تولید زیست پلیمر کردلان توسط *Agrobacterium radiobacter* در محیط کشت حاوی ضایعات انگور

آنا عبدالشاهی[۱]، مرضیه موسوی نسب[۲ و ۳]، لیلا منجذب مرودشتی[۴*]

۱. مرکز تحقیقات سلامت مواد غذایی (نمک)، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۳. گروه پژوهشی آبزیان، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

۴. دانش‌آموخته دکتری صنایع غذایی، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *leila.monjazeb@mail.um.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۱۸

چکیده

کردلان پلی ساکاریدی نامحلول در آب و گران‌قیمت است که از واحدهای β (۱←۳)D-گلوکان تشکیل‌شده است. خواص ژل ایجادشده توسط گرما باعث شده کردلان در صنایع غذایی از اهمیت بالایی برخوردار شود. یکی از اصلی‌ترین فاکتورهای محدودکننده استفاده گسترده از کردلان، هزینه تولید بالای آن است. لذا به‌کارگیری ضایعات کشاورزی راهی مناسب برای این مشکل است. در این تحقیق، تولید کردلان توسط باکتری *Agrobacterium radiobacter* PTCC 1654 در محیط کشت با غلظت‌های مختلف (۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد) شیره انگور و ساکارز به عنوان منبع کربن، مورد ارزیابی قرار گرفت. علاوه بر این، میزان کردلان و بیومس تولیدی تعیین و ترکیب قندهای پلی ساکارید به‌دست‌آمده با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی لایه‌نازک تعیین شد. تغییرات pH محیط تخمیر نیز در طول فرایند مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد بالاترین میزان تولید پلی ساکارید، در محیط تخمیر حاوی شیره انگور با بریکس ۷/۵ و پس از گذشت ۱۴۴ ساعت از شروع تخمیر به دست آمد. pH محیط تخمیر در طول فرایند تخمیر از ۷ به حدود ۵/۵ کاهش یافت. نتایج کروماتوگرافی لایه نازک پلی ساکارید تولیدی نشان داد که تنها مونومر تشکیل‌دهنده ساختار این پلیمر، گلوکز بود. نتایج همچنین نشان داد که شیره انگور در مقایسه با ساکارز خالص به شکل معنی‌داری بازدهی بالاتری در تولید کردلان داشت (p <۰/۰۵). بنابراین در این زمینه دارای مزیت نسبی بود. بر اساس یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت، ضایعات کشاورزی نظیر شیره انگور را می‌توان به‌عنوان منبع کربن فرایند تخمیر برای تولید پلیمر کردلان استفاده کرد.

واژگان کلیدی: *Agrobacterium radiobacter* PTCC 1654، زیست پلیمر، شیره انگور، کردلان.

مقدمه

انگور میوه‌ای است که در سراسر دنیا کشت می‌شود و از مهم‌ترین محصولات باغبانی محسوب می‌شود. در سال ۱۳۹۴، تولید انگور در ایران پس از سیب بیشترین سهم در تولید محصولات باغی را به خود اختصاص داده که از این نظر و با تولید بیش از ۳۰۰۰۰۰۰ تن در سال، ایران رتبه هفتم را در دارد (وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۹۴). با توجه نبود امکانات مناسب فراوری، انبارداری و انتقال ضایعات انگور به عنوان دومین محصول باغی کشور بسیار بالاست و کاهش این ضایعات اهمیت فراوانی بر اقتصاد ایران خواهد داشت (Emamifar, 2018).

یکی از روش‌های نگهداری انگور کاهش فعالیت آبی آن از طریق تغلیظ می‌باشد (Tavakolipour and Kalbasi Ashtari, 2013). شیره انگور محصول تغلیظ شده آب انگور، با درجه بریکس ۸۰-۷۰ است. ترکیبات شیمیایی شیره انگور بسیار متنوع است. این ماده غنی از قندهای طبیعی، اسیدهای آلی، مواد معدنی، آنزیم‌ها و انواع ویتامین‌ها مانند B_2، B_1، C و A است (Kaya and Belibağlı, 2002; Walzem, 2008). ترکیبات فنولی و کارتنوئیدی نیز در شیره انگور یافت می‌شود که با داشتن فعالیت ضد اکسایشی می‌تواند در سلامت افراد نقش مهمی را ایفا کند. حضور مقادیر قابل قبولی از عناصر ضروری مانند مس، آهن و

روی، این ماده را به‌عنوان گزینه مناسبی برای استفاده در محیط تخمیر میکروارگانیسم‌ها مطرح کرده است (Arslan et al., 2005; Bunea et al., 2012). در ارتباط با شیره انگور، مطالعات متعددی انجام‌شده است. توکلی پور و کلباسی (۲۰۱۳) ویژگی‌های رئولوژیکی شیره انگور را بررسی کرده و نتایج کار آن‌ها نشان داد که شیره انگور سیالی غیر نیوتونی و غلیظ شونده با برش (دایلاتانت) است (Tavakolipour and Kalbasi Ashtari, 2013). در زمینه استفاده از شیره انگور در محیط تخمیر میکروارگانیسمی مطالعات اندکی صورت گرفته است. نجاتی (۲۰۱۱) از شیره انگور برای تولید بیوپلیمر زانتان در محیط کشت باکتری *Xanthomonas campestris* استفاده کرد. و بیشترین تولید بیوپلیمر را در غلظت ۶۷/۹۷ گرم بر لیتر شیره انگور بدست آورد (Nejati, 2011). در تحقیقی دیگر شهیدی و همکاران (۲۰۱۵) از شیره انگور به عنوان منبع شیرین‌کننده در فرمولاسیون تولید کیک اسفنجی استفاده کردند و اظهار داشتند نمونه کیک با ۴۰ ٪ شیره انگور جایگزین شده با شکر، امتیاز را توسط پنلیست ها در فاکتورهای احساس دهانی، مرطوب بودن و پذیرش کلی کسب نمود(Shahidi et al., 2015). کاراکا و همکاران (۲۰۱۲)، افزودن مقادیر مختلف شیره انگور بر خواص کیفی و فیزیکی ماست را بررسی و مشاهده کردند که روشنایی محصول و میزان آب انداختگی ماست در اثر افزایش شیره انگور به ترتیب کاهش و افزایش پیدا کردند(Karaca et al., 2012). بیلگیکلی و اکبولوت (۲۰۰۹) تأثیر افزودن شیره انگور بر ویژگی‌های رئولوژیکی و فیزیکی کیک را مورد بررسی قراردادند و گزارش کردند با افزودن شیره انگور، خمیر رفتار سودوپلاستیک از خود نشان داده و حجم کیک نهایی کاهش و تیرگی محصول نیز افزایش یافت (Bilgicli and Akbulut, 2009).

