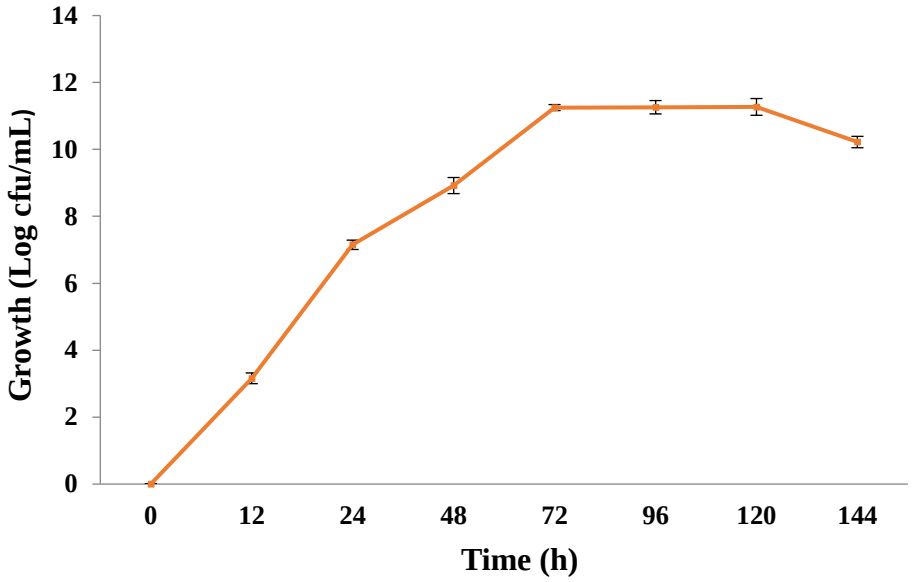


Fig. 2- Growth curve of *P. polymyxa* bacteria in basic culture medium.

۲-۳ غربالگری عوامل مؤثر بر رشد باکتری *P. polymyxa*

در پژوهش حاضر طرح غربالگری براساس روش پلاکت-برمن، به منظور شناسایی متغیرهای مؤثر بر رشد در محیط ملاس انجام شد. این روش به‌ویژه زمانی مفید است که تعداد زیادی فاکتور (متغیر) بالقوه وجود دارد و تصمیم‌گیری و انتخاب آن‌ها برای طراحی آزمایش مشکل است. در این روش با کمترین تعداد آزمایش اطلاعات اولیه و مفیدی از سیستم به‌دست می‌آید که برای مراحل بعدی طراحی بسیار کارایی دارند [۲۳].

متغیرها بر اساس تحقیقات گذشته و پیش تیمارهای انجام شده انتخاب و در قالب یک ماتریس با ۱۲ آزمایش طراحی شد. متغیرهای مستقل شامل pH، سرعت چرخش (دور در دقیقه)، زمان تخمیر (ساعت)، درصد تلقیح میکروارگانیسم، بریکس ملاس، میزان آمونیوم سولفات (گرم در لیتر)، میزان اوره (گرم در لیتر) میزان گلوکز مورد استفاده (درصد) و محلولی از عناصر کم‌مقدار (میکرولیتر در لیتر) بود. ماتریکس پلاکت-برمن به منظور ارزیابی تولید توده سلولی باکتری و نیز نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان بیومس تولیدی در جدول ۱ نشان داده شده است.

Table 1. Plackett–burman matrix to evaluate cell mass production

No.	TES (µL/L)	Time (h)	Glucose (%)	Inocolum (%)	Urea (g/L)	Ammonium sulfate (g/L)	Mollases (Bx)	Rotation (rpm)	pH	Wet Biomass (g/L)a	Dry Biomass (g/L)
	J	H	G	F	E	D	C	B	A		
1	1000	120	12	1	3	3	5	200	5	5.15	1.18
2	1000	120	2	10	1.5	1.5	5	200	5	6.13	1.19
3	100	72	2	1	1.5	1.5	5	100	5	5.56	1.42
4	1000	72	12	10	1.5	3	5	100	7	7.90	1.89
5	1000	120	2	10	3	1.5	25	100	7	17.78	4.35
6	100	72	12	10	3	1.5	25	200	5	14.03	3.68

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-23]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213]

