بررسی عوامل موثر در تولید دکستران توسط یک سویه بومی پرتولید *Leuconostoc mesentroides*

جواد حامدی*[۱]، علی مخدومی کاخکی[۲]، اعظم حسنی نسب[۲]

[۱]آزمایشگاه بیوتکنولوژی میکربی، بخش میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

[۲]گروه پژوهشی میکروبیولوژی کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

* مسئول مکاتبات- آدرس الکترونیکی: *jhamedi@ut.ac.ir*

(دریافت: ۸۷/۹/۸ ؛ پذیرش:۸۸/۶/۲)

چکیده

دکستران یک پلیمر پلی ساکاریدی $(C_6H_{10}O_5)_n$ شامل مونومرهای گلوکز است. این پلیمر زیستی به علت داشتن خواص غیر یونی و پایداری در شرایط عملیاتی کاربردهای گسترده‌ای در صنایع غذایی، دارویی، بیوشیمیایی و دیگر صنایع پیدا کرده است. در این پژوهش، اثر عوامل مهم موثر بر تولید دکستران توسط ***Leuconostoc mesentroides* UTMC00118** مطالعه شده است. نتایج به دست آمده نشان می دهد که شرایط بهینه عبارت است از **pH** ۹، **۳۲°C**، **۵۰ g/l** سوکروز، **۲۰g/l** عصاره مخمر، میزان مایه تلقیح ٪۱۰ (حجم/حجم) و بدون نیاز به هوادهی. به منظور یافتن ترکیبات محیط کشت ارزان قیمت محلی، غلظت‌های مختلف ملاس چغندر قند و عصاره حاصل از مخمر نانوایی برای تولید دکستران آزمایش شد. بر اساس نتایج به دست آمده غلظت‌های **۴۰g/l** ملاس و **۲۰g/l** عصاره مخمر نانوایی بهترین غلظت‌های این ترکیبات برای تولید دکستران است. با اعمال شرایط بهینه میزان تولید نسبت به شرایط اولیه ۳/۵ برابر افزایش یافته و به**g/l** ۸۰ رسیده است. این نتایج می تواند موجب کاهش هزینه تولید دکستران با استفاده از منابع ارزان قیمت شود.

واژه‌های کلیدی:

مقدمه

دکستران یک پلیمر پلی ساکاریدی شامل مونومرهای گلوکز است که عمدتاً (٪۹۵) با پیوند (۶و۱)α به یکدیگر متصل شده اند. در ساختار این ترکیب تعداد کمی (۳و۱)α و یا (۴و۱)α و یا (۲و۱)α در زنجیره‌های جانبی دیده می شود. دکستران توسط برخی سویه‌های *Leuconostoc mesentroides* ، سویه‌های *Streptococcus* ، *Acetobacter* ، *Rhizopus* و *Lactobacillus* تولید می شود. تولید صنعتی دکستران به علت بازده بیشتر توسط *Leuconostoc mesenteroides* انجام می‌شود.

دکستران به علت داشتن خواص غیر یونی و پایداری در شرایط عملیاتی مانند حرارت، اسید و قلیا، افزایش ویسکوزیته، حلالیت در آب و روغن، امکان تشکیل فیلم، خاصیت نگهداری آب کاربردهای گسترده‌ای در صنایع غذایی، دارویی، بیوشیمیایی و دیگر صنایع پیدا کرده است.

عمده ترین کاربرد تجاری دکستران در صنایع داروسازی به عنوان جایگزین پلاسمای انسانی در موارد خونریزی، سوختگی و جراحی است (Jørgensen *et al.* 1997; Barker *et al.* 1993). ترکیب دکستران و آهن در درمان کم خونی ناشی از کمبود آهن و در شرایط عدم امکان تجویز خوراکی آهن یا نیاز به ذخیره سریع آهن در نوزادان و زنان باردار استفاده می شود (Faich & Strobos 1999). دکستران با پیوندهای متقاطع در بیوشیمی به عنوان صافی ملکولی و در صنایع غذایی به عنوان قوام دهنده و امولسیفایر کاربرد دارد (Kato *et al.* 1990). دکستران سولفات به اتصال با اسیدهای نوکلئیک تمایل دارد و یک ممانعت کننده مناسب برای عملکرد ریبونوکلئوزها است. این ترکیب با مهار آنزیم ترانسکریپتاز معکوس می تواند در درمان HIV به کار رود (Mitsuya *et al.* 1988; Mathes *et al.* 1991) همچنین دکستران سولفات برای درمان بیماریهای آرترواسکلروز در ژاپن استفاده شده است (Leitinger 1996). دکستران همچنین در صنایع غذایی به عنوان افزودنی در محصولاتی مانند شکلات‌ها و بستنی‌ها استفاده می شود (McKenna 2003). برخی ترکیبات دکستران به عنوان امولسیون کننده، صمغ‌های با ویسکوزیته بالا، دفولوکوله کننده‌ها در محصولات کاغذ و در بهبود ثانویه بنزین کاربرد دارد (Blijdenstein *et al.* 2004). مشتق دیگر دکستران به نام مرکاپتودکستران نیز تمایل بالایی نسبت به یونهای فلزات سنگین مانند نقره، جیوه و مس دارد و بنابراین

Archive of SID

www.SID.ir

می‌توان از آن در درمان مسمومیت‌های با فلزات سنگین (Naessens 2004) و یا حذف آلودگی فلزات سنگین در محیط استفاده کرد (Norberg & Persson 1984).

برای تولید هر فراورده بیوتکنولوژیک از جمله دکستران نیاز به بهینه سازی سویه مولد محصول، شرایط تولید (شامل عوامل محیطی و نیز ترکیب محیط کشت) است. هدف این پژوهش تعیین شرایط بهینه تولید دکستران با استفاده از یک سویه پرتولید *Leuconostoc mesentroides* است.

