Archive of SID

مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۴۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶ (ص۳۳۶-۳۲۹)

بهینه سازی شرایط محیطی تولید بیوپلیمر کفیران توسط *Lactobacillus kefiranofaciens* با استفاده از روش سطح پاسخ

سحر زنگنه[۱]، فرامرز خدائیان[۲*]، سید هادی رضوی[۳]، محمدرضا نقوی[۴]

۱.دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۲.دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۳.استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۴.استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۲/۹- تاریخ بازنگری : ۱۳۹۶/۳/۳۱ - تاریخ تصویب : ۱۳۹۶/۴/۷)

چکیده

تولید بیوپلیمر توسط انواع میکروارگانیسم‌ها بمنظور کاربردهای مهم صنعتی در سال‌های اخیر مورد توجه بوده است. باکتری *Lactobacillus kefiranofaciens* تولید کننده‌ی اگزو پلی ساکارید موجود در دانک‌های کفیر با نام کفیران می‌باشد. هدف از این مطالعه بهینه‌یابی شرایط محیطی تولید پلی ساکارید کفیران در یک محیط سنتزی بر پایه‌ی آب پنیر با استفاده از روش سطح پاسخ است. در این راستا اعمال ترکیبات مختلف pH (۴/۷-۶/۳) ، دما (۳۷ -۲۳ درجه‌ی سلسیوس) و سرعت همزدن (۱۷۰-۷۰ دور در دقیقه) بر روی تولید کفیران مورد مطالعه قرار گرفت. طبق آزمون‌های صورت گرفته شرایط بهینه‌ی تولید کفیران pH برابر با ۵/۷، دمای ۳۱ درجه‌ی سلسیوس و سرعت همزدن ۱۲۷ دور در دقیقه تعیین گردید که منجر به تولید ۱/۱۴ گرم در لیتر کفیران پس از ۵ روز گرمخانه گذاری شد. همچنین وزن مولکولی کفیران تولید شده در کشت خالص این باکتری بوسیله کروماتوگرافی فیلتراسیونی ژلی میزان $۱/۱ \times ۱۰^{۶}$ دالتون اندازه‌گیری شد.

واژه‌های کلیدی: اگزوپلی‌ساکارید، کفیران، لاکتوباسیلوس کفیرانوفاسینس، روش سطح پاسخ

مقدمه

با افزایش تمایل مصرف کننده‌گان به مصرف مواد طبیعی در سال‌های اخیر، میزان توجه به پلیمرهای طبیعی بعنوان افزودنی غذایی به طرز چشمگیری افزایش یافته است. انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌ها توانایی تولید پلی ساکاریدها و دفع آنها به خارج از سلول را دارا می‌باشند (Vuyst and de Ven 1998). این اگزوپلی‌ساکاریدها می‌توانند بعنوان منعقدکننده‌های زیستی ، عوامل حذف کننده‌ی فلزات سنگین، عوامل رها کننده‌ی داروها و غیره در غذاها، صنعت مواد دارویی و شیمیایی مورد استفاده قرار گیرند (Celik et al., 2008; Roeselers Sutherland 1998 et al., 2008). مثال‌هایی از کاربرد صنعتی اگزوپلی‌ساکاریدها با منشاء میکروبی استفاده از زانتان تولید شده توسط *xanthomonas campesteris* و ژلان تولید شده توسط *Pseudomonas elodea* بعنوان افزودنی غذایی می‌باشد (Matsukawa and Garcia-Garibay and Marshall 1991 ;Watanabe 2007).علاوه بر موارد ذکر شده امروزه باکتری‌های لاکتیک اسید که توانایی تولید اگزوپلی‌ساکاریدهایی با وزن مولکولی بالا را دارا می‌باشند مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند (Wang et al., 2008). یکی از این باکتری‌ها *Lactobacillus kefiranofaciens* نام دارد که از فلور میکروبی دانک‌های کفیر جداسازی شده و توانایی تولید پلی ساکارید موجود در دانک‌های کفیر به آن نسبت داده شده است (Toba et al., 1986). پلی ساکارید موجود در دانک‌های کفیر کفیران نام دارد که حداقل ۲۴ درصد ماده‌ی خشک موجود در دانک‌ها را تشکیل داده است .این اگزوپلی‌ساکارید محلول در آب است و از واحد های تکراری هگزا یا هپتاساکارید که شامل مقدار تقریباً برابری از دی-گلوکز و دی-گالاکتوز هستند، تشکیل شده است (Piermaria et al., 2009). این ماده در بهم پیوستگی دانک‌ها و فراهم آوردن بستر مناسب برای جایگذاری انواع میکروارگانیسم‌ها در دانک‌های کفیر نقش اساسی را ایفا می‌کند (Yeesang et al., 2008). کفیران دارای خصوصیات فیزیکوشیمیایی قابل توجهی است و می‌تواند بعنوان قوام‌دهنده، پایدارکننده، امولسیفایر، تشکیل دهنده‌ی فیلم، جایگزین چربی و تشکیل دهنده‌ی ژل مورد استفاده قرار گیرد (Hamet et al., 2013). علاوه بر این

* نویسنده مسئول : khodaiyan@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

