Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال دوم، شماره ۵، بهار ۱۳۹۲، صفحه ۱- ۱۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۹/۱۴ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۲/۱۸

بهینه سازی تولید میکروبی صمغ زانتان توسط *زانتاموناس کمپستریس* با استفاده از نشاسته هیدرولیز شده

سید وحید نیک‌نژاد: دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی بیوتکنولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، vahidniknezhad@gmail.com
محمد علی اسداللهی: استادیار مهندسی شیمی بیوتکنولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، masadollahi@yahoo.com *
داود بیریا: استادیار مهندسی شیمی بیوتکنولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، dav_biria@yahoo.com
اکرم زمانی: استادیار مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی اصفهان، ایران، zamani.akram@cc.iut.ac.ir

چکیده

مقدمه: در تولید فرآورده‌های زیستی با ارزش افزوده پایین، هزینه سوبسترا سهم زیادی از قیمت تمام شده محصول را تشکیل می‌دهد؛ بنابراین، انتخاب یک سوبسترای ارزان قیمت که دارای بازده بالایی از محصول باشد، می‌تواند قیمت تمام شده محصول را تا حد زیادی کاهش دهد. نشاسته به عنوان یکی از منابع کربن فراوان و ارزان قیمت می‌تواند سوبسترای مناسبی برای تولید صمغ زانتان باشد. تاکنون در بیشتر تحقیقات انجام شده بر روی تولید میکروبی صمغ زانتان، از گلوکز به عنوان سوبسترای اصلی استفاده شده است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، تولید میکروبی صمغ زانتان توسط باکتری *زانتاموناس کمپستریس* PTCC 1473 با استفاده از نشاسته هیدرولیز شده بررسی شده است. دو عامل زمان و غلظت منبع کربن (نشاسته‌هیدرولیز شده) با استفاده از روش تحلیل آماری سطح رویه پاسخ- طراحی ترکیبی مرکزی (RSM- CCD) بهینه شده است. هر دو عوامل موثر بر تولید زانتان از سوبسترای نشاسته هیدرولیز شده شناخته شدند.

نتایج: بر اساس نتایج حاصل از تحقیق، زمان ۳۸/۴ ساعت و غلظت ۵۶/۰ گرم بر لیتر از نشاسته هیدرولیز شده، به عنوان زمان و غلظت بهینه از سوبسترا برای تولید ۸/۳۴ گرم بر لیتر صمغ زانتان به‌دست آمدند.

بحث و نتیجه‌گیری: این نتایج نشان دهنده قابلیت استفاده از نشاسته هیدرولیز شده به عنوان یک منبع کربن ارزان قیمت و ضایعاتی به جای گلوکز برای تولید زانتان است. همچنین، از بین دو عامل غلظت منبع کربن و زمان، عامل غلظت منبع کربن اثر بیشتری بر تولید زانتان داشت. این دو عامل با یکدیگر اثر متقابل نداشته و هر یک به تنهایی موثر بودند.

واژه‌های کلیدی: صمغ زانتان، *زانتوموناس کمپستریس*، نشاسته، بهینه‌سازی

* نویسنده مسؤول مکاتبات

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

صمغ زانتان هتروپلی‌ساکارید برون سلولی است که درون آب محلول است و به شکل صنعتی از ساکارز و گلوکز طی فرآیند تخمیری با سویه های میکروبی *زانتاموناس* به ویژه *زانتاموناس کمپستریس* تولید می‌شود (۵ و ۷). با توجه به خواص تغییر شکل متنوع، زانتان در صنایع گوناگونی همچون صنایع غذایی، آرایشی و تزئینی، داروسازی، افزایش بازیافت نفت به عنوان غلیظ کننده، پایدار کننده و معلق کننده استفاده می‌شود (۲ و ۵). فرآیندهای پایین دستی در جداسازی زانتان و خالص کردن آن با هزینه بسیار بالا، حدود ۵۰ درصد هزینه تمام شده است (۱۵). بنابراین، یکی از راه‌ها، استفاده از منابع کربن ارزان قیمت برای کاهش هزینه کلی تولید است. مطالعات زیادی بر روی کاهش هزینه تولید با استفاده از منابع متنوع کربن همچون ملاس چغندر قند، ملاس نیشکر، آب‌پنیر، ضایعات میوه (مرکبات، فندق، خرما) انجام گرفته است (۳، ۴، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۲). میزان تولید جهانی صمغ زانتان حدود ۳۰۰۰۰ تن با ارزشی حدود ۴۰۸ میلیون دلار است. این میزان تولید با رشدی حدود ۵ تا ۱۰ درصد روبه‌رو است (۲، ۳ و ۹). در این مقاله، برای کاهش هزینه‌های تولید و افزایش بازده تولید برای استفاده این بسپار در صنایع غذایی، از نشاسته هیدرولیزی برای تولید زانتان توسط باکتری *زانتاموناس کمپستریس* استفاده شده است. برای بهینه‌سازی میزان تولید زانتان از روش آماری سطح پاسخ نقطه مرکزی (CCD) که دو عامل زمان و غلظت منبع کربن را در نظر گرفته است، استفاده شد. منبع کربن استفاده شده در این تحقیق نشاسته بوده که منبعی ارزان و قابل دسترس است.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم و شرایط رشد

سویه استاندارد *زانتاموناس کمپستریس* PTCC 1473 از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به شکل لیوفیلیزه خریداری شد. این سویه بر روی محیط کشت GYC حاوی ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۲۰ گرم بر لیتر کلسیم‌کربنات، ۱۷ گرم بر لیتر آگار و ۱۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد.