مواد و روش کار

باکتری مولد دکستران: در این پژوهش از باکتری *Leuconostoc mesentoides* UTMC00118 استفاده شده است. این سویه از یک نمونه کلم شور در آزمایشگاه بیوتکنولوژی میکربی دانشکده زیست شناسی دانشگاه تهران در سال ۱۳۷۵ جدا و پس از شناسایی به روش‌های استاندارد در بانک میکربی دانشگاه تهران با کد UTMC00118 ذخیره شده است.

محیطهای کشت: برای کشت سویه مولد از محیط MRS آگار با ترکیبات زیر استفاده شد (g/l): پپتون کازئین ۱۰، عصاره گوشت ۸، عصاره مخمر ۴، D (+) گلوکز ۲۰، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۲، توئین هشتاد ۱، دی آمونیوم هیدروژن سیترات ۲، سدیم سیترات ۵، منیزیم سولفات ۰/۲، منگنز سولفات ۰/۰۴ و آگار ۱۵ (De Man *et al.* 1960). این ترکیبات با یکدیگر مخلوط شده و در دمای ۱۱۵°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. به منظور فعال سازی ویال‌های لیوفیلیزه باکتری و نیز تهیه پیش کشت (seeding) از محیط کشت MRS برات استفاده شد و برای تهیه این محیط، آگار از ترکیبات فوق حذف گردید. برای تولید دکستران از محیط کشت پایه تولید دکستران با ترکیبات زیر استفاده شد (g/l): عصاره مخمر ۲۰، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۸ و سوکروز ۴۰. این اجزاء با یکدیگر مخلوط شده و در دمای ۱۲۱ °C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند.

تهیه عصاره مخمر: برای تهیه عصاره مخمر نانوایی، ۵۰ گرم مخمر نانوایی تهیه شده از شرکت ایران مایه (تهران، ایران) در ۱۰۰۰ml آب مقطر سوسپانسیون و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C اتوکلاو شد. سپس ترکیب حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفوژ شده و حجم مایع رویی دقیقاً محاسبه و معادل ۵۰ گرم در لیتر عصاره مخمر در نظر گرفته شده و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شد. در هنگام تهیه محیط کشت بسته به غلظت مورد نیاز عصاره مخمر، حجم معادل آن محاسبه و به محیط اضافه شد. لازم به ذکر است که معادل حجم عصاره مخمر به کار رفته، از حجم آب مصرفی کاسته شد.

شرایط تولید: ویال لیوفیلیزه *Leuconostoc mesentroides* UTMC00118 در شرایط آسپتیک باز شده و پس از تهیه سوسپانسیون در لوله آزمایش درپیچ دار دارای محیط کشت MRS برات تلقیح وبه مدت ۳ روز در دمای ۳۰°C در انکوباتور بیهوازی دارای ۵٪ CO2 نگهداری شد. پس از نمونه برداری و آزمایش میکروسکوپی و اطمینان از عدم آلودگی، به میزان ۵٪ (حجم به حجم) به فلاسک‌های ارلن مایر با حجم ۲۵۰ml دارای ۷۵ml محیط کشت MRS برات تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور در ۵۰rpm نگهداری شد. در پایان دوره انکوباسیون، سلولها در شرایط آسپتیک در ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴°C سانتریفوژ شد. سپس به منظور حذف اثر بقایای محیط کشت در پاسخ‌ها، بیوماس حاصل چندبار با سرم فیزیولوژیک سترون شسته شد و سوسپانسیونی از سلولهای *L. mesentroides* UTMC00118 با غلظت $۱/۵\times ۱۰^{۸}$ سلول در میلی لیتر تهیه شد. برای تنظیم تعداد سلولها از روش تعیین میزان جذب نور در طول موج ۶۰۰nm استفاده شد. سپس به میزان ۵٪ حجم به حجم به فلاسک‌های ارلن مایر با حجم ۲۵۰ml دارای ۷۵ml محیط پایه تولید دکستران تلقیح و به منظور جلوگیری از نفوذ اکسیژن دهانه فلاسک‌های بسته شده با پنبه، با پارافیلم نیز مسدود شد. تیمارهای مورد بررسی شامل دما (۲۵°C-۳۵°C)، pH اولیه محیط کشت (۱۲-۴) و دور همزن (۱۵۰rpm-۰)، غلظت‌های مختلف سوکروز با درجه خوراکی-شکر (۶۰g/l-۳۰)، ملاس (تهیه شده از شرکت بیدستان، قزوین، ایران) (۵۰g/l-۱۰)، عصاره مخمر (Merck) (۴۰g/l-۰)، عصاره مخمر نانوایی (۴۰g/l-۰) و غلظت‌های مختلف مایه تلقیح (inoculum) (۲۰٪-۱٪حجم به حجم) در تولید دکستران بوده است. هر یک از عوامل فوق به فلاسک‌های دارای محیط پایه تولید اضافه شده است. در هنگام بررسی اثر منابع کربن و نیتروژن، این منابع جایگزین منابع کربن یا نیتروژن محیط کشت پایه تولید شده است.

سنجش‌های انجام شده

pH: به روش معمول و به کمک pH متر رومیزی انجام شد.

مورفولوژی سویه: از هر فلاسک نمونه برداری و پس از رنگ آمیزی به روش گرم به کمک میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰۰ مطالعه شد.

