سنتز، شناسایی، بهینه سازی و مدلسازی تولید صمغ کردلان از *Paenibacillus polymyxa* بوسیله روش سطح پاسخ (RSM)

سید مهدی رفیق[a*]، منوچهر وثوقی[b]، علی وزیری[c]، علی اکبر سیف کردی[c]، مهدی ارجمند[d]

[a] *دانش آموخته دکتری گروه مهندسی شیمی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*
[b] *استاد گروه مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران*
[c] *استاد گروه مهندسی شیمی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*
[d] *استادیار گروه مهندسی شیمی، واحد تهران جنوب، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۳/۲۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۴/۱۶

چکیده

مقدمه: صمغ کردلان یک بیوپلیمر پلی ساکاریدی باکتریایی است که از پیوند های β-(۱←۳) دی گلیکوزیدی حاصل می شود. بعلت توانایی دلمه‌ای شدن و نگهداری آب، کردلان در تولید مواد غذایی متعدد نظیر انواع ژله‌ها، نودل‌ها و فیبرهای خوراکی کاربرد دارد. همچنین کردلان زیست تخریب پذیر، غیرسمی، دارای خواص بیولوژیکی و کاربردهای وسیعی در صنایع دارویی است. در این تحقیق برای اولین بار تولید، بهینه سازی ترکیبات محیط کشت ناپیوسته، مدل سازی تولید صمغ کردلان بوسیله سویه *Paenibacillus polymyxa* PTCC 1020 با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) و تعیین خصوصیات کردلان انجام شد.

مواد و روش‌ها: پس از آماده سازی میکروارگانیزم و محیط کشت، ابتدا از طرح Plackett–Burman و تعداد ۱۲ آزمایش بمنظور یافتن عوامل مغذی موثر از میان ۱۱ متغیر محیط کشت ناپیوسته برای تولید کردلان استفاده شد. سپس با استفاده از روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی، ۲۰ آزمایش برای بهینه سازی متغیرهای موثراستفاده شد. همچنین ۴ روش FT-IR، XRD، ^{13}C NMR و DSC برای شناسایی کردلان بکار گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ۳ عامل مغذی بترتیب گلوکز، عصاره مخمر، تریتون x−۱۰۰ در محیط کشت تولید کردلان موثر هستند. حداکثر تولید کردلان ۴/۷۵ g/l از شرایط بهینه گلوکز(۱۰۰ g/l)، عصاره مخمر(۲/۵ g/l)، تریتون x− ۱۰۰(۳ g/l) بدست آمد. همچنین در این تحقیق، وزن مولکولی صمغ کردلان $۱/۷ \times ۱۰^{۶}$ Da با استفاده از GPC تعیین شد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل بیانگر این بود که سویه مورد مطالعه در این تحقیق توانایی تولید صمغ کردلان را با نرخ رشد ویژه (μ) بیشتر نسبت به تحقیقات گذشته دارد. همچنین صحت تولید صمغ کردلان با استفاده از روش های شناسایی تایید شد.

واژه‌های کلیدی: *بهینه سازی، روش سطح پاسخ (RSM)، صمغ کردلان، Paenibacillus polymyxa*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: Rafigh@engineer.com

مقدمه

صمغ کردلان[1] یک بیوپلیمر پلی ساکاریدی، باکتریایی خارج سلولی، خنثی، خطی بدون شاخه و بطور کامل شامل پیوندهای β-(۱←۳) دی گلیکوزیدی می‌باشد (Lee, 2005). نامگذاری کردلان بعلت توانایی دلمه[2] شدن آن هنگامی است که در معرض گرما قرار می‌گیرد (Harada, 1977). همین خاصیت باعث می‌شود که کردلان را بعنوان ماده‌ای ژله‌ای مناسب برای بهبود کیفیت بافت‌ها، قدرت نگهداری آب و پایداری حرارتی محصولات تجاری متعدد در نظر گرفت (Jezequel, 1998). کردلان دارای پتانسیل استفاده در تولید محصولات غذایی همانند انواع ژله‌ها، نودل‌ها، فیبرهای خوراکی، غذاهای یخزده و اخیراً محصولات کاهش دهنده کالری می‌باشد (Funami & Nishinari, 2007; Zhang & Nishinari, 2009; Funami *et al*., 1998; Wang *et al*., 2010).

کردلان زیست تخریب پذیر، خوراکی و غیر سمی برای محیط زیست و انسان‌ها است و ظرفیت روز افزونی در صنایع داروسازی بدلیل وجود پتانسیل فعالیت‌های بیولوژیکی منحصر بفرد دارد (Spicer *et al*., 1999; Zhang & Edgar, 2014; Lee, 2005). صمغ کردلان و مشتقات آن بعنوان حامل های دارورسانی برای رهایش هدفمند مواد دارویی و همچنین پایه حمایتی برای تثبیت آنزیم‌ها کاربرد دارند (Takeda-Hirokawa *et al*., 1997; Kim *et al*., 2000; Saudagar & Singhal, 2004; Renn, 1997). مشتقات هیدروکسی اتیل کردلان بعنوان ابزاری کمکی در دارورسانی پروتئینی نیز کاربرد دارند (Renn, 1997). سولفات کردلان و مشتقات آن خاصیت بالای ضد سندروم نقص ایمنی اکتسابی (AIDS) با حداقل تاثیرات جانبی را دارا می‌باشند (Aoki *et al*., 1991; Jagodzinski *et al*., 1994; Takeda-Hirokawa *et al*., 1997; Jeon *et al*., 1997; Gao *et al*., 1999). همچنین، سولفات کردلان دارای تاثیرات بازدارندگی قوی ضدلختگی خون می‌باشد و می‌توان آن را در درمان بیماری ترومبوزیس[3] بکار برد (Alban & Franz, 2000). وجود این خواص متعدد باعث می شود تا صمغ کردلان بعنوان یک ماده جذاب برای صنایع غذایی و دارویی قرار گیرد.

مطالعات گذشته بطور عمده به تولید کردلان و بهینه‌سازی شرایط کشت تخمیری با استفاده از باکتری‌های گونه‌های *Agrobacterium* و *Alcaligenes* بوده است (Kim *et al*., 2003; Lee *et al*., Kim *et al*., 2000; 1999a; *Lee et al*., 1999b; Wu *et al*., 2008; West & Nemmers, 2008; Jin *et al*., 2008; Xia, 2013). اخیراً نیز سویه های *Pseudomonas sp.* و *Bacillus sp.* SNC 107 نیز برای تولید کردلان بکار گرفته شده‌اند (Gummadi & Kumar, 2005; Cui & Qiu, 2012).

همچنین، مدل‌های پیش بینی کننده بعنوان یک ابزار آگاهی بخش برای مطالعه سریع و کم هزینه رشد میکروبی، توسعه محصولات میکروبی، ارزیابی میزان خطر و سایر اهداف علمی متعدد در علم بیوتکنولوژی پذیرفته شده اند (Khoramnia *et al*., 2011).

روش سطح پاسخ[4] (RSM) یک تکنیک برای طراحی آزمایشات بمنظور ایجاد مدلی ریاضی پیش بینی کننده است که توانایی ارزیابی میزان تاثیر تعدادی عامل (متغیرهای مستقل) را بر روی یک پاسخ مطلوب (متغیر وابسته) را دارد (Hamsaveni *et al*., 2001). در حقیقت RSM، تکنیکی آماری است که از اطلاعات کمی حاصل از تعداد مناسبی آزمایش، بطور همزمان برای تعیین و همچنین تحلیل معادلات چند پارامتری برای رسیدن به شرایط بهینه استفاده می‌کند (Daramola *et al*., 2007; Kalil *et al*., 2000). روش سطح پاسخ یک تکنیک مناسب و مرسوم برای بهینه‌سازی اجزاء محیط کشت و دیگر متغیر های تاثیر گذار برای تولید بیومولکول ها و بیوپلیمرهایی از قبیل: صمغ کردلان، صمغ زانتان، صمغ گلان، صمغ ولان، پولالان، سلولز میکروبی، دکستران، لوان و اسیدهای آلی همچون اسید سیتریک واسید سوکسینیک می‌باشد (Banik *et* Psomas *et al*., 2007; Panesar *et al*., 2012; Ben Salah *et al*., 2010; Sim & Kamaruddin, 2008; Chen *et al*., 2012; Naessens *et al*., 2004; Bajaj *et al*., 2006; Kalil *et al*., 2000; Cui & Qiu, 2012).

Paenibacillus polymyxa یک باکتری گرم مثبت، هوازی و ندرتاً غیر هوازی، میله‌ای شکل و ایجاد کننده اسپور است که معمولاً در خاک و اندام ریشه گیاهان یافت می‌شود (Timmusk *et al*., 1999; Ash *et al*., 1991). این گونه در سال های اخیر تبدیل به یک میکروارگانیزم

[1] Curdlan Gum [2] Curdle [3] Thrombosis [4] Response Surface Methodology

بیولوژیکی مهم شده است و در سال ۲۰۰۲ میلادی بعنوان یکی از مهم‌ترین میکروارگانیزم‌ها بوسیله آژانس حمایتی محیط (EPA) معرفی شده است (Bent *et al*., 2002).