مایه تلقیح

برای رسیدن به یک توده‌ی میکروبی مناسب برای استفاده در فرآیند تخمیری، از محیط کشت YPD حاوی ۲۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۲۰ گرم بر لیتر پپتون، ۱۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر استفاده شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت داخل یک فلاسک ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته و پس از اتوکلاو شدن، از محیط کشت GYC مقدار ۴ لوپ به این محیط کشت تلقیح شد. محیط کشت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در دور ۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۴ ساعت گرمادهی شد (۳). در این زمان با توجه به این‌که سویه در فاز لگاریتمی رشد بوده بهترین زمان برای تلقیح اولیه است. از مایه تلقیح به دست آمده به عنوان مایه تلقیح آزمایش‌های اصلی به میزان ۵ درصد(حجمی/حجمی) استفاده شد (۷).

فرآیند تخمیر

آزمایش با درصدهای مختلف از منبع کربن (نشاسته هیدرولیزی) که با توجه به تحلیل آماری در سه سطح اصلی (۸۰، ۵۰ و ۲۰ گرم بر لیتر) و دو سطح اضافه (۷/۵۷ و ۹۲/۴۳ گرم بر لیتر) مشخص شده بود توسط نرم‌افزار و مقادیر ثابت محیط کشت (گرم بر لیتر) انجام شد. این مقادیر ثابت عبارتند از: پتاسیم دی‌هیدروژن‌فسفات: ۲، سولفات منیزم: ۰/۲،

www.SID.ir

Archive of SID

نیترات‌آمونیم: ۲، سیتریک اسید:۲، بوریک اسید: ۰/۰۰۰۶، کلرید روی: ۰/۰۰۰۶، کلرید آهن: ۰/۰۰۲۴، کربنات کلسیم:۰/۰۲. اسیدیته محیط کشت با افزودن NaOH (1M) به ۷/۲ رسانده (۴ و ۱۱) و محیط کشت در دمای ۱۱۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شد.

هیدرولیز نشاسته

نشاسته (آرد گندم) خشک شده به نسبت ۱:۵ در آب مخلوط شد. پس از رساندن اسیدیته به ۵/۵ توسط کلریدریک اسید یک مولار، آنزیم آلفا آمیلاز با نسبت ۰/۰۰۰۲ درصد حجمی به نشاسته اضافه و پس از دو ساعت هم‌زدن در حمام ۹۰ درجه سانتی‌گراد، دمای محلول به ۶۵ درجه سانتی‌گراد رسانده شد. سپس برای مرحله قندسازی، اسیدیته محلول در ۴/۵ تنظیم و ۰/۰۰۰۲ درصد حجمی آنزیم گلوکوآمیلاز به آن اضافه شد. سپس این محلول در یک شیکر انکوباتور با دور متوسط (۱۲۰ دور بر دقیقه) به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد (۱۴). در پایان، محلول سانتریفیوژ شده و مایع رویی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. غلظت نشاسته در این محلول ۲۰ درصد است که با رقیق کردن آن غلظت‌های ۲، ۵ و ۸ درصد برای استفاده در محیط کشت به دست آمد.

برآورد میزان تولید سلولی

سلول‌ها پس از سانتریفیوژ در دور ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از مایع‌رویی که برای جداسازی زانتان استفاده می‌شود، جدا شده و از اتانول برای جداسازی بقایای زانتان موجود به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ استفاده شد. سلول‌ها درون آون به مدت ۳ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک شد. سپس وزن خشک سلول با توزین ظرف حاوی سلول و ظرف خالی توسط ترازو (دقت ۰/۰۰۰۰۱ گرم) و کسر این دو وزن از یکدیگر تخمین زده شد (۳).

تولید زانتان

صمغ زانتان توسط فرآیند هوازی به شکل ناپیوسته درون ارلن و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در دور ۲۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۵۶ ساعت انجام شد. محیط کشت به دست آمده به مدت ۲۵ دقیقه در دور ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی بدون سلول میکروبی درون میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته و مقدار یک میلی‌لیتر ایزوپروپانول حاوی یک درصد نمک کلسیم کلراید به آن اضافه شد (۷). پس از سانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، پلیمر رسوب کرده در ته ظرف به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. به علت مدت زمان زیاد فرآیند خشک شدن و دمای متوسط خشک شدن زانتان، رطوبتی که موجب خطای تخمین زانتان شود وجود ندارد. میزان تولید زانتان بر اساس اختلاف وزن میکروتیوب قبل از ریختن مواد و پس از خشک شدن بر اساس گرم بر لیتر توسط ترازو (دقت ۰/۰۰۰۰۱ گرم) محاسبه شد.

