Archive of SID

بهینه سازی برخی فاکتورهای کشت سویه بومی *Xanthomonas campestris b82* به روش تاگوچی برای تولید صمغ میکروبی زانتان

مرضیه عزیزی[۱]، محمدرضا صعودی*[۱] و صدیقهٔ شمس[۲]

[۱] تهران، دانشگاه الزهراء، گروه زیست شناسی، بخش میکروبیولوژی

[۲] تهران، دانشگاه الزهراء، گروه ریاضی

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/٦ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱/۲۵

چکیده

زانتان یکی از مهم ترین بیوپلیمرهای صنعتی است که توسط سویه های جنس *Xanthomonas* تولید می شود. در این مطالعه با به کارگیری طرح آزمایش تاگوچی، به بهینه سازی منابع منیزیم، آهن، گوگرد، نیتروژن و فسفر، در محیط کشت سویه بومی مولد زانتان *Xanthomonas campestris* strain b82 پرداخته شد. در این بررسی کشت تازهٔ باکتری در فلاسکهای شیاردار در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و دور ۱۵۰ rpm برای مدت ٦۸ ساعت گرماگذاری شد و سپس مقدار توده سلولی، زانتان و ویسکوزیتهٔ محصول به عنوان شاخصهای تولید مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در شرایط بهینه (میزان منبع فسفات با غلظت بهینه ۵/۸ g/l از فسفات پتاسیم، میزان منبع منیزیم با غلظت بهینه ۰/۲٤ g/l از سولفات منیزیم، میزان منبع گوگرد با غلظت بهینه ۲/۸ g/l از سولفات سدیم، میزان منبع نیتروژن با غلظت بهینه ۱/۲ g/l از کلرید آمونیوم، میزان منبع آهن با غلظت بهینه ۱/٦۸ mg/l از کلرید فریک) میزان تولید زانتان با درجه اطمینان ۹۵ درصد ۲/٦۷ g/l ± ۱۸/۷۸ است. علاوه بر این نشان داده شدکه در شرایط مورد بررسی غلظت منبع منیزیم مهم ترین فاکتور کنترل کنندهٔ تولید زانتان است در حالی که برای رشد باکتری منبع نیتروژن اهمیت بیشتری دارد و منبع آهن مؤثرترین فاکتور در ایجاد ویسکوزیته می باشد.

واژه های کلیدی : زانتان، تاگوچی، منیزیم، نیتروژن، آهن، *Xanthomonas campestris*

نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۲۲۷۷۳۷۲۱ پست الکترونیکی:msoudi@yahoo.com

مقدمه

زانتان اولین پلی ساکارید میکروبی با اهمیت تجاری است که توسط تعدادی از سویه های جنس *Xanthomonas* به ویژه گونهٔ *X. campestris* تولید می شود(۹ و ۱۲). این هتروپلی ساکارید دارای ساختمان اولیه پنتاساکاریدی متشکل از دو واحد گلوکز، دو واحد مانوز و یک واحد گلوکورونیک اسید تشکیل شده است و حضور پیرووات و استات به این صمغ خصوصیت آنیونی داده است. زانتان به عنوان قوام دهنده ، پایدارکننده و امولسیون کننده در صنایع غذایی، آرایشی، دارویی و نفتی به کار می رود(۷، ۱٤).

تاکنون مطالعات بسیاری در جهت بهینه سازی محیط کشت تولید صمغ زانتان انجام شده است. پژوهشگران نشان دادند که محدودیت در منبع منیزیم یا فسفات به دلیل تأثیر بر مسیر EMP تولید صمغ زانتان با پیرووات کم می شود، آنها همچنین نشان دادند که محیطهایی با غلظت پایین آمونیوم تولید صمغ زانتان را بالا می برند(۲٤). در مطالعهٔ دیگر Letisse با استفاده از سویهٔ *X. campestris* ATCC 13951 و به کار بردن سوکروز و آمونیوم به عنوان منابع کربن و نیتروژن نشان داد که آمونیوم سوبسترای مناسب تری برای تولید توده سلولی است، در حالی که

www.SID.ir

Archive of SID

نیترات می تواند بازده تولید زانتان را افزایش دهد. وی همچنین ثابت کرد که محدودیت دسترسی به فسفات باعث تجمع توده سلولی می گردد (١٦). Souw و همکارانش با مطالعهٔ سویهٔ *X. campestris* NRRL B-1459 گزارش کردند که سوکروز بهترین سوبسترای تولید زانتان است و وجود سوبستراهای سوکسینات و آلفا – کتوگلوتارات در محیط دارای سوکروز به عنوان منبع اصلی کربن، محرک تولید زانتان است (۳۰). Garcia-Ochoa با به کارگیری روشهای طراحی آزمایش به منظور بهینه سازی شرایط کشت و انجام طرح آزمایش فاکتوریل، نیازمندیهای غذایی *X. campestris* NRRL B-1459 را برای تولید زانتان بررسی کرد. آنها در پژوهش خود میزان سوکروز، کلسیم، آهن، روی و اسیدسیتریک را ثابت نگه داشتند و غلظتهای نیتروژن ، منیزیم، فسفر و سولفور را بهینه کردند. نتایج حاصل از مطالعه آنها نشان داد که نیتروژن، فسفر و منیزیم بر رشد سلولهای *X. campestris* اثر دارند و نیتروژن، فسفرو گوگرد بر تولید زانتان تأثیر می گذارند (۱۰). این نتایج نشان می دهد که به دلیل تفاوت میان سویه ها و اختلاف روشهای طراحی آزمایش و روشهای آماری که پژوهشگران برای بهینه سازی ترکیب محیط کشت به کار برده اند نتایج متنوع و متفاوتی از این پژوهشها به دست آمده است(۳۵ و ٣٦). لذا به نظر می رسد برحسب نوع سویه، ترکیب محیط کشت و روش طراحی آزمایش چنین بررسیهایی را برای فرآیندهای تازه باید تکرار کرد. در سالهای اخیر به کارگیری روشهای نوین طراحی آزمایش امکان دستیابی به شرایط بهینه کشت را با حداقل تعداد آزمایشها فراهم کرده است و در مطالعه حاضر از روش تاگوچی (۲۷ و ٣٦)، بدین منظور استفاده شد.

جدول۱- آرایه متعامد L_{16} طراحی آزمایش بهینه سازی*

فاکتور \آزمایش	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
۳	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۲	۱	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۲
۴	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۱	۱	۱	۱
۵	۱	۲	۲	۱	۱	۲	۲	۱	۱	۲	۲	۱	۱	۲	۲
۶	۱	۲	۲	۱	۱	۲	۲	۲	۲	۱	۱	۲	۲	۱	۱
۷	۱	۲	۲	۲	۲	۱	۱	۱	۱	۲	۲	۲	۲	۱	۱
۸	۱	۲	۲	۲	۲	۱	۱	۲	۲	۱	۱	۱	۱	۲	۲
۹	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۲
۱۰	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۲	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۲	۱
۱۱	۲	۱	۲	۲	۱	۲	۱	۱	۲	۱	۲	۲	۱	۲	۱
۱۲	۲	۱	۲	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۱	۲	۱	۲
۱۳