خصوصیات، کفیران دارای فعالیت‌های ضد باکتریایی و ضد سرطانی می‌باشد، این اگزو پلی‌ساکارید تنظیم کننده‌ی سیستم ایمنی روده است و از سلول‌های مخاطی در برابر فاکتورهای خارج سلولی *باسیلوس سرئوس* محافظت می‌کند، بعلاوه دارای اثرات مثبتی روی متابولیسم کلسترول می‌باشد (Cheirsilp and Radchabut 2011). با توجه به خواص بیولوژیکی و تکنولوژیکی ذکر شده برای کفیران و عملیات پیچیده و راندمان کم استخراج کفیران از دانک‌های کفیر بهینه‌یابی شرایط محیطی تولید کفیران توسط کشت خالص باکتری تولید کننده‌ی آن یعنی *L. kefiranofaciens* هدف این پژهش قرار گرفت.

در این راستا بمنظور بررسی تاثیر متغیرها و بهینه سازی پاسخ، روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology) که مجموعه‌ای از تکنیک‌های ریاضی و آماری می‌باشد بکار گرفته شد. این روش علاوه بر تجزیه و تحلیل تاثیر متغیرهای مستقل، یک مدل ریاضی را بعنوان خروجی در اختیار پژوهشگر قرار می‌دهد. روش سطح پاسخ تاکنون کاربردهای زیادی در طراحی، توسعه، فرمول‌سازی محصولات جدید غذایی و همچنین ارتقای طراحی محصولات موجود داشته است (Bas and Boyac 2007).

مواد و روش‌ها

مواد

لاکتوز مونو هیدرات، گلوکز، سدیم استات، سولفات منیزیم، سولفات منگنز، آگار و کلرید سدیم از شرکت مرک، آلمان تهیه گردیدند. تریپتون، سیستئن مونو هیدروکلراید، توئین ۸۰ و سولفات آهن از شرکت سیگما، آمریکا تهیه گردیدند. الکل ۹۶٪ مورد استفاده از شرکت رازی، ایران خریداری شد.

محیط کشت

محیط کشت‌های مورد استفاده در این پژوهش محیط کشت مایع و جامد آب پنیر (Yokoi and Watanabe 1992) تکمیل شده شامل ۱۰۰ میلی‌لیتر آب پنیر، یک گرم لاکتوز مونو هیدرات، ۰/۵ گرم گلوکوز، ۰/۵ گرم تریپتون، ۰/۰۵ گرم سیستئن مونو هیدروکلراید، ۰/۵ گرم سدیم استات، ۰/۱ میلی-لیتر توئین ۸۰، ۱ میلی‌لیتر محلول مواد معدنی و ۲ گرم آگار (در محیط جامد) بود. محلول مواد معدنی شامل ۰/۰۴ ٪ وزنی- حجمی سولفات منیزیم ۷ آبه، ۰/۰۱۵ ٪ وزنی- حجمی منگنز سولفات ۴ آبه، ۰/۰۱۸ ٪ وزنی- حجمی سولفات آهن ۷ آبه و ۰/۰۱ ٪ وزنی- حجمی کلرید سدیم بود.آب پنیر مورد استفاده در محیط کشت آگار دار با تنظیم pH شیر بدون چربی روی ۵/۵ توسط اسید لاکتیک و حرارت دادن بمدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه‌ی سلسیوس و سپس فیلتر کردن رسوبات تشکیل شده تهیه گردید. برای تهیه‌ی آب پنیر مورد استفاده در محیط مایع، pH شیر بدون چربی بوسیله‌ی افزودن هیدروکلریک اسید ۲ نرمال روی ۴/۶ تنظیم شد سپس بمدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه حرارت داده شد و پس از حذف رسوبات pH مایع بدست آمده بوسیله‌ی هیدروکسید سدیم ۲ نرمال روی ۶/۸ تنظیم شد و بمنظور تکمیل عملیات پروتئین زدایی مجددا ۳۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سلسیوس حرارت داد شد و رسوبات جداسازی شد(Wang et al., 2008) .

دانک‌های کفیر و میکروارگانیسم‌ها

دانک‌های کفیر مورد استفاده در این پژوهش از گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه تهران تهیه گردید. باکتری *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* با کشت رقت‌های متوالی از دانک‌های کفیر روی محیط کشت آگاردار آب پنیر تکمیل شده و سپس شناسایی بوسیله‌ی روشهای فنوتیپی و مولکولی، از فلور میکروبی دانک‌های کفیر جداسازی شده و مورد تایید قرار گرفت (داده‌ها نشان داده نشده است). بمنظور نگهداری از میکروارگانیسم خالص شده کشت آن در محیط تجاری MRS براث با pH اولیه‌ای برابر با ۵/۵ انجام شد و پس از گرمخانه‌گذاری بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس، سوسپانسیون باکتری با ۲۰٪ گلیسرول مخلوط شده و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار گرفت.

آماده سازی سوسپانسیون باکتری

بمنظور فعالسازی مجدد باکتری، کشت آنها روی محیط کشت آگاردار آب پنیر (Yokoi and Watanabe 1992) تکمیل شده بصورت خطی صورت گرفت. پس از گرمخانه‌گذاری بمدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس و در شرایط بی‌هوازی از کلنی-های تشکیل شده به محیط کشت آب پنیر تکمیل شده منتقل شد. این محیط پس از گرمخانه‌گذاری بمدت ۲ روز در ۳۰ درجه سلسیوس و شرایط بی‌هوازی، بعنوان مایع کشت مورد استفاده قرار گرفت.