دکستران تولید شده: به منظور ارزیابی میزان دکستران تولید شده از روش اصلاح شده Qader و همکاران (۲۰۰۵) استفاده شد. به این منظور 5ml محیط کشت حاوی دکستران درون لوله‌های فالکون ۵۰ml ریخته شد و به آن۱۰ml اتانول سرد (نگهداری شده در دمای ۴°C) اضافه گردید و در ۴۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصل جدا شده و مایع رویی مجدداً با اتانول استخراج شد و رسوب احتمالی تشکیل شده به رسوب مرحله قبلی اضافه شد. این عمل ۳ بار تکرار گردید. دکسترانهای رسوب کرده جمع آوری شده و با ترازوی با دقت ۰/۱ mg توزین شد. با توجه به اینکه در روشهای سنجش مبتنی

Archive of SID

www.SID.ir

بر استخراج، امکان استخراج ٪۱۰۰ ماده مورد نظر وجود ندارد، بنابراین برای در نظر گرفتن بازده استخراج و افزایش دقت آزمایش، در هر بار سنجش، ۲ گرم دکستران استاندارد (Sigma) در ml ۵۰ آب مقطر به کمک حرارت حل شد. پس از سرد شدن دکستران مجدداً به روش مذکور استخراج و توزین گردید. مقدار واقعی دکستران تولید شده از معادله زیر محاسبه شد: وزن دکستران تولید شده = وزن دکستران استخراج شده از مایع فرمانتاسیون× (وزن دکستران استاندارد استخراج شده / وزن دکستران استاندارد توزین شده). برای تائید دکستران بودن پلیمر تولید شده از روش FT-IR استفاده شد. به این منظور یک نمونه تولید شده و نیز دکستران استاندارد(Sigma Co.) با استفاده از CaBr به صورت قرص‌های بسیار شفاف در آمده و طیف جذب آن در ناحیه فروسرخ (400-4000nm) با استفاده از دستگاه FTIR (Germany) Bruker مدل Tensor 27 تعیین شد.

میزان سوکروز باقیمانده: پس از رسوب دکستران، از مایع رویی برای اندازه گیری سوکروز باقیمانده به روش فنل سولفوریک اسید استفاده شد (Dobois *et al.* 1956). به این منظور در لوله‌های درپیچ دار، به ml ۰/۵ از رقت مناسب از مایع فرمانتاسیون، ml ۰/۵ فنل اضافه گردید. پس از همزدن لوله‌ها، به هر لوله ml ۲/۵ اسید سولفوریک غلیظ (٪۹۸) اضافه شد و لوله‌ها مجددا ورتکس شد و ۱۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. سپس لوله‌ها در حمام آب گرم ^{o}C ۲۵ به مدت ۲۵ دقیقه نگهداری شد و پس از آن جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۸۸nm با کمک اسپکتروفتومتر(Shimadzu, Model 120A, Japan) اندازه گیری شد. غلظت سوکروز باقیمانده در محیط با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد. برای تهیه منحنی استاندارد غلظت‌های ۱۰ -۱۰۰ میکروگرم بر لیتر از سوکروز تهیه گردید و به روش فوق جذب آنها سنجیده شد.

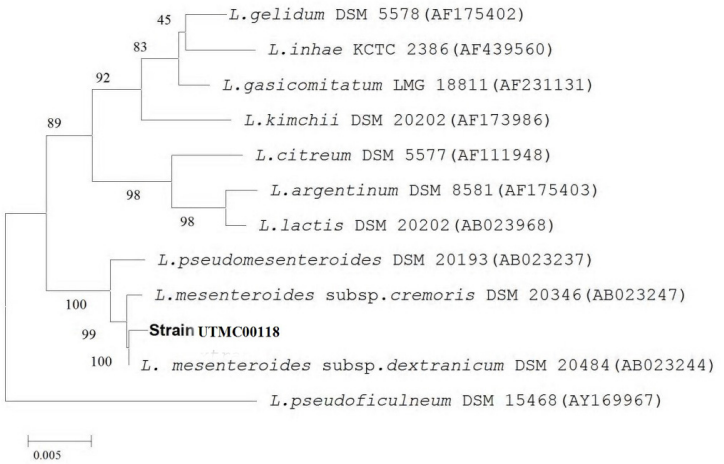
نتایج و بحث

در این پژوهش اثر عوامل مختلف موثر بر رشد *L. mesentroides* UTMC00118 و تولید دکستران در کشت‌های بسته بررسی شده است. سویه مورد استفاده از کلم شور و بر روی محیط MRS agar جداشده است. این سویه گرم مثبت، ناتوان در حرکت، دارای ظاهر تیپیک کوکوس‌های دوتایی تخم مرغی شکل در زیر میکروسکوپ، ناتوان در تولید اسپور، کاتالاز منفی، بیهوازی اختیاری، هتروفرمانتاتیو، غیرپروتئولیتیک، ناتوان در تولید اندول، ناتوان در احیاء نیترات، مقاوم به ونکومایسین،و قادر به تولید پلیمر خارج سلولی (دکستران) بر روی محیط BHIagar دارای (w/v) ٪۵ سوکروز بوده است. همچنین سویه قادر به تولید D(-) لاکتیک اسید از گلوکز بوده است. سویه توانایی رشد در (w/v) ٪۶/۵ نمک را نداشته و در مصرف آرژینین ناتوان بوده است. ترادف ژن 16SrRNA سویه مذکور، ٪۹۹/۵۸ شباهت با *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* DSM 20484 داشته است. در شکل ۱ دندروگرام میزان شباهت ترادف با ۱۲ سویه شناخته شده آورده شده است.

برای بررسی هر تیمار، ۳ بچ و هر بچ شامل ۳ تکرار انجام شده است. داده‌های ارائه شده شامل میانگین ۹ تکرار حاصل بعد از محاسبه انحراف معیار و آنالیز واریانس یکطرفه است. میزان خطای معیار در نمودارها نشان داده است. طراحی آزمایشهای مربوطه بر اساس روش یک عامل در یک زمان (one-factor at a time) انجام شده و پس از بررسی هر عامل و یافتن شرایط بهینه، عامل بعدی در شرایط بهینه عامل قبلی بررسی شده است.