7	1000	72	12	1	1.5	1.5	25	200	7	10.44	2.59
8	100	72	2	10	3	3	5	200	7	6.08	1.50
9	10000	72	2	1	3	3	25	100	5	12.08	3.08
10	100	120	12	1	3	1.5	5	100	7	7.12	1.73
11	100	120	2	1	1.5	3	25	200	7	11.45	2.75
12	100	120	12	10	1.5	3	25	100	5	12.46	3.19

جدول ۲ آنالیز واریانس فاکتورهای اولیه مورد استفاده در غربالگری را نشان می‌دهد. مدل بدست آمده بر اساس ارزیابی فاکتورهای مستقل بر میزان تولید زیست‌توده معنی‌دار بوده و با توجه به آن‌که ضریب تبیین در حدود ۰/۹ می‌باشد، مدل برازش‌شده مناسب ارزیابی می‌شود.

جهت تعیین روند تغییرات تولید بیومس بررسی اثر هر یک از متغیرهای مستقل در ابتدا نیاز به تعیین مناسب تربن مدل جهت برازش داده های آزمون می باشد. از نظر آماری مدلی مناسب است که آزمون عدم برازش آن معنی‌دار نبوده و آزمون برازش معنی دار باشد. براساس ارزش p بدست آمده برای هر فاکتور در بررسی تاثیر عوامل مختلف بر میزان تولید زیست‌توده، مشخص می‌شود که در میان فاکتورهای مورد بررسی اثر دور همزن، زمان فرایند تخمیر و درصد تلقیح در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار است. پس از آن ترم‌های بریکس ملاس، درصد گلوکز مورد استفاده، میزان اوره و آمونیوم سولفات مورد استفاده حائز اهمیت می‌باشند. دور شیکر به تأثیر سرعت و نوع هم زدن در فرایند تخمیر اشاره دارد که می‌تولند به توزیع یکنواخت مواد مغذی و بهبود شرایط رشد سویه های میکروبی کمک کند. زمان لازم برای تخمیر نیز می‌تواند بر روی تولید زیست‌توده موثر باشد. مدت زمان ناکافی می‌تواند منجر به تولید نامناسب یا ضعیف و عدم تکمیل فرایند تخمیر شود. همچنین درصد میکروارگانیسم‌هایی که به فرایند تخمیر یا سوسپانسیون اضافه می‌شوند، تاثیر مستقیمی بر روی میزان زیست‌توده تولیدی خواهد داشت. درصد مناسب تلقیح می‌تواند باعث افزایش تولید شود. با توجه به نتایج بدست آمده اثر بریکس یا سنجش غلظت قندهای محلول مشخص می گردد و در اینجا مستقیما به بررسی غلظت ملاس و تأثیر آن بر روی فرایند اشاره دارد. ملاس منبع قند برای میکروارگانیسم‌هاست و غلظت مناسب آن به همراه گلوکز به عنوان قند اصلی فرایند می‌تواند موجب افزایش تولید زیست‌توده گردد. در کنار این عوامل منابع نیتروژنی مانند اوره و سولفات آمونیوم نیز می توانند بر میزان توده زیستی اثرگذار باشند. به منظور مطالعه دقیق اثر هر فاکتور و کمی کردن آن و همچنین سنجیدن ارزش پاسخ ها، آنالیز و بررسی پاسخ‌ها، مطالعه جدول آنالیز واریانس آن ها ضروری است. معنی‌دار بودن معادله مدل چند جمله ای از نظر آماری با آنالیز واریانس (ANOVA) ارزیابی شد. آنالیز واریانس و در اصل ضریب تغییرات اثرات متغیرها در تعیین پارامترهای مؤثر و غیر مؤثر را برای مدل های مربوط به پاسخ نشان می‌دهد.