به منظور اینکه صمغ کردلان در رقابت با سایر پلی ساکاریدهای تجاری باقی بماند، لزوم افزایش جذابیت‌های اقتصادی در میزان راندمان تولید و کاهش هزینه‌های تولید آن ضروری بنظر می‌رسد. هدف از این تحقیق، برای اولین بار مطالعه امکان تولید، ارزیابی خصوصیات محصول پلیمر نهایی، بهینه‌سازی محیط کشت و ارائه مدلی با استفاده از روش سطح پاسخ برای تولید کردلان از گونه *Paenibacillus polymyxa* PTCC 1020 است.

مواد و روش ها

همه ترکیبات و مواد شیمیایی استفاده شده در این تحقیق با درجه آزمایشگاهی از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) خریداری شده است.

- آماده سازی محیط های کشت و پیش کشت:

محیط پیش کشت شامل مواد زیر (گرم بر لیتر) است: ۲۰: گلوکز، ۵: عصاره مخمر، ۵:Peptone، ۱: KH_2PO_4 ، ۰/۵: $MgSO_4{\cdot}7H_2O$. محیط کشت تخمیر نیز شامل مواد زیر (گرم بر لیتر) است: ۵۰: گلوکز بعنوان منبع کربن، ۱: عصاره مخمر بعنوان منبع نیتروژن، ۲: KH_2PO_4، ۰/۵: K_2HPO_4، ۱: $MnCl_2 . 4H_2O$ ، ۱: $FeCl_3 . 6H_2O$ ، ۱: $CaCl_2 . 2H_2O$, ۰/۵: $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ ، ۱: NaCl است. بمنظور تنظیم pH =۷ محیط ها، از اسید کلریدریک نیم نرمال و سود یک نرمال استفاده شد و سپس محیط ها را برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ $^{\circ}C$ سانتی‌گراد در فشار ۱/۵ atm داخل اتوکلاو استریل شدند.

- میکروارگانیزم

سویه *Paenibacillus polymyxa* PTCC 1020 از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران بصورت کشت لیوفیلیزه در آمپول تهیه شد. سپس این کشت باکتری را به پلیت‌های شامل محیط کشت رشد (نوترینت آگار) برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۴ $^{\circ}C$ بمنظور رشد اولیه ارگانیسم‌ها قرار گرفت و سپس این پلیت ها را در یخچال با دمای ۴ $^{\circ}C$ نگهداری شدند. این پلیت ها هر دو هفته تجدید کشت شد.

- شرایط کشت ناپیوسته

کلونی های رشد کرده بر روی پلیت ها را به اندازه ۱ cm^2 برداشته و به ارلن های ۲۵۰ cc که شامل ۵۰ cc محیط پیش کشت است، تلقیح شد. این پیش کشت را در ۳۰ $^{\circ}C$ داخل شیکر انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در ۱۲۰ rpm گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۴۰ cc از این محیط پیش کشت به یک ارلن یک لیتری شامل ۴۰۰ cc محیط کشت تخمیر تلقیح شد. این کشت در ۳۰ $^{\circ}C$ داخل شیکر انکوباتور به مدت ۹۶ ساعت در ۱۸۰ rpm گرمخانه‌گذاری شد.

- تخمین مقدار صمغ کردلان و وزن توده سلولی

راندمان تولید کردلان و توده سلولی را مطابق روش اصلاح شده از دستورالعملی که قبلاً گزارش شده، انجام شد (Lee *et al*., 1999b). در این روش، محیط کشت تخمیر را پس از همگن سازی بمدت ۱۰ دقیقه با دور g × ۱۰۰۰۰ در دمای ۵ $^{\circ}C$ سانتری فوژ شد. سپس ذرات شامل کردلان خام و سلول ها استحصال شد. کردلان را با افزودن ۱۰ cc محلول سود ۲ مولار بمدت یک ساعت بصورت محلول در آورده و سپس سلول ها بوسیله سانتری فوژ با دور g × ۱۰۰۰۰ بمدت ۱۵ دقیقه جداسازی شدند. کردلان موجود در مایع رویی با افزودن حجم مناسبی از اسید کلریدریک ۲ مولار رسوب شد. سلول ها و کردلان را ۳ بار با آب مقطر شسته و در دمای ۸۰ $^{\circ}C$ تا رسیدن به وزن ثابت نگهداری شدند. بمنظور تعیین گلوگز اضافی در محیط تخمیر، از روش دی نیترو سالسیلیک اسید استفاده شد (Miller, 1959). همچنین بمنظور اندازه‌گیری قند کل از روش فنل – اسید سولفوریک استفاده شد (Dubois *et al*., 1956).

- شناسایی صمغ کردلان

بمنظور اطمینان از صحت تولید صمغ کردلان، ۴ آزمون شناسایی (FT-IR، ^{13}C NMR، XRD و DSC) هر کدام برای کردلان خالص تولید شده در این تحقیق و نمونه کردلان تجاری سیگما تهیه شده از گونه *Alcaligenes faecalis* انجام گرفت.

- طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز[1] (FT-IR)

این آزمون بوسیله دستگاه طیف سنج (Shimadzu spectrometer 8400, Japan) با رزولوشن $4\ cm^{-1}$ در بازه $5000-4000\ cm^{-1}$ با در اختیار گرفتن دیسک‌های برومید پتاسیم (KBr) مطابق استاندارد (ASTM E1252-07) انجام شد.

- رزونانس مغناطیسی هسته‌ای کربن[2] (C-NMr)

این آزمون بوسیله دستگاه BRUKER Ultrashield 400 Mhz بر روی نمونه‌های کردلان حل شده در حلال دی متیل سولفوکسید (DMSO) انجام گرفت.

- آزمون پراش اشعه x[3] (XRD)

آزمون پراش اشعه x توسط دستگاه (Philips X'pert) انجام گرفت. برای انجام آزمون، ژنراتور تولید اشعه x در 40 kV و 40 mA تنظیم شد. ابتدا نمونه های کردلان را بصورت پودر در آمد و سپس در معرض اشعه x با طول موج (λ=۱/۱۵۴۰۵Å) قرار گرفت. تشعشعات بازتابشی از نمونه، در دمای محیط و در محدوده (2θ=۱/۵-۵۵°) جمع آوری شد و نمودار مربوط به شدت بازتابش آنها ترسیم شد.

- گرماسنج پویشی تفاضلی[4] (DSC)

بمنظور مقایسه خصوصیات حرارتی نمونه های کردلان، ۵ میلی‌گرم از هر نمونه در دمای ۶۰ °C بمدت یک ساعت خشک شدند و پس از توزین دقیق داخل pan آلومینیومی دستگاه DSC قرار گرفته و پرچ گردید. نمونه‌های در محدوده دمایی۳۰ تا ۳۰۰ °C با جریان ۲۰ میلی‌لیتر بر دقیقه و سرعت گرمایش ۱۰ °C بر دقیقه قرار داده شدند و رفتار حرارتی آنها ترسیم شد.

- کروماتوگرافی ژل تراوایی[5] (GPC)

بمنظور تعیین تعداد متوسط وزن مولکولی($\bar{M}_W$) نمونه کردلان تولید شده در این تحقیق از دستگاه - GPC Waters 2410 مجهز به دتکتور مادون قرمز بدین شرح انجام گرفت: حل کردن نمونه کردلان در حلال تتراهیدروفوران (THF) در شرایطی که نوع ذرات پرکننده ستون اولترا استایراژل بقطر $10^{6}-10^{3}$ Å؛ سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه در دمای ۳۰ °C و بصورت اتوماتیک، زمان تجزیه ۴۵ دقیقه؛ غلظت محلول‌ها ۰/۵ گرم در ۱۰۰ cc حلال و نوع استاندارد پلی استرین ($\bar{M}_W \times 10^{6}$ ۳-۲۰۰۰) بود.

- طرح پلاکت برمان[6] (PBD)

طرح PBD یک ابزار بسیار مفید بمنظور غربالگری عوامل موثر از میان N متغیر فقط بوسیله تعداد N+1 شماره آزمایش است (Plackett & Burman, 1946). این طرح در بسیاری از تحقیقات بیوتکنولوژی مورد توجه خاص محققان قرار گرفته است (Naveena *et al*., 2005; Chauhan *et al*., 2007). از نظر سیستماتیک، استفاده از این طراحی در شرایطی توصیه می شود که تعداد متغیرها بیش از ۶ باشد و محقق لازم بداند، اهمیت و ترتیب آنها را در محدوده خاصی از تغییرات بررسی کند (Elsanhoty *et al*., 2012; Plackett & Burman, 1946). مطابق جدول ۱، بر اساس طرح PBD، ۱۱ عامل مغذی (کلرید کلسیم دو آبه، فسفات دی پتاسیم، عصاره مخمر، کلرید آهن، کلرید سدیم، کلرید منگنز (II)، گلوکز، فسفات منو پتاسیم، تریتون X-100، سولفات منیزیم هفت آبه و سولفات روی) هر کدام در ۲ سطح در نظر گرفته شد. بر این اساس تعداد ۱۲ آزمایش برای غربالگری شناسایی متغیرهای مستقل موثر بر راندمان تولید صمغ کردلان انجام گرفت. همه آزمایشات ۳ مرتبه انجام شد و مقدار متوسط مشاهدات در جدول۲ آورده شد.