β- گلوکان‌ها پلی‌ساکاریدهایی هستند که از واحدهای D-گلوکز متصل شده با پیوندهای β-گلیکوزیدیک تشکیل‌شده‌اند. β- گلوکان‌ها در منابع متفاوتی مانند غلات، قارچ‌ها و میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شوند و طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی را از خود نشان می‌دهند که شامل فعالیت‌های ضد سرطانی، ضدالتهابی، ضد پیری و ... می‌باشد (Funami and Nishinari, 2007). کردلان یک پلی ساکارید خارج سلولی میکروبی است که از واحدهای (۱←۳) β- گلوکان است. امروزه این زیست پلیمر علاقه‌مندی خاصی را در زمینه‌های مختلف به خود جلب کرده است چرا که علاوه بر تأثیر معینی که بر سلامت افراد دارد، دارای ویژگی‌های رئولوژیکی و حلالیت منحصر بفردی بوده و با داشتن ساختمان ساده، پلیمری است که برای دست‌کاری‌های مصنوعی بسیار مناسب می‌باشد. در مقایسه با سایر پلیمرها مانند کیتین و سلولز که در آب نامحلول و در محیط‌های قلیایی محلول هستند، کردلان در آب از حلالیت خوبی برخوردار است و در مقایسه با بسیاری از پلی‌ساکاریدهای طبیعی حلالیت آلی بالاتری دارد (Zhang and Edgar, 2014).

کردلان (Curdlan) یکی از پلی ساکاریدهای میکروبی است که استفاده آن در صنایع دارویی و غذایی در ایالات‌متحده توسط سازمان غذا و دارو (FDA) مجاز شناخته‌شده است. در دنیا هر سال بیش از ۱۰۰ تن کردلان تولید می‌شود و به‌عنوان یکی از گران‌ترین زیست پلیمرهاست که در زمینه‌های مختلف صنایع غذایی و دارویی و آرایشی و بهداشتی مورداستفاده قرار می‌گیرد. استفاده از این زیست پلیمر در تولید محصولات گوشتی کم‌چرب بسیار موردتوجه است (Funami and Nishinari, 2007). تاکنون گزارش‌هایی مبنی براثر پروبیوتیک این زیست پلیمر نیز گزارش‌شده است به‌طوری‌که رشد باکتری‌های *Bifidobacterium* در روده را بهبود داده و از این

طریق اثر پروبیوتیک خود را اعمال می‌کند (Shimizu et al., 2001). علاوه بر این از β- گلوکان در تولید نان بدون گلوتن بر پایه نشاسته برنج (Kittisuban et al., 2014)، محصولات لبنی با کالری و کلسترول پایین ((Sharafbafi et al., 2014)، محصولات اسنکی (Brennan et al., 2013)، کیک (Kim et al., 2005) و سایر محصولات استفاده گردیده است.

کردلان در مقایسه با سایر زیست پلیمرها از قیمت بالایی برخوردار است. یکی از عوامل مهم که قیمت این محصول تخمیری را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد، قیمت بالای منابع کربنی استفاده‌شده برای رشد میکروارگانیسم موردنظر است. بنابراین معرفی یک منبع کربن ارزان قیمت در جهت کاهش هزینه‌های تولید این ماده امری غیرقابل‌اجتناب به نظر می‌رسد. در کشور ایران به دلیل ضعف در صنایع تبدیلی، شرایط نامناسب برداشت، نگهداری و انتقال، تولید ضایعات زیاد در محصولات باغی و از جمله انگور دارد. لذا در این تحقیق برای تولید زیست پلیمر کوردلان از شیره انگور به‌عنوان جایگزین منبع کربن استفاده گردید و بازده تولید، با محیط حاوی ساکارز مقایسه گردیده است.

روش کار

تولید شیره انگور

انگور واریته ریش‌بابا سفید قصر دشت درجه ۳ از میوه‌فروشی در شهر شیراز تهیه گردید. پس از شستشو و حذف ناخالصی‌ها، آب انگور گرفته شد.آب انگور تا رسیدن به بریکس موردنظر (بریکس ۷۰) جوشانیده و درون ظروف تمیز بسته‌بندی شد. شیره انگور تولیدشده تا زمان مصرف در دمای اتاق نگهداری شدند..

ویژگی‌های شیمیایی شیره انگور

قند کل، پروتئین، خاکستر، pH، کل ماده جامد محلول (Brix) بر اساس روش AOAC و در سه تکرار اندازه‌گیری شد (۱۴).

آماده‌سازی شیره انگور

محلول شیره انگور اولیه با استفاده از آب مقطر و به کمک دستگاه همزن تا رسیدن به بریکس ۲۰ رقیق شد. سپس برای جداسازی مواد جامد نامحلول موجود، شیره انگور رقیق‌شده به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید.