بررسی اثر pH بر تولید دکستران

در شکل ۲ نتایج بررسی اثر pH اولیه محیط کشت پایه تولید در بازه ۴- ۱۲ در تولید دکستران نشان داده شده است. نتایج به دست آمده

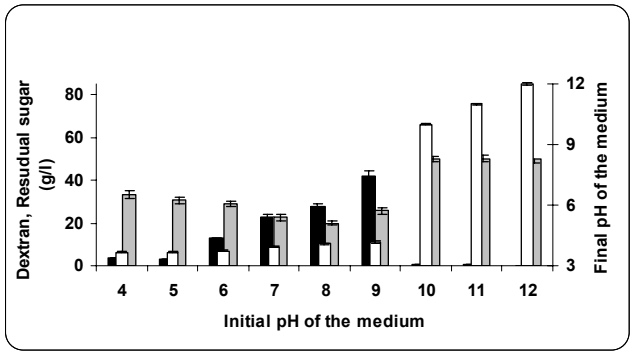


شکل ۱- دندروگرام فیلوژنتیک بر اساس ژن 16SrRNA، در شکل فواصل تکاملی با استفاده از روش neighbor-joining نشان داده شده که نشانگر موقعیت فیلوژنیتک سویه UTMC00118 با سویه‌های دارای بیشترین مشابهت است.

Archive of SID

www.SID.ir

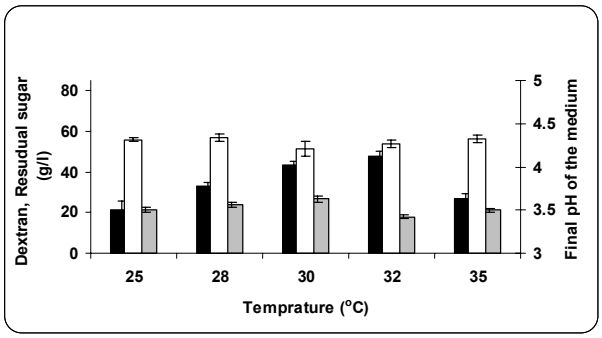
نشان می دهد که در فلاسک‌های دارای pH ۹-۴ رشد باکتری دیده شده ولی در محیط‌های کشت دارای pH بیش از ۹ رشد مشاهده نشده است. پس از اتمام دوره کشت، pH در محیط‌های که باکتری در آنها قادر به رشد و تولید دکستران بود بین ۲-۵ واحد کاهش پیدا کرده و پس از تولید دکستران pH محیط به حدود ۴ رسیده است. همانطور که مشاهده می شود بیشترین دکستران تولید شده در محیط دارای pH اولیه ۹ به دست آمده است ولی در pHهای بالاتر (۱۰-۱۲) تولید دکستران متوقف شده است. میزان سوکروز باقیمانده در محیط رابطه معکوس با تولید دکستران داشته است. بطوریکه در محیط‌های با تولید دکستران بالا بخش قابل ملاحظه ای از سوکروز محیط به مصرف رسیده است و در pHهای ۱۲-۱۰ که تولید دکستران وجود نداشته است سوکروز مصرف نشده است. در پژوهش Karthikeyan و همکاران (۱۹۹۶) نیز pH بهینه اولیه برای محیط کشت ۸/۳ گزارش شده است. البته باید توجه داشت که pH قلیایی برای تولید دکستران در صورتی مناسب است که مانند پژوهش کنونی و یا Karthikeyan و همکاران (۱۹۹۶) امکان کنترلpH در ضمن فرایند وجود نداشته باشد، در مواردی که امکان کنترل pH وجود داشته، مقدار بهینه pH برای تولید دکستران ۵/۵ گزارش شده است (Santos *et al.* 2000 ، Lazic *et al.* 1993).



شکل ۲- بررسی اثر مقادیر متفاوت pH در تولید دکستران توسط *Leuconostoc mesentroides* UTMC00118 در شکل مقدار دکستران، کربوهیدرات باقیمانده و مقدار pH نهایی محیط کشت به ترتیب با ستونهای سیاه، سفید و خاکستری نشان داده شده است.

بررسی اثر دما بر تولید دکستران

نتایج بررسی اثر دماهای مختلف ۲۵-۳۵°C بر تولید دکستران توسط *Leuconostoc mesentoides* در محیط پایه تولید دارای pH اولیه ۹ در شکل ۳ نشان داده شده است. بیشترین میزان تولید دکستران و کمترین میزان سوکروز باقیمانده در دمای ۳۲°C به دست آمده است ($P<0.01$).



شکل ۳- بررسی اثر دما در تولید دکستران توسط *Leuconostoc mesentroides* UTMC00118 در شکل مقدار دکستران، کربوهیدرات باقیمانده و مقدار pH نهایی محیط کشت به ترتیب با ستونهای سیاه، سفید و خاکستری نشان داده شده است.

در بررسی منابع علمی نیز تفاوت میزان تولید دکستران در دماهای مختلف دیده می شود. بهترین دما برای تولید دکستران توسط Cortezi و همکاران (۲۰۰۵) ۲۳-۲۶°C، Kim و همکاران (۲۰۰۳) ۲۸°C، Santos و همکاران (۲۰۰۰) ۳۵°C و Karthikeyan و همکاران (۱۹۹۶) ۲۳°C گزارش شده است. تفاوت بین سویه‌های *Leuconostoc mesenteroides* به کار رفته در این پژوهشها مهمترین علت تفاوت بین این داده است.