- طرح مرکب مرکزی[7] (CCD)

در این تحقیق پس از استفاده ازPBD برای شناسایی و غربال متغیرهای موثر، از روش سطح پاسخ (RSM) با استفاده از طرح مرکب مرکزی بمنظور ارزیابی کمی و کیفی تاثیر متغیرهای مؤثر بر متغیر وابسته (راندمان تولید کردلان) استفاده شد. طرح مرکب مرکزی یکی از معروفترین روش‌های طراحی آزمایشات برای بهینه سازی و

[1] Fourier Transform Infrared Spectroscopy
[2] C - Nuclear Magnetic Resonance
[3] X-ray Diffractometry
[4] Differential Scanning Calorimeter
[5] Gel Permeation Chromatography
[6] Plackett–Burman
[7] Central Composite Design

جدول ۱ - متغیرها و سطوح آنها درطرح آزمایشات PBD

متغیر	عوامل	سطح بالا (+)	سطح پایین(−)
۱	کلرید کلسیم دو آبه	۱	۳
۲	فسفات دی پتاسیم	۱	۳
۳	عصاره مخمر	۱/۵	۲/۵
۴	کلرید آهن	۱	۳
۵	کلرید سدیم	۳	۵
۶	کلرید منگنز (II)	۱/۵	۲/۵
۷	گلوکز	۵۰	۱۰۰
۸	فسفات منو پتاسیم	۲	۴
۹	تریتون X−۱۰۰	۲	۴
۱۰	سولفات منیزیم هفت آبه	۳	۵
۱۱	سولفات روی	۱	۳

جدول ۲ – سطوح متغیر ها برای غربالگری با طرح PBD

آزمایش		۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
میزان سطح ماده مغذی	کلرید کلسیم دو آبه	−۱	۱	۱	۱	−۱	۱	−۱	−۱	۱	−۱	−۱	۱
	فسفات دی پتاسیم	−۱	۱	۱	۱	−۱	−۱	۱	−۱	−۱	۱	۱	−۱
	عصاره مخمر	۱	−۱	−۱	۱	−۱	۱	۱	−۱	۱	−۱	۱	−۱
	کلرید آهن	−۱	−۱	۱	−۱	−۱	۱	−۱	۱	۱	۱	۱	−۱
	کلرید سدیم	۱	−۱	۱	−۱	−۱	۱	۱	−۱	−۱	۱	−۱	۱
	کلرید منگنز (II)	۱	۱	۱	−۱	−۱	−۱	۱	۱	۱	−۱	−۱	−۱
	گلوکز	−۱	−۱	−۱	۱	−۱	−۱	۱	۱	۱	۱	−۱	۱
	فسفات منو پتاسیم	۱	۱	−۱	−۱	−۱	−۱	−۱	−۱	۱	۱	۱	۱
	تریتون X−۱۰۰	۱	−۱	۱	۱	−۱	−۱	−۱	۱	−۱	−۱	۱	۱
	سولفات منیزیم هفت آبه	۱	۱	−۱	۱	−۱	۱	−۱	۱	−۱	۱	−۱	−۱
	سولفات روی	−۱	۱	−۱	−۱	−۱	۱	۱	۱	−۱	−۱	۱	۱
تولید کردلان [گرم بر لیتر]		۲/۴۵	۰/۳۴	۱/۱۱	۳/۶۷	۱/۵	۱/۴۵	۲/۵۵	۲/۳۹	۲/۷۵	۲/۰۵	۲/۱۷	۲/۵۹

مدلسازی است. مزیت آن نسبت به روش‌های فاکتوریل کامل و ناقص، این است بمنظور بهینه‌سازی عوامل و تخمین سطوح پاسخ، با وجود داشتن دقت مناسب نیازمند تعداد آزمایشات کمتری است (Box & Wilson, 1992; Box & Hunter, 1957; Özer & Güçer, 2011).

طراحی آزمایشات به روش سطح پاسخ بوسیله طرح مرکب مرکزی برای ۳ متغیر وابسته موثر هرکدام در ۵ سطح کد شده (α+، ۱+، ۰، ۱− و α−) در جدول۳ آورده شده است. رابطه بین متغیرهای مستقل کد شده و مقادیر حقیقی آنها در معادله(۱) آمده است:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \qquad (۱)$$

که در این معادله؛ x_i: مقدار کد شده، X_i: مقدار حقیقی، X_0: مقدار حقیقی همان متغیر در نقطه مرکزی و ΔZ: تغییر گام در مقدار متغیر است.

داده‌های حاصل از آزمایشات با معادله(۲) که معادله برازش چند جمله ای درجه ۲ است، مطابقت داده شد:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} {X_i}^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \qquad (۲)$$

که در این معادله Y: پاسخ پیش بینی شده، β_0: عرض از مبداء، β_i: ضریب خطی، β_{ii}: ضریب درجه۲، β_{ij}: ضریب بر هم کنش (تعاملی) و X_i و X_j متغیر های مستقل هستند.

- تجزیه و تحلیل آماری

نرم افزار آماری Minitab 16 بمنظور برازش[1] داده‌های آزمایشات، ترسیم نمودارهای سطح پاسخ و آنالیز واریانس (ANOVA) پارامترهای آماری تولید صمغ کردلان استفاده شد. همچنین بمنظور ارزیابی صحت برازش و دقت پیش بینی مدل ارائه شده با روش پاسخ سطح از ۲ پارامتر آماری: ضریب تعیین[2] (R^2) و ضریب تعیین اصلاح شده[3] استفاده شد. همچنین، کلیه آزمون‌های آماری در سطح معنی $P \leq ۰/۰۵$ (احتمال ۹۵ ٪) انجام شد.

یافته ها

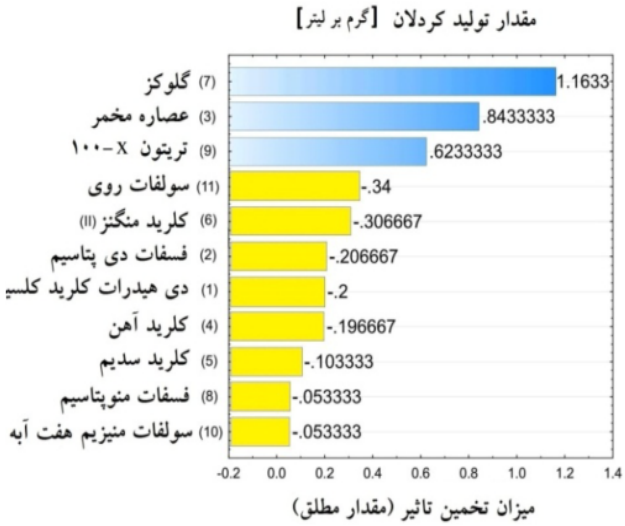
- یافته‌های حاصل از غربالگری عوامل موثر بر تولید کردلان

طرح PBD بمنظور یافتن عوامل مغذی موثر در تولید صمغ کردلان از میان ۱۱ متغیر با ۱۲ آزمایش انجام گرفت و نتایج حاصل با استفاده از Pareto Chart ارزیابی گردید و در شکل۱ آورده شد. مطابق این شکل، فقط ۳ متغیر مستقل دارای تاثیر موثر بر تولید صمغ کردلان بودند که به ترتیب میزان اهمیت؛ گلوکز، عصاره مخمر و تریتون x– ۱۰۰ می باشد.

همچنین در این تحقیق بمنظور ارزیابی نحوه تاثیر و تعامل ۳ متغیر مستقل موثر از طرح مرکب مرکزی با ۲۰ آزمایش که از این تعداد، ۶ آزمایش در نقطه مرکزی بود، استفاده شد. همه آزمایشات ۳ بار انجام گرفت و مقدار متوسط نتایج در جدول۴ گزارش شد.