میکروارگانیسم و محیط تخمیر

میکروارگانیسم مورداستفاده در این تحقیق *Agrobacterium radiobacter* PTCC 1654 بود که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. در ابتدا میکروارگانیسم را درون یونیورسال حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از محیط نوترینت براث (Nutrient broth) کشت داده شد. یونیورسال‌ها به مدت ۲۴ ساعت و دمای ۲۸ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. پس از گذشت این مدت میکروارگانیسم‌ها فعال شدند. μL ۱۰۰ از این محیط مایع را به محیط کشت جامد تریپتیکاز سوی آگار (TSA) منتقل و ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردید. درنهایت میکروارگانیسم در لوله‌های حاوی محیط کشت مورب TSA کشت داده و تا زمان استفاده در دمای ۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. محیط مایع اولیه جهت تلقیح شامل (در یک لیتر):۲۰ گرم ساکاروز، ۵ گرم عصاره مخمر، ۳ گرم پپتون، ۲ گرم عصاره گوشت گاو، ۱ گرم $(NH_4)_2HPO_4$ و ۱ گرم KH_2PO_4 در pH معادل ۷، بود. ۲ لوپ از میکروارگانیسم فعال رشد داده‌شده بر روی محیط جامد را به ۱۰۰ میلی‌لیتر از این محیط انتقال داده و درون شیکر بن‌ماری (Brunswick، G76، ساخت USA) در دمای ۲۸ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد تا زمانی که میزان جذب محیط در طول‌موج ۶۰۰nm به ۰/۶ رسید. محیط تخمیر اصلی نیز شامل: ۱/۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۲ گرم پپتون، ۰/۱ گرم عصاره گوشت گاو، ۱ گرم $(NH_4)_2HPO_4$، ۰/۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۲ گرم $FeSO_4.7H2O$، ۰/۰۲ گرم $MnSO_4$ و ۰/۰۱ گرم

$ZnSO_4$ در یک لیتر ساکارز یا شیره انگور با بریکس ۵، ۷/۵ و ۱۰ با pH=۷ بود. برای جلوگیری از واکنش‌های میلارد منابع کربنی (شیره انگور و ساکاروز) و سایر مواد به‌صورت جداگانه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حدود ۵۰ میلی‌لیتر از محیط تخمیر ریخته و پس از تلقیح (۱۰ درصد حجمی/حجمی) درون شیکر بن‌ماری (Brunswick، G76، ساخت USA) با دور ۱۶۰rpm و دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرارداده شدند. نمونه‌برداری در بازه‌های زمانی ۲۴ ساعتی انجام و وزن زیست پلیمر تولیدی، بیومس و سایر پارامترها اندازه‌گیری شدند (Karnezis et al., 2002).

جداسازی کردلان از محیط تخمیر

استخراج کردلان از محیط تخمیر بدین‌صورت بود که برای هر بار نمونه‌برداری میزان ۵۰ میلی‌لیتر از محیط تخمیر را برداشته به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. پس از دور ریختن مایع رویی، رسوب سلولی با استفاده از اسیدکلریدریک ۰/۰۱ نرمال شستشو داده شد و دوباره در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. این بار به رسوب‌ها هیدروکسید سدیم ۰/۵ مولار اضافه و به‌شدت به هم زده شد. سپس مخلوط حاصل در معرض دمای ۶۰ درجه سلسیوس نگهداری قرار گرفت. پس از گذشت ۶۰ دقیقه، سلول‌های میکروارگانیسم با استفاده از کاغذ صافی (واتمن ۱) از محیط جدا گردید و مایع حاصل با استفاده از اسیدکلریدریک ۵ نرمال خنثی و زیست پلیمر کردلان رسوب داده شد (West, 2009). رسوب حاصله با سانتریفیوژ کردن در ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شد. کردلان به‌دست‌آمده با آب مقطر سه بار شستشو داده شد. از استون ۹۹ درصد برای آبگیری بیوپلیمر تولیدی استفاده شد. نمونه‌ها به‌وسیله خشک‌کن انجمادی (SPEEDIVAC، ساخت انگلستان) خشک و با مش ۲۷۰-۱۲۰ آسیاب و بسته‌بندی شدند.

آنالیز ساختاری کردلان توسط کروماتوگرافی لایه‌نازک (TLC)

به‌منظور شناسایی و تأیید تولید زیست پلیمر کردلان آزمون کروماتوگرافی انجام شد. در ابتدا محلول ۳ درصد (حجمی/حجمی) کردلان توسط اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت هیدرولیز شد. از این نمونه‌های هیدرولیز شده جهت آزمون کروماتوگرافی استفاده شد. گلوکز، فروکتوز و ساکارز نیز به‌صورت محلول‌های ۳ درصد و به‌عنوان نمونه‌های شاهد مورداستفاده قرار گرفتند. در ابتدا نمونه‌های آماده‌شده بر روی صفحاتی از جنس سیلیکاژل لکه‌گذاری شدند. صفحات در تانک حلال حاوی محلول ۱ به ۴ ایزوپروپیل الکل و آب قرارداده شدند. صفحات بعد از رسیدن جبهه حلال به ارتفاع ۳ سانتی‌متری از بالای آن، از تانک خارج و سپس خشک شدند. در پایان نیز از محلول شناساگر نیترات نقره ۱ درصد در آب و محلول ۰/۵ مولار تیوسولفات سدیم برای شناسایی محل لکه‌ها استفاده شد (Broderick et al., 2006).

تجزیه‌وتحلیل آماری

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از طرح فاکتوریل انجام شد. کلیه آزمون‌ها حداقل در سه تکرار انجام شد. نتایج به‌صورت مقادیر میانگین و انحراف معیار استاندارد بیان‌شده‌اند. آنالیز واریانس برای بررسی معنی‌داری اختلافات در سطح $p < ۰/۰۵$ بکار گرفته شد و به‌منظور تعیین اختلافات بین میانگین اعداد، پس از آنالیز واریانس از آزمون دانکن استفاده گردید. تمام مراحل تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SAS (ورژن ۹/۴) صورت گرفت و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار EXCEL استفاده شد.