جداسازی و خالص سازی اگزوپلی‌ساکاریدهای تولید شده

اگزوپلی‌ساکاریدهای تولید شده توسط *L. kefiranofaciens* با اصلاحاتی در روش ریمادا و آبراهام (Rimada and Abraham 2003) جداسازی شدند. بدین صورت که پس از گذشت مدّت زمان مناسب تخمیر، محیط مایع حاوی باکتری بمنظور حل شدن کفیران متصل به سلول‌ها به مدّت ۳۰ دقیقه در حمام آب

www.SID.ir

Archive of SID

°C ۹۰ حرارت داده شد. سپس محلول حاصل به مدّت ۱۵ دقیقه در دمای °C ۲۰ با دور g ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد و مواد جامد غیر محلول در آب آن، جداسازی شدند. بمنظور رسوب پلی ساکاریدهای موجود در مایع شفاف رویی حاصل از سانتریفوژ، به میزان دو برابر حجم مایع، اتانول سرد ۹۶٪ به آن افزوده شد و عمل رسوب نمودن پلی ساکارید به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس انجام گرفت. پس از گذشت زمان مذکور برای جدا کردن پلی‌ساکارید رسوب یافته از سانتریفوژ با دور g ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. رسوب حاصل مجدداً در آب داغ حل شده و استخراج به روش ذکر شده یک بار دیگر انجام شد. در نهایت کفیران استخراج شده در دمای °C ۴۲ به مدت ۴۸ ساعت خشک شد.

اندازه گیری غلظت کفیران تولید شده

اندازه‌گیری مقدار کفیران به روش دوبوئیس و همکاران انجام شد (Dubois et al., 1956). بر طبق این روش به هر نمونه ۱ میلی لیتر از محلول فنول ۵٪ و پس از آن مقدار ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ افزوده شد و پس از نگهداری در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه، جذب محلول توسط اسپکتروفتومتر (طول موج ۴۸۵ نانو متر) خوانده شد.

تعیین وزن مولکولی بیوپلیمر کفیران

بدلیل وجود ناخالصی‌های احتمالی در کفیران تولید شده پس از بهینه‌سازی تولید این پلی‌ساکارید، وزن مولکولی آن با روش کروماتوگرافی فیلتراسیونی ژلی با کمک ستون سفاروز (۱/۵×۶۰ سانتی متر) تعیین گردید. نمونه قبل از ورود به ستون توسط بافر سدیم فسفات ۰/۰۱ مولار با pH برابر ۶/۴ متعادل شد. محلول بافر سدیم کلرید ۰/۵ مولار جهت شستشو مورد استفاده قرار گرفت و دمای ستون در ۳۰ درجه سلسیوس ثابت نگه داشته شد. سرعت جریان فاز متحرک ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه بود و میزان ۵۰ میکرولیتر نمونه به ستون مورد نظر تزریق شد. به منظور تخمین وزن مولکولی این پلی ساکارید ستون توسط دکسترانهایی با وزن مولکولی متفاوت کالیبره شد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه به منظور بهینه‌سازی شرایط محیطی (سرعت همزدن ، دما و pH محیط) بر میزان تولید کفیران، از روش سطح پاسخ و طرح باکس بهنکن[1] استفاده شد. سطوح واقعی و کد شده‌ی متغیرهای مستقل در جدول (۱) نشان داده شده است. به منظور بررسی اثر متغیرها ۱۵ آزمایش مطابق جدول (۲) طراحی شدند. در این طرح نقطه‌ی مرکزی در سه تکرار جهت تعیین خطای خالص استفاده شد. آنالیز رگرسیون و ترسیم شکل‌ها توسط نرم افزار Design Expert 7.1.6 انجام شد. برای تعیین نقاط بهینه‌ی متغیرها از پاسخ‌های واحدهای آزمایشگاهی استفاده گردید و با استفاده از آنالیز رگرسیون چند متغیره، معادله‌ی چند جمله‌ای درجه‌ی دوم به صورت زیر بدست آمد.

(رابطه ۱)

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^{1} \beta_i x_i + \sum_{j=1}^{k} \beta_{ij} x_j^2 + \sum \sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j$$

در این معادله Y پاسخ پیش‌بینی شده‌ی متغیر (بازده‌ی کفیران) است. β_0، β_j، β_{jj} و β_{ij} به ترتیب ضرایب ثابت، خطی، درجه دوم و اثر متقابل رگرسیون هستند. X_i و X_j متغیرهای مستقل کد شده هستند. صحت مدل چند جمله‌ای بر اساس ضریب تبیین R^2 و R^2_{adj} تعیین شد.