جدول ۳ - متغیرها و سطوح آنها برای طرح مرکب مرکزی

متغیر [گرم بر لیتر]	سطح کد شده متغیر				
	$-\alpha$	−۱	۰	+۱	$+\alpha$
X_3: عصاره مخمر	۴/۱۸	۳/۵	۲/۵	۱/۵	۰/۸۲
X_7: گلوکز	۱۴۲/۰۴	۱۲۵	۱۰۰	۷۵	۵۷/۹۶
X_9: تریتون ۱۰۰–x	۴/۶۸	۴	۳	۲	۱/۳۲



شکل۱- بررسی میزان تاثیر ۱۱ متغیر مستقل بر راندمان تولید صمغ کردلان

جدول ٤ - مقادیر تولید صمغ کردلان (تجربی - پیش بینی شده) و وزن توده سلولی حاصل از طرح مر کب مرکزی

آزمایش	متغیر های مستقل در سطوح کد شده			وزن توده سلولی	مقدار تولید کردلان [گرم بر لیتر]	
	X_3: عصاره مخمر	X_7: گلوکز	X_9: تریتون ۱۰۰–x		مقدار تجربی	مقدار پیش بینی
۱	۰	۰	۰	۷/۱۱	۴/۳۹	۴/۳۷۹
۲	−۱	۱	−۱	۶/۹۰	۳/۱۳	۲/۵۵۵
۳	۰	۰	۰	۷/۲۰	۴/۲۸	۴/۳۷۹
۴	۰	۰	−۱/۶۸	۵/۵۰	۲/۰۱	۲/۱۶۶
۵	−۱	۱	۱	۶/۲۰	۱/۹۵	۱/۹۷۶
۶	۰	۰	۰	۷/۳۱	۴/۴۵	۴/۳۷۹
۷	۰	۰	۰	۷/۱۰	۴/۷۵	۴/۳۷۹
۸	۰	۰	۰	۷/۰۷	۴/۶۷	۴/۳۷۹
۹	۱	−۱	−۱	۶/۲۰	۱/۲۳	۰/۹۷۷
۱۰	۰	۰	۱/۶۸	۶/۵۰	۱/۸	۱/۹۶۵
۱۱	۱	−۱	۱	۶/۶۰	۰/۹۷	۱/۳۱۷

[1] Regression [2] Determination Coefficient [3] Adjusted Determination Coefficient

ادامه جدول ٤

آزمایش	متغیر های مستقل در سطوح کد شده			وزن توده سلولی	مقدار تولید کردلان [گرم بر لیتر]	
	X_3: عصاره مخمر	X_7: گلوکز	X_9: تریتون ۱۰۰-x		مقدار تجربی	مقدار پیش بینی
۱۲	۱	۱	-۱	۶	۳/۸۳	۴/۰۳۱
۱۳	۱/۶۸	۰	۰	۶/۵۰	۱/۸۶	۲/۱۲۴
۱۴	-۱/۶۸	۰	۰	۵/۹۰	۲/۸۹	۳/۲۰۶
۱۵	-۱	-۱	۱	۵/۸۰	۴/۲۵	۴/۰۸۰
۱۶	۱	۱	۱	۷/۱۰	۱/۵	۱/۳۱۱
۱۷	-۱	-۱	-۱	۴/۸۰	۱/۳۸	۱/۶۰۰
۱۸	۰	۱/۶۸	۰	۶/۵۰	۲/۴	۲/۷۳۹
۱۹	۰	-۱/۶۸	۰	۴/۱۰	۱/۷	۱/۹۴۱
۲۰	۰	۰	۰	۷/۱۵	۴/۳۱	۴/۳۷۹

- گزینش مدل مناسب برای برازش داده ها با روش سطح پاسخ:

بمنظور تعیین مدل تجربی برای پیش بینی پاسخ (تولید کردلان)، معادلات چند جمله‌ای شامل خطی، دو فاکتوریلی (تعاملی)، درجه ۲ و درجه ۳ بر داده‌های بدست آمده از روش سطح پاسخ برازش شدند. سپس این مدل‌ها مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. لازم بذکر است که از نظر آماری مدلی مناسب است که آزمون ضعف برازش[1] آن معنی دار نبوده و دارای بالاترین مقدار R^2 و R^2 اصلاح شده باشد.

همانطور که در جدول۵ مشاهده می شود، آزمون ضعف برازش مربوط به مدل چند جمله‌ای درجه ۲ برازش یافته بر داده‌های پاسخ سطح، معنی دار نیست که بیانگر برازش موفق داده‌ها می‌باشد. همچنین با توجه به مقادیر R^2 و R^2 اصلاح شده که بترتیب ۰/۹۷ و ۰/۹۴ می‌باشند، مدل چند جمله‌ای درجه ۲ انتخاب شد. با بکارگیری روش سطح پاسخ، معادله (۳) که نشان دهنده ی ارتباط تجربی میان مقدار تولید کردلان و ۳ متغیر مستقل موثر (بر اساس مقادیر حقیقی) بدست آمد.

$$\text{صمغ کردلان [g/l]} = ۴/۴۶ - ۰/۳۶\ x_3 + ۰/۲۸\ x_7 - ۰/۰۹۲\ x_9 - ۰/۴۶\ x_3 x_7 - ۰/۵۳\ x_3 x_9 - ۰/۷۶\ x_7 x_9 - ۰/۶۸\ x_3^2 - ۰/۷۹\ x_7^2 - ۰/۸۴\ x_9^2 \quad (۳)$$

راندمان تولید کردلان حاصل از آزمایشات تجربی و پیش‌بینی شده از طریق روش سطح پاسخ در جدول۴ آورده شده است. مشاهدات این جدول، بیانگر همبستگی بسیار خوب بین نتایج بدست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش بینی شده با روش آماری است. همچنین از این مدل برای ارزیابی میزان تاثیرات خطی، تعاملی و درجه ۲ متغیر های مستقل بر متغیر وابسته استفاده شد.

جدول ۵- آنالیز آماری برای انتخاب مدل برازش شده بر داده های آزمایشات

نوع مدل	انحراف معیار	ضریب تعیین (R^2)	R^2 اصلاح شده	ارزش P برای ضعف برازش
خطی	۱/۴۰	۰/۰۶	-۰/۰۹	۰/۰۰۰۱ >
۲ فاکتوریل	۱/۳۲	۰/۳۴	۰/۰۳۲	۰/۰۰۰۱ >
درجه ۲	۰/۳۳	۰/۹۷	۰/۹۴	۰/۰۵۶۷
درجه ۳	۰/۲۹	۰/۹۵	۰/۹۵	۰/۰۳۳۸

- شناسایی و تعیین خواص صمغ کردلان:

طیف های حاصل از آزمون FT-IR برای نمونه کردلان تولید شده در این تحقیق و نمونه تجاری، نظیر یکدیگر بودند. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، طیف FT-IR نشان دهنده پیک‌های جذبی: در ناحیه $۳۴۲۸/۸۸\ cm^{-1}$ مربوط به حضور گروه (–OH)، گروه (–CH2–) در ناحیه $۲۹۱۵/۵۰\ cm^{-1}$ و گروه (C=O) در ناحیه $۱۱۳۹/۵۲\ cm^{-1}$ می‌باشد. حضور پیک در ناحیه $۸۸۵/۷۷\ cm^{-1}$، حاکی از وجود شکل فضایی[2] β می‌باشد و همچنین بعلت اینکه هیچ پیک جذبی در ناحیه $۸۴۰\ cm^{-1}$ مشاهده نشده است بنابراین حالت فضایی α در محصول پلیمری تایید نمی‌گردد. طیف مشابه در این تحقیق برای کردلان قبلاً

[1] Lack of fit

[2] Configuration

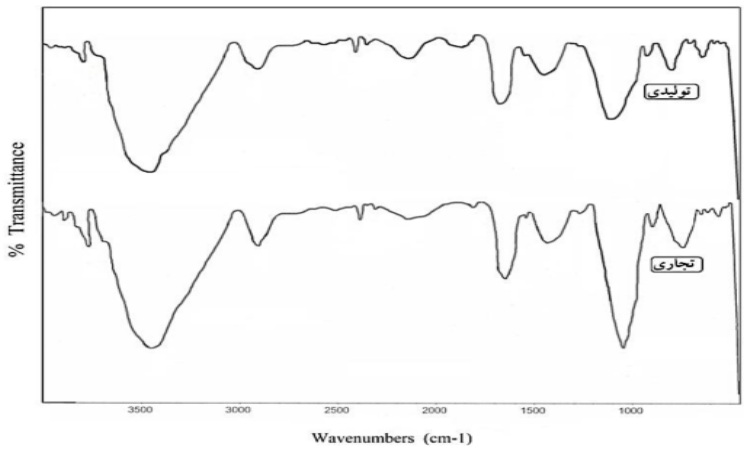
گزارش شده است (Zhang *et al*., 2001).

مطابق شکل ۳، طیف ^{13}C NMR برای نمونه‌های کردلان تولید شده و نمونه تجاری، دارای جهش‌های شیمیایی برابر می‌باشد. طیف ^{13}C NMR دارای ۶ رزونانس اصلی در ۱۰۳/۷۸، ۷۴/۱۲، ۷۸/۳۲، ۶۸/۸۸، ۷۶/۹۲ و ۶۰/۹۱ ppm است که بترتیب مربوط به C-۱، C-۲، C-۳، C-۴، C-۵ و C-۶ می باشد و تایید کننده ساختمان β-(۱←۳) دی گلوکان در صمغ کردلان تولید شده در این تحقیق است. لازم بذکر است که طیف ^{13}C NMR مشابه در این تحقیق برای کردلان قبلاً گزارش شده است (Saitô *et al*., 1979; Zhang *et al*., 2001).