بررسی اثر دور همزن بر تولید دکستران

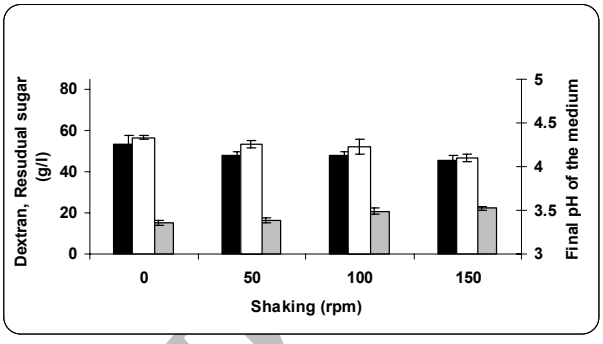
در شکل ۴ نتایج بررسی اثر میزان همزدن محیط کشت در تولید دکستران در محیط پایه دارای pH اولیه ۹ در دمای ۳۲°C نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می شود افزایش همزدن محیط کشت اثر نامطلوبی در تولید دکستران داشته و بیشترین تولید دکستران در محیط بدون همزدن بوده است. این نتایج با میزان سوکروز باقیمانده همخوانی داشته و در محیطهای بیشتر همزده مقدار سوبسترای باقیمانده بیشتر بوده است.

عدم نیاز به همزدن در شرایط آزمایشگاهی کنونی می تواند ناشی از نسبت کم حجم محیط کشت به حجم فلاسک (۳۰٪) و توزیع نسبتاً مناسب مواد و خروج بموقع گازهای حاصل از متابولیسم باکتری (مثلاً دی‌اکسیدکربن) از مایع تخمیر باشد. ضمناً باید در نظر داشت که *Leuconostoc mesenteroides* یک میکروارگانیسم میکروآئروفیل بوده و اثر مثبت غلظت‌های کم اکسیژن و اثر منفی غلظت‌های بالای اکسیژن در رشد آن گزارش شده است. در این پژوهش برای جلوگیری از این تاثیر منفی دهانه فلاسکها با پارافیلم پوشانیده شده است. اگرچه نتایج به دست آمده نشان می دهد که برای تولید دکستران در تولید آزمایشگاهی نیازی به همزدن محیط کشت نیست، ولی باید توجه داشت که در ابعاد صنعتی همزدن و نیز کمی هوادهی برای تولید دکستران ضروری است. در پژوهش Lazic و همکاران (۱۹۹۳) نیز

Archive of SID

www.SID.ir

تاکید شده که برای تولید بهینه دکستران، مقدار اکسیژن موجود در محیط کشت باید به اندازه مصرف باکتری بوده و از تجمع اکسیژن در محیط جلوگیری شود.



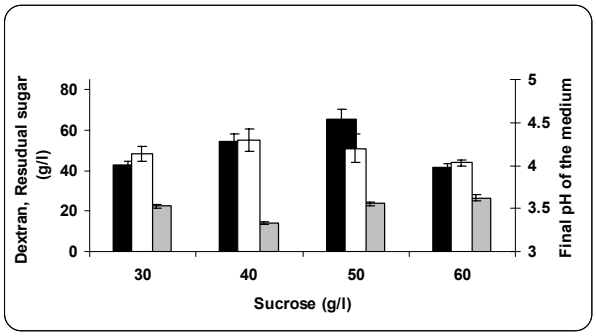
شکل ۴- بررسی اثر همزدن در تولید دکستران توسط *Leuconostoc mesentroides* UTMC0018 در شکل مقدار دکستران، کربوهیدرات باقیمانده و مقدار pH نهایی محیط کشت به ترتیب با ستونهای سیاه، سفید و خاکستری نشان داده شده است.

بررسی اثر غلظت‌های متفاوت سوکروز بر تولید دکستران

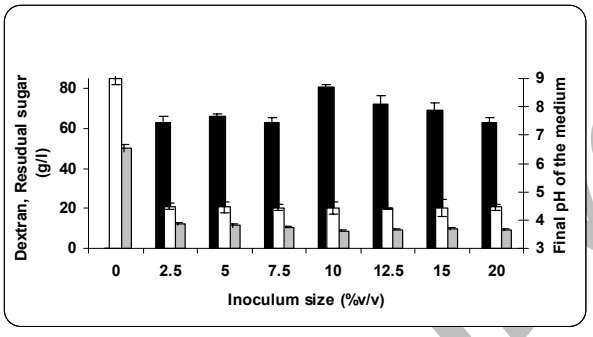
اثر غلظت‌های مختلف سوکروز بر تولید دکستران در محیط پایه دارای pH اولیه ۹ ، دمای ۳۲°C و بدون همزدن در شکل ۵ نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می شود بالاترین میزان دکستران تولید شده در محیط با غلظت ۵۰ گرم در لیتر سوکروز به دست آمده است. با افزایش غلظت سوکروز اولیه میزان قند باقیمانده در محیط نیز افزایش پیدا کرده است. در پژوهش Purama و Goyal (۲۰۰۸) و Karthikeyan و همکاران (۱۹۹۶) بهترین غلظت سوکروز g/l ۳۰ و در پژوهش Cortezi و همکاران (۲۰۰۵) g/l ۴۰-۳۰ گزارش شده است. با توجه به حجم مصرف بالای دکستران، در پژوهش کنونی امکان استفاده از منابع ارزان قیمت تر سوکروز (ملاس) نیز بررسی شده است.

