بهینه‌سازی ترکیب محیط صنعتی کشت زانتاموناس کمپستریس (*Xanthomonas campestris*) به منظور افزایش بازده تولید زانتان به شیوه سطح پاسخ

زهرا فرقانی[a]، مرضیه موسوی نسب[b*]، سارا خشنودی‌نیا[c]

[a] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
[b] استاد بخش علوم و صنایع غذایی و رئیس گروه فرآوری آبزیان، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
[c] دانشجوی دکترای بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۶/۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱/۱۹

چکیده

مقدمه: صمغ زانتان به دلیل رفتار سودوپلاستیک، نسبت به صمغ‌های نیوتنی احساس صمغی کم‌تری در دهان ایجاد کرده و به عنوان قوام‌دهنده و تعلیق‌کننده کاربرد زیادی در صنعت غذا دارد. زانتان صمغی باکتریایی است و فرایند تولید آن به‌شدت تحت تأثیر ترکیب محیط کشت قرار دارد. هدف از این مطالعه بهینه‌سازی محیط کشت صنعتی برای رسیدن به حداکثر بازده صمغ زانتان است.

مواد و روش‌ها: تولید صمغ زانتان توسط باکتری زانتاموناس کمپستریس PTCC-1473 و در محیط‌های کشت مختلف در بیوراکتور هم‌زن‌دار باکنترل شرایط pH و اکسیژن محلول انجام شد. در این پژوهش از طرح فاکتوریل جزئی برای شناسایی فاکتورهای مؤثر بر تولید صمغ زانتان توسط باکتری مذکور استفاده شد. شیوه سطح پاسخ و طرح مرکزی نیز برای برآورد اثر ساده و متقابل چهار متغیر معنی‌دار (گلوکز، ساکارز، عصاره مخمر و سولفات آمونیوم) بر تولید توده سلولی و صمغ زانتان در محیط کشت مایع استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد هر دو منبع کربن و نیتروژن تأثیر زیادی بر تولید زانتان دارند، اما منبع کربنی و به ویژه گلوکز بیش‌تر از منابع نیتروژنی در رشد سلولی و تولید صمغ زانتان مؤثر است. نرم‌افزار، سطح بهینه محیط کشت برای تولید صمغ زانتان ۵۳/۷۵ گلوکز (گرم/لیتر)، ۲۷/۸ ساکارز (گرم/لیتر)، ۷/۸ عصاره مخمر (گرم/لیتر) و ۵/۶ سولفات آمونیوم (گرم/لیتر) برآورد کرد، در این محیط کشت تولید ۱۲/۴۳ گرم/لیتر پیش‌بینی شد. استفاده از محیط کشت بهینه شده در بیوراکتور ۵ لیتری بعد از ۳۶ ساعت تخمیر باعث تولید ۰/۴۴±۱۲/۲۶ زانتان شد، که مطابقت بالایی با میزان پیش‌بینی شده داشت.

نتیجه‌گیری: محیط کشت بهینه شده در این پژوهش می‌تواند توانایی بالایی در بهبود بازدهی و متعاقبا تولید مقرون به صرفه‌تر صمغ زانتان داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: *بهینه‌سازی محیط کشت، شیوه سطح پاسخ، صمغ زانتان، طرح فاکتوریل جزئی*

[*] نویسنده مسئول مکاتبات email: marzieh.moosavi-nasab@mail.mcgill.ca

مقدمه

صمغ زانتان یکی از پلی‌ساکاریدها و بیوپلیمرهای مهم صنعتی است که در اواخر دهه ۱۹۵۰ میلادی توسط یک گروه تحقیقاتی که بر روی پلیمرهای کاربردی متمرکز بودند، کشف شد. در سال ۱۹۶۹ استفاده از صمغ زانتان در محصولات غذایی مورد تأیید مرجع غذا و دارو[1] قرار گرفت و تولید صنعتی آن به طور گسترده آغاز شد (Salah *et al*., 2010). این زانتان ویژگی‌های بافتی، ویسکوزیته، ظاهر محصول و ویژگی‌های کنترل آب را بهبود بخشیده و رئولوژی محصول نهایی را نیز کنترل می‌کند. ویژگی‌های سودوپلاستیک داشته و احساس صمغی کم‌تر نسبت به صمغ‌های با ویژگی نیوتنی نشان می‌دهد. به همین دلیل کاربری زیادی دارد. از این صمغ در صنایع نانوایی، سس‌های سالاد، نوشیدنی‌ها، محصولات لبنی و گوشتی، و صنایع آرایشی و بهداشتی و کشاورزی استفاده می‌شود (Palaniraj & Jayaraman, 2011).