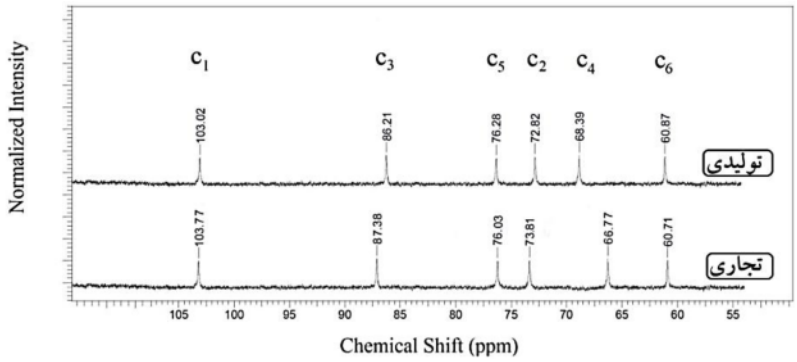
منحنی‌های پراش اشعه x (دیفراکتوگرام‌ها) که نشان دهنده فاصله بین لایه‌های کریستالی ماده مورد آنالیز می‌باشد برای نمونه‌های کردلان تولید شده و تجاری دارای الگوی مشابه است و در شکل ۴ آمده است. پیک‌های پراش در کردلان تولید شده دارای مقدار 2θ به ترتیب در زاویه‌های (°۶/۷۶، °۱۱/۳۴، °۲۱/۶۸، °۲۲/۳۵ و °۳۲/۸) می‌باشند.

مطابق شکل۵، مشاهده می شود که منحنی های ترموگرام (گرمانگاشت) حاصل از آنالیز حرارتی کالریمتری (DSC) برای نمونه‌های کردلان تولیدی و تجاری دارای رویه‌ای مشابه یکدیگرند. ترموگرام DSC برای کردلان تولید شده در این تحقیق دارای ۲ ناپایداری حرارتی گرماگیر در °۷۴/۸ و °۲۵۱ بترتیب دارای مقدار آنتالپی ۱۵۷/۱۷ و J/g ۸۷/۸۸ می باشد.

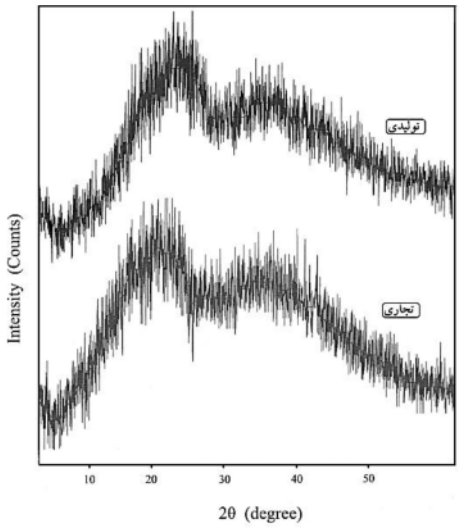
در این تحقیق، تعداد متوسط وزن مولکولی نمونه کردلان تولید شده از *Paenibacillus polymyxa* با استفاده از کروماتوگرافی ژل تراوایی Da $۱۰^{۶} \times ۱/۷$ تعیین شد. در تحقیقات گذشته، وزن کردلان $۱۰^{۴} \times ۵/۳$ تا Da $۱۰^{۶} \times ۲$ گزارش شده است (Jin *et al*., 2006; *Nakata et al*., 1998). اخیراً، وزن مولکولی کردلان تولید شده از سویه جهش‌یافته *Agrobacterium* sp. ATCC 31750 حدود Da $۱۰^{۵} \times ۳$ گزارش شده است (Kim *et al*., 2003).



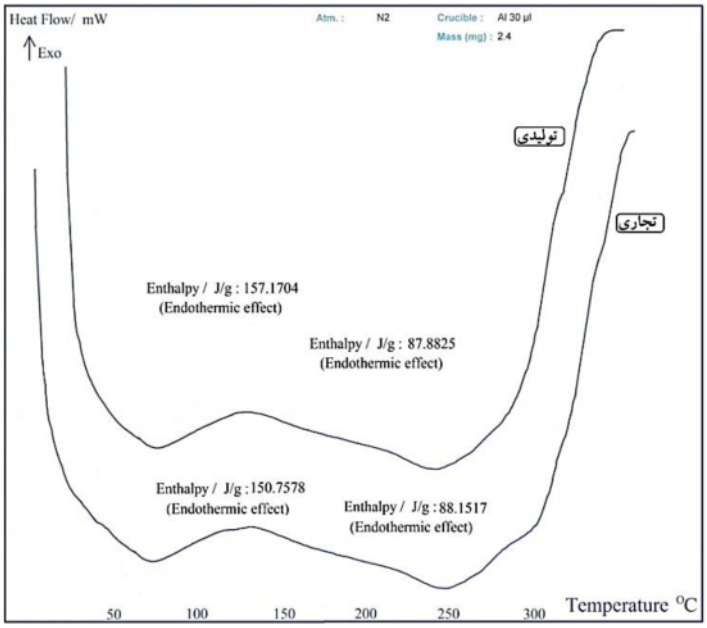
شکل۲- آزمون FT-IR نمونه کردلان



شکل۳- آزمون ^{13}C-NMR نمونه کردلان



شکل٤- آزمون XRD نمونه کردلان



شکل٥- آزمون DSC نمونه کردلان

بحث

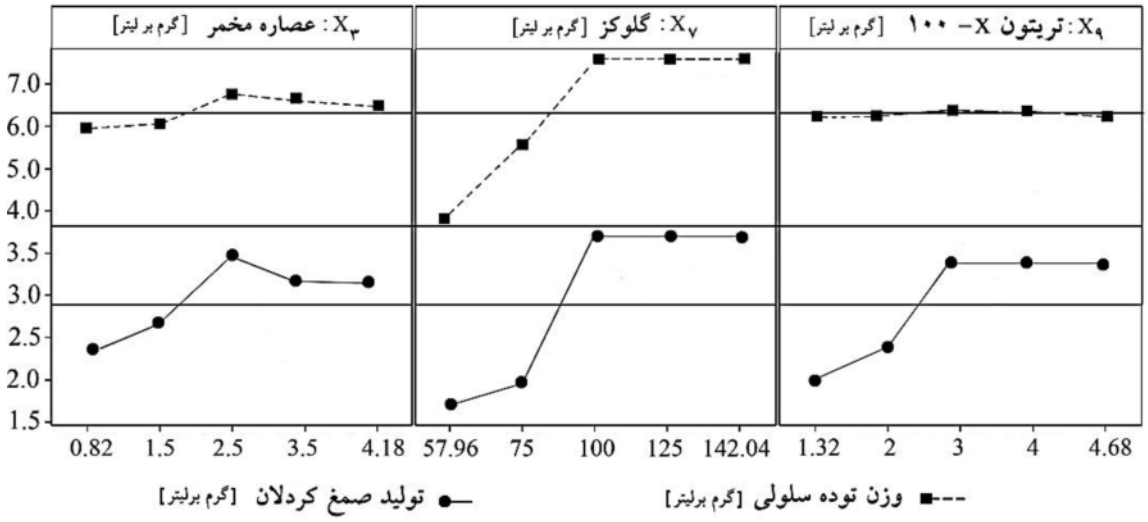
نحوه تاثیر مستقیم هر ۳ عامل مغذی (عصاره مخمر، گلوکز و تریتون x-۱۰۰) بر میزان تولید کردلان و جرم توده سلولی در شکل ۶ آورده شده است. گلوکز بعنوان منبع کربنی در محیط کشت است و همانطور که در شکل ۱ مشاهده شد، اصلی‌ترین عامل مغذی در تولید صمغ کردلان است و بعد از آن بترتیب اهمیت، عصاره مخمر و تریتون x-۱۰۰ قرار دارند. هنگامی که غلظت گلوکز از ۵۷/۹۶ تا ۷۵ g/l افزایش می‌یابد، جرم توده سلولی نیز افزایش می‌یابد که نشان دهنده شروع رشد سلولی است و در نتیجه مقدار تولید کردلان زیاد می‌شود و در ادامه، افزایش غلظت گلوکز از ۷۵ تا ۱۰۰ g/l منجر به افزایش بسیار زیاد هم در وزن توده سلولی(رشد سلول) و همچنین درتولید کردلان می‌شود. اما افزایش غلظت گلوکز بیش از ۱۰۰ g/l، تغییری در مقدار تولید کردلان حاصل نمی‌شود که بعلت ثابت بودن میزان مصرف قند گلوکز از طرف سلول و ثابت بودن رشد سلول میکروبی است. بنابراین غلظت بهینه گلوکز در محیط تخمیر تولید کردلان برابر با ۱۰۰ g/l بدست آمد.