بررسی اثر میزان پیش کشت در تولید دکستران

به منظور بررسی اثر میزان مایه تلقیح در تولید دکستران، فلاسکهای محیط محیط پایه دارای pH اولیه ۹ ، دمای ۳۲°C ، غلظت اولیه سوکروز g/l ۵۰ و بدون همزدن با میزان متفاوت (درصد وزن به حجم) محیط پیش کشت تلقیح شد. غلظت‌های ٪۲/۵، ٪۵، ٪۷/۵، ٪۱۰، ٪۱۲/۵، ٪ ۱۵و ٪۲۰ محیط پیش کشت طبق روش ذکر شده در بخش ۲-۲ به محیط تولید افزوده شد. نتایج به دست آمده که در شکل ۶ آورده شده، نشان می دهد که تغییر میزان مایه تلقیح تاثیر زیادی بر pH نهایی محیط تولید نداشته است، با این وجود محیط‌های دارای دکستران تولیدی بیشتر pHنهایی کمتری داشته‌اند. بیشترین میزان تولید دکستران در محیط با ٪۱۰ مایه تلقیح مشاهده گردید. افزایش یا کاهش مایه تلقیح از این میزان موجب کاهش تولید دکستران گردیده است. در پژوهش Karthikeyan و همکاران (۱۹۹۶) نیز مایه تلقیح ٪۱۰ برای تولید دکستران به کار رفته است. ولی میزان مایه تلقیح در پژوهش Cortezi و همکاران (۲۰۰۵) ٪۵ بوده است. در هر صورت هیچیک از این پژوهشگران تاثیر غلظت‌های دیگر مایه تلقیح را بررسی نکرده‌اند.



شکل ۵- بررسی اثر سوکروز در تولید دکستران توسط *Leuconostoc mesentroides* UTMC00118 در شکل مقدار دکستران، کربوهیدرات باقیمانده و مقدار pH نهایی محیط کشت به ترتیب با ستونهای سیاه، سفید و خاکستری نشان داده شده است.



شکل ۶- بررسی اثر مقدار پیش کشت در تولید دکستران توسط *Leuconostoc mesentroides* UTMC00118 در شکل مقدار دکستران، کربوهیدرات باقیمانده و مقدار pH نهایی محیط کشت به ترتیب با ستونهای سیاه، سفید و خاکستری نشان داده شده است.

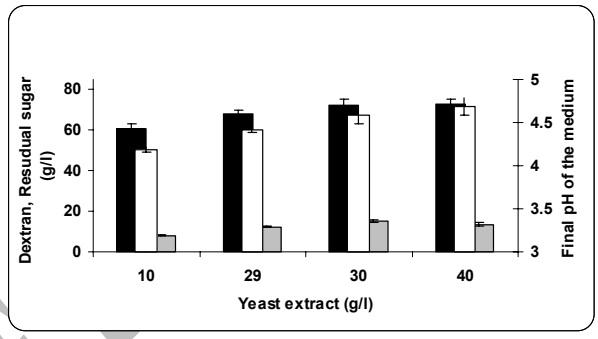
بررسی اثر غلظت‌های متفاوت عصاره مخمر بر تولید دکستران

اثر غلظت‌های مختلف عصاره مخمر (Merck) بر تولید دکستران در محیط پایه دارای pH اولیه ۹ ، دمای ۳۲°C، g/l ۵۰ سوکروز، بدون همزدن و با میزان مایه تلقیح ٪۱۰ در شکل ۷ نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می شود با افزایش غلظت عصاره مخمر pH نهایی محیط کشت افزایش پیدا کرده و بیشترین pH نهایی محیط کشت در فلاسکهای دارای ۴۰ گرم در لیتر عصاره مخمر دیده شده است. افزایش غلظت عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن تا ۲۰ گرم در لیتر موجب افزایش تولید دکستران گردیده، ولی افزودن غلظت‌های فراتر آن تاثیر معنی داری در افزایش تولید دکستران نداشته است ($P<0.05$). در

Archive of SID

www.SID.ir

غلظت‌های کمتر از ۲۰ گرم در لیتر عصاره مخمر، میزان سوکروز باقیمانده در محیط بیشتر از محیط‌های دارای غلظت بالاتر عصاره مخمر بوده است. در نهایت به دلائل اقتصادی استفاده از غلظت ۲۰ گرم در لیتر عصاره مخمر توصیه می شود. به طور کلی منبع نیتروژن و فاکتورهای رشد در تولید دکستران تاثیر زیادی دارد. Karthikeyan و همکاران (۱۹۹۶) از غلظت بهینه g/l ۱۰ عصاره مخمر و Purama و Goyal (۲۰۰۸) از غلظت ۱۵g/l عصاره گوشت به این منظور استفاده کرده‌اند.



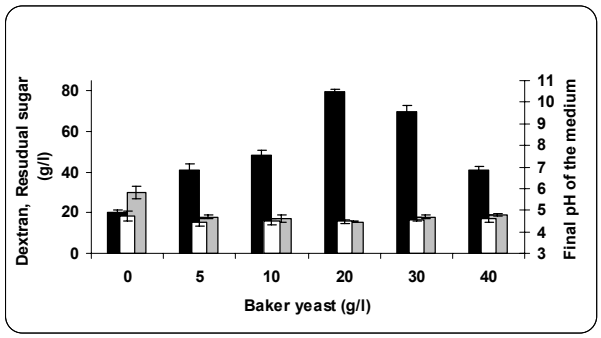
شکل ۷- بررسی اثر عصاره مخمر در تولید دکستران توسط *Leuconostoc mesentroides* UTMC00118 در شکل مقدار دکستران، کربوهیدرات باقیمانده و مقدار pH نهایی محیط کشت به ترتیب با ستونهای سیاه، سفید و خاکستری نشان داده شده است.