زانتان ساختار موکولی نسبتاً پیچیده‌ای دارد. زنجیره اصلی آن ساختاری شبیه سلولز دارد (شامل موکول‌های گلوکز که توسط پیوند گلیکوزیدی ۱،۴- بتا به یکدیگر متصل شده‌اند) و زنجیره‌های جانبی این موکول شامل بتا-دی مانوز، بتا-۱، ۴- دی‌گلوکورونیک اسید و آلفا-۱، ۲- دی‌مانوز به همراه واحدهای پیرویک اسید است (Palaniraj & Jayaraman, 2011). ساختار موکولی زانتان به شدت تحت تأثیر ترکیب محیط کشت است. به همین دلیل تاکنون مطالعات گوناگونی روی انواع مواد مغذی مؤثر بر تولید زانتان صورت گرفته است (El Enshasy *et al*., 2013; Funahashi *et al*., 1987; Umashankar *et al*., 1996). بهینه‌سازی محیط کشت این باکتری می‌تواند در تولید صنعتی آن حائز اهمیت ویژه باشد. مطالعات پیشین نشان داده است که شیوه سطح پاسخ[2] (RSM) روش مناسبی برای بهینه‌سازی شرایط تولید صنعتی صمغ‌ها توسط فرایند تخمیر است (Zhang *et al*., 2015; Salah *et al*., 2010; Amid & Mirhosseini, 2012). این روش توانسته است بر برخی محدودیت‌های بهینه‌سازی تک پارامتری غلبه کند و با موفقیت برای بهینه‌سازی ترکیب محیط کشت و دیگر پارامترهای مهم واکنش در حداقل تعداد آزمون به کار گرفته شود (Zhang *et al*., 2015; Anderson & Whitcomb, 2005). عواملی مختلفی همچون نوع باکتری (Niknezhad *et al*., 2015; Moreira *et al*., 2001)، نوع فرایند تخمیر (Papagianni *et al*., 2001)، محیط کشت (Psomas *et al*., 2007) دما (Esgalhado *et al*., 1995)، pH (Esgalhado *et al*., 1995)، زمان (Cacik *et al*., 2001)، سرعت هم زدن (El Enshasy *et al*., 2013) و هوادهی (Moshaf *et al*., 2014) بر میزان تولید صمغ زانتان مؤثر است، اما در تولید فرآورده‌های زیستی که ارزش‌افزوده چندانی ندارند، هزینه سوبسترا سهم زیادی از قیمت تمام‌شده محصول است، بنابراین بهینه‌سازی محیط کشت نقش مهمی در کاهش قیمت محصول دارد. علی‌رغم معرفی سوبستراهای حاصل از پسماندهای صنعتی و کشاورزی از جمله نشاسته هیدرولیز شده (نیک‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۲)، ملاس (Kalogiannis *et al*., 2003; Murugesan *et al*., 2012)، پروتئین آب‌پنیر (Niknezhad *et al*., 2015; Gilani *et al*., 2011; Mesomo *et al*., 2009)، عصاره پالم (Salah *et al*., 2010)، شیره خرما (Moshaf *et al*., 2011) به‌عنوان منبع کربنی و نیتروژنی، اما هیچ‌یک از این منابع نتوانسته‌اند، میزان صمغی به اندازه سوبستراهای تجاری (ساکارز، گلوکز، سولفات آمونیوم و غیره) داشته باشند و عملاً استفاده از این منابع همچنان به مطالعه بیش‌تری نیاز دارد. لذا به نظر می‌رسد بهینه‌سازی محیط کشت‌های مرسوم دارای الویت باشد. با این‌که تحقیقاتی در زمینه بهینه‌سازی محیط‌های کشت تجاری صورت گرفته، با این حال نتایج این پژوهش‌ها بعضاً ضدونقیض بوده و همچنان نیاز به پژوهش بیش‌تر را تأیید می‌کنند. لذا در این در این پژوهش ابتدا تمام مواد مؤثر در محیط کشت (منابع فسفات، منیزیوم، نیتروژن، کربن، نمک) طی آزمون فاکتوریل جزئی[3] غربال‌گری شدند و عوامل مؤثرتر بر راندمان تولید انتخاب و توسط شیوه سطح پاسخ و با استفاده از نرم‌افزار Minitab 16 بهینه‌سازی شدند.

مواد و روش‌ها

[1] The Food and Drug Authority (FDA)
[2] Response Surface Methodology
[3] Fractional Factorial Design

میکروارگانیسم: میکروارگانیسم زانتاموناس کمپستریس[1] PTCC-1473 از بانک میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به شکل لیوفیلیزه خریداری شد. این باکتری در محیط کشتGYC شامل؛ ۲۰ گرم/لیتر گلوکز، ۲۰ گرم/لیتر کلسیم کربنات، ۱۰ گرم/لیتر عصاره مخمر و ۱۷ گرم/لیتر آگار به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد.

محیط کشت: محیط کشت مورد استفاده در فرایند تخمیر حاوی ۲۰g/L گلوکز، g/L ۱ نیترات آمونیوم، g/L ۱۰ فسفات دی‌هیدروژن‌پتاسیم، g/L ۲ اسید سیتریک، g/L ۰/۰۰۸۹ کلرید سدیم، g/L ۰/۰۵۰۷ سولفات منیزیم، g/L ۰/۰۱ اسید بوریک، g/L ۰/۰۶۵ سولفات روی، g/L ۰/۰۰۲۷ کلرید آهن، g/L ۰/۰۲۴ کربنات کلسیم و ml ۰/۱۳ اسید کلریدریک بود. که pH اولیه آن روی ۷ تنظیم شد (Esgalhado *et al*., 1995; Salah *et al*., 2010).

شرایط محیط کشت: یک لوپ از باکتری زانتاموناس کمپستریس از محیط کشت جامد اولیه خود (محیط کشت GYC) به یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت استریل منتقل و ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد روی شیکر روتاری با دور rpm ۱۵۰ قرار داده شد. ۱۰٪ از این محیط کشت به محیط تخمیر در یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل و تلقیح در سرعت rpm ۱۸۰ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۶ ساعت دنبال شد (نیک‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۲). محیط‌های تخمیر بر پایه طراحی آزمون تغییر داده شدند. تخمیر در بیوراکتور stirred bioreactor ۵ لیتری با حجم کاری ۳/۵ لیتر انجام گرفت. شرایط فرایند روی pH ۰/۱ ± ۷، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، سرعت هم زدن ۱۸۰ دور در دقیقه و سرعت هوادهی vvm ۱/۲ تنظیم شد. هر دو فرایند مخلوط کردن و هوادهی در طول فرایند ثابت نگه داشته شد (Esgalhado *et al*., 1995; Salah *et al*., 2010).

تعیین وزن سلول‌های خشک: سلول‌ها بعد از سانتریفوز به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و rpm ۶۰۰۰ از قسمت مایع جدا و جمع‌آوری شدند. بیومس به منظور حذف زانتان دو مرتبه با الکل شستشو داده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه دیگر سانتریفوژ (universal 320, Hettich, Germany) گردید و در آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت خشک و وزن شد (Moshaf *et al*., 2011).

تولید زانتان و اندازه‌گیری غلظت: براث حاصل از فرمانتور برای ۳۰ دقیقه در rpm ۱۲,۰۰۰ به منظور حذف سلول باکتری در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. ۱۵ میلی‌لیتر مایع فاقد سلول حاصل از سانتریفوژ (سوپرنیتنت[2]) را جدا کرده و با دو برابر حجم آن با این مخلوط برای مدت ۱۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد به منظور ترسیب صمغ زانتان نگهداری شد. بعد از آن رسوب توسط ۳۰ دقیقه سانتریفوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و rpm۱۰۰۰۰ جدا گردید. صمغ زانتان با الکل اتانول ۷۰٪ رقیق و با ۱۰۰ میکرولیتر پتاسیم کلراید خالص مخلوط شده و مجدداً سانتریفوژ و در آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک شد. میزان بیوپلیمر تولید شده توسط اندازه‌گیری وزن خشک در هر لیتر براث به دست می‌آید و به صورت گرم/لیتر بیان می‌شود (نیک‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۲).