Table 2. Variance analysis of variables influencing the growth of *P. polymyxa* based on the plackett–burman designs

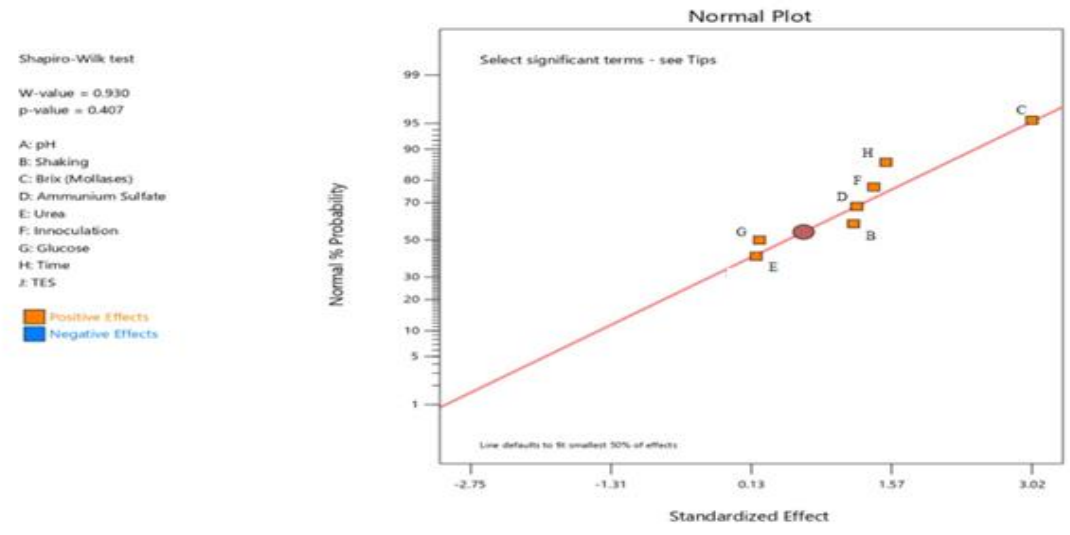
Source	Sum of Squares	Mean Square	Mean Square	F value	P value	
Model	**84.19**	**9**	**8.42**	**0.716**	**0.0435**	**Significant**

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-23]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213]

pH (A)	**12.61**	**1**	**12.61**	**1.07**	**0.1488**	
Shaker (B)	**0.0075**	**1**	**0.0075**	**0.0006**	**0.0098**	
Mollases Bx (C)	**8.27**	**1**	**8.27**	**0.0703**	**0.0505**	
Ammonium sulfate (D)	**0.5689**	**1**	**0.5689**	**0.0484**	**0.0682**	
Urea (E)	**9.39**	**1**	**9.39**	**0.0798**	**0.0535**	
Inocolum (F)	**2.88**	**1**	**2.88**	**0.0244**	**0.0307**	
Glucose (G)	**9.68**	**1**	**9.68**	**0.0823**	**0.0530**	
Time (H)	**6.21**	**1**	**6.24**	**0.0531**	**0.0409**	
TES (J)	**2.72**	**1**	**2.72**	**0.0231**	**0.714**	
Residue	**11.76**	**1**	**11.76**			
Coefficient						**0.887**
Coefficient Variation						**14.52**

در منحنی توزیع نرمال طرح پلاکت-برمن (شکل ۳)، علاوه بر درجه اهمیت هر یک از فاکتورهای مورد بررسی، مثبت یا منفی بودن اثر فاکتور نیز به ترتیب با رنگ‌های نارنجی و آبی قابل مشاهده است. از بین متغیرهای مورد بررسی بریکس ملاس مورد استفاده، زمان، درصد تلقیح، میزان سولفات آمونیوم، سرعت هم‌زدن، میزان گلوکز و اوره به‌صورت معادله درجه اول اثر مثبت معنی‌داری بر رشد باکتری و تولید زیست‌توده دارد که از این میان اثر بریکس ملاس مورد استفاده بیش از سایر متغیرها است؛ این درحالی است که pH و میزان عناصر کم مصرف مورد استفاده اثر منفی بر رشد سلولی داشته است.



[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-23]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213]