همچنین، هنگامی که میزان غلظت عصاره مخمر بعنوان منبع نیتروژنی در محیط کشت از ۰/۸۲ تا ۲/۵ g/l

افزایش می‌یابد مقدار تولید کردلان و جرم توده سلولی نیز افزایش می‌یابد اما در ادامه، با افزایش در غلظت عصاره مخمر، مقدار تولید کردلان کاهش می‌یابد. علت این نیز توسط تعدادی از محققین اینچنین گزارش شده است که، افزودن مقدار اضافی عصاره مخمر به محیط کشت فقط در حین فاز رشد سلول می‌تواند بر تولید محصول نهایی موثر باشد که بدلیل وجود فاکتورهای رشد در عصاره مخمر است. عصاره مخمر مخلوطی شامل اسیدهای آمینه، پپتیدها، پروتئین‌ها و سرشار از ویتامین B و نمک‌های معدنی مفید است (Sharmila *et al*., 1989; Shen *et al*., 1993). همچنین افزایش زیاد غلظت عصاره مخمر (منبع نیتروژنی) سبب انتقال مقداری از کلوگز (منبع کربنی و اصلی‌ترین عامل مغذی) به خارج سلول می‌گردد (Phillips *et al*., 1983; Jiang, 2013) و در نهایت سبب کاهش تولید صمغ کردلان می‌شود. بدین ترتیب غلظت بهینه عصاره مخمر در محیط تخمیر تولید کردلان برابر با ۲/۵ g/l بدست آمد.

همچنین با افزایش تریتون x−۱۰۰ در محیط کشت از ۱/۳۲ تا ۳ g/l، مقدار تولید کردلان افزایش می یابد اما در ادامه، افزایش غلظت تریتون x−۱۰۰ در محیط تخمیر تاثیری ایجاد نمی‌کند. تریتون x− ۱۰۰یک ماده فعال سطحی خوب است که باعث افزایش نفوذپذیری غشاء دولایه لیپیدی سلول می‌شود و در حقیقت میزان تراوش کردلان را افزایش می‌دهد. همچنین وجود تریتون x−۱۰۰ در محیط کشت باعث افزایش همگن شدن براث و انتقال آسان تر مواد مغذی به سلول می‌گردد. اما با افزودن مقدار اضافی تریتون x−۱۰۰ به محیط کشت نمی‌توان کشش سطحی براث تخمیررا کاهش داد و میزان نفوذپذیری غشاء سلولی و تولید کردلان تغییر نمی‌کند. بعلاوه، جرم توده سلولی با افزایش غلظت تریتون x−۱۰۰ در محیط کشت تغییری نداشت و بیانگر این است که تریتون x−۱۰۰ بعنوان یک عامل رشد مغذی برای *Paenibacillus polymyxa* PTCC 1020 نیست و غلظت بهینه تریتون x−۱۰۰ برای تولید کردلان برابر با ۳ g/l بدست آمد.

مطابق جدول ۶ اگر چه تریتون x−۱۰۰ بر خلاف گلوکز و عصاره مخمر دارای تاثیر خطی معنی‌دار نیست اما همانطور که مشاهده می‌شود، دارای تاثیرات تعاملی معنی‌دار با گلوکز و عصاره مخمر است. بطور کلی تمامی اثرات تعاملی (عصاره مخمر−گلوکز، عصاره مخمر− تریتون x−۱۰۰ و گلوکز− تریتون x−۱۰۰) بر راندمان تولید کردلان معنی‌دار بوده است و می‌توان آنها را در شکل۷ در قالب نمودارهای سه‌بعدی پاسخ سطح[1] و نمودار کنتور[2] مشاهده کرد. همچنین تمامی اثرات درجه ۲ هر ۳ متغیر بر راندمان تولید کردلان معنی‌دار بود.



شکل٦- بررسی میزان تاثیر مستقیم متغیرهای موثر بر میزان تولید صمغ کردلان و وزن توده سلولی

[1] 3D-Response Surface Plot

[2] Contour Plot

جدول ٦ – نتایج آنالیز آماری مدل درجه ۲ برازش یافته بر داده های پاسخ

منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	متوسط مربعات	ارزش F	ارزش P احتمال > F
مدل	۳۲/۲	۹	۳/۶۹	۳۴/۴۸	۰/۰۰۰۱ >
تاثیر خطی					
X_3 – عصاره مخمر	۱/۷۷	۱	۱/۷۷	۱۶/۵۱	۰/۰۰۲۳
X_7 – گلوکز	۱/۰۳	۱	۱/۰۳	۹/۶۶	۰/۰۱۱۱
X_9 – تریتون X–۱۰۰	۰/۱۱	۱	۰/۱۱	۱/۰۷	۰/۳۲۴۳
تاثیر تعاملی					
$X_7 - X_3$	۱/۶۹	۱	۱/۶۹	۱۵/۸۲	۰/۰۰۲۶
$X_9 - X_3$	۲/۲۹	۱	۲/۲۹	۲۱/۴۰	۰/۰۰۰۹
$X_9 - X_7$	۴/۶۸	۱	۴/۶۸	۴۳/۷۶	۰/۰۰۰۱ >
تاثیر درجه ۲					
$(X_3)^2$	۶/۵۹	۱	۶/۵۹	۶۱/۶۱	۰/۰۰۰۱ >
$(X_7)^2$	۹/۰۲	۱	۹/۰۲	۸۴/۳۳	۰/۰۰۰۱ >
$(X_9)^2$	۱۰/۲۳	۱	۱۰/۲۳	۹۵/۶۱	۰/۰۰۰۱ >
باقیمانده	۱/۰۷	۱۰	۰/۱۱		
عدم برازش	۰/۸۸	۵	۰/۱۸	۴/۷۳	۰/۰۵۶۷
خطای خالص	۰/۱۹	۵	۰/۰۳۷		

ضریب تعیین(R^2)= ۰/۹۷: ضریب تعیین اصلاح شده(**Adjusted-R^2**)= ۰/۹۴

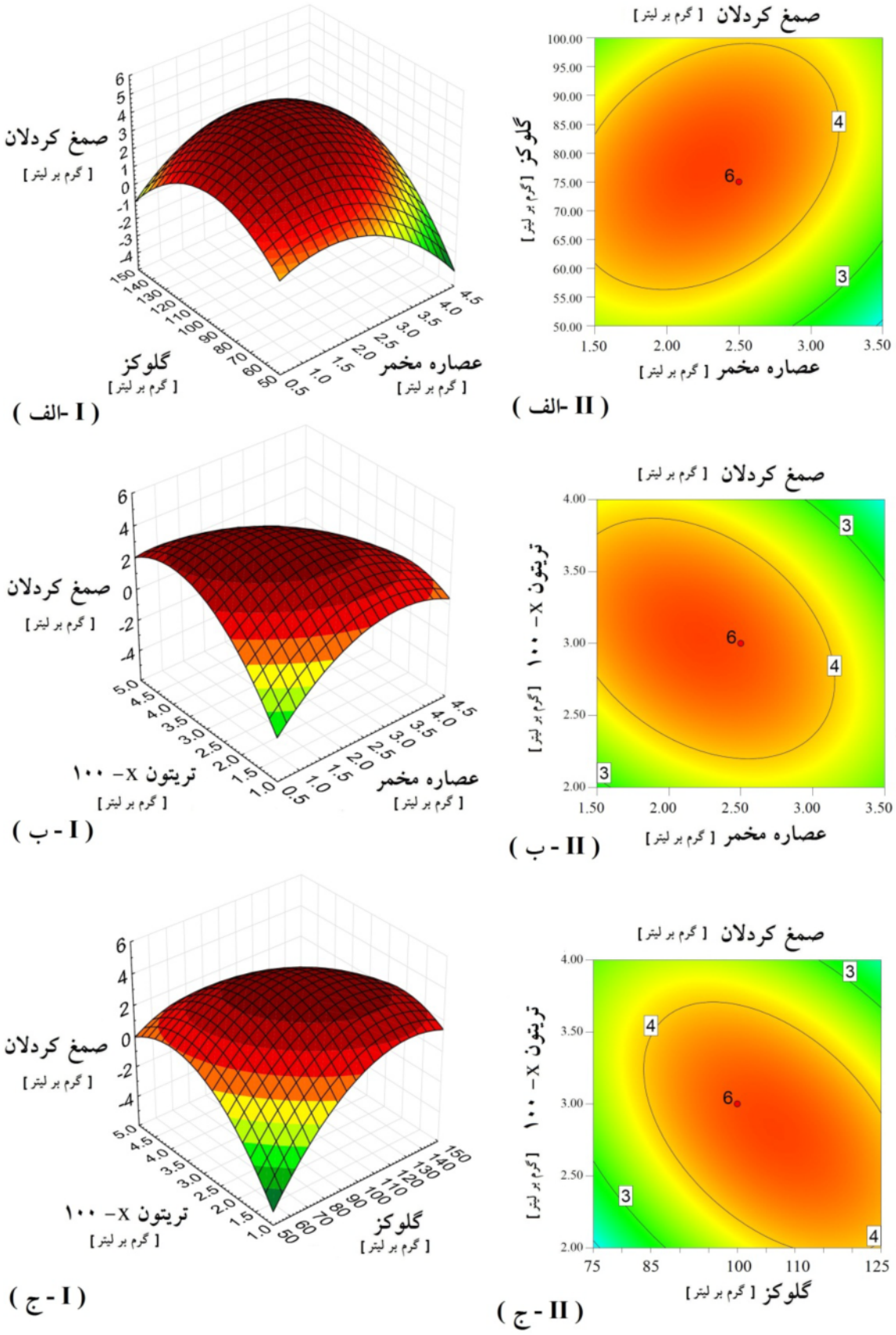
همچنین در این تحقیق، حداکثر مقدار تولید کردلان برابر با g/l ۴/۷۵ بود که از آزمایش شماره ۷ بوسیله شرایط بهینه (عصاره مخمر: g/l ۲/۵، گلوکز: g/l ۱۰۰، تریتون x–۱۰۰: g/l ۳) حاصل شده است. در تحقیقات گذشته، میزان تولید کردلان از *Agrobacterium sp.* در حدود g/l ۴، از *Bacillus sp.* SNC 107 در حدود g/l ۷ و از *Pseudomonas sp.* در حدود g/l ۲/۳۵ بوده است (Gummadi & Kumar, 2005; Cui & Qiu, 2012 ; Saudagar & Singhal, 2004).