بررسی اثر مخمرنانوایی در تولید دکستران

با توجه به نتایج فوق در ادامه کار امکان استفاده از مخمر نانوایی (*Saccharomyces cerevisiae*) به عنوان منبع ازت ارزان قیمت و به جای عصاره مخمر Merck بررسی شده است. به این منظور غلظت‌های متفاوت عصاره به دست آمده از مخمر نانوایی در تولید دکستران در محیط پایه دارای pH اولیه ۹ ، دمای ۳۲°C، ۵۰g/l سوکروز، بدون همزدن و با میزان مایه تلقیح ۱۰٪ ارزیابی شده و نتایج حاصل در شکل ۸ آورده شده است. همانگونه که مشاهده می شود بیشترین دکستران در محیط دارای ۲۰ گرم در لیتر عصاره مخمر دیده شده است. کمترین غلظت سوکروز باقیمانده نیز در این محیط دارای مشاهده شد. در جدول ۱ آنالیز ترکیبات عمده مخمر نانوایی به کار رفته آورده شده است. تاکنون مقاله منتشر شده ای در مورد استفاده از مخمر نانوایی به جای عصاره مخمر تجاری گزارش نشده است.

بررسی اثر ملاس در تولید دکستران

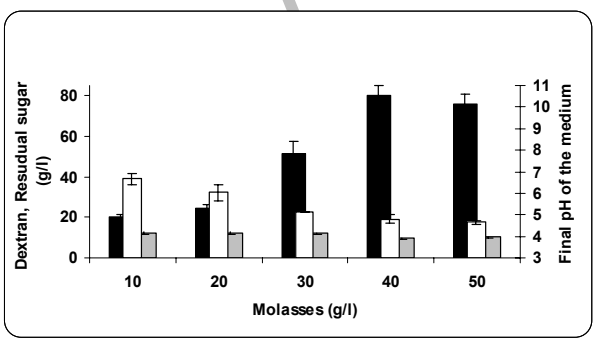
با توجه به نیاز فراوان به دکستران و بالا بودن نسبی بهای سوکروز، اثر ملاس به عنوان منبع ارزان قیمت در تولید دکستران بررسی شد. به این منظور غلظت‌های ۱۰-۵۰ گرم در لیتر ملاس چغندرقند جایگزین سوکروز موجود در محیط پایه دارای pH اولیه ۹ ، دمای ۳۲°C، ۴۰g/l ملاس، بدون همزدن و با میزان مایه تلقیح ۱۰٪ تولید شده و اثر آن بر تولید دکستران بررسی شد. بر اساس نتایج حاصل که در شکل ۹ نشان داده شده، بیشترین تولید دکستران در محیط دارای غلظت ۴۰ گرم در لیتر ملاس به دست آمده است. همچنین در این محیط، کمترین میزان سوکروز باقی مانده دیده شده است. در پژوهش Behravan و همکاران (۲۰۰۳) از غلظت ۲۰٪ ملاس برای تولید دکستران استفاده شده است. در پژوهش Vedyashkina و همکاران (۲۰۰۵) نیز محیط دارای ملاس (دارای ۱۷/۵٪ گلوکز) برای تولید دکستران استفاده شده و بازده تولید g/l ۵۵ بوده است. در جدول ۲ ترکیبات اصلی ملاس به کار رفته آورده شده است.



شکل ۸- بررسی اثر مخمر نانوایی در تولید دکستران توسط *Leuconostoc mesentroides* UTMC00118 در شکل مقدار دکستران، کربوهیدرات باقیمانده و مقدار pH نهایی محیط کشت به ترتیب با ستونهای سیاه، سفید و خاکستری نشان داده شده است.

جدول ۱- ترکیبات عمده مخمر نانوایی به کار رفته در این پژوهش.

نام ترکیب	*مقدار (٪)*
درصد جامد	۹۵/۵
پروتئین	۴۳
کربوهیدرات	۴۰
چربی	۱/۲
خاکستر	۶/۹



شکل ۹- بررسی اثر ملاس در تولید دکستران توسط *Leuconostoc mesentroides* UTMC00118 در شکل مقدار دکستران، کربوهیدرات باقیمانده و مقدار pH نهایی محیط کشت به ترتیب با ستونهای

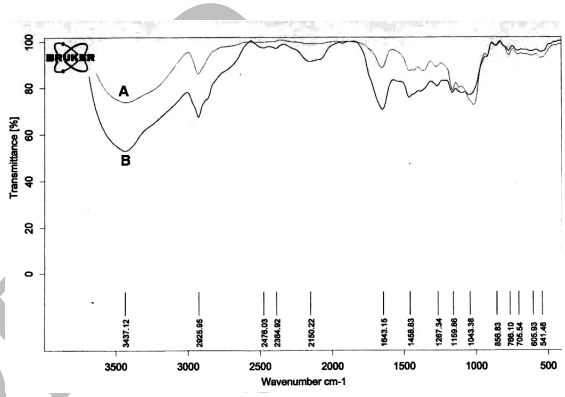
Archive of SID

www.SID.ir

سیاه، سفید و خاکستری نشان داده شده است.

جدول ۲- ترکیبات اصلی ملاس به کار رفته در این پژوهش

ترکیب	مقدار (٪)
درصد جامد	۷۵
پروتئین	۶/۵
کربوهیدرات	۶۵
چربی	۰
فیبر	۰
خاکستر	۵/۴



شکل ۱۰- مقایسه طیف IR دکستران استاندارد (A) با دکستران تولید شده (B).

آنالیز دکستران تولید شده به روش IR

به منظور تایید دکستران حاصل از فرمانتاسیون از آنالیز IR استفاده شد و با مقایسه طیف به دست آمده از دکستران تولید شده با طیف نمونه استاندارد تولید دکستران تایید گردید (شکل ۱۰).