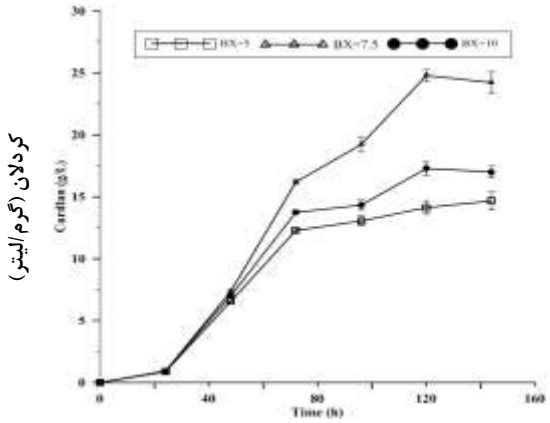
نتایج

ویژگی‌های شیمیایی شیره انگور

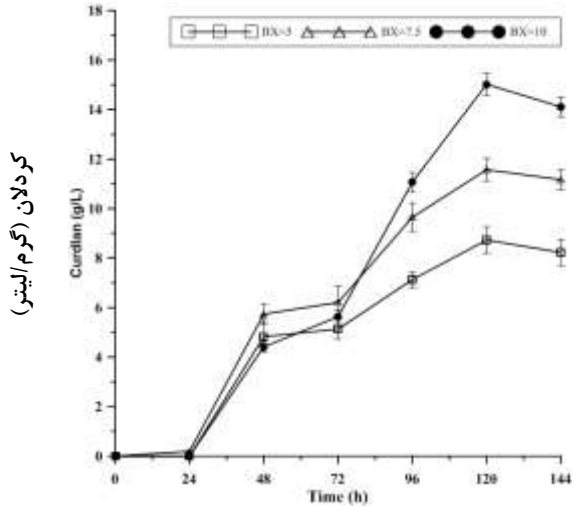
آنالیز شیمیایی شیره انگور تولیدشده در این پژوهش انجام شد که بر این اساس ترکیبات شیمیایی شیره انگور شامل ۸۸/۴۱ درصد کل قند احیا، ۲/۷۹ درصد پروتئین، ۲/۳۶ درصد خاکستر، ۸۱/۵ بریکس و pH ۵/۶۲ بود.

میزان تولید زیست پلیمر کردلان

در این پژوهش سینتیک رشد باکتری *Agrobacterium radiobacter* PTCC 1654و تولید زیست پلیمر کردلان در یک سیستم ناپیوسته آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که قبلاً اشاره شد محیط‌های تخمیر استفاده‌شده در این تحقیق منبع کربن بریکس‌های متفاوتی داشتند. منابع کربن مورداستفاده قند ساکارز و شیره انگور بودند. میزان زیست پلیمر کردلان تولیدی محیط‌های تخمیر در طول زمان در شکل ۱ نشان داده‌شده است. با توجه به نتایج بدست آمده بیشترین تولید زیست پلیمر در بریکس ۷/۵ شیره انگور با گذشت ۱۳۲ ساعت از تخمیر به دست آمد. در بازه‌های زمانی بالاتر از ۱۳۲ ساعت، بازده کردلان تولیدشده به‌صورت معنی‌داری کاهش پیدا کرد ($p < ۰/۰۵$). افت بیشتر pH و درواقع اسیدی شدن محیط با گذشت زمان از تخمیر و در پی آن کاهش رشد باکتری‌ها، می‌تواند از دلایل آن باشند.

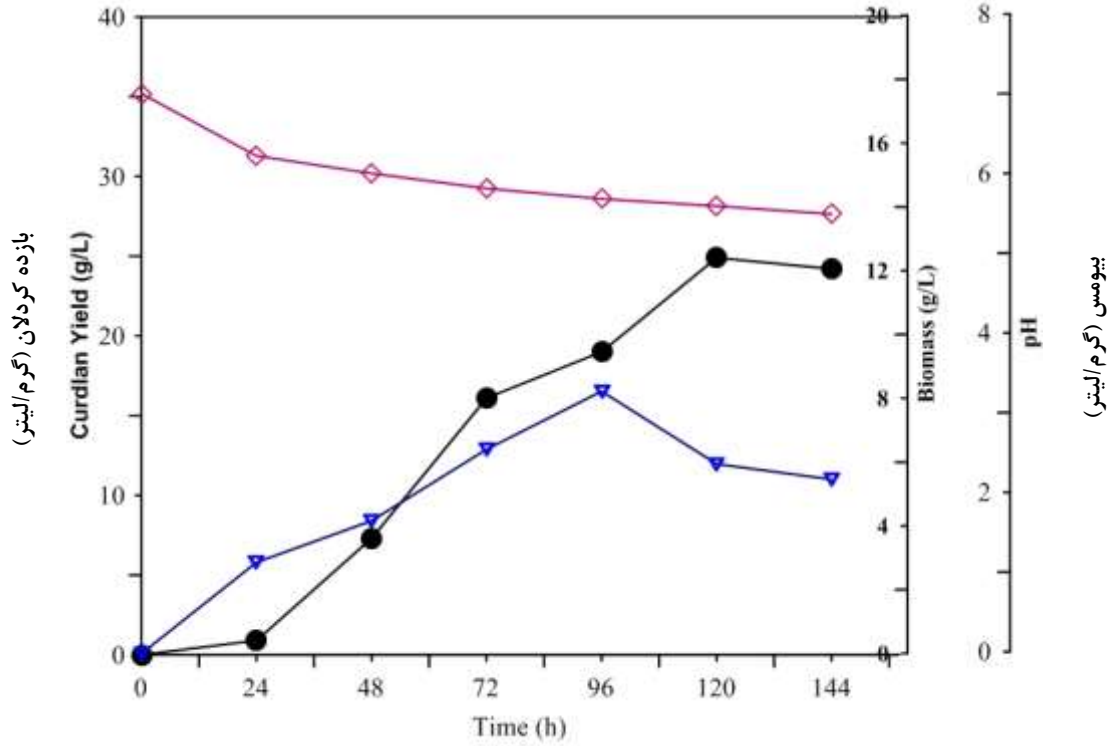


شکل ۱، بازده زیست پلیمر تولیدی باکتری *Agrobacterium* radiobacter PTCC 1654 در محیط تخمیر حاوی شیره انگور در بریکس‌های متفاوت.