- آنالیز کینتیک رشد میکروبی در فرآیند تولید صمغ کردلان

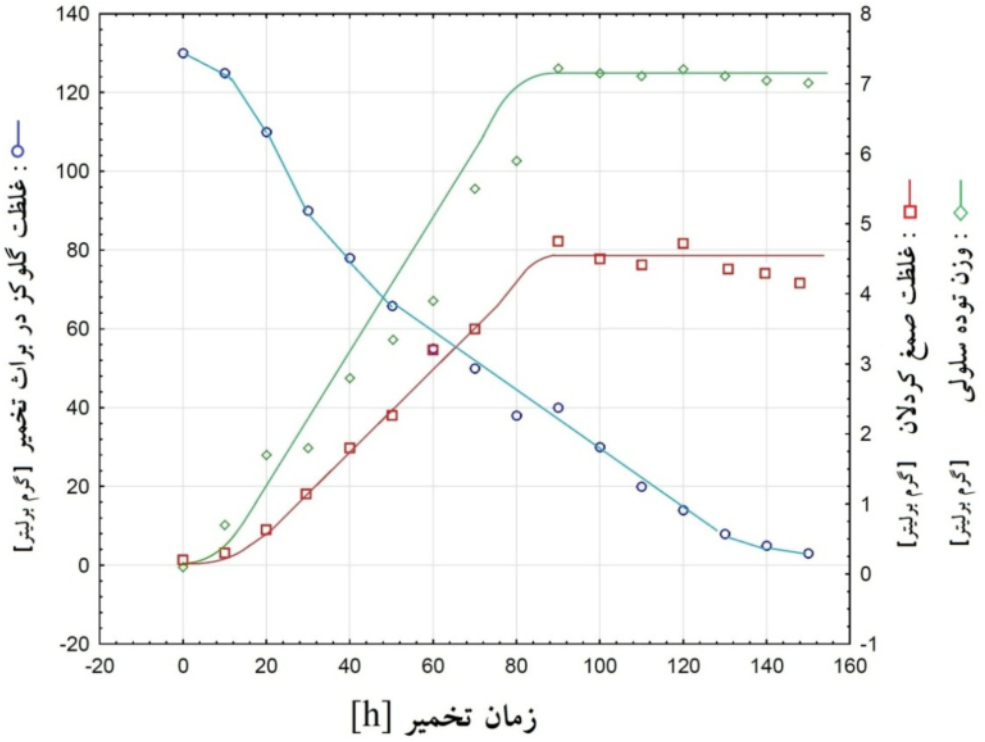
مطابق شکل۸، تشکیل صمغ کردلان بطور همزمان با شروع رشد سلولی در فرآیند تخمیر ناپیوسته تحت شرایط بهینه مشاهده می شود. میزان تولید کردلان بسرعت طی فاز نمایی[1] رشد سلول افزایش می یابد و سپس تولید صمغ کردلان به آرامی در فاز سکون رشد[2] سلول ادامه یافته و در نهایت بعد از مرگ سلول، تولید کردلان نیز کاهش می‌یابد. غلظت صمغ کردلان همچون رشد سلولی در ۹۰ ساعت به حداکثر خود رسیده و بعد از ۱۲۰ ساعت، تولید کردلان کاهش یافت. این کاهش تولید احتمالاً در نتیجه مرگ سلول *Paenibacillus polymyxa* PTCC 1020 می‌باشد. همچنین بعد از گذشت ۱۲۰ ساعت از شروع فرآیند تخمیر، غلظت مصرف گلوکز در براث بسیار کم می‌شود. در نتیجه، بنظر می‌رسد که تولید صمغ کردلان، فرآیندی وابسته به رشد[3] می‌باشد.

همچنین، تولید کردلان از *Agrobacterium sp.* با نرخ رشد ویژه (μ) برابر با h^{-1} ۰/۰۹ گزارش شده است در حالیکه در این تحقیق نرخ رشد ویژه برابر با h^{-1} ۰/۱۴ می‌باشد که نسبت به تحقیقات گذشته حدود ۱/۵ برابر بیشتر است (Ben Salah *et al.*, 2011).

[1] Exponential Phase [2] Stationary Phase [3] Growth – Associated



شکل۷- تاثیر تعاملی متغیرهای موثر گلوکز، عصاره مخمر و تریتون x-۱۰۰ با استفاده از نمودارهای سطح پاسخ سه بعدی(I) - کنتور (II)



شکل ۸- منحنی کینتیکی رشد میکروبی، تولید صمغ کردلان و غلظت گلوکز مصرف شده در براث تخمیر

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که سویه *Paenibacillus polymyxa* PTCC 1020 توانایی تولید صمغ کردلان را دارد. حداکثر مقدار تولید کردلان g/l ۴/۷۵ بود که از آزمایش بروش پاسخ سطح بوسیله شرایط بهینه (عصاره مخمر: g/l ۲/۵، گلوکز: g/l ۱۰۰، تریتون x–۱۰۰: g/l ۳) حاصل شد. در این تحقیق نرخ رشد ویژه (μ) برابر با h^{-1} ۰/۱۴ برای تولید کردلان می‌باشد که نسبت به تحقیقات گذشته حدود ۱/۵ برابر بیشتر است.

منابع

Alban, S. & Franz, G. (2000). Characterization of the Anticoagulant Actions of a Semisynthetic Curdlan Sulfate. Thrombosis Research, 99, 377-388.

Aoki, T., Kaneko, Y., Stefanski, M. S., Nguyen, T. & Ting, R. C. (1991). Curdlan sulfate and HIV-1. I. In vitro inhibitory effects of curdlan sulfate on HIV-1 infection. AIDS Research Human Retroviruses, 7, 409-15.

Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S. & Collins, M. D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus Bacillus revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. Letters in Applied Microbiology, 13, 202-206.

Bajaj, I. B., Saudagar, P. S., Singhal, R. S. & Pandey, A. (2006). Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from Sphingomonas paucimobilis ATCC 31461. Journal of Bioscience and Bioengineering, 102, 150-156.

Banik, R. M., Santhiagu, A. & Upadhyay, S. N. (2007). Optimization of nutrients for gellan gum production by Sphingomonas paucimobilis ATCC-31461 in molasses based medium using response surface methodology. Bioresource Technology, 98, 792-797.

Ben Salah, R., 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.

Ben Salah, R., Jaouadi, B., Bouaziz, A., Chaari, K., Blecker, C., Derrouane, C., Attia, H. & Besbes, S. (2011). 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, 44, 1026-1034.

Bent, E., Breuil, C., Enebak, S. & Chanway, C. (2002). Surface colonization of lodgepole pine roots by Pseudomonas fluorescens and Paenibacillus polymyxa under gnotobiotic conditions. Plant and Soil, 241, 187-196.

Box, G. E. P. & Hunter, J. S. (1957). Multi-Factor Experimental Designs for Exploring Response Surfaces. 195-241.

Box, G. E. P. & Wilson, K. B. (1992) On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. In: KOTZ, S. & JOHNSON, N. (eds.) Breakthroughs in Statistics. Springer New York.

Chauhan, K., Trivedi, U. & Patel, K. C. (2007). Statistical screening of medium components by Plackett–Burman design for lactic acid production by Lactobacillus sp. KCP01 using date juice. Bioresource Technology, 98, 98-103.

Chen, J., Wu, S. & Pan, S. (2012). Optimization of medium for pullulan production using a novel strain of Auerobasidium pullulans isolated from sea mud through response surface methodology. Carbohydrate Polymers, 87, 771-774.

Cui, J.-D. & Qiu, J. Q. (2012). Production of Extracellular Water-Insoluble Polysaccharide from Pseudomonas sp. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 4865-4871.

Daramola, M. O., Keesman, K. J. & F. Spenkelink (2007). Process Modelling of Ultrafiltration Units: An RSM Approach. Journal of Applied Sciences, 7, 3687-3695.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956) .Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry, 28, 350-356.

Elsanhoty, R. M., Al-Turki, I. A. & Ramadan, M. F. (2012). Screening of medium components by Plackett–Burman design for carotenoid production using date (Phoenix dactylifera) wastes. Industrial Crops and Products, 36, 313-320.

Funami, T. & Nishinari, K. (2007). Gelling characteristics of curdlan aqueous dispersions in the presence of salts. Food Hydrocolloids, 21, 59-65.