طراحی آزمایش‌ها

آزمایش‌ها بر پایه دو عامل زمان و غلظت منبع کربن، طراحی شد. عامل زمان در سه سطح ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت و غلظت منبع کربن نیز در سه سطح ۲۰، ۵۰ و ۸۰ گرم بر لیتر بررسی شد. این طرح بر اساس روش آزمایشی طراحی نقطه مرکزی (CCD) و با استفاده از نرم افزار Minitab 16 انجام شد. به طور کلی، ۱۳ آزمایش با در نظر گرفتن نقاط مرکزی و تکرار آن‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

انجام شد. آزمایش‌ها به شکل تصادفی انجام شد تا کم‌ترین مقدار خطا را داشته باشد. در جدول (۱) سطوح متغیرها همراه با مقادیر زانتان تولیدی نشان داده شده است.

جدول ۱- نوع طراحی آزمایش و مقادیر تولیدی صمغ زانتان

شماره آزمایش	غلظت نشاسته هیدرولیزی (گرم بر لیتر)	زمان (ساعت)	صمغ زانتان (گرم بر لیتر)
۱	۵۰	۳۶	۸/۱۰
۲	۹۲/۴	۳۶	۷/۳۵
۳	۵۰	۱۹	۵/۹۸
۴	۷/۶	۳۶	۲/۴۵
۵	۵۰	۳۶	۸/۰۰
۶	۸۰	۲۴	۶/۶۸
۷	۸۰	۴۸	۷/۱۰
۸	۲۰	۲۴	۴/۷۰
۹	۵۰	۳۶	۸/۲۳
۱۰	۵۰	۳۶	۷/۶۹
۱۱	۵۰	۳۶	۷/۹۸
۱۲	۲۰	۴۸	۵/۱۲
۱۳	۵۰	۵۳	۷/۴۵

نتایج

در بهینه‌سازی فرآیند تولید صمغ زانتان، پس از انجام آزمایش بر اساس طرح آماری تنظیم شده در جدول ۱، نتایج مربوط به پاسخ‌های به دست آمده در هر یک از شرایط آزمایشی تعریف شده مطابق جدول ۲ به دست آمد.

با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایش‌ها توسط نرم افزار Minitab16، ابتدا هر یک از پاسخ‌ها به شکل جداگانه بررسی و تحلیل شد. علاوه بر ارائه رابطه‌ای بین پاسخ و متغیرهای مورد آزمایش، سطوح بهینه این متغیرها نیز بر اساس متغیرهای پاسخ تعیین شد. در بررسی آماری داده‌ها، نتایج به‌دست آمده توسط نرم‌افزار تحلیل و مدل نخستین ارائه شد. این مدل از درجه دو بوده و ضرایب مربوط به هر عامل از طریق رگرسیون محاسبه شد. از آن‌جایی که مدل اولیه پیشنهادی شامل کلیه عامل‌های A، B، AB، A^2 و B^2 (متغیرها با توان اول و دوم و اثر متقابل متغیرها) است، درجه اهمیت هر یک از عامل‌ها با توجه به مقدار P مربوط به هر یک از آن‌ها که در جدول تحلیل آماری ارائه می‌شود، مشخص شده و عامل‌های با درجه اهمیت کمتر که در واقع تاثیر ناچیزی در مدل ارائه شده دارند، حذف شدند. به طور کلی، هرچه میزان P مربوط به یک عامل کمتر باشد، آن عامل از اهمیت و تاثیر بیش‌تری برخوردار است و از آن‌جایی که مقدار ۹۵ درصد به عنوان سطح اطمینان از موثر بودن عامل در نظر گرفته می‌شود در صورت عدم صدق شرط (P value <0.05) در مورد یک عامل، عامل مربوطه توسط نرم‌افزار حذف شده و رابطه جدیدی که تنها شامل عامل‌های مهم باشد، ارائه می‌شود (۱). علاوه بر موارد ذکر شده، ضریب همبستگی (R^2) متغیر دیگری است که برای تحلیل بهتر داده‌ها می‌توان از آن استفاده کرد (۱۳). به طور معمول، هرچه میزان این ضریب به یک نزدیک‌تر باشد، انطباق داده‌های تجربی و مدل ارائه شده بیشتر بوده و مدل از دقت بالاتری برخوردار است.