غربالگری ترکیبات مؤثر بر بازده صمغ زانتان در محیط کشت: طرح‌های فاکتوریل جزئی[3](FFD) برای تشخیص مواد مغذی مهم و روابط بین دو یا چند ماده مغذی بسیار مناسب است. به این ترتیب می‌توان تعداد آزمایش‌ها را بدون از دست رفتن اطلاعات اصلی کاهش داد. به منظور شناسایی مهم‌ترین ترکیبات محیط کشت بر راندمان تولید زانتان، یک طرح فاکتوریل جزئی با ۷ متغیر مستقل و ۱۶ آزمایش طراحی شد و به این ترتیب مهم‌ترین عوامل مؤثر بر تولید زانتان شناسایی شد. تمام آزمون‌ها در سه تکرار صورت گرفت (Li *et al*., 2002; Zhang *et al*., 2015).

بهینه‌سازی: متغیرهای مستقلی که تأثیر آن‌ها در طرح فاکتوریل معنی‌دار شدند (ساکارز و گلوکز، سولفات آمونیوم و عصاره‌ی مخمر) در ۵ سطح و بر اساس روش آزمایشی طراحی نقطه مرکزی (CCD) و توسط نرم‌افزار Minitab 16 بررسی شدند (جدول ۱). به طوری کلی ۳۰ آزمایش با در نظر گرفتن نقاط مرکزی و تکرار آن‌ها ترتیب داده شد. آزمایش‌ها به شکل تصادفی انجام شد تا کم‌ترین مقدار خطا را داشته باشد. اعتبار مدل توسط آنالیز واریانس داده‌ها توسط نرم‌افزار Minitab 16 سنجش شد (Salah *et al*., 2010).

[1] *Xanthomonas campestris*
[2] Supernatant
[3] Fractional Factorial Designs (FFD)

مدل یک چند جمله‌ای درجه دوم مطابق معادله زیر در نظر گرفته شد.

$$y = b_0 + \sum bixi + \sum biixi\,2 + \sum bijxixj$$

که b0، bi، bii و bij مقدار ضرایب رگرسیونی به ترتیب برای عرض از مبدأ، ضریب معادله خطی، ضریب معادله درجه ۲ و ضریب اثرات متقابل هستند. xi و xj متغیرهای مستقل و y متغیر وابسته (میزان توده سلولی و صمغ زانتان) است (Zhang *et al*., 2015). به منظور پایش اعتبار مدل، مقادیری که توسط نرم‌افزار به عنوان سطح بهینه متغیرهای محیط کشت به منظور رسیدن به بهترین بازدهی زانتان ارائه شده است، در محیط کشت اعمال و میزان صمغ اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها

غربال‌گری به کمک طرح فاکتوریل جزئی به منظور انتخاب عوامل اصلی مؤثر بر بازدهی صمغ انجام شد. در این مرحله ۷ عامل ساکارز، گلوکز، سولفات منیزیوم، سولفات آمونیوم، پتاسیم‌هیدورژن فسفات و کلرید سدیم هر کدام در دو سطح مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۲). نتایج آزمایش نشان داد، میزان تولید صمغ زانتان برحسب گرم/لیتر بین ۱۲/۳۹–۱/۹۵ متغیر است. کم‌ترین میزان تولید صمغ زانتان زمانی به دست آمد که غلظت ساکارز و گلوکز در مقدار حداکثر و غلظت ۵ متغیر دیگر در حداقل تعیین شده بود، زمانی که تمام متغیرها در حداکثر غلظت خود بودند، میزان تولید صمغ قابل توجه (۱۱/۵۸) بود.

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده در آزمایش بهینه‌سازی

عوامل تغییر	کد				
	+α	۱	۰	-۱	-α
عصاره‌ی مخمر (X_1)	۱۵	۱۱/۲۵	۷/۵	۳/۷۵	۰
گلوکز (X_2)	۵۵/۵	۴۱/۶۲۵	۲۷/۷۵	۱۳/۸۷۵	۰
ساکارز (X_3)	۸۳/۲۵	۶۲/۴۳۷۵	۴۱/۶۲۵	۲۰/۸۱۲۵	۰
سولفات آمونیوم (X_4)	۱۵	۱۱/۲۵	۷/۵	۳/۷۵	۰

جدول ۲- تأثیر غلظت عوامل مختلف بر تولید صمغ زانتان

آزمایش	گلوکز	ساکارز	عصاره مخمر	سولفات آمونیوم	سولفات‌منیزیم	پتاسیم‌هیدروژن فسفات	کلرید سدیم	صمغ زانتان
۱	۲	۲	۲۰	۱	۳	۳	۳	۱۰/۵۸
۲	۲۰	۲۰	۲	۱	۱	۳	۳	۱۰/۳۱
۳	۲	۲۰	۲	۱	۳	۳	۱	۱۲/۳۹
٤	۲۰	۲	۲	۳	۳	۳	۱	۳/۲۲
٥	۲	۲	۲۰	۳	۳	۱	۱	۲/۲۷
٦	۲	۲۰	۲۰	۳	۱	۳	۱	۶/۹۱
۷	۲۰	۲۰	۲۰	۱	۳	۱	۱	۸/۵۴
۸	۲	۲	۲	۳	۱	۳	۳	۳/۰۰
۹	۲۰	۲	۲۰	۳	۱	۱	۳	۳/۲۲
۱۰	۲۰	۲	۲۰	۱	۱	۳	۱	۶/۵۷
۱۱	۲	۲۰	۲۰	۱	۱	۱	۳	۷/۴۱
۱۲	۲۰	۲۰	۲۰	۳	۳	۳	۳	۱۱/۵۸
۱۳	۲۰	۲	۲	۱	۳	۱	۳	۵/۵۸
۱٤	۲	۲۰	۲	۳	۳	۱	۳	۵/۶۳
۱٥	۲۰	۲۰	۲	۳	۱	۱	۱	۱/۹۵
۱٦	۲	۲	۲	۱	۱	۱	۱	۲/۰۲

* واحدهای همه مؤلفه‌ها گرم/لیتر است.

بر اساس فرض اولیه و پیشنهادی، تمامی ۷ متغیرهای (با توان اول و دوم و اثر متقابل آن‌ها) به کار رفته در طراحی مدل در میزان تولید صمغ مؤثر بوده‌اند. اما در عمل برخی متغیرها اضافی بوده و باید حذف شوند، لذا احتیاج به یک تحلیل آماری جهت مشخص نمودن متغیرهای تأثیرگذار وجود دارد. این تحلیل با استفاده از آزمون فرض و پارامتر p-value انجام شد. نتایج جدول ۳ حاکی از این بود که ساکارز، گلوکز، سولفات‌آمونیوم و عصاره مخمر تأثیر معنی‌داری بر تولید صمغ دارند ($p<۰/۰۵$). به همین دلیل این عوامل برای بهینه‌سازی محیط کشت به عنوان تیمارهای مستقل در طرح سطح پاسخ در نظر گرفته شدند و تأثیر این پارامترها بر میزان توده زیستی و بازدهی صمغ زانتان اندازه‌گیری شد.