Funami, T., Yada, H & Nakao, Y. (1998). Curdlan Properties for Application in Fat Mimetics for Meat Products. Journal of Food Science, 63, 283-287.

Gao, Y., Katsuraya, K., Kaneko, Y., Mimura, T., Nakashima, H. & Uryu, T. (1999). Synthesis, Enzymatic Hydrolysis, and Anti-HIV Activity of AZT−Spacer−Curdlan Sulfates. Macromolecules, 32, 8319-8324.

Gummadi, S. & Kumar, K. (2005). Production of extracellular water insoluble β-1,3-glucan (curdlan) fromBacillus sp. SNC07. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 10, 546-551.

Hamsaveni, D. R., Prapulla, S. G. & Divakar, S. (2001). Response surface methodological approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate. Process Biochemistry, 36, 1103-1109.

Harada, T. (1977) Production, Properties, and Application of Curdlan. Extracellular Microbial Polysaccharides. American Chemical Socienty.

Jagodzinski, P. P., Wiaderkiewicz, R., Kurzawski, G., Kloczewiak, M., Nakashima, H., Hyjek, E., Yamamoto, N., Uryu, T., Kaneko, Y., Posner, M. R. & Et Al. (1994). Mechanism of the inhibitory effect of curdlan sulfate on HIV-1 infection in vitro. Virology, 202, 735-45.

Jeon, K.-J., Katsuraya, K., Kaneko, Y., Mimura, T. & Uryu, T. (1997). Studies on Interaction Mechanism of Sulfated Polysaccharides as an AIDS Drug by NMR. Macromolecules, 30, 1997-2001.

Jezequel, V. (1998). Curdlan: A new functional β-glucan Cereal Foods World, 43, 361-364.

Jiang, L. (2013). Effect of nitrogen source on curdlan production by Alcaligenes faecalis ATCC 31749. International Journal of Biological Macromolecules, 52, 218-22.

Jin, L.-H., Um, H.-J., Yin, C.-J., Kim, Y.-H. & Lee, J.-H. (2008). Proteomic analysis of curdlan-producing Agrobacterium sp. in response to pH downshift. Journal of Biotechnology, 138, 80-87.

Jin, Y., Zhang, H., Yin, Y. & Nishinari, K. (2006). Comparison of curdlan and its carboxymethylated derivative by means of Rheology, DSC, and AFM. Carbohydrate Research, 341, 90-99.

Kalil, S. J., Maugeri, F. & Rodrigues, M. I. (2000). Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. Process Biochemistry, 35, 539-550.

Khoramnia, A., Ebrahimpour, A., Beh, B. K. & Lai, O. M. (2011). Production of a Solvent, Detergent, and Thermotolerant Lipase by a Newly Isolated Acinetobacter sp. in Submerged and Solid-State Fermentations. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011, 12.

Kim, B., Jung, I., Kim, J., Lee, J. H., Lee, I. & Lee, K. (2000). Curdlan gels as protein drug delivery vehicles. Biotechnology Letters, 22, 1127-1130.

Kim, M. K., Ryu, K. E., Choi, W. A., Rhee, Y. H. & Lee, I. Y. (2003). Enhanced production of (1 → 3)-β-d-glucan by a mutant strain of Agrobacterium species. Biochemical Engineering Journal, 16, 163-168.

Lee, I. Y. (2005) Curdlan. Biopolymers Online. Wiley, pp. 135-141.

Lee, I. Y., Kim, M. K ,.Lee, J. H., Seo, W. T., Jung, J. K., Lee, H. W. & Park, Y. H. (1999a). Influence of agitation speed on production of curdlan by Agrobacterium species. Bioprocess Engineering, 20, 283-287.

Lee, J. H., Lee, I. Y., Kim, M. K. & Park, Y. H. (1999b). Optimal pH control of batch processes for production of curdlan by Agrobacterium species. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 23, 143-148.

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry, 31, 426-428.

Naessens, M., Vercauteren, R. & Vandamme, E. J. (2004). Three-factor response surface optimization of the production of intracellular dextran dextrinase by Gluconobacter oxydans. Process Biochemistry, 39, 1299-1304.

Nakata, M., Kawaguchi, T., Kodama, Y. & Konno, A. (1998). Characterization of curdlan in aqueous sodium hydroxide. Polymer, 39, 1475-1481.

Naveena, B. J., Altaf, M., Bhadriah, K. & Reddy, G. (2005). Selection of medium components by Plackett–Burman design for production of l(+) lactic acid by Lactobacillus amylophilus GV6 in SSF using wheat bran. Bioresource Technology, 96, 485-490.

Özer, E. T. & Güçer, Ş. (2011). Central composite design for the optimisation of Cd and Pb determination in PVC materials by atomic absorption spectrometry after Kjeldahl digestion. Polymer Testing, 30, 773-778.

Panesar, P. S., Chavan, Y., Chopra, H. K. & Kennedy, J. F. (2012). Production of microbial cellulose: Response surface methodology approach. Carbohydrate Polymers, 87, 930-934.

Phillips, K. R., Pik, J., Lawford, H. G., Lavers, B., Kligerman, A. & Lawford, G. R. (1983). Production of curdlan-type polysaccharide by Alcaligenes faecalis in batch and continuous culture.

Plackett, R. L. & Burman, J. P. (1946). The DESIGN of Optimum Multifactorial Experiments. Biometrika, 33, 305-325.

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

Renn, D. W. (1997). Purified curdlan and its hydroxyalkyl derivatives: preparation, properties and applications. Carbohydrate Polymers, 33, 219-225.

Saitô, H., Ohki, T. & Sasaki, T. (1979). A 13C-nuclear magnetic resonance study of polysaccharide gels. Molecular architecture in the gels consisting of fungal, branched (1 → 3)-β-d-glucans (lentinan and schizophyllan) as manifested by conformational changes induced by sodium hydroxide. Carbohydrate Research, 74, 227-240.

Saudagar, P. & Singhal, R. (2004). Fermentative production of curdlan. Applied Biochemistry and Biotechnology, 118, 21-31.

Sharmila, M., Ramanand, K. & Sethunathan, N. (1989). Effect of yeast extract on the degradation of organophosphorus insecticides by soil enrichment and bacterial cultures. Canadian Journal of Microbiology, 35, 1105-1110.

Shen, C., Kosaric, N. & Blaszczyk, R. (1993). Properties of anaerobic granular sludge as affected by yeast extract, cobalt and iron supplements. Applied Microbiology and Biotechnology, 39, 132-137.

Sim, J. H. & Kamaruddin, A. H. (2008). Optimization of acetic acid production from synthesis gas by chemolithotrophic bacterium – Clostridium aceticum using statistical approach. Bioresource Technology, 99, 2724-2735.

Spicer, E. J. F., Goldenthal, E. I. & Ikeda, T. (1999). A toxicological assessment of curdlan. Food and Chemical Toxicology, 37, 455-479.

Takeda-Hirokawa, N., Neoh, L.-P., Akimoto, H., Kaneko, H., Hishikawa, T., Sekigawa, I., Hashimoto, H., Hirose, S.-I., Murakami, T., Yamamoto, N., Mimura, T. &

Kaneko, Y. (1997). Role of Curdlan Sulfate in the Binding of HIV-1 gp120 to CD4 Molecules and the Production of gp120-Mediated TNF-α. Microbiology and Immunology, 41**,** 741-745.

Timmusk, S., Nicander, B., Granhall, U. & Tillberg, E. (1999). Cytokinin production by Paenibacillus polymyxa. Soil Biology and Biochemistry, 31**,** 1847-1852.

Wang, M., Chen, C., Sun, G., Wang, W. & Fang, H. (2010). Effects of curdlan on the color, syneresis, cooking qualities, and textural properties of potato starch noodles. Starch - Stärke, 62, 429-434.

West, T. P. & Nemmers, B. (2008). Curdlan production by Agrobacterium sp. ATCC 31749 on an ethanol fermentation coproduct. Journal of Basic Microbiology, 48**,** 65-68.

Wu, J., Zhan, X., Liu, H. & Zheng, Z. (2008). Enhanced Production of Curdlan by Alcaligenes faecalis by Selective Feeding with Ammonia Water during the Cell Growth Phase of Fermentation. Chinese Journal of Biotechnology, 24**,** 1035-1039.

Xia, Z. (2013). Effect of Tween 80 on the production of curdlan by Alcaligenes faecalis ATCC 317 .Carbohydrate Polymers, 98**,** 178-180.

Zhang, H. & Nishinari, K. (2009). Characterization of the conformation and comparison of shear and extensional properties of curdlan in DMSO. Food Hydrocolloids, 23**,** 1570-1578.

Zhang, L., Zhang, M., Dong, J., Guo, J., Song, Y. & Cheung, P. C. K. (2001). Chemical structure and chain conformation of the water-insoluble glucan isolated from Pleurotus tuber-regium. Biopolymers, 59**,** 457-464.

Zhang, R. & Edgar, K. J. (2014). Properties, Chemistry, and Applications of the Bioactive Polysaccharide Curdlan. Biomacromolecules, 15, 1079-1096.