شکل ۲، بازده زیست پلیمر تولیدی باکتری *Agrobacterium radiobacter* PTCC 1654 در محیط تخمیر حاوی قند ساکارز در بریکس‌های متفاوت.

شکل ۳ بازده تولید زیست پلیمر کردلان در محیط تخمیر شیره انگور و ساکارز در بهینه بریکس هرکدام برای تولید زیست‌پلی‌مر به‌صورت مقایسه‌ای آورده است. با توجه به نتایج بدست آمده، در هر دو نوع محیط کشت بیشترین مقدار زیست پلیمر کردلان در ساعات پایانی تخمیر تولید شد. این در حالی است که در هر دو محیط کشت پس از به دست آمدن بیشینه کردلان تولیدی، بازده روند کاهشی داشت.



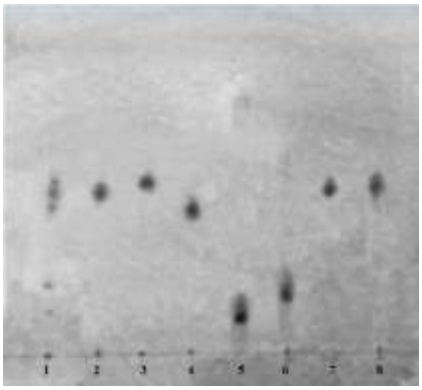
شکل ۳، بهینه بازده زیست پلیمر کردلان ( ) و بیومس تولیدی ( ) باکتری *Agrobacterium radiobacter* PTCC 1654 و تغییرات pH محیط تخمیر حاوی شیره انگور ( ) در بریکس ۷/۵.

pH محیط تخمیر

pH محیط در ابتدا بر روی هفت تنظیم شده بود که با شروع فرایند تخمیر روند کاهشی از خود نشان داد به‌طوری‌که در انتهای دوره تخمیر (۱۴۴ ساعت) تقریباً به ۵/۴۵ رسید. تأثیر pH بر بازده تولید زیست پلیمر کردلان و بیومس باکتری *Agrobacterium radiobacter* PTCC 1654 در شکل ۳ نشان داده‌شده است. در ابتدای فرایند تخمیر نمودار تغییر pH شیب بیشتری را نسبت به مراحل انتهایی ثبت کرد. بر اساس داده‌های ثبت شده می‌توان نتیجه گرفت که pH بهینه برای تولید کردلان حدود شش است.

کروماتوگرافی لایه‌نازک

آنالیز اجزا قندی زیست پلیمر کردلان به‌دست‌آمده در این تحقیق توسط کروماتوگرافی لایه‌نازک در شکل ۴ نشان داده‌شده است. حضور مشابه لکه‌های قندی که در نتیجه تجزیه کردلان به دست آمد در مقابل قند شاهد، بیانگر تولید و حضور کردلان در محیط حاوی شیره انگور و ساکارز بود (شکل ۴).



شکل ۴، کروماتوگرام TLC برای نمونه‌های قند شامل: (۱) مخلوط قندهای ساده، (۲) گلوکز، (۳) فروکتوز، (۴) گالاکتوز، (۵) گالاکترونیک اسید، (۶) گلوکرونیک اسید، (۷) زیست پلیمر تولیدی از قند ساکارز، (۹) زیست پلیمر تولیدی از شیره انگور.

بحث

تحلیل نتایج آنالیز شیمیایی نشان داد با توجه به درصد بالای قند احیا موجود در شیره انگور انتظار می‌رود که این ماده جایگزین خوبی برای منبع کربنی محیط تخمیر باکتری *Agrobacterium radiobacter* جهت تولید زیست پلیمر کردلان باشد. در این پژوهش از میکروارگانیسم *Agrobacterium radiobacter* PTCC 1654 جهت تولید پلی‌ساکارید کردلان استفاده شد. تولید این زیست پلیمر توسط سویه‌های میکروبی دیگر نیز گزارش‌شده است. تعدادی از سویه‌ها، از جمله سویه گزارش‌شده در این مطالعه (PTCC 1654)، نشان داد توانایی خوبی برای تولید کردلان دارد هرچند در تحقیقات انجام‌شده توسط بختیاری و همکاران (۲۰۱۵)، اگزوپلی-ساکارید سوکسینوگلیکان (Succinoglycan) نیز توسط همین سویه تولیدشده بود (Bakhtiyari et al., 2015). این نتایج نشان‌دهنده توانایی سویه *Agrobacterium radiobacter* PTCC 1654 در تولید هر دو پلیمر کردلان و سوکسینوگلیکان بود. یو و همکاران (۲۰۱۱) تولید بیوپلیمر کردلان از سویه *Agrobacterium radiobacter* ATCC 31749 را مورد ارزیابی قراردادند و گزارش دادند با بهینه کردن منبع فسفات بازده تولید کردلان از ۲۳ به ۱۳۴ درصد ارتفاع بافت (Yu et al., 2011). در تحقیقی دیگر جیانگ و همکاران (۲۰۱۳)، اثر منابع نیتروژن را بر روی تولید کردلان توسط *Alcaligenes faecalis* ATCC 31749 مورد ارزیابی قراردادند (Jiang, 2013). سویه‌ای جهش‌یافته از *Agrobacterium* ATCC 31750 نیز برای تولید کردلان توسط کالیاناسوندارم و همکاران (۲۰۱۲) مورداستفاده قرار گرفت (Kalyanasundaram et al., 2012). در تحقیقی دیگر یانگ و همکاران (۲۰۱۶) از باکتری سودوموناس *Pseudomonas* QL212 برای تولید و بهینه‌سازی کردلان استفاده کردند(Yang et al., 2016). در تحقیقات مشابهی کردلان در محیط‌های کشت حاوی منابع گیاهی (West and Peterson, 2013)، ضایعات نشاسته کاساوای هیدرولیز شده (Wu et al., 2016) و α- لاکتوز (Liu et al., 2015) نیز تولیدشده است. علاوه بر این، صلاح و همکاران (۲۰۱۱) بیوپلیمر کردلان را از ریزوبیوم رادیوباکتر ATCC 6466 در محیط تخمیر حاوی شیره خرما تولید کردند و پس از خالص‌سازی ویژگی‌های رئولوژیکی و فیزیکو-شیمیایی آن را بررسی کردند (Salah et al., 2011).