جدول ۱. نمایش سطوح کدبندی و واقعی متغیر های مستقل فرآیند و مقادیر آنها

علائم	مقادیر		
	-۱	۰	۱
pH (X1)	۴/۷	۵/۵	۶/۳
دمای گرمخانه گذاری (°C) (X2)	۲۳	۳۰	۳۷
سرعت همزدن (دور در دقیقه)	۷۰	۱۲۰	۱۷۰

نتایج

تاثیر pH، دمای انکوباسیون و سرعت همزدن بر میزان تولید کفیران

در این مطالعه به منظور بهینه‌سازی شرایط محیطی (سرعت همزدن ، دما و pH محیط) بر میزان تولید کفیران، از روش سطح پاسخ و طرح Box-Behnken استفاده شد. جدول (۲) نتایج بدست آمده از این آزمایش‌ها را نشان می‌دهد. به کارگیری این روش آماری و مقایسه مقادیر مشاهده شده با مقادیر پیشگویی شده تطابق نزدیک این اعداد به مدل پیشنهادی را نشان می‌دهد. بعلاوه، همبستگی بسیار خوبی بین نتایج به دست آمده با روش تجربی و مقادیر پیشگویی شده با روش آماری بدست آمده است.

1. Box-Behnken

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. تیمارهای صورت گرفته در طرح آزمایش و نتایج حاصل

آزمون	pH	دما (°C)	سرعت همزدن (دور در دقیقه)	مشاهده شده	پیش بینی شده
		کفیران استخراج شده (گرم در لیتر)			
۱	۴/۷	۲۳	۱۲۰	۰/۱۸	۰/۰۷۹
۲	۶/۳	۲۳	۱۲۰	۰/۴۵۹	۰/۵۲۸
۳	۴/۷	۳۷	۱۲۰	۰/۴۸۹	۰/۴۲۰
۴	۶/۳	۳۷	۱۲۰	۰/۶۱۹	۰/۷۲۰
۵	۴/۷	۳۰	۷۰	۰/۲۴۱	۰/۳۶۵
۶	۶/۳	۳۰	۷۰	۰/۶۹۳	۰/۶۴۷
۷	۴/۷	۳۰	۱۷۰	۰/۳۱۴	۰/۳۶۰
۸	۶/۳	۳۰	۱۷۰	۰/۹۵۲	۰/۸۲۸
۹	۵/۵	۲۳	۷۰	۰/۴۳۲	۰/۴۰۹
۱۰	۵/۵	۳۷	۷۰	۰/۵۴۳	۰/۴۸۸
۱۱	۵/۵	۲۳	۱۷۰	۰/۲۵۶	۰/۳۱۱
۱۲	۵/۵	۳۷	۱۷۰	۰/۷۴۱	۰/۷۶۴
۱۳	۵/۵	۳۰	۱۲۰	۱/۲۳۹	۱/۰۹۹
۱۴	۵/۵	۳۰	۱۲۰	۱/۰۷۸	۱/۰۹۹
۱۵	۵/۵	۳۰	۱۲۰	۰/۹۸۱	۱/۰۹۹

جدول آنالیز واریانس (جدول۳) برای بررسی معنادار بودن اثرات خطی، درجه دوم و متقابل ضرایب مدل رگرسیون برای هر پاسخ مورد استفاده قرار گرفت.

همان طور که در جدول تجزیه واریانس مشخص است مقادیر P برای عبارات خطی، درجه دوم و اثرات متقابل مربوط به مدل رگرسیونی درجه دوم تولید کفیران به ترتیب برابر با ۰/۰۳۲ ، ۰/۰۰۷ و ۰/۵۵۷ بودند که نشان دهنده‌ی معنادار بودن مدل برای عبارات خطی و درجه دوم است. مدل ها و عبارت-هایی که مقدار P آنها از ۰/۰۵کمتر باشد، از لحاظ آماری می-توانند داده ها را با خطای کمتر از ۵ درصد پیش بینی کنند. عبارت‌هایی که مقدار P آنها بیشتر از ۰/۰۵ باشد، وارد مدل نمی‌شوند. در واقع هرچه مقدار P یک عبارت کوچک تر باشد معنای آن عبارت در مدل بیشتر خواهد بود (Ravikumar et al., 2007).

نتایج نشان داده شده در جدول حاکی از آن است که اثرات خطی مربوط به pH اولیه محیط و دمای گرمخانه‌گذاری تاثیر معنادار بر تولید کفیران داشته اما اثر خطی مربوط به فاکتور سرعت همزدن فاقد تاثیر معنادار بر تولید کفیران می‌باشد. از طرفی اثرات متقابل هیچ یک از متغیرها معنی‌دار نبود. همانطوری که در جدول (۴) نشان داده شده است، عدم برازش برای پاسخ مورد نظر در سطح اطمینان ۹۵٪ معنادار نمی‌باشد. بنابراین بالا بودن ضریب تبیین و معنی دار نبودن عدم برازش برای آن، صحت مدل را برای برازش اطلاعات تأیید می‌کند. به منظور گزینش مدل مناسب، مدل‌های تجربی برای پیش‌بینی پاسخ، روابط خطی و چندجمله‌ای درجه دوم بر داده‌های تجربی بدست آمده از آزمایش و پیش بینی شده، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