جدول ۴ طرح سطح پاسخ را در ۳۰ نقطه نشان می‌دهد. به منظور سنجش مدل درجه دوم ارائه شده، آنالیز آماری ۴ متغیر مستقل و اثر متقابل آن‌ها پایش و نتایج آن در جدول ۵ گزارش شده است. پارامتر عدم برازش[1] نشان‌دهنده مناسب یا نامناسب بودن مدل است. مقادیر کوچک و معنی‌دار این پارامتر گواه این است که مدل باید کنار گذاشته شود. با توجه به این توضیحات مدل حاضر مدل محاسباتی مناسبی بود ($p>۰/۰۵$).

نتایج نشان داد که میزان ترکیبات کربنی نسبت به منابع نیتروژنی اثر بیش‌تری بر رشد توده زیستی داشته است. برای مثال زمانی که غلظت ساکارز از ۱۳/۸۸ به ۴۱/۶۳ میلی‌مول می‌رسد توده زیستی از ۲/۲۱۱۵ به ۲/۸۳ گرم بر لیتر می‌رسد. اما این شیب تغییر در میزان توده زیستی با افزایش سولفات آمونیوم از ۲/۵ به ۵ گرم بر لیتر دیده نمی‌شود. غلظت‌های بالاتر از ۵ گرم بر لیتر سولفات آمونیوم از میزان توده زیستی کاست (شکل ۱). در مجموع ساکارز و عصاره مخمر تأثیر بیش‌تری در افزایش توده زیستی نسبت به گلوکز و سولفات آمونیوم داشتند.

میزان اهمیت هر عامل از روی شاخص p آن قابل تشخیص است، هر چه این شاخص کم‌تر باشد اهمیت متغیر مورد بررسی بیش‌تر است. در مجموع همان‌طور که از جدول ۵ مشخص است، تمام عوامل شاخص p نزدیک به صفر دارند که بیانگر تأثیر بسیار زیاد این عوامل بر تولید صمغ زانتان است. با این حال طبق اثر متقابل ساکارز و سولفات آمونیوم همان‌طور که مشخص است میزان p نزدیک به ۰/۰۵ دارد که بیانگر اثر بیش‌تر گلوکز و عصاره مخمر بر تولید صمغ است. هم‌چنین نتایج حاکی از این است که منابع کربنی، منابع مهم‌تری در افزایش تولید زانتان نسبت به منابع نیتروژنی هستند (شکل ۲ و جدول ۵). بنابراین نتایج نشان می‌دهد منابع کربنی علاوه بر رشد سلولی مشوق تولید پلی‌ساکاریدها توسط باکتری نیز هست.

محاسبه ضریب همبستگی مدل محاسباتی (R^2(adj) برای صمغ زانتان ۰/۹۲ بود. به طور معمول ضریب همبستگی ۶۰ درصد بیانگر انطباق داده‌ها و خط محاسباتی رگرسیون است. بنابراین میزان R^2 نتایج به دست آمده

جدول ۳- آنالیز داده‌های تعیین عوامل مؤثر بر تولید صمغ زانتان

منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	فاکتور F	P
مدل	۱۷۹/۲	۷	۲۵/۶۰	۲۶/۵۷	۰/۰۰۰۱*
گلوکز	۰/۰۱	۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۰۱*
ساکارز	۴۸/۳۴	۱	۴۸/۳۴	۵۰/۱۷	۰/۰۰۰۱*
عصاره‌ی مخمر	۱۱/۲۷	۱	۱۱/۲۷	۱۱/۷۰	۰/۰۰۹۱*
سولفات آمونیوم	۳۹/۶۰	۱	۳۹/۶۰	۴۱/۱۰	۰/۰۰۰۲*
سولفات منیزیم	۲۲/۲۱	۱	۲۲/۲۱	۲۳/۰۵	۰/۳۱۱۴
پتاسیم‌هیدورژن فسفات	۴۷/۲۳	۱	۴۷/۲۳	۴۹/۰۳	۰/۹۳۹۰
کلرید سدیم	۱۰/۵۵	۱	۱۰/۵۵	۱۰/۹۵	۰/۰۲۰۷
باقی‌مانده	۷/۷۱	۸	۰/۹۶		
مجموع	۱۸۶/۹	۱۵			

* به معنی معنی‌دار بودن متغیر است.

[1] Lack of Fit

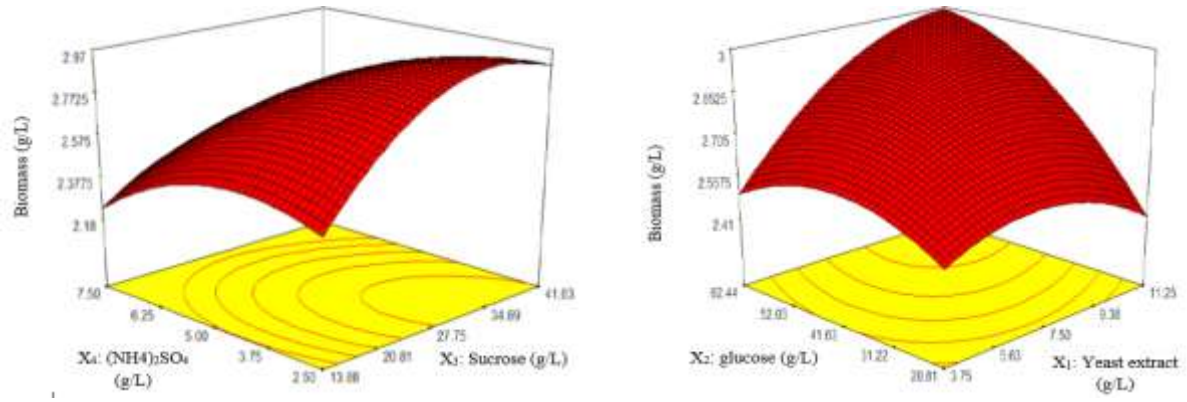
جدول ٤- طرح مرکب مرکزی و پاسخ متغیرهای وابسته برای استخراج صمغ زانتان از باکتری زانتاموناس کمپستریس