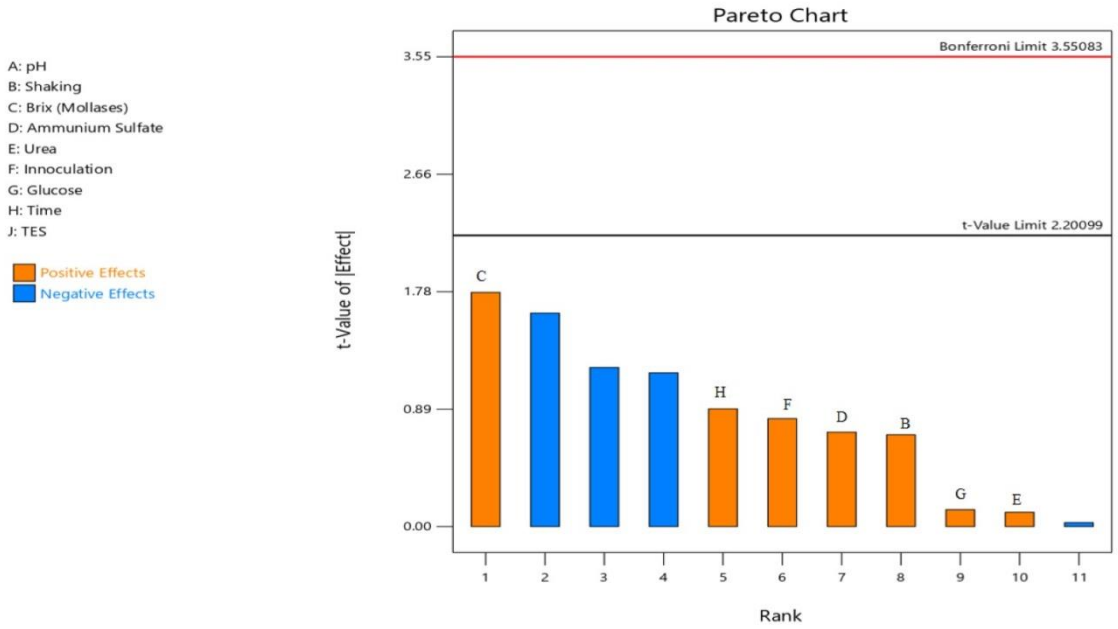


Fig. 3. The normal distribution curve of Burman's plackett plot related to the screening of independent variables influencing *P. polymyxa* biomass (Normal plot and Pareto chart).

Rafigh و همکاران (۲۰۱٤) اثر پارامترهای مختلف روی تولید توده سلولی توسط سویه *P. polymyxa* را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که دما و غلظت گلوکز به عنوان عوامل مستقل، دارای ارزش ضریب بالایی بودند، که نشان دهنده تأثیر معنی‌دار خطی این دو عامل بر رشد باکتری است. اثر مستقیم شش متغیر (دما، pH، زمان تخمیر، گلوکز، عصاره مخمر و سرعت همزن) بر بازده متغیر پاسخ (تولید توده سلولی) در نتایج این مطالعه به وضوح مشهود است. از نظر pH، هنگامی که pH اولیه تخمیر از ۵/۵ تا ۷/۰ افزایش یافت، تولید توده سلولی نیز افزایش یافت. با این حال، مقادیر بالاتر (pH=۸/۵) موجب کاهش تولید گردید. علاوه بر این، مطالعه نشان داد که با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری از ۷۲ تا ۹٦ ساعت، تولید توده زیستی افزایش و به یک نقطه حداکثر در ۹٦ ساعت رسید و زمان‌های طولانی‌تر تأثیر مثبتی بر تولید توده زیستی نداشتند [۱٦]. نتایج تحقیقات Lee و همکاران (۱۹۹۹) نشان داد که تولید توده زیستی باکتری Agrobacterium (که مانند *P. polymyxa* تولنایی تولید اگزوپلی‌ساکارید کردلان را دارا می‌باشد)، با افزایش سرعت هم‌زدن از ۱۲۰ به ۱۵۰ دور در دقیقه به طور قابل‌توجهی افزایش یافت. بالاترین تولید توده زیستی در سرعت هم‌زدن ۱۵۰ دور در دقیقه به دست آمد. تولید بیومس در ۱۲۰ دور در دقیقه کم گزارش شد که می‌توان آن را به محدودیت انتقال اکسیژن نسبت داد. با این حال، در ۱۸۰ دور در دقیقه، سطوح کمتری از توده زیستی

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-23]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213]

مشاهده شد که می‌تواند به تجزیه باکتریایی ناشی از چندین مکانیسم برشی نسبت داده شود [۲٤].