جدول ۳ آنالیز واریانس به دست آمده از مدل درجه دوم برای کفیران تولید شده

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش F	ارزش P
مدل	۱/۳۹	۹	۰/۱۵	۷/۳۱	۰/۰۲۰۶
اثرات خطی	۰/۴۳۸۳۲	۳	۰/۱۴۶	۶/۸۹	۰/۰۳۲
(X1) pH	۰/۲۸	۱	۰/۲۸	۱۳/۲۵	۰/۰۱۴۹
دمای گرمخانه گذاری (X2)	۰/۱۴	۱	۰/۱۴	۶/۶۹	۰/۰۴۹۰
سرعت همزدن (X3)	۰/۰۱۶	۱	۰/۰۱۶	۰/۷۴	۰/۴۲۹۲
اثرات درجه دوم	۰/۹۰۷	۳	۰/۳۰۲۴	۱۴/۲۷	۰/۰۰۷
X12	۰/۳۴	۱	۰/۳۴	۱۵/۹۷	۰/۰۱۰۴
X22	۰/۴۸	۱	۰/۴۸	۲۲/۵۵	۰/۰۰۵۱
X32	۰/۲۲	۱	۰/۲۲	۱۰/۵۹	۰/۰۲۲۶
اثرات متقابل	۰/۰۴۹۱۷	۳	۰/۰۱۶	۰/۷۷	۰/۵۵۷
X1X2	۰/۰۰۵۵۵	۱	۰/۰۰۵۵۵	۰/۲۶	۰/۶۳۰۶
X1X3	۰/۰۰۸۶۴۹	۱	۰/۰۰۸۶۴۹	۰/۴۱	۰/۵۵۱۰
X2X3	۰/۰۳۵	۱	۰/۰۳۵	۱/۶۵	۰/۲۵۵۲
خطای باقی‌مانده	۰/۱۱	۵	۰/۰۲۱	-	-
عدم تطابق با مدل	۰/۰۷۲	۳	۰/۰۲۴	۱/۴۱	۰/۴۴۰
خطای خالص	۰/۰۳۴	۲	۰/۰۱۷	۱/۴۱	۰/۴۳۹۹

مقادیر بالای R^2 و R^2 تعدیل شده نشان دهنده مناسب بودن مدل است (جدول ۴).

جدول ۴. آنالیز آماری مدل پیش بینی یافته بر پاسخ

منبع	R-Squared	Adj R-Squared
درجه دوم	٪۹۲/۹۴	٪۸۰/۲۳

با آنالیز رگرسیون این داده‌ها، معادله متغیرهای pH، دما و سرعت همزنی بر روی تولید کفیران به صورت زیر بیان شد:

$$Kefiran\ (g/L) = -۲۲/۵۷ + ۵/۵۰X_۱ + ۰/۴۶۴X_۲ - ۰/۴۷۳X_۱^۲ - ۰/۰۰۷۳۴X_۲^۲ - ۰/۰۰۰۰۹۹X_۳^۲ \quad \text{(رابطه۲)}$$

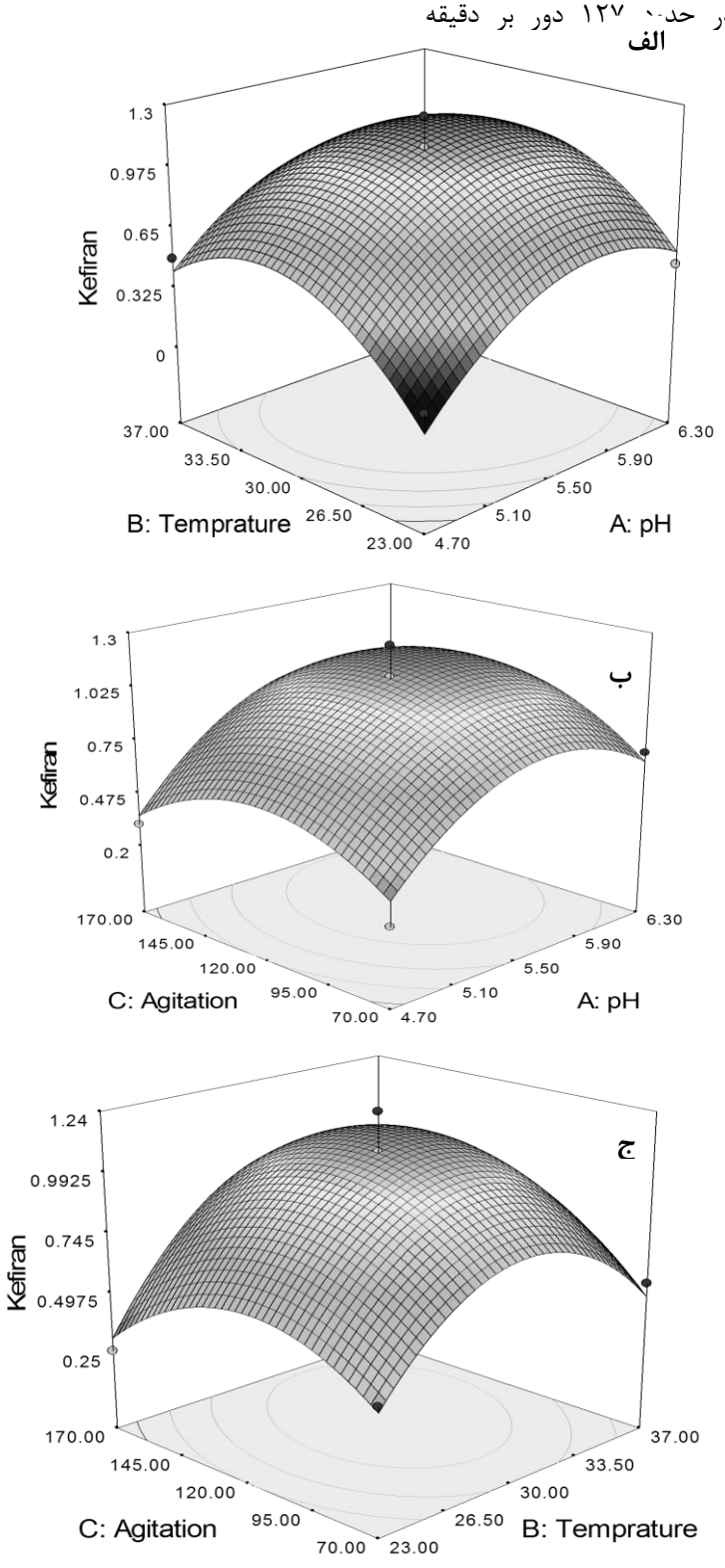
ترسیم مدل به کمک نمودارهای سطح پاسخ و یافتن نقاط بهینه