شماره آزمایش	عصاره مخمر (g/L)	گلوکز (g/L)	ساکارز (g/L)	سولفات‌آمونیوم (g/L)	صمغ زانتان (g/L)	میزان بیومس (g/L)
۱	۷/۵۰	۴۱/۶۲۵	۲۷/۷۵	۱۰/۰۰	۹/۸۹	۱/۵۶
۲	۱۱/۲۵	۲۰/۸۱۲۵	۴۱/۶۲۵	۷/۵۰	۱۰/۴۷	۱/۵۸
۳	۱۱/۲۵	۲۰/۸۱۲۵	۴۱/۶۲۵	۲/۵۰	۱۰/۲۲	۲/۲۱
۴	۷/۵۰	۴۱/۶۲۵	۲۷/۷۵	۵/۰۰	۱۱/۳۸	۲/۹۵
۵	۷/۵۰	۴۱/۶۲۵	۲۷/۷۵	۵/۰۰	۱۱/۴۶	۲/۹۱
۶	۰	۴۱/۶۲۵	۲۷/۷۵	۵/۰۰	۱۰/۵۷	۲/۳۳
۷	۷/۵۰	۴۱/۶۲۵	۰	۵/۰۰	۱۰/۲۳	۱/۶۸
۸	۳/۷۵	۲۰/۸۱۲۵	۴۱/۶۲۵	۷/۵۰	۱۰/۴۵	۲/۳۲
۹	۳/۷۵	۲۰/۸۱۲۵	۱۳/۸۷۵	۷/۵۰	۱۰/۱۸	۱/۶۵
۱۰	۱۱/۲۵	۶۲/۴۳۷۵	۴۱/۶۲۵	۷/۵۰	۱۰/۸۷	۲/۱۹
۱۱	۳/۷۵	۶۲/۴۳۷۵	۱۳/۸۷۵	۲/۵۰	۱۰/۲۳	۲/۱۸
۱۲	۳/۷۵	۶۲/۴۳۷۵	۴۱/۶۲۵	۷/۵۰	۱۰/۴۱	۱/۸۵
۱۳	۷/۵۰	۴۱/۶۲۵	۲۷/۷۵	۵/۰۰	۱۲/۰۲	۳/۰۱
۱۴	۱۱/۲۵	۶۲/۴۳۷۵	۱۳/۸۷۵	۷/۵۰	۱۱/۰۶	۲/۶۵
۱۵	۱۱/۲۵	۶۲/۴۳۷۵	۱۳/۸۷۵	۲/۵۰	۱۰/۸۴	۲/۸۹
۱۶	۷/۵۰	۴۱/۶۲۵	۵۵/۵۰	۵/۰۰	۱۰/۴۵	۲/۱۱
۱۷	۷/۵۰	۸۳/۲۵	۲۷/۷۵	۵/۰۰	۱۰/۸۹	۲/۵۱
۱۸	۷/۵۰	۰	۲۷/۷۵	۵/۰۰	۱۰/۳۷	۲/۲۱
۱۹	۳/۷۵	۶۲/۴۳۷۵	۴۱/۶۲۵	۲/۵۰	۱۱/۰۲	۲/۷۳
۲۰	۳/۷۵	۲۰/۸۱۲۵	۴۱/۶۲۵	۲/۵۰	۱۰/۸۹	۲/۵۸
۲۱	۱۵/۰۰	۴۱/۶۲۵	۲۷/۷۵	۵/۰۰	۱۰/۷۷	۲/۴۱
۲۲	۳/۷۵	۲۰/۸۱۲۵	۱۳/۸۷۵	۲/۵۰	۱۰/۱۱	۱/۶۵
۲۳	۱۱/۲۵	۲۰/۸۱۲۵	۱۳/۸۷۵	۷/۵۰	۱۰/۷۵	۲/۲۵
۲۴	۱۱/۲۵	۲۰/۸۱۲۵	۱۳/۸۷۵	۲/۵۰	۱۰/۱۳	۲/۰۲
۲۵	۷/۵۰	۴۱/۶۲۵	۲۷/۷۵	۵/۰۰	۱۱/۴۵	۲/۸۶
۲۶	۷/۵۰	۴۱/۶۲۵	۲۷/۷۵	۵/۰۰	۱۱/۷۳	۳/۰۷
۲۷	۱۱/۲۵	۶۲/۴۳۷۵	۴۱/۶۲۵	۲/۵۰	۱۱/۹۱	۲/۷۱
۲۸	۳/۷۵	۶۲/۴۳۷۵	۱۳/۸۷۵	۷/۵۰	۹/۵۹	۱/۵۶
۲۹	۷/۵۰	۴۱/۶۲۵	۲۷/۷۵	۰	۱۰/۶۳	۲/۸۱
۳۰	۷/۵۰	۴۱/۶۲۵	۲۷/۷۵	۵/۰۰	۱۲/۱۱	۲/۹۸

نشانگر مطابقت عالی مدل‌های محاسباتی با نقاط آزمایش شده و دقت بالای مدل است. هم‌چنین رگرسیون بین بازده زانتان و وزن سلولی (R^2(adj)) برابر ۰/۷۲۵ داشت، که میزان همبستگی نسبتاً مناسبی است. داده‌های جدول ۴ نیز حاکی از این است که لزوماً توده سلولی بالاتر به‌منزله میزان صمغ بالاتر نیست. نرم‌افزار نقطه بهینه ترکیبات گلوکز، ساکارز، عصاره مخمر و سولفات آمونیوم به ترتیب ۴۱/۶۳، ۳۰/۷۵، ۸/۱ و ۴/۱ گرم/لیتر برای توده سلولی و ۵۳/۷۵، ۲۷/۸، ۷/۸ و ۵/۶ گرم/لیتر برای زانتان بود که در این نقطه میزان تولید زانتان ۱۲/۴۳ گرم برآورد شد. این نقطه بهینه مورد آزمون تجربی قرار گرفت و در عمل میزان صمغ تولیدی در این نقطه ۰/۴۴±۱۲/۲۶ گرم/لیتر بود که به میزان برآورد شده توسط مدل بسیار نزدیک بود.