در چندین پژوهش متفاوت، از طرح پلاکت–برمن به منظور بهینه‌سازی محیط کشت میکروارگانیسم‌های خانواده Bacillus که از نظر قرابت به Paenibacillus نزدیک می‌باشند، استفاده شده است. Shi و همکاران (۲۰۲٤) در مطالعه‌ای به بهینه‌سازی محیط کشت تخمیر و شرایط رشد *Bacillus velezensis* BHZ-29 پرداخته و پیشرفت‌های قابل توجهی در افزایش تولید توده زیستی و قدرت ضدباکتری این سویه نشان دادند. آزمایش طرح پلاکت–برمن برای تعیین عوامل مهم مؤثر بر تعداد باکتری‌های زنده و قدرت ضد باکتریایی و آزمایش طرح Box-Behnken برای به دست آوردن شرایط رشد بهینه *B. velezensis* BHZ-29 استفاده شد. نتایج نشان داد ملاس، پپتون و سولفات منیزیم به‌عنوان عوامل کلیدی شناسایی شدند که تأثیر معناداری بر رشد باکتری و فعالیت ضدباکتریایی داشتند. نتایج این تحقیق نشان داد که تعداد سلول‌های زنده از ۱۰۹ ×۷/۸۳ CFU/mL به ۱۰۱۰ × ۲/۱۷ CFU/mL و تیتر ضدباکتری از ۱۱۱/٦۷ به ۱۵۳/۱۳ mm/mL افزایش یافت. همچنین بعد از بهینه‌سازی، شرایط تخمیر برای *B. velezensis* BHZ-29 به شرح زیر بود: دما ۲۵/۵۷ درجه سانتی گراد، pH=۷/۲۳، زمان کشت ۹۵ ساعت، سرعت چرخش ۱٦۰ دور بر دقیقه، مقدار تلقیح ۲ درصد و حجم تخمیر ۱۰۰ میلی‌لیتر. پس از بهینه‌سازی شرایط تخمیر، تعداد باکتری‌های زنده به ۱۰۱۰ × ۳/۹ CFU/mL و تیتر باکتریواستاتیک به ۱۵۸/۸۵ mm/ml افزایش یافت [۲۵].

مطالعه‌ای که توسط Ghasemi و Ahmadzadeh (۲۰۱۳) انجام شده است، به بررسی روش‌های غربالگری و بهینه‌سازی تخمیر برای افزایش همزمان تولید توده زیستی و کارایی یک متابولیت کنترل زیستی از *Bacillus subtilis* UTB96 می‌پردازد. با استفاده از طراحی پلاکت–برمن، محققان به‌طور مؤثری عوامل محیطی مختلفی را که بر تولید توده سلولی تأثیر می‌گذارند، بررسی نموده و بر pH، دما و نسبت کربن به نیتروژن (C/N) به‌عنوان پارامترهای کلیدی تمرکز کردند. شرایط بهینه تعیین‌شده— pH برابر با ۷، دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد و نسبت C/N برابر با ۲۳:۱—با پروفایل‌های رشدی که معمولاً برای بسیاری از گونه‌های باکتری باسیلوس مشاهده می‌شود، همخوانی دارد. حفظ pH متعادل به‌ویژه برای متابولیسم میکروبی اهمیت زیادی دارد، زیرا فعالیت آنزیمی و جذب مواد مغذی را تسهیل می‌کند. نسبت C/N انتخاب‌شده احتمالاً محیطی متعادل فراهم می‌آورد که به سنتز مولکول‌های ضروری کمک می‌کند و در نتیجه به انباشت توده سلولی کمک می‌کند. یکی از یافته‌های برجسته این مطالعه، افزایش قابل‌توجه توده سلولی در باکتری‌هایی است که تحت شرایط بهینه کشت داده شده‌اند. محققان بیان نمودند کاربرد غربالگری فاکتورهای موثر در رشد توده سلولی و همچنین بهینه‌سازی شرایط کشت در بیوراکتور نیمه‌صنعتی و شرایط آزمایشگاهی تأثیر مثبتی در کاهش طول فاز تأخیر رشد باکتری داشت. این مشاهده نشان می‌دهد که استفاده از یک محیط بهینه می‌تواند سازگاری باکتری‌ها با شرایط محیطی جدید را تسریع کند که به‌طور کلی بهره‌وری را افزایش می‌دهد. کاهش فاز تأخیر به‌ویژه در کاربردهای بیوتکنولوژیکی سودمند است، زیرا کارایی زمان می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی بر سودآوری اقتصادی تأثیر بگذارد [۲٦].