در جدول ۲ تحلیل آماری مربوطه قابل مشاهده است. آزمایش رگرسیون دارای P صفر بوده که آزمایشی منطقی و دارای خطای بسیار پایین را نشان می‌دهد. عامل غلظت منبع کربن با P بسیار پایین حدود صفر مشاهده می‌شود که نشان دهنده معنی‌دار بودن انتخاب عامل مربوطه و داشتن بیش‌ترین اثر ممکن بر تولید زانتان است. ولی عامل زمان در حد مرز ممکن P بوده که گویای این است که نسبت به عامل غلظت موثر نیست، هرچند باز هم عاملی موثر تلقی می‌شود. اثر

www.SID.ir

Archive of SID

متقابل این دو عامل (زمان و غلظت منبع کربن) دارای P بسیار بالایی است که اثر این دو عامل را بر روی هم رد کرده و این عوامل را به تنهایی موثر می داند. عبارت Lack-of-Fit به نوعی معرف خطا است که هرچه P آن بیشتر باشد بهتر است، چون در Lack-of-Fit معنی‌دار بودن خطا با P بالا رد می‌شود. در این آزمایش، بالاتر بودن P از حد مرزی ۵ درصد، نشان دهنده معنی‌دار نبودن خطای Lack-of-Fit و در نتیجه خطای پایین آزمایش است. مقدار R نیز با توجه به آزمایش برابر با ۹۵/۸۷ درصد است. این مقدار بسیار نزدیک به عدد یک بوده و انطباق داده‌های تجربی و مدل ارائه شده را نشان می‌دهد.

جدول ۲- تحلیل واریانس تولید صمغ زانتان

عوامل	درجه آزادی[۱]	مجموع مربعات[۲]	تعدیل مجموع مربعات[۳]	تعدیل میانگین مربعات[۴]	F[۵]	P[۶]
R^2 = ۹۵/۸۷ درصد						
رگرسیون	۵	۳۳/۳۵	۳۳/۳۵	۶/۶۷	۳۱/۷۵	۰/۰۰۰
غلظت منبع کربن (گرم بر لیتر):A	۱	۱۴/۸۲	۱۴/۸۲	۱۴/۸۲	۷۰/۵۵	۰/۰۰۰
زمان (ساعت): B	۱	۱/۰۶	۱/۰۶	۱/۰۶	۵/۰۷	۰/۰۵۰
A^2	۱	۱۴/۷۹	۱۶/۲۱	۱۶/۲۱	۷۷/۱۹	۰/۰۰۰
B^2	۱	۲/۶۶	۲/۶۶	۲/۶۶	۱۲/۷۰	۰/۰۰۹
A×B	۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۰۰۰
Lack-of-Fit	۳	۱/۳۱	۱/۳۱	۰/۴۳	۸/۹۷	۰/۰۶۱
خطای خالص[۷]	۴	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۰۳		
تمام آزمایش	۱۲	۳۴/۸۲				

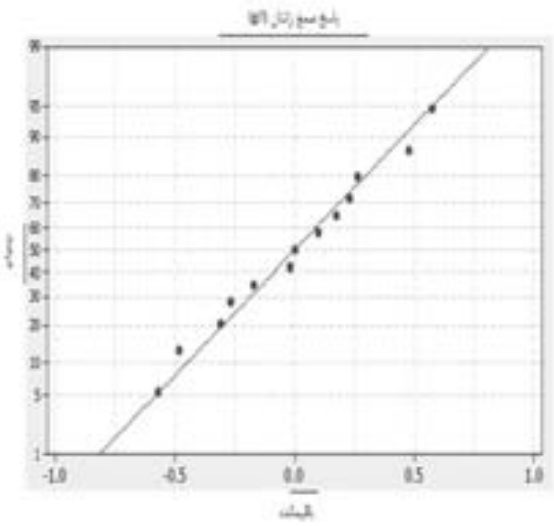
نرم افزار بر اساس داده‌های به دست آمده و روش‌های آماری و ریاضی، معادله‌ای را برای مقدار تولید صمغ زانتان پیش‌بینی می‌کند. اعتبار کار آماری معادلات چند جمله‌ای به وسیله تحلیل واریانس است(۱۰). معادله ۱ ارتباط تولید با مقادیر غلظت منبع کربن و زمان تولید محصول را نشان می‌دهد. اثر متقابل این دو عامل با ضریب صفر مشخص شده که نشان دهنده بی‌اهمیتی و عدم اثر متقابل این دو عامل است.

$$\text{صمغ زانتان} = (g/l) \text{ ۸/۰۰ + ۱/۳۶ A + ۰/۸۵B + ۰/۰۰۰ A×B - ۱/۳۶ } A^2 \text{ - ۱/۱۳ } B^2 \quad (۱)$$

یکی از فرضیات کلیدی برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های آزمایش این است که داده‌ها به شکل نرمال توزیع شوند. نرمال بودن داده‌ها را می‌توان با نمودار احتمال نرمال باقیمانده بررسی نمود (۱). به طور کلی، اگر داده‌ها از خط رسم شده در شکل (۱) دور نباشند، توزیع به شکل نرمال بوده و داده‌ها با کمترین میزان خطا وارد شده‌اند.