افزایش تولید کردلان با استفاده از شیره انگور به‌عنوان یک سوبسترا، به احتمال زیاد به در دسترس بودن اسیدآمینه و به ویژه اسیدآمینه گلوتامات در این سوبسترا در مقایسه با ساکارز ارتباط دارد. علاوه بر این، شیره انگور مقادیر قابل‌توجهی از اسیدهای آلی در ترکیب خود دارد که می‌تواند تولید زیست پلیمر کردلان را افزایش دهد. علاوه بر این، شیره انگور ترکیبات نیتروژنی بیشتری دارد و بنابراین نیاز به نیتروژن ارگانیسم برای تولید بیشتر

کردلان را فراهم کند (Stoppok and Buchholz, 1996). میزان بیشینه کردلان تولیدشده در محیط حاوی شیره انگور در این تحقیق از مقادیر گزارش‌شده توسط یانگ و همکاران (۲۰۱۶) توسط باکتری *Pseudomonas* QL212 (۵/۹۲g/L) بیشتر بود. این در حالی است که مقادیر کردلان تولیدی گزارش‌شده توسط جیانگ و همکاران (۲۰۱۴) توسط باکتری *Alcaligenes faecalis* ATCC 31749 و کالیاناسوندارم و همکاران (۲۰۱۲) توسط *Agrobacterium radiobacter* ATCC 31750 به ترتیب ۲۸/۱۶ و ۴۱ گرم بر لیتر گزارش شد که از مقدار بهینه در این تحقیق بالاتر بود (Kalyanasundaram et al., 2012; Yang et al., 2016; Zhang and Edgar, 2014).

علاوه بر شیره انگور از ساکارز نیز به عنوان منبع کربن جهت تولید زیست پلیمر کردلان استفاده شد. شکل ۲ میزان به‌دست‌آمده از محیط تخمیر حاوی ساکارز در بریکس‌های مختلف را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، نمودار تولید کردلان در محیط حاوی ساکارز، با گذشت ۸۴ ساعت از شروع تخمیر تغییر چندانی را نشان نداد که نشان‌دهنده عدم تولید کردلان در مراحل اول تخمیر بود. در ۲۴ بعد، شیب تندی در نمودار مشاهده شد و این روند با گذشت ۱۰۸ ساعت از شروع فرایند تخمیر نیز ادامه یافت. پس از آن در بریکس ۱۰ میزان تولید کردلان کاهش یافت این در حالی بود که در سایر بریکس‌های قند ساکارز روند افزایشی خود را حفظ کرد و درنهایت نیز کاهش ناچیزی نشان دادند. به‌طورکلی در زمان‌های بین ۱۰۸ تا ۱۲۰ ساعت بیشترین تولید کردلان ثبت شد. همان‌طور که در بالا اشاره شد بعد از این مرحله تولید کردلان کاهش پیدا کرد، به نظر می‌رسد این کاهش ناشی از عوامل محدودکننده مختلفی از جمله تولید متابولیت‌های سمی توسط میکروارگانیسم، تولید اسید، کاهش pH، کاهش مواد مغذی بود که درنهایت نرخ رشد میکروارگانیسم را کاهش داده و تولید زیست پلیمر روند کاهشی نشان داد. همچنین این امکان وجود دارد که بخشی از زیست‌پلی‌مر تولیدی، در اثر نامساعد بودن شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط تخمیر تجزیه‌شده و روند کاهشی را در نمودار ثبت کرده‌اند.