Praharyawan و همکاران (۲۰۱٤) از طراحی پلاکت–برمن برای غربالگری ترکیبات محیطی به منظور افزایش

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-23]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213]

تولید بیوسورفاکتانت توسط باکتری Bacillus sp. DSW17 استفاده نمودند. این رویکرد به‌طور مؤثر عوامل کلیدی تأثیرگذار بر بازده بیوسورفاکتانت را شناسایی و قدم مهمی در بهینه‌سازی فرآیندهای تخمیر برای تولید بیوسورفاکتانت محسوب می‌شود. از مجموع ۱۱ ترکیب بررسی شده، ۹ مورد آن به‌طور قابل‌توجهی بر تولید بیوسورفاکتانت تأثیر داشتند. به‌طور خاص، $FeSO_4.7H_2O$، $NaNO_3$، $CaCl_2.2H_2O$، K_2HPO_4 و ساکارز رابطه مستقیمی با تولید بیوسورفاکتانت داشتند. منابع نیتروژن مانند $NaNO_3$ برای سنتز پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک ضروری هستند، در حالی که منابع کربن مانند ساکارز انرژی لازم برای رشد باکتری و تولید بیوسورفاکتانت را تأمین می‌کنند. درحالیکه، مشاهده شد که $ZnSO_4.7H_2O$، KH_2PO_4 و $MgSO_4.7H_2O$ رابطه معکوسی با تولید بیوسورفاکتانت دارند. این یافته‌ها دلالت بر این دارد که در محدوده تجربی مورد مطالعه، غلظت‌های بالای این ترکیبات ممکن است سنتز بیوسورفاکتانت را مهار کند [۲۷].

مطالعه‌ای که توسط Rajendran و همکاران (۲۰۰۷) انجام شده است، بر کارایی استفاده از طراحی پلاکت–برمن در ارزیابی آماری اجزای محیط کشت برای افزایش تولید توده سلولی و لیپاز توسط باکتری *Bacillus sphaericus* تأکید می‌کند. با تجزیه و تحلیل دوازده مؤلفه محیطی در فرآیند تخمیر غوطه‌وری، این مطالعه به‌طور مؤثر عوامل کلیدی که به‌طور قابل‌توجهی بر تولید لیپاز تأثیر می‌گذارند، شناسایی کرده است. در میان اجزای ارزیابی‌شده، گلوکز، روغن زیتون، پپتون، NaCl و $MnSO_4 \cdot H_2O$ به‌عنوان مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر فعالیت لیپاز شناسایی شدند. وجود گلوکز و روغن زیتون به‌عنوان منابع کربن به‌ویژه حائز اهمیت است. گلوکز به‌عنوان یک منبع انرژی اولیه عمل کرده و فرآیند تنفس سلولی و رشد توده زیستی را تقویت می‌کند، در حالی که روغن زیتون اسیدهای چرب ضروری را فراهم می‌کند که برای تولید لیپاز حیاتی هستند. نقش پپتون به‌عنوان منبع نیتروژن نیز مهم است، زیرا اسیدهای آمینه لازم برای سنتز پروتئین‌ها، از جمله آنزیم لیپاز را تأمین می‌کند. دستیابی به حداکثر فعالیت لیپاز به میزان ۲.۸۲ U/ml در فرآیند تخمیر نشان‌دهنده پتانسیل باکتری *Bacillus sphaericus* به‌عنوان یک تولیدکننده مؤثر لیپاز است [۲۸].

٤–نتیجه‌گیری

باکتری *P. polymyxa*، یک باکتری گرم مثبت طبیعی و مفید در خاک است که توانایی تولید انواع آنتی بیوتیک‌ها و پلی–ساکاریدهایی از قبیل کردلان را دارا می‌باشد. بنابراین ارائه راهکار برای رشد بیشتر این سویه در محیط کشت‌های ارزان قیمت می‌تواند منجر به تولید محصول نهایی با قیمت تمام شده پایین‌تر گردد. این پژوهش به بررسی اثرات انواع منابع کربن، نیتروژن و شرایط محیطی با تأکید بر استفاده از ملاس به عنوان یک منبع کربن ارزان‌قیمت و دسترس‌پذیر بر رشد این باکتری اختصاص دارد. نتایج آزمون غربالگری نشان داد اثر دور همزن، زمان فرایند و درصد تلقیح نسبت به سایر پارامترهای مورد بررسی، بر میزان تولید توده سلولی معنادارتر بود ($P<0.95$)ز. تحقیقات بیشتری در زمینه ارائه راهکار مناسب به منظور رشد بیشتر *P. polymyxa* در محیط کشت حاوی ملاس به منظور تولید توده سلولی بالاتر و در نتیجه تولید با راندمان بیشتر محصول متابولیکی مدنظر، لازم است.