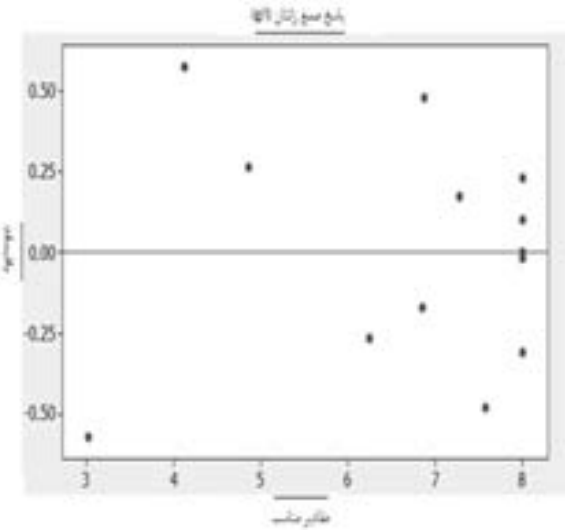
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- نمودار احتمال نرمال باقیمانده

نمودار مقادیر باقیمانده تجربی برحسب مقادیر پیش‌بینی شده در شکل (۲) آمده است، که با عدم تبعیت از الگوی خاصی در روند پراکندگی داده‌ها، میزان خطا در آزمایش را در کم‌ترین مقدار دانسته و هم‌پوشانی داده‌های تجربی و پیش‌بینی شده توسط مدل برای صمغ زانتان را نشان می‌دهد.

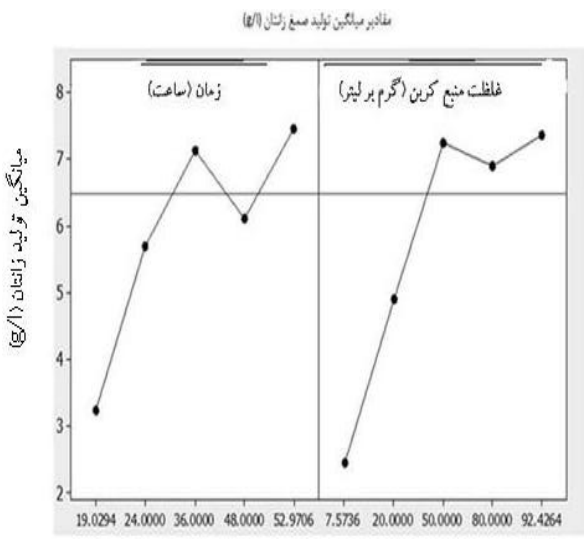


شکل ۲- نمودار مقادیر باقیمانده تجربی بر حسب مقادیر پیش‌بینی شده

در شکل ۳ اثر دو عامل زمان و غلظت نشاسته هیدرولیز شده بر روی تولید صمغ زانتان به شکل متوسط تولید نشان داده شده است. در این شکل میزان تولید با گذشت زمان رفتار متفاوتی از خود نشان داده است به طوری‌که در زمان ۴۸ ساعت میزان میانگین تولید زانتان کاهش یافته ولی در زمان ۵۳ ساعت دوباره میزان تولید افزایش یافته است. افزایش میزان تولید در زمان ۵۳ ساعت شاید به دلیل تعداد کم آزمایش‌های انجام شده برای این زمان بر اساس طراحی انجام شده باشد که از اشکالات روش RSM-CCD می‌باشد. ولی به طور کلی با افزایش زمان، میزان تولید نیز بیش‌تر می‌شود. شایان ذکر است که نمی‌توان افزایش زمان را تنها عامل افزایش مقدار زانتان دانست و باید با غلظت منبع کربن مقایسه شود. در شکل ۳ با افزایش غلظت تا ۵۰ گرم بر لیتر مقدار زانتان تولیدی به شدت افزایش داشته و به مقدار متوسطی حدود ۷/۲ گرم بر لیتر می‌رسد. با افزایش غلظت، تولید زانتان افزایش چندانی نداشته و در برخی موارد حتی کاهش پیدا می‌کند. اگرچه هر دو عامل بسیار بر میزان تولید صمغ زانتان موثر شناخته می‌شوند ولی دارای محدودیت‌هایی نیز هستند. افزایش این دو عامل تا مقادیر خاصی موثر بوده و افزایش تولید را به دنبال دارد. شایان ذکر است علت نوسان‌های موجود در نمودارها به علت مقادیر میانگین بوده که متأثر از تعداد آزمایش‌های انجام شده هستند.