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود مقدار کردلان تولیدی در محیط کشت حاوی شیره انگور به‌مراتب از ساکارز بیشتر بود. بنابراین، محیط تخمیر حاوی شیره انگور برای تولید زیست پلیمر کردلان مناسب‌تر بود زیرا شیره انگور علاوه بر منبع کربن حاوی مواد مغذی دیگری است که هم به رشد میکروارگانیسم کمک کرده و هم تولید متابولیت سلولی را تسریع می‌کند. ویوو و همکاران در سال ۲۰۱۶ منابع مختلف کربن را بر تولید زیست پلیمر کردلان توسط باکتری *Alcaligenes faecalis* ATCC 31,749 مورد ارزیابی قراردادند (Wu et al., 2016). مشابه نتایج پژوهش حاضر، آن‌ها نیز گزارش کردند که نشاسته هیدرولیز شده کاساوا در مقایسه با گلوکز، فروکتوز، مالتوز، گالاکتوز و حتی ساکاروز بازده بالاتری در مورد تولید کردلان داشت. افت pH منجر به کاهش رشد میکروارگانیسم، بیومس و به دنبال آن کاهش تولید زیست پلیمر کردلان شد. کالیاناسوندارم و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز گزارش کردند که با کاهش pH محیط تخمیر از ۷ به ۵/۵ تولید کردلان متوقف شد و بر اساس نتایج حاصل گزارش کردند که pH اپتیمم تولید زیست پلیمر کردلان توسط باکتری *Agrobacterium* ATCC 13750 برابر هفت است (Kalyanasundaram et al., 2012). در کروماتوگرافی لایه نازک مقدار R_f کردلان تجزیه‌شده با اسید مساوی با مقدار R_f گلوکز در شرایط صعودی بود. لذا این نتایج نشان داد واحدهای مونومر تشکیل‌دهنده زیست پلیمر تولیدشده در این پژوهش گلوکز بود. نتایج این تحقیق مشابه یافته‌های کالیاناسوندارم در کروماتوگرافی لایه‌نازک کردلان تولیدی توسط باکتری *Agrobacterium* بود.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق تولید زیست پلیمر کردلان توسط باکتری *Agrobacterium radiobacter* PTCC 1654

در محیط کشت حاوی شیره انگور و ساکارز مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌طورکلی منابع قندی ساده مثل گلوکز، فروکتوز و ساکارز قابلیت استفاده به عنوان منبع کربن در محیط‌های تخمیر را داشته و بنابراین قادرند به عنوان منبع قندی در تولید زیست پلیمرها استفاده شوند. اما استفاده از این منابع با محدودیت‌هایی روبرو است، ازیک‌طرف منابع قندی خالص گران‌قیمت هستند از طرف دیگر منابع قندی دیگر ارزان‌قیمت هستند و در طبیعت به وفور یافت می‌شوند و تهیه آن‌ها به‌مراتب راحت‌تر از سایر منابع خالص قندی است. بر همین اساس است که امروزه استفاده از منابع قندی جایگزین با هدف کاهش هزینه‌های تولید مواد زیستی، توجهات زیادی را به خود جلب کرده است. با توجه به حجم بالای تولید انگور در کشور و امکان تولید شیره انگور از ضایعات این محصول باغی، در پژوهش حاضر سعی شده است قابلیت استفاده از این ماده با ارزش در تولید زیست پلیمر کردلان نشان داده شود. همان‌طور که نتایج این پژوهش نشان داد نه‌تنها محیط کشت حاوی شیره انگور قابلیت تولید زیست پلیمر کردلان را داشت بلکه میزان تولید زیست پلیمر کردلان از محیط حاوی شیره انگور به‌مراتب خیلی بیشتر از محیط حاوی قند ساکارز نیز بود. این میزان تولید بالا ممکن است به خاطر ساده‌تر بودن قندهای موجود در شیره انگور (گلوکز و فروکتوز) نسبت به ساکارز و تنوع مواد معدنی موجود در شیره انگور باشد که بر روی سینتیک رشد میکروارگانیسم و میزان تولید زیست پلیمر آن تأثیر گذاشته است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شیراز برای حمایت مالی و از پرسنل آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز به خاطر همکاری در زمینه انجام پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Arslan, E., Yener, M., Esin, A., 2005. Rheological characterization of tahin/pekmez (sesame paste/concentrated grape juice) blends. J Food Engin. 69: 167-172.
2. Bakhtiyari, M., Moosavi-Nasab, M., Askari, H., 2015. Optimization of succinoglycan hydrocolloid production by Agrobacterium radiobacter grown in sugar beet molasses and investigation of its physicochemical characteristics. Food Hydrocolloids. 45: 18-29.
3. Bilgicli, N., Akbulut, M., 2009. Effects of different pekmez (fruit molasses) types on chemical, nutritional content and storage stability of cake. J Food Qual. 32: 96-107.
4. Brennan, M.A., Derbyshire, E., Tiwari, B.K., Brennan, C.S., 2013. Integration of β-glucan fibre rich fractions from barley and mushrooms to form healthy extruded snacks. Plant foods for human nutrition. 68: 78-82.
5. Broderick, E., Lyons, H., Pembroke, T., Byrne, H., Murray, B., Hall, M., 2006. The characterisation of a novel, covalently modified, amphiphilic alginate derivative, which retains gelling and non-toxic properties. J colloid interface Sci. 298: 154-161.
6. Bunea, C.-I., Pop, N., Babeş, A.C., Matea, C., Dulf, F.V., Bunea, A., 2012. Carotenoids, total polyphenols and antioxidant activity of grapes (Vitis vinifera) cultivated in organic and conventional systems. Chemis Cen J. 6: 66.
7. Emamifar, A., 2018. Evaluation of nano ZnO edible coating effect on microbial, physicochemical and sensorial characteristics of black table grape during storage. Innovative Food Technol. 1: 10-20.
8. Funami, T., Nishinari, K., 2007. Gelling characteristics of curdlan aqueous dispersions in the presence of salts. Food Hydrocolloids. 21: 59-65.
9. Jiang, L., 2013. Effect of nitrogen source on curdlan production by Alcaligenes faecalis ATCC 31749. International J Biol Macromol. 52: 218-220.