٥–تقدیر و تشکر

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-23]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213]

این اثر تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) برگرفته شده از طرح شماره "٤٠١٤٢٢٤" انجام شده است.

٦-منابع

[1] Raza, W., et al., Optimization, purification, characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by Paenibacillus polymyxa SQR-21. Bioresource technology, 2011. **102**(10): p. 6095-6103.

[2] El-Sayed, M.H., et al., Optimization, purification and physicochemical characterization of curdlan produced by Paenibacillus sp. strain NBR-10. Biosciences Biotechnology Research Asia, 2016. **13**(2): p. 901-909.

[3] Zhang, F., et al., Biocontrol potential of Paenibacillus polymyxa against Verticillium dahliae infecting cotton plants. Biological Control, 2018. **127**: p. 70-77.

[4] Huang, X.-Y., et al., Exopolysaccharides of Paenibacillus polymyxa: A review. International Journal of Biological Macromolecules, 2024: p. 129663.

[5] Falah, F., et al., Effect of immobilization, mutation, and microbial stresses on increasing production efficiency of "Cyclosporin A". Biomass Conversion and Biorefinery, 2024. **14**(4): p. 4441-4456.

[6] Topić Popović, N., et al., Sample preparation and culture condition effects on MALDI-TOF MS identification of bacteria: A review. Mass spectrometry reviews, 2023. **42**(5): p. 1589-1603.

[7] Brown, R.W., et al., Nutrient (C, N and P) enrichment induces significant changes in the soil metabolite profile and microbial carbon partitioning. Soil Biology and Biochemistry, 2022. **172**: p. 108779.

[8] Vasiee, A., et al., Optimization of the production conditions of the lipase produced by Bacillus cereus from rice flour through Plackett-Burman Design (PBD) and response surface methodology (RSM). Microbial Pathogenesis, 2016. **101**: p. 36-43.

[9] Falah, F., et al., Optimization of γ-aminobutyric acid (GABA) production by Lactobacillus spp. from agro-food waste. Biomass Conversion and Biorefinery, 2024. **14**(3): p. 3425-3437.

[10] Öz, Y.E. and M. Kalender, A novel static cultivation of bacterial cellulose production from sugar beet molasses: Series static culture (SSC) system. International Journal of Biological Macromolecules, 2023. **225**: p. 1306-1314.

[11] Saejung, C. and L. Puensungnern, Evaluation of molasses-based medium as a low cost medium for carotenoids and fatty acid production by photosynthetic bacteria. Waste and Biomass Valorization, 2020. **11**: p. 143-152.

[12] Çakar, F., et al., Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. Carbohydrate polymers, 2014. **106**: p. 7-13.

[13] Ejaz, U., A. Ahmed, and M. Sohail, Statistical optimization of immobilization of yeast cells on corncob for pectinase production. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2018. **14**: p. 450-456.

[14] Stone, M., et al., Standardized evaluation of Zika nucleic acid tests used in clinical settings and blood screening. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2023. **17**(3): p. e0011157.

[15] Triveni, R., T. Shamala, and N. Rastogi, Optimised production and utilisation of

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-23]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213]

exopolysaccharide from Agrobacterium radiobacter. Process Biochemistry, 2001. **36**(8-9): p. 787-795.

[16] Rafigh, S.M., et al., Optimization of culture medium and modeling of curdlan production from Paenibacillus polymyxa by RSM and ANN. International journal of biological macromolecules, 2014. **70**: p. 463-473.

[17] Falah, F., et al., Production of cyclosporin A by Tolypocladium inflatum using dairy waste medium: optimization and investigation of the effect of ultrasound, high hydrostatic pressure, and pulsed electric field treatments on the morphology of fungus. Biomass Conversion and Biorefinery, 2023: p. 1-13.