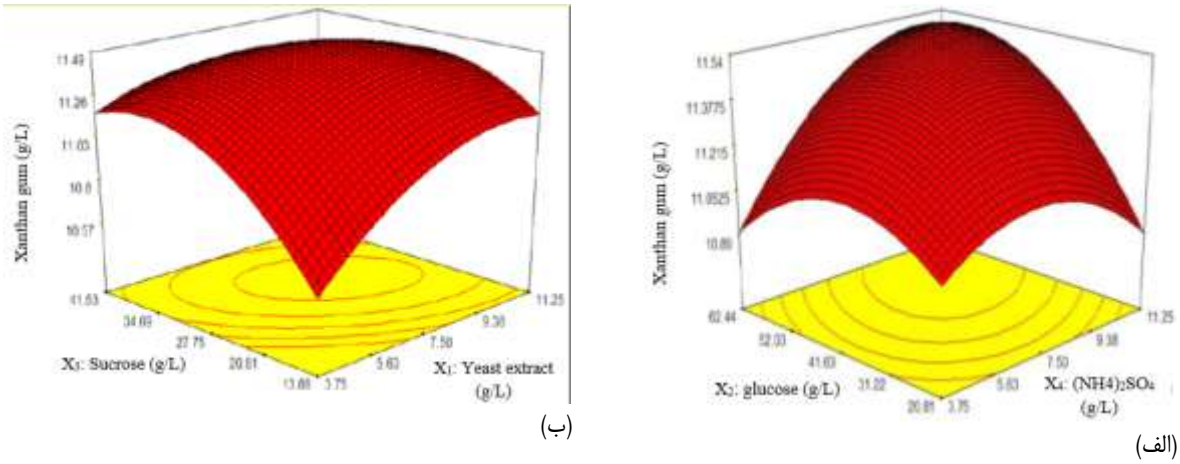
جدول ۵- جدول آنالیز داده‌های تأثیر گلوکز، ساکارز، سولفات آمونیوم و مخمر بر تولید زانتان

منابع تغییر	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار p Probe>F
مدل	۷/۵۷	۱۳	۰/۵۸	۲۴/۱۶	<۰/۰۰۰۱**
عصاره‌ی مخمر (X_1)	۰/۳۸	۱	۰/۳۸	۱۵/۸۶	۰/۰۰۱۱**
گلوکز (X_2)	۰/۳۸	۱	۰/۳۸	۱۵/۸۶	۰/۰۰۱۱**
ساکارز (X_3)	۰/۳۸	۱	۰/۳۸	۱۵/۸۶	۰/۰۰۱۱**
سولفات آمونیوم (X_4)	۰/۲۲	۱	۰/۲۲	۹/۰۶	۰/۰۰۸۳*
X_1X_2	۰/۴۷	۱	۰/۴۷	۱۹/۳۲	۰/۰۰۰۵**
X_1X_3	۰/۴۷	۱	۰/۴۷	۱۹/۳۲	۰/۰۰۰۵**
X_1X_4	۰/۳۷	۱	۰/۳۷	۱۵/۳۱	۰/۰۰۱۲**
X_2X_4	۰/۲۰	۱	۰/۲۰	۸/۴۹	۰/۰۱۰۱*
X_3X_4	۰/۱۱	۱	۰/۱۱	۴/۷۲	۰/۰۴۵۱*
X_1^2	۰/۹۸	۱	۰/۹۸	۴۰/۶۶	<۰/۰۰۰۱**
X_2^2	۱/۰۹	۱	۱/۰۹	۴۵/۰۸	<۰/۰۰۰۱**
X_3^2	۲/۰۲	۱	۲/۰۲	۸۳/۸۹	<۰/۰۰۰۱**
X_4^2	۲/۳۳	۱	۲/۳۳	۹۶/۷۰	<۰/۰۰۰۱**
باقی‌مانده	۰/۳۹	۱۶	۰/۰۲		
عدم برازش	۰/۳۴	۱۱	۰/۰۳	۳/۱۸	ns۰/۱۰۶۱
خطای خالص	۰/۰۵	۵	۰/۰۱		
Cor total	۷/۹۶	۲۹			



(الف) (ب)

شکل ۱- تأثیر الف) عصاره مخمر و گلوکز ب) ساکارز و سولفات آمونیوم بر توده زیستی باکتری



(الف) (ب)

شکل ۲- تأثیر الف) عصاره سولفات آمونیوم و گلوکز ب) ساکارز و عصاره مخمر بر تولید زانتان

بحث

در تولید فرآورده‌های زیستی، هزینه سوبسترا سهم زیادی از قیمت تمام شده محصول را تشکیل می‌دهد، بنابراین بهینه‌سازی محیط کشت محصول حائز اهمیت است. به همین دلیل در آزمون اولیه و طرح فاکتوریل جزئی تمام مواد مغذی محیط کشت که قبلاً به عنوان عوامل کلیدی در پژوهش‌های مختلف عنوان شده بودند (منابع کربنی، نیتروژن، فسفات، منیزیوم و نمک) مورد بررسی قرار گرفتند. در این میان منابع فسفات، منیزیوم و نمک تأثیر معنی‌داری را بر روند تولید زانتان نشان ندادند. اما در برخی پژوهش‌ها فسفات در میان منابع تعیین‌کننده اصلی عنوان شده است که غلظت‌های بالاتر آن می‌تواند راندمان تولید را بالا ببرد. فسفات عامل بافری برای جلوگیری از نوسانات pH است، به همین دلیل برخی محققین غلظت آن را بر تولید زانتان مؤثر دانسته‌اند (Mesomo *et al.*, 2009). اما در اینجا در غلظت ۱ تا ۳ در مقایسه با منابع کربنی و نیتروژنی تأثیر معنی‌داری بر روند تولید نداشت و در غربالگری از میان مؤلفه‌ها حذف شد. محققین بیان داشته‌اند که غلظت‌های بالای فسفات می‌تواند محتوی پیروات صمغ زانتان را کاهش و ترکیب زانتان را تغییر و در برخی موارد باعث کاهش تولید صمغ شود (Umashankar *et al.*, 1996; Davidson, 1978). با این حال Kalogiannis و همکاران (۲۰۰۳) افزودن فسفات هیدروژن پتاسیم را دارای تأثیر معنی‌دار در افزایش بازدهی زانتان دانستند و میزان بهینه آن را ۴ گرم/لیتر بیان کردند. نیک‌نژاد و همکاران (۲۰۱۵) نیز فسفات را در مقابل منابع کربنی در تولید زانتان از زانتاموناس کمسپتریس فاقد اثر معنی‌دار عنوان کردند اما اثر متقابل فسفات و منابع کربنی در تولید زانتان توسط باکتری زانتاموناس پلارگونی معنی‌دار بود و میزان بهینه فسفات هیدروژن پتاسیم را ۱۴/۸ گرم/لیتر عنوان کردند (Niknezhad *et al.*, 2015). بنابراین سایر متغیرهای واکنش از جمله نوع و شرایط تخمیر، نوع باکتری و نوع و مقدار سایر ترکیبات محیط کشت می‌تواند یکی از دلایل نتایج متفاوت محققین باشد.