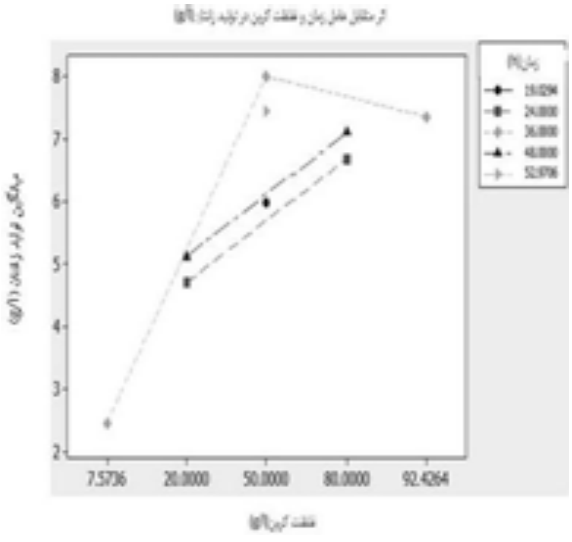
www.SID.ir

Archive of SID



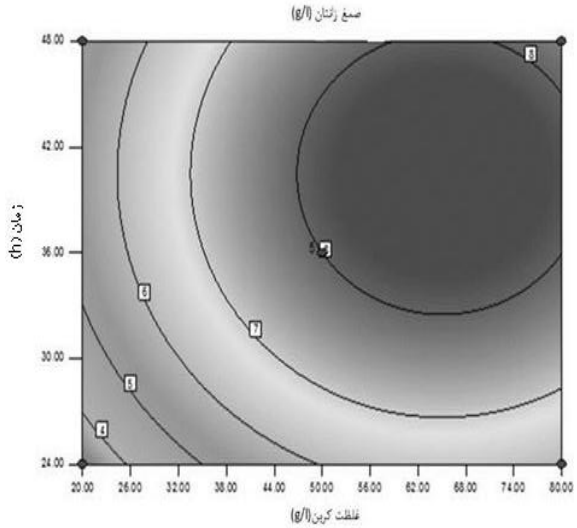
شکل ۳- اثر دو عامل زمان و غلظت نشاسته هیدرولیز شده بر روی تولید صمغ زانتان

در شکل ۴ اثر دو عامل زمان و غلظت منبع کربنی بر روی همدیگر (اثر متقابل) نشان داده شده است. طبق مقدار P، این دو عامل بر روی هم اثری ندارند. این مطلب را می‌توان در این نمودار مشاهده کرد زیرا اگر این دو عامل بر روی هم اثر متقابل داشته باشند، خطوط رسم شده همدیگر را قطع می‌کنند ولی در این شکل هیچ‌گونه برخوردی بین خطوط مشاهده نمی‌شود.



شکل ۴- اثر متقابل دو عامل زمان و غلظت منبع کربنی

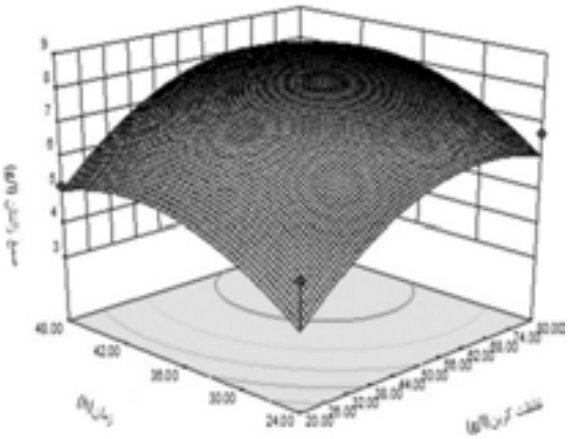
بر اساس تحلیل آماری انجام شده نمودارهای دو و سه بعدی برای توصیف رویه پاسخ که ارتباط دو عامل بررسی شده را نشان می‌دهد، مناسب هستند (شکل‌های ۵ و ۶). همان گونه که مشخص است، با افزایش غلظت از ۲ گرم بر لیتر به حدود ۶ گرم بر لیتر، هم‌زمان با افزایش زمان از ۲۴ ساعت به حدود ۳۹ ساعت، میزان تولید صمغ زیاد شده، سپس با افزایش غلظت به مقادیر بالا در زمان‌های بالاتر میزان تولید کاهش پیدا می‌کند. رویه پاسخ و نمودار دو بعدی بسیار مناسب ایجاد شده، نقاط بیشینه و کمینه تولید را به طور واضح نشان می‌دهد که بیانگر مناسب بودن این روش در بهینه‌سازی منابع مختلف کربن و زمان در تولید صمغ زانتان می‌باشد.



شکل ۵- نمودار دو بعدی ارتباط زمان و غلظت منبع کربن در تولید صمغ زانتان

www.SID.ir

Archive of SID



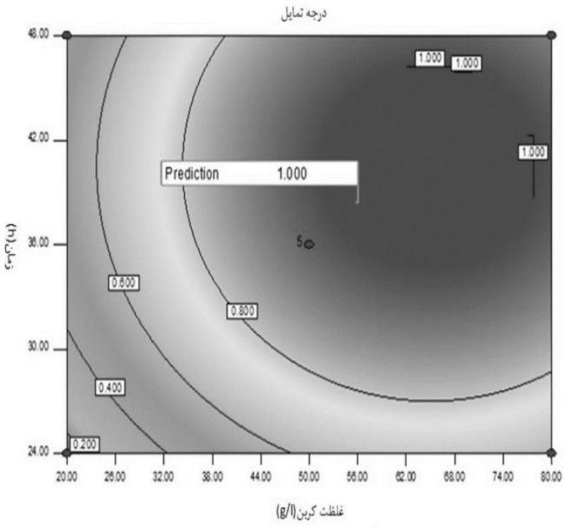
شکل ۶- نمودار سه بعدی ارتباط زمان و غلظت منبع کربن در تولید صمغ زانتان