نتیجه گیری نهایی

پلیمر دکستران باکتریایی به علت داشتن خواص غیر یونی و پایداری در شرایط عملیاتی (گرما، اسید و قلیا، تشکیل فیلم، افزایش ویسکوزیته محیط، حلالیت در آب و روغن و غیرسمی و غیرآلرژیک بودن) کاربردهای گسترده ای در صنایع غذایی، دارویی، بیوشیمیایی و صنعت پیدا کرده است.

نتایج این پژوهش که به شرح زیر خلاصه شده، می تواند برای تولید دکستران در مقیاس انبوه مفید باشد. بر اساس نتایج این پژوهش شرایط بهینه تولید دکستران عبارت است از: pH اولیه محیط کشت ۹، دمای انکوباسیون $32^{o}C$، دور همزن ۰، منبع کربن ملاس با غلظت g/l ۴۰، عصاره مخمر حاصل از مخمر نانوایی (g/l ۲۰) به عنوان منبع نیتروژن و فاکتورهای رشد و میزان پیش کشت v/v ٪۱۰ . با انجام فرایند در این شرایط میزان تولید دکستران نسبت به شرایط اولیه ۳/۵ برابر افزایش می یابد.

تقدیر و تشکر

ضمن تقدیر و تشکر اعلام می شود این طرح با حمایت مالی جهاد دانشگاهی تهران، واحد علوم، طی طرح پژوهشی شماره ۱۱-۱۰۶۳ انجام شده است.

منابع:

Barker P., Ajongwhen N.J., Ganetsos G. 1993: A novel approach to the production of clinical grade dextran, *Chem. Technol. Biotechnol.* **57:** 21-26.

Behravan J. Bazzaz B.S. Salimi Z. 2003: Optimization of dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 using cheap and local sources of carbohydrate and nitrogen, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **38:** 267-269.

Blijdenstein T.B.J., Zoet F.D., Van Vliet T., Van Derlinden E., Van Aken G.A. 2004: Dextran-induced depletion flocculation in oil-in-water emulsions in the presence of sucrose, *Food hydrocol.* **18:** 857-863.

Cortezi M., Monti R., Contiero J. 2005: Temperature effect on dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* FT 045 B isolated from alcohol and sugar mill plant, *Afric. J. Biotechnol.* **4:** 279-285.

Dubois, M. and Gilles, K.M. 1956: Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Anal. Chem.* **28**, 350–356.

Faich G., Strobos J. 1999: Sodium ferric gluconate complex in sucrose: safer intravenous iron therapy than iron dextrans. *Am J Kidney Dis.* **33:** 464-470.

Jørgensen P.S., Rasmussen S.W., Tørholm C. 1997: The use of dextran 70 as a plasma expander increases the intraoperative bleeding in total hip replacement, clinical and applied thrombosis, *Hemostasis.* **3:** 267-269.

Karthikeyan R.S., Rakshit S.K., Baradarajan A. 1996: Optimization of batch conditions for dextran production. *Bioprocess Eng.* **15:** 247-251.

Kato A., Sasaki Y., Furuta R., Kobayash K. 1990: Functional protein-polysaccharide conjugate prepared by controlled dry-heating of ovalbumin-dextran mixtures, *Agric. Biolog. Chem.* **54:** 107-112.

Kim D., Robyt J.F., Lee S.Y., Lee J.H., Kim Y.M. 2003: Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose concentration, pH, and temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextransucrase, *Carb. Res.* **238:**

Archive of SID

www.SID.ir

1183-1189.
Lazic M.L., Veljković V.B., Vučetić J.I., Vrvić M.M. 1993: Effect of pH and aeration on dextran production by *Leuconostoc mesenteroides, Enz. Microbial Technol.* **15:** 334-338.
Leitinger N. 1996: Decreased susceptibility of low-density lipoproteins to *in-vitro* oxidation after dextran-sulfate LDL-apheresis treatment. *Atherosclerosis.* **126:** 305 – 312.
Mathes, L.E., Hayes, K.A., Swenson, C.L., Polas, P.J., Weisbrode, S.E., Kociba G.J. 1991: Evaluation of antiviral activity and toxicity of dextran sulfate in feline leukemia virus-infected cats, *Antimicrob. Agents Chemother.* **35:** 2147-2150.
McKenna B. M. 2003: Texture in Food: Volume 1: Semi-Solid Foods, Woodhead Publishing, pp. 275-308.
Mitsuya H, Looney D.J., Kuno S., Ueno R., Wong-Staal F., Broder S. 1988: Dextran sulfate suppression of viruses in the HIV family: inhibition of virion binding to CD4+ cells, *Science.* **240:** 646-649.
Naessens, M., Vercauteren R., Vandamme E. J. 2004: Three-factor response surface optimization of the production of intracellular dextran dextrinase by *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochem.* **39:** 299-1304.
Norberg A.B., Persson H. 1984: Accumulation of heavy metal ions by Zoogloea ranrigera, *Biotechnol. Bioeng.* **26:** 239-246.
Purama R.K., Goyal A. 2008: Screening and optimization of nutritional factors for higher dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640 using statistical approach, *Biores. Technol.* **99:** 7108-7114.
Qader S.A.U.L., Iqbal L., Aman A., Shireen E. Azhar A. 2005: Production of dextran by newly isolated strains of *Leuconostoc mesentroides* PCSIR-4 and PCSIR-9, *Turk. J. Biochem.* **31:** 21-26.
Santos M., Teixeira J., Rodrigues A. 2000: Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f) *Biochem. Eng. J.* **4:** 77-188.
Vedyashkina T.A., Revin V.V., Gogotov I.N. 2005: Optimization the conditions of dextran synthesis by the bacterium *Leuconostoc mesenteroides* grown in a molasses-containing medium, *Appl. Biochem. Microbiol.* **41:** 361-364.

Archive of SID

www.SID.ir