منیزیوم یک کوفاکتور برای بسیاری از آنزیم‌هاست و در دیواره سلولی باکتری نقش مهمی دارد. به همین دلیل El Enshasy و همکاران (۲۰۱۳) عامل منیزیم و فسفات را جز متغیرهای مستقل اصلی عنوان کردند و بهینه‌سازی غلظت منیزیم را بر بازدهی زانتان مؤثر دانستند. این پژوهشگران عنوان کردند زمانی که غلظت منیزیوم از ۱ گرم به ۲ گرم افزایش می‌یابد بازدهی زانتان به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. این محققین با بهینه‌سازی غلظت سولفات منیزیوم، ساکارز، نیترات آمونیوم و فسفات بعد از ۱۲۰ ساعت تخمیر در شرایط صنعتی، بازده زانتان را به ۲۸ گرم بر لیتر رساندند. در این پژوهش غلظت ۱ و ۳ سولفات منیزیوم، تفاوت معنی‌داری را در بازده زانتان ایجاد نکرد. در نتیجه تأثیر منیزیوم در غربال‌گری به عنوان متغیر اصلی انتخاب نشد. با این حال نتایج نیک‌نژاد و همکاران (۲۰۱۵) نیز در راستای نتایج به دست آمده در این پژوهش بود و غلظت منیزیم را فاقد اثر معنی‌داری بر بازدهی صمغ زانتان اعلام کردند.

نتایج حاکی از این بود که ترکیبات قندی و نیتروژنی هر دو تأثیر بسیار معنی‌داری بر تولید زانتان دارند. با این حال بررسی‌های دقیق‌تر تأثیر بیش‌تری را برای منابع قندی در نظر گرفت. نیک‌نژاد و همکاران (۱۳۹۲) زمانی که از نشاسته هیدرولیز شده به عنوان منبع کربن استفاده کردند، نیز غلظت کربن را مهم‌ترین عامل در بازدهی صمغ زانتان بیان کردند. علت تأثیر بالای غلظت منبع کربن بر تولید زانتان از باکتری زانتاموناس، وابستگی بالای این باکتری به منابع کربنی برای رشد و تولید زانتان عنوان شده است (Funahashi *et al.*, 1987). Funahashi و همکاران (۱۹۸۷) گلوکز را در تولید زانتان مهم‌ترین فاکتور دانسته و غلظت ۴۰-۳۰ گرم در هر کیلوگرم براث را بهینه‌ترین مقدار قند عنوان کرده‌اند. اما در این پژوهش حالت بهینه استفاده از گلوکز برای تولید زانتان ۵۳/۶ گرم بر لیتر به دست آمد.

محققین نوع، غلظت و نسبت بین کربن و نیتروژن را سه فاکتور مهم در تولید زانتان دانسته‌اند. هر چه نسبت کربن به نیتروژن بیش‌تر باشد، تولید زانتان ترغیب می‌شود (Leela & Sharma, 2000; El Enshasy *et al.*, 2013). در این پژوهش عامل نیتروژن تأثیر بسیار معنی‌داری بر تولید توده سلولی و زانتان داشت. با این حال برخی محققین عنوان کردند، تولید زانتان و توده سلولی در غلظت بالای ۵ گرم/لیتر نیترات آمونیوم متوقف می‌شود. در این پژوهش نیز غلظت بالای نیترات از شدت رشد توده سلولی کاست اما بهترین مقدار سولفات آمونیوم برای تولید

زانتان بیش از ۵ گرم بود. نیک‌نژاد و همکاران سه منبع فسفات، منیزیوم و کربن را مهم‌تر از نیتروژن دانستند. در مجموع عموماً کربن را منبع مهم‌تری نسبت به نیتروژن در تولید زانتان می‌دانند (نیک‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۲؛ Salah *et al*., 2010; Gilani *et al*., 2011). علت این اختلاف نظر را می‌توان تنوع در نوع سوبسترا و شرایط تخمیر دانست. در بین دو منبع نیتروژنی عصاره مخمر منبع بهتری برای نیتروژن بود، که این نتایج با یافته‌های سایر محققین هم‌خوانی داشت (Palaniraj & Jayaraman, 2011; Murugesan *et al*., 2012).

طبق مطالعات بین رشد سلولی و تولید زانتان هم‌بستگی حدود ۷۵٪ برآورد شد. به این معنی که لزوماً تولید بالای بیومس به معنی افزایش تولید زانتان نیست. این نتایج با سایر محققین نیز هم‌خوانی داشت، برای مثال El Enshasy و همکاران (۲۰۱۳) حداکثر تولید توده سلولی را در ۸۰ گرم ساکارز و بیش‌ترین سطح بیوپلیمر را در غلظت حدود ۶۰ گرم ساکارز به دست آوردند.

De Vuyst and Vermeire (۱۹۹۴) نیز بیش‌ترین سطح بیوپلیمر در غلظت ۲۰ تا ۵۰ ساکارز است. در این پژوهش نیز سطح بهینه ساکارز برای توده سلولی و زانتان در همین دامنه قرار دارد و این میزان برای تولید بیومس بیش‌تر از تولید زانتان بود.