بحث و نتیجه‌گیری

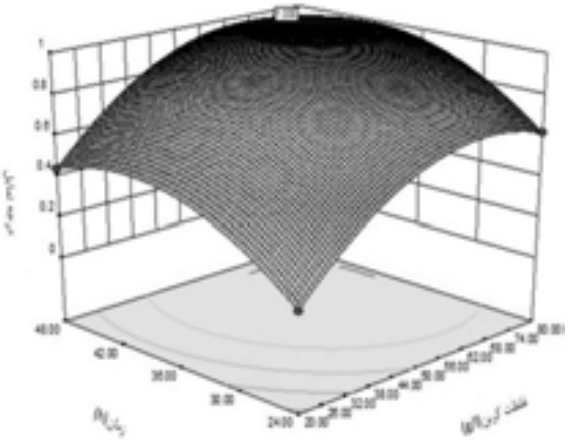
با توجه به تحلیل انجام شده، میزان تولید این صمغ با سوبسترای نشاسته هیدرولیز شده برای استفاده در صنایع مختلف، به‌ویژه غذایی مناسب بوده است. زانتان تولیدی در مقایسه با کارهای قبلی که بر تولید زانتان از گلوکز متمرکز شده بودند، دارای بازدهی تولید مناسبی است (۷). عامل غلظت نسبت به عامل زمان دارای اهمیت بیش‌تری بوده است. علت اثر زیاد غلظت منبع کربن بر تولید زانتان، نیازمندی زیاد میکروارگانیسم زانتوموناس برای رشد و نیز تولید زانتان به منبع کربن است (۸ و ۱۰). با توجه به نیازمندی میکروارگانیسم‌ها به مواد مغذی و هم‌چنین تطابق با شرایط محیط کشت برای تولید صمغ زانتان، زمان، عامل موثری بر تولید زانتان است. همچنین طبق تحقیق‌های انجام شده، صمغ زانتان بیش‌ترین تولید را در مرحله رشد نمایی دارد (۷). معادله ۱ دیدی مناسب نسبت به عوامل مورد بررسی و میزان تأثیر هر کدام بر تولید زانتان نشان می‌دهد ولی به علت تأثیر عوامل گوناگونی همچون غلظت مواد دیگر همچون منبع فسفر و منبع نیتروژن در تولید صمغ زانتان، این معادلات را نمی‌توان مصداقی کلی برای تمام فرآیندها و روش‌های تولید زانتان دانست. با استفاده از رسم نمودارهای سه بعدی و دو بعدی سطوح بهینه، مقادیر ۵۶ گرم بر لیتر برای غلظت منبع کربن و ۳۸/۴ ساعت برای زمان مشخص شد. براساس نمودار رشد، سویه زانتوموناس کمپستریس در زمان ۳۸/۴ ساعت پس از کشت در مرحله سکون رشد بوده و از مرحله نمایی رشدگذشته است پس برای محصول‌گیری زمان مناسبی است (داده‌ها نشان داده نشده). عوامل گوناگونی همچون غلظت منبع کربن، غلظت منبع نیتروژن و دما بررسی شدند. بین این سه عامل فقط غلظت منبع کربن بر تولید زانتان موثر شناخته شد و دو عامل دیگر بر تولید زانتان موثر شناخته نشدند. نتیجه به دست آمده در این تحقیق، نتایج قبلی و موثر بودن غلظت منبع کربن بر تولید زانتان را تأیید می‌کند (۳). برای بهینه‌سازی تولید صمغ زانتان، غلظت منبع نیتروژن، دور همزدن و غلظت منبع فسفر، عواملی موثر بر تولید زانتان شناخته شدند (۱۳). علت اختلاف نظر بین محققین بر موثر بودن و نبودن منبع نیتروژن می‌تواند اختلاف در نوع سوبسترا، مواد مغذی درون محیط کشت و عوامل دیگر بر تولید زانتان دانست. پس استفاده از تحلیل آماری می‌تواند در کم‌ترین تکرار و تعداد آزمایش راه‌گشایی برای پیدا کردن بهترین بازده تولید محصول‌های زیستی باشد. در شکل‌های ۷ و ۸ مقادیر بهینه به شکل ۲ بعدی و سه بعدی نمایش داده شده‌اند. مقادیر بهینه زمان و غلظت منبع کربن با شدت رنگ بیشتر و ایجاد یک رویه مناسب در شکل سه بعدی قابل مشاهده هستند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷- نمودار دو بعدی پیش‌بینی مقدار بهینه



شکل ۸- نمودار سه بعدی پیش‌بینی مقدار بهینه

References

(1) Antony J. *Design of Experiments for Engineers and Scientists*. New York Butterworth-Heinemann; 2003 390- 445.

(2) Antunes AEC. Screening of *Xanthomonas campestris* pv pruni strains According to Their Production of Xanthan and its Viscosity and Chemical Composition. *Braz J Food Technol* 2003; 6 (2): 317-22.