برای بررسی ارتباط بین متغیر های مستقل و وابسته از نمودار

www.SID.ir

Archive of SID

سه بعدی سطح پاسخ رسم شده توسط مدل استفاده شد. در هر نمودار اثر دو متغیر در حالتی که متغیر سوم در نقطه مرکزی قرار دارد، بررسی گردیده است. با نگاه به این نمودارها می توان دریافت که بیشترین میزان تولید مربوط به محدوده‌ای با pH محیط در حدود۵/۷، دمای گرمخانه‌گذاری در حدود ۳۱ درجه سلسیوس و سرعت همزدن در حد۰ ۱۲۷ دور بر دقیقه می‌باشد. همانطور که از نمودارها مشخص است افزایش هر سه فاکتور تا حدود بیان شده موجب افزایش در میزان تولید کفیران شده است اما افزایش بیشتر مقدار این فاکتورها موجب مهار تولید کفیران شده است.



شکل ۱. نمودار سطح پاسخ مربوط به اثرات متقابل (الف) دما و سرعت همزدن (ب) سرعت همزدن وpH

www.SID.ir

Archive of SID

(ج) سرعت همزدن و دما بر بازده تولید کفیران تولید شده توسط ***L.kefiranofaciens***.

یافتن نقاط بهینه و تایید مدل پیشنهادی

به منظور یافتن بهینه شرایط کشت برای تولید کفیران معادله‌ی (۲) حل گردید. حل این معادله نشان داد که بیشترین میزان تولید کفیران توسط باکتری *L. kefiranofaciens* (۱/۱۴۴ گرم درلیتر) در pH ۵/۷۵، دمای گرمخانه‌گذاری ۳۱/۳۴ درجه سلسیوس و سرعت همزدن ۱۲۷/۵۷ دور بر دقیقه بدست می‌آید. به منظور تایید مدل،کشت در شرایط بهینه در سه تکرار انجام شد. نتایج بدست آمده (۱/۳، ۱/۰۵ و ۱ گرم در لیتر) مدل پیشنهادی را تصدیق می‌کنند. این نتایج نشان می دهند که مدل توانسته تا حدود زیادی اثر ۳ متغیر دما، pH و سرعت همزدن را جهت تولید کفیران توسط باکتری *L. kefiranofaciens* نشان دهد.

تعیین خلوص کفیران تولید شده

میزان قند کل نمونه بمنظور تعیین خلوص کفیران تولید شده به روش فنول- سولفوریک اسید، میزان ۹۸٪ اندازه‌گیری شد. اگزو پلی ساکارید خالص شده پاسخ منفی به روش Bradford نشان داد و هیچ جذبی در طول موج ۲۸۰ و ۲۶۰ فرابنفش مشاهده نشد که نشان دهنده‌ی عدم حضور پروتئین و اسید نوکلئیک در نمونه می‌باشد. کروماتوگرافی فیلتراسیونی ژلی توزیع یکنواختی را نشان داد. با مقایسه‌ی نتایج و رگرسیون نمودار بدست آمده از منحنی کالیبراسیون دکستران استاندارد و منحنی کفیران تولید شده میزان وزن مولکولی این بیوپلیمر $۱/۱ \times ۱۰^{۶}$ دالتون تعیین شد.