[18] Salah, R.B., et al., Fermentation of date palm juice by curdlan gum production from Rhizobium radiobacter ATCC 6466™: Purification, rheological and physico-chemical characterization. LWT-Food Science and Technology, 2011. **44**(4): p. 1026-1034.

[19] Maier, R.M. and I.L. Pepper, Bacterial growth, in Environmental microbiology. 2015, Elsevier. p. 37-56.

[20] Peleg, M. and M.G. Corradini, Microbial growth curves: what the models tell us and what they cannot. Critical reviews in food science and nutrition, 2011. **51**(10): p. 917-945.

[21] Lee, Y., et al., Occurrence of phenotypic variation in Paenibacillus polymyxa E681 associated with sporulation and carbohydrate metabolism. Biotechnology Reports, 2022. **34**: p. e00719.

[22] Zhao, T., et al., Isolation and Characterization of Paenibacillus polymyxa B7 and Inhibition of Aspergillus tubingensis A1 by Its Antifungal Substances. International Journal of Molecular Sciences, 2024. **25**(4): p. 2195.

[23] Kaczmarek, J.A. and K.L. Prather, Effective use of biosensors for high-throughput library screening for metabolite production. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2021. **48**(9-10): p. kuab049.

[24] Lee, I.Y., et al., Influence of agitation speed on production of curdlan by Agrobacterium species. Bioprocess engineering, 1999. **20**: p. 283-287.

[25] Shi, Y., et al., Optimization of the fermentation media and growth conditions of Bacillus velezensis BHZ-29 using a Plackett–Burman design experiment combined with response surface methodology. Frontiers in Microbiology, 2024. **15**: p. 1355369.

[26] Ghasemi, S. and M. Ahmadzadeh, Optimisation of a cost-effective culture medium for the large-scale production of Bacillus subtilis UTB96. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2013. **46**(13): p. 1552-1563.

[27] Praharyawan, S., D. Susilaningsih, and K. Syamsu, Statistical screening of medium components by plackett–burman experimental design for biosurfactant production by indonesian indigenous Bacillus sp. DSW17. Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci, 2013. **15**(4): p. 805-13.

[28] Rajendran, A., A. Sundaramurthy, and V. Thangavelu, Statistical evaluation of medium components using Plackett-Burman experimental design and kinetic modeling of lipase production by Bacillus sphaericus. Chemical and biochemical engineering quarterly, 2007. **21**(2): p. 181-188.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-23]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213]

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Screening of effective factors in the growth of *Paenibacillus polymyxa* using Platelet-Berman experimental design

Alireza Vasiee[1], Mahboobe Sarabi-Jamab[2*], Fereshteh Falah[3], Seyed Ali Mortazavi[3]

1 –Department of Food Safety and Quality Control, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran

2 –Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, RIFST, Mashhad, Iran

3 –Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received:2024/11/4

Accepted:2024/12/11

Keywords:

Paenibacillus polymyxa,
cell growth,
Plackett -Burman

DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213.

*Corresponding Author E-
m.sarabi@rifst.ac.ir

ABSTRACT

Paenibacillus polymyxa is one of the microorganisms that has the ability to produce extracellular exopolysaccharides and antibiotics. Several factors, including culture medium content, carbon and nitrogen sources, pH, temperature, air velocity, and culture conditions, have an effect on the growth and production of higher cell mass, as well as the production of microbial metabolites. The purpose of this study was to investigate the growth rate of *P. polymyxa* in a culture medium containing molasses and to screen five components of the culture medium along with four factors of the fermentation conditions using the Plackett -Burman method to maximize cell mass production. The results showed that among the investigated variables, molasses brix, time, percentage of inoculation, amount of ammonium sulfate, stirring speed, and the amount of glucose and urea, as a first-order equatino, had a significant positive effect on bacterial growth and biomass production. Molasses brix medium was found to be more effective than other variables; however, pH and the amount of low-use elements had a negative effect on cell growth. The findings of this study indicated that molasses-based culture medium can be used as a cost-effective and suitable option for the growth of *P. polymyxa*.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-01-23]

[DOI: 10.22034/FSCT.22.158.213]