10. Kalyanasundaram, G.T., Doble, M., Gummadi, S.N., 2012. Production and downstream processing of (1→ 3)-β-D-glucan from mutant strain of Agrobacterium sp. ATCC 31750. AMB Express. 2: 31.
11. Karaca, O.B., Saydam, I.B., Gueven, M., 2012. Physicochemical, mineral and sensory properties of set-type yoghurts produced by addition of grape, mulberry and carob molasses (Pekmez) at different ratios. Inter J Dairy Technol. 65: 111-117.
12. Karnezis, T., Fisher, H.C., Neumann, G.M., Stone, B.A., Stanisich, V.A., 2002. Cloning and characterization of the phosphatidylserine synthase gene of Agrobacterium sp. strain ATCC 31749 and effect of its inactivation on production of high-molecular-mass (1→ 3)-β-d-glucan (curdlan). J Bacteriol. 184: 4114-4123.
13. Kaya, A., Belibağlı, K., 2002. Rheology of solid gazıantep pekmez. J Food Engin. 54: 221-226.
14. Kim, Y.-W., Kim, K.-H., Choi, H.-J., Lee, D.-S., 2005. Anti-diabetic activity of β-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from Agaricus blazei. Biotechnol letters. 27: 483-487.
15. Kittisuban, P., Ritthiruangdej, P., Suphantharika, M., 2014. Optimization of hydroxypropylmethylcellulose, yeast β-glucan, and whey protein levels based on physical properties of gluten-free rice bread using response surface methodology. LWT-Food Sci Technol. 57: 738-748.
16. Liu, Y., Gu, Q., Ofosu, F.K., Yu, X., 2015. Isolation and characterization of curdlan produced by Agrobacterium HX1126 using α-lactose as substrate. Inter J Biol macromol. 81: 498-503.
17. Nejati, S., 2011. Investigating the Parameters Effect on the Production of xhanthan Biopolymer in Medium Based on Grain and Date Syrups. Isfahan University of Technology.
18. Salah, R.B., 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 Sci Technol. 44: 1026-1034.
19. Shahidi, B., Kalantari, M., Boostani, S., 2015. Preparation and characterization of sponge cake made with grape juice. Iran Food Sci Technol Res J. 13: 415-425.
20. Sharafbafi, N., Tosh, S.M., Alexander, M., Corredig, M., 2014. Phase behaviour, rheological properties, and microstructure of oat β-glucan-milk mixtures. Food Hydrocolloids. 41: 274-280.
21. Shimizu, J., Tsuchihashi, N., Kudoh, K., Wada, M., Takita, T., Innami, S., 2001. Dietary curdlan increases proliferation of bifidobacteria in the cecum of rats. Bioscience, biotech bioch. 65: 466-469.
22. Stoppok, E., Buchholz, K., 1996. Sugar-Based Raw Materials for Fermentation Applications. Biotechnology Set, Second Edition: 4-29.
23. Tavakolipour, H., Kalbasi Ashtari, A., 2013. Determination of rheological properties of grape molasses. Food Sci Technol. 10: 129-137.
24. Walzem, R., 2008. Wine and health: state of proofs and research needs. Inflammopharmacology. 16: 265-271.
25. West, T.P., 2009. Elevated curdlan production by a mutant of Agrobacterium sp. ATCC 31749. J Basic Nicrobiol. 49: 589-592.
26. West, T.P., Peterson, J.L., 2013. Production of the polysaccharide curdlan by an Agrobacterium strain grown on a plant biomass hydrolysate. Can J Microbiol. 60: 53-56.
27. Wu, S., Lu, M., Fang, Y., Wu, L., Xu, Y., Wang, S., 2016. Production of Curdlan Grown on Cassava Starch Waste Hydrolysates. J Polym Envir: 1-6.
28. Yang, M., Zhu, Y., Li, Y., Bao, J., Fan, X., Qu, Y., Wang, Y., Hu, Z., Li, Q.,

2016. Production and optimization of curdlan produced by Pseudomonas sp. QL212. Int J Biol Macromol. 89: 25-34.

29. Yu, L., Wu, J., Liu, J., Zhan, X., Zheng, Z., Lin, C.C., 2011. Enhanced curdlan production in Agrobacterium sp. ATCC 31749 by addition of low-polyphosphates. Biotech Biop Engin. 16: 34-41.

30. Zhang, R., Edgar, K.J., 2014. Properties, chemistry, and applications of the bioactive polysaccharide curdlan. Biomacromolecules. 15: 1079-1096.

Prevalence of antibiotic resistance genes in *Entrococcus faecalis* isolated from meat in Shahrekord

Abdolshahi A[1], Moosavi-Nasab M[2,3], Monjzeb Marvdashti L[4*]

1. Food Safety Research Center (salt), Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran.

2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

3. Seafood Processing Research Group, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

4. Graduated of Food science, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

***Corresponding author:** *leila.monjazeb@mail.um.ac.ir*

Received: 10 October 2017 Accepted: 9 December 2017

Abstract

Curdlan is water-insoluble and expensive polysaccharide that is made up of D-glucan monomers with β- (1→3) bonds. The properties of the gel created by the heat make Curdlan very important in the food industry. One of the main limiting factors for using Curdlan is its production cost. Agricultural waste can be used as a cheap substrate for its production. In this research, Curdlan production of was evaluated by *Agrobacterium radiobact*er PTCC 1654 in a culture medium different concentrations (5, 7.5 and 10%) of grape syrup and neat sucrose as carbon source. Based on the yield of Curdlan production, the optimum carbon source was determined. Moreover, the amount of produced Curdlan and biomass was measured. The polysaccharide sugar composition was evaluated by thin-layer chromatography technique. The pH change of the medium was also evaluated during the fermentation process. The results showed that the highest amount of polysaccharide was obtained in fermentation medium containing grape syrup with 7.5 Brix and after 144 hours. The pH of the fermentation medium decreased from about 7 to about 5.5 during the fermentation process. The results of thin-layer chromatography of polysaccharide showed that the glucose was the only monomer in the polymer's structure. In grape syrup medium Curdlan production in grape syrup was significantly higher than sucrose medium (p<0.05). Grape syrup is a cheap substrate widely available in Iran and has potential for Curdlan production.

Keywords: *Agrobacterium radiobact*er PTCC 1654, biopolymer, Curdlan, grape syrup.