نتایج و بحث

بر طبق نتایج ، شرایط محیطی بهینه برای تولید کفیران توسط کشت خالص *Lactobacillus kefiranofaciens* در pH اولیه برابر ۵/۷ ، دمای ۳۱ درجه‌ی سلسیوس و سرعت همزدن ۱۲۷ دور در دقیقه بدست آمد. بیشترین غلظت کفیران ۱/۱۴۴۳ گرم بر لیتر بود. pH و دمای بهینه‌ی بدست آمده در این پژوهش شباهت زیادی با نتایج گزارش شده در مطالعات پیشین دارد. (Yokoi et al)، گزارش کردند که دمای ۳۰ درجه سلسیوس و pH برابر ۵ برای تولید کفیران توسط باکتریهای لاکتیک اسید جدا شده از دانک‌های کفیر مناسب می‌باشد. آنها راندمان در pH برابر ۵/۵ را ۹۳٪ راندمان در pH برابر ۵ گزارش کردند که نشاندهنده‌ی عدم تفاوت قابل توجه برای این دو مقدار بود (Yokoi and Watanabe 1992). Yeesang و همکاران pH و دمای بهینه برای تولید کفیران توسط کشت خالص این باکتری در محیط کشتی حاوی نشاسته‌ی Sago بعنوان منبع کربن را به‌ترتیب برابر ۵/۵ و ۳۰ درجه‌ی سلسیوس گزارش کردند (Yeesang et al. 2008). همچنین Cheirsilp و Radchabut نیز در بهینه سازی شرایط تولید کفیران توسط کشت مخلوط *Lactobacillus kefiranofaciens* و مخمر ساکارومیسز سرویزیه pH برابر ۵/۵ را بعنوان مقدار بهینه گزارش کردند (Cheirsilp and Radchabut 2011). بررسی محققان نشان داده است pH مناسب برای رشد باکتریهای لاکتیک اسید برابر ۵/۵ می‌باشد (Gassem et al., 1997; Yokota et al., 1995). رشد باکتریهای لاکتیک اسید در pH های بالاتر از این مقدار به آهستگی انجام می‌شود از طرفی در pHهای اولیه‌ی کمتر از این مقدار تاثیر مهارکنندگی لاکتیک اسید تولید شده توسط این باکتری‌ها در محیط، نسبت به pH های اولیه‌ی بالاتر تشدید می‌شود و این امر در نهایت منجر به تولید کمتر کفیران می‌شود (Cheirsilp and Radchabut 2011). دمای ۳۱ درجه‌ی سلسیوس دمای بهینه برای تولید کفیران شناخته شد. پژوهشهای دیگر در ارتباط با تاثیر دما روی تولید محصولات زیستی توسط باکتریهای لاکتیک اسید نتایج این پژوهش را تایید می‌کنند. در محدوده‌ی دمایی ۳۰-۲۵ درجه‌ی سلسیوس رشد باکتری *Lactobacillus kefiranofaciens* بخوبی انجام می‌شود. در دماهای پایین‌تر رشد این باکتری بخوبی صورت نمی‌گیرد و افزایش دما احتمالا موجب مهار رشد سلولی و کاهش میزان تولید کفیران می‌شود (Yeesang et al., 2008).

در بررسی تاثیر سرعت همزدن بر تولید کفیران مشاهده شد با افزایش دور تا ۱۲۷ دور در دقیقه میزان تولید کفیران افزایش یافت اما در مقادیر بالاتر سرعت همزدن ، تولید کفیران کاهش یافت. با توجه به نتایج احتمال می‌رود در دورهای پایین عدم دسترسی مناسب میکروارگانیسم‌ها به مواد مغذی موجب عدم رشد مناسب و کاهش تولید کفیران شود اما با افزایش دور تا ۱۲۷ دور در دقیقه بدلیل تلاطم ایجاد شده در محیط همه‌ی میکروارگانیسم‌ها دارای شرایط یکسان از لحاظ دسترسی به مواد مغذی می‌باشند. در توضیح کاهش میزان تولید کفیران با افزایش سرعت همزنی به بالاتر از ۱۲۷ دور در دقیقه می‌توان گفت با توجه به اینکه باکتری مورد نظر کم هوا دوست بوده و گزارش شده است که تولید کفیران توسط آن در شرایط کم هوا دوست افزایش می‌یابد (Cheirsilp and Radchabut 2011) ، احتمال می رود با افزایش تلاطم ایجاد شده در دورهای بالاتر از ۱۲۷ دور در دقیقه، میزان هوادهی به درون محیط کشت افزایش یافته و این امر موجب کاهش رشد باکتری و میزان تولید کفیران توسط آن شود.

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهش‌های محققان نشان داده است که وزن مولکولی و ساختار پلی‌ساکاریدها با عملکرد غذایی و دارویی آنها ارتباط نزدیکی دارد. بطور مثال مشخص شده است که وزن مولکولی پلی‌ساکارید تولید شده توسط *Sinorhizobium meliloti* مسئول عملکرد سین‌بیوتیکی آن می‌باشد از طرفی وزن مولکولی خود تحت تاثیر عواملی از جمله ترکیبات موجود در محیط کشت و نوع میکروارگانیسم قرار می گیرد (Wang and Bi 2008). از این رو تعیین وزن مولکولی این بیوپلیمر می‌تواند بر تعیین عملکردهای آن تاثیرگذار باشد. همانطور که گفته شد وزن مولکولی این بیوپلیمر برابر ۱/۱ ×۱۰^{۶} دالتون تعیین شد که این نتایج، با نتایج حاصل از پژوهش‌های پیشین همخوانی دارد برای مثال وزن مولکولی کفیران توسط پژوهشگران دیگر برابر ۱/۵ ×۱۰^{۵} (Wang et al., 2008)، برابر ۱۰^{۷} (Piermaria et al., 2008) و برابر ۱/۳۵ ×۱۰^{۶} (Ghasemlou et al., 2012) گزارش شده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به خواص تکنولوژیکی و بیولوژیکی منحصر بفرد کفیران هدف از این مطالعه بررسی اثر pH، دما و سرعت همزدن بر میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید کفیران در کشت خالص باکتری *Lactobacillus kefiranofaciens* بود. نتایج نشان داد کنترل شرایط محیطی می‌تواند موجب افزایش راندمان تولید کفیران شود. شرایط بهینه برای کشت خالص باکتری *Lactobacillus kefiranofaciens*، pH برابر ۵/۷، دمای ۳۱ درجه‌ی سلسیوس و سرعت همزدن ۱۲۷ دور در دقیقه تعیین گردید. وزن مولکولی این بیوپلیمر برابر ۱/۱ ×۱۰^{۶} دالتون اندازه‌گیری شد که در محدوده اعداد گزارش شده توسط پژوهشگران پیشین است. مقادیر بالای R^2 وR^2 تعدیل شده نشاندهنده مناسب بودن طرح روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی تولید کفیران است. با توجه به نتایج بدست آمده مطالعات بعدی در زمینه‌ی بهینه‌یابی شرایط تولید کفیران در کشتهای fed-batch برای افزایش راندمان تولید این بیوپلیمر سودمند، مفید واقع خواهد شد.