تولید زانتان در شرایط بهینه پژوهش ۱۲/۴۳ گرم/لیتر برآورد و در عمل ۱۲/۲۶ گرم/لیتر بود. در پژوهش‌های دیگر در شرایط بهینه و در بازه‌های زمانی بین ۳۶ ساعت تا ۱۲۸ ساعت بازده ۶ تا ۲۸ گرم ثبت شده است، در این بازدهی علاوه بر سوبسترا عواملی چون نوع سویه باکتری، نوع و شرایط تخمیر و به ویژه زمان نقش مهمی دارد (نیک‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۲؛ El Enshasy *et al*., 2013; Gilani *et al*., 2011; Kalogiannis *et al*., 2003; Mesomo *et al*., 2009; Moshaf *et al*., 2014; Niknezhad *et al*., 2015; Papagianni *et al*., 2001; Psomas *et al*., 2007).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه ترکیب محیط کشت تولید بیولوژیک صمغ زانتان توسط باکتری زانتامونس کمپستریس با شیوه طرح فاکتوریل جزئی و سطح پاسخ بهینه شد. این شیوه ابزاری قدرتمند برای بهینه‌سازی محیط کشت این صمغ بود. نتایج آزمایشگاهی به روشنی نشان داد صمغ زانتان تولید شده توسط باکتری به شدت به غلظت منابع کربنی و نیتروژنی وابسته است. غلظت‌های بهینه ترکیبات نیتروژنی و قندی توانست میزان تولید صمغ را بیش از ۳۳ درصد افزایش دهد و به بالای ۱۲ گرم/لیتر در محیط بهینه برساند. ضریب همبستگی مدل محاسباتی در این پژوهش بیش از ۹۰ درصد با نقاط آزمایش شده مطابقت داشت که حاکی از دقت بالای مدل بود. بنابراین به نظر می‌رسد نتایج این پژوهش بتواند افزایش سطح تولید و صرفه اقتصادی بیش‌تر را در ابعاد صنعتی برای تولید صمغ زانتان به همراه داشته باشد.

منابع

نیک‌نژاد، و.، اسدالهی، م. ع.، بی‌ریا، د. و زمانی، ا. (۱۳۹۲). بهینه‌سازی تولید میکروبی صمغ زانتان توسط زانتاموناس کمپستریس با استفاده از نشاسته هیدرولیز شده. مجله زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها، سال دوم، شماره ۵، صفحات ۱۰-۱.

Amid, B. T. & Mirhosseini, H. (2012). Optimisation of aqueous extraction of gum from durian (Durio zibethinus) seed: A potential, low cost source of hydrocolloid. Food Chemistry, 132**,** 1258-1268.

Anderson, M. J. & Whitcomb, P. J. (2005). RSM simplified: optimizing processes using response surface methods for design of experiments, Productivity Press.

Cacik, F., Dondo, R. G. & Marqués, D. (2001). Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. Computers & Chemical Engineering, 25**,** 409-418.

Davidson, I. (1978). Production of polysaccharide by Xanthomonas campestris in El Enshasy, H., Then, C., Othman, N., Al Homosany, H., Sabry, M., Sarmidi, M. R. & Aziz, R. (2013). Enhanced xanthan production process in shake flasks and pilot scale bioreactors using industrial semidefined medium. African Journal of Biotechnology, 10**,** 1029-1038.

Esgalhado, M. E., Roseiro, J. C. & Collaço, M. A. (1995). Interactive effects of pH and temperature on cell growth and polymer production by Xanthomonas campestris. Process Biochemistry, 30**,** 667-671.

Funahashi, H., Yoshida, T. & Taguchi, H. (1987). Effect of glucose concentrations on xanthan gum production by xanthomonas campestris. Journal of fermentation technology,

65, 603-606.

Gilani, S., Heydarzadeh, H., Mokhtarian, N., Alemian, A. & Kolaei, M. (2011). Effect of preparation conditions on xanthan gum production and rheological behavior using cheese whey by Xanthomonas campestris. *Aust. J. Basic Appl Sci*, 5, 855-9.

Kalogiannis, S., Iakovidou, G., Liakopoulou-Kyriakides, M., Kyriakidis, D. A. & Skaracis, G. N. (2003). Optimization of xanthan gum production by Xanthomonas campestris grown in molasses. *Process Biochemistry*, 39, 249-256.

Leela, J. K. & Sharma, G. (2000). Studies on xanthan production from Xanthomonas campestris. Bioprocess Engineering, 23, 687-689.

Li, C., Bai, J., Cai, Z. & Ouyang, F. (2002). Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by Lactococcus lactis using response surface methodology. Journal of Biotechnology, 93, 27-34.

Mesomo, M., Silva, M. F., Boni, G., Padilha, F. F., Mazutti, M., Mossi, A., De Oliveira, D., Cansian, R. L., DI Luccio, M. & Treichel, H. (2009). Xanthan gum produced by Xanthomonas campestris from cheese whey: production optimisation and rheological characterisation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 89, 2440-2445.

Moreira, A., Vendruscolo, J., Gil-Turnes, C. & Vendruscolo, C. (2001). Screening among 18 novel strains of Xanthomonas campestris pv pruni. Food hydrocolloids, 15, 469-474.

Moshaf, S., Hamidi-Esfahani, Z. & Azizi, M. (2011). Optimization of conditions for xanthan gum production from waste date in submerged fermantation. World Acad Sci Eng Technol, 57, 521-524.

Moshaf, S., Hamidi-Esfahani, Z. & Azizi, M. (2014). Statistical Optimization of Xanthan Gum Production and Influence of Airflow Rates in Lab-scale Fermentor. Applied Food Biotechnology, 1, 17-24.

Murugesan, A., Dhevahi, B., Gowdhaman, D., BALA, A. & SATHESH, P. (2012). Production of xanthan employing Xanthomonas campestris using sugarcane molasses. Am J Environ Eng, 2, 31-34.

Niknezhad, S. V., Asadollahi, M. A., Zamani, A., Biria, D. & Doostmohammadi, M. (2015). Optimization of xanthan gum production using cheese whey and response surface methodology. Food Science and Biotechnology, 24, 453-460.

Palaniraj, A. & Jayaraman, V. (2011). Production, recovery and applications of xanthan gum by Xanthomonas campestris. Journal of Food Engineering, 106, 1-12.

Papagianni, M., Psomas, S., Batsilas, L., Paras, S., Kyriakidis, D. & Liakopoulou-Kyriakides, M. (2001). Xanthan production by Xanthomonas campestris in batch cultures. Process Biochemistry, 37, 73-80.

Psomas, S., Liakopoulou-Kyriakides, M. & Kyriakidis, D. (2007). Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal, 35, 273-280.

Salah, R. B., Chaari, K., Besbes, S., Ktari, N., Blecker, C., Deroanne, C. & Attia, H. (2010). Optimisation of xanthan gum production by palm date (Phoenix dactylifera L.) juice by-products using response surface methodology. Food Chemistry, 121, 627-633.

Umashankar, H., Annadurai, G., Chellapandian, M. & Krishnan, M. (1996). Influence of nutrients on cell growth and xanthan production by Xanthomonas campestris. Bioprocess Engineering, 14, 307-309.

Zhang, J., Dong, Y.-C., Fan, L.-L., Jiao, Z.-H. & Chen, Q.-H. (2015). Optimization of culture medium compositions for gellan gum production by a halobacterium Sphingomonas paucimobilis. Carbohydrate polymers, 115, 694-700.