(3) Ben Salah R, Chaari K, Besbes S, Ktari N, Blecker C, Deroanne C, et al. Optimisation of xanthan gum production by palm date (Phoenix dactylifera L.) juice by-products using response surface methodology. *Food Chem* 2010; 121(2): 627-33.

(4) Bilanovic D, Shelef G, Green M. Xanthan fermentation of citrus waste. *Bioresource Technol* 1994; 48 (2): 169-72.

(5) Bono A, Fong NL, Sarbatly RH, Krishnaiah D. Xanthan Gum Production Using Fed-Batch Continuous Recycled Packed Bed Bioreactor. *International Conference on Chemical Reactors* 2006; 17 (1): 298-301.

(6) Esgalhado ME, Roseiro JC, CollaGo MTA. Interactive Effects of pH and Temperature on Cell Growth and Polymer Production by *Xanthomonas campestris*. *Process Biochem* 1994; 30 (7): 667-71.

(7) Garcia OF, Santos VE, Casas JA, Gómez E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotech Adv* 2000; 18 (7): 549-79.

(8) Gilani SL, Heydarzadeh HD, Mokhtarian N, Alemian A, Kolaei M. Effect of preparation conditions on xanthan gum production and rheological behavior using cheese whey by *Xanthomonas campestris*. *Aust. J. Basic Appl Sci* 2011; 5 (10): 855-9.

(9) Kalogiannis S, Iakovidou G, Liakopoulou K M, Kyriakidis D A, Skaracis G N. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. *Process Biochem* 2003; 39 (2): 249- 56.

www.SID.ir

Archive of SID

(10) Kyriakides ML, Psomas SK, Kyriakidis DA. Xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* w.t. Fermentation from chestnut extract. *Appl Biochem Biotech* 1999; 82 (3): 175-83.

(11) Mesomo M, Silva MF, Boni G, Padilha FF, Mazutti M, Mossi A, et al. Xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* from cheese whey: production optimization and rheological characterization. *J Sci Food Agric* 2009; 89 (14): 2440–5.

(12) Murugesan AG, Dhevahi B, Gowdhaman D, Amutha K B, Prabu CS. Production of xanthan employing *Xanthomonas campestris* using sugarcane molasses. *American J Environ Eng* 2012; 2(2): 31-4.

(13) Moshaf S, Esfahani ZH, Azizi MH. Optimization of conditions for xanthan gum productionfrom waste date in submerged fermentation. *World Acad Sci Eng Technol* 2011; 81 (1): 521-4.

(14) Vinche MH, Heidary M, Karimi K, Zamani A, Asachi R. Chitosan: A valuable byproduct of ethanolic fermentation by *Rhizopus oryzae*. *J of Biobased Mater and Bioen* 2012; 6 (5): 552-7.

[1]. Degree of Freedom
[2]. Sum Square
[3]. Adjust Sum Square
[4]. Adjust Mean Square
[5]. F- test
[6]. P-value
[7]. Pure Error

www.SID.ir

Archive of SID

Optimization of microbial production of xanthan gum by the bacterium *Xanthamonas campestris* using the hydrolyzed starch

Seyyed Vahid Niknezhad
M.Sc Student of Chemical Engineering-Biotechnology, University of Isfahan, Iran, vahidniknezhad@gmail.com
Mohammad Ali Asadollahi*
Assistant Professor of Chemical Engineering- Biotechnology, University of Isfahan, Iran, masadollahi@yahoo.com
Davood Biria
Assistant Professor of Chemical Engineering- Biotechnology, University of Isfahan, Iran, dav_biria@yahoo.com
Akram Zamani
Assistant Professor of Chemical Engineering, Isfahan University of Technology, Iran, zamani.akram@cc.iut.ac.ir

Abstract

Introduction: In biological production of low value added bioproducts, the substrate cost comprises a significant part of the total price. Therefore, choosing an inexpensive substrate with a high yield of production can greatly reduce the production cost. Starch as an abundant and cheap carbon source can be a suitable substrate for microbial production of xanthan gum. However, in most of the studies on microbial xanthan gum production, glucose has been used as substrate.

Materials and methods: In this study, microbial production of xanthan gum using *Xanthomonas campestris* PTCC 1473 and hydrolyzed starch as carbon source was investigated. The concentration of carbon source and time were optimized using RSM-CCD method. Both factors were regarded to be significant for production of xanthan using hydrolyzed starch.

Results: Based on the obtained results, optimum carbon source concentration and time were 56 g/L and 38.4 h, respectively. Under optimum conditions, 8.34 g/L of xanthan gum was produced.

Discussion and conclusion: The results of this study indicated that starch could be used as a waste and inexpensive carbon source instead of glucose for the production of xanthan gum. It was also shown that the effect of carbon source concentration was more significant than time for xanthan production. In addition, these two factors were independent and did not have any interaction.

Key words: Xanthan gum, *Xanthomonas campestris*, Starch, Optimization

* Corresponding Author
Received: December 4, 2012 / **Accepted:** May 8, 2013

www.SID.ir