سپاس گزاری

نگارندگان مقاله برخود لازم می‌دانند از شرکت لبنیات سحر و تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی نمایند.

REFERENCES

Bas, D. and İ. H. Boyac (2007). "Modeling and optimization II: Comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction." *Journal of Food Engineering* 78(3): 846-854.

Celik, G. Y., B. Aslim and Y. Beyatli (2008). "Characterization and production of the exopolysaccharide (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains." *Carbohydrate polymers* 73(1): 178-182.

Cheirsilp, B. and S. Radchabut (2011). "Use of whey lactose from dairy industry for economical kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in mixed cultures with yeasts." *New biotechnology* 28(6): 574-580.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. Rebers and F. Smith (1956). "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." *Analytical chemistry* 28(3): 350-356.

Garcia-Garibay, M. and V. Marshall (1991). "Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*." *Journal of applied bacteriology* 70(4): 325-328.

Gassem, M., K. Schmidt and J. Frank (1997). "Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*." *Journal of food science* 62(1): 171-173.

Ghasemlou, M., F. Khodaiyan, K. Jahanbin, S. M. T. Gharibzahedi and S. Taheri (2012). "Structural investigation and response surface optimisation for improvement of kefiran production yield from a low-cost culture medium." *Food Chemistry* 133(2): 383-389.

Hamet, M. F., A. Londero, M. Medrano, E. Vercammen, K. Van Hoorde, G. L. Garrote, G. Huys, P. Vandamme and A. G. Abraham (2013). "Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefiranofaciens* in microbial consortia present in kefir grains." *Food microbiology* 36(2): 327-334.

Matsukawa, S. and T. Watanabe (2007). "Gelation mechanism and network structure of mixed solution of low-and high-acyl gellan studied by dynamic viscoelasticity, CD and NMR measurements." *Food Hydrocolloids* 21(8): 1355-1361.

Piermaria, J. A., M. L. de la Canal and A. G. Abraham (2008). "Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain." *Food hydrocolloids* 22(8): 1520-1527.

Piermaria, J. A., A. Pinotti, M. A. Garcia and A. G. Abraham (2009). "Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization." *Food hydrocolloids* 23(3): 684-690.

Ravikumar, K., S. Krishnan, S. Ramalingam and K. Balu (2007). "Optimization of process variables by the application of response surface methodology for dye removal using a novel adsorbent." *Dyes and Pigments* 72(1): 66-74.

Rimada, P. S. and A. G. Abraham (2003).

www.SID.ir

Archive of SID

"Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by kefir grains in milk and whey." *Le Lait* 83(1): 79-87.

Roeselers, G., M. Van Loosdrecht and G. Muyzer (2008). "Phototrophic biofilms and their potential applications." *Journal of applied phycology* 20(3): 227-235.

Sutherland, I. W. (1998). "Novel and established applications of microbial polysaccharides." *Trends in biotechnology* 16(1): 41-46.

Toba, T., S. Abe, K. Arihara and S. Adachi (1986). "medium for the isolation of capsular bacteria from kefir grains." Agricultural and biological chemistry.

Vuyst, D. and V. de Ven (1998). "Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis." *Journal of Applied Microbiology* 84(6): 1059-1068.

Wang, M. and J. Bi (2008). "Modification of characteristics of kefiran by changing the carbon source of *Lactobacillus kefiranofaciens*." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88(5): 763-769.

Wang, Y., Z. Ahmed, W. Feng, C. Li and S. Song (2008). "Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir." *International journal of biological macromolecules* 43(3): 283-288.

Yeesang, C., S. Chanthachum and B. Cheirsilp (2008). "Sago starch as a low-cost carbon source for exopolysaccharide production by *Lactobacillus kefiranofaciens*." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(7): 1195-1201.

Yokoi, H. and T. Watanabe (1992). "Optimum culture conditions for production of kefiran by *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains." *Journal of fermentation and bioengineering* 74(5): 327-329.

Yokota, A., S. Amachi, S. Ishii and F. Tomita (1995). "Acid sensitivity of a mutant of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2 with reduced membrane-bound ATPase activity." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 59(10): 2004-2007.

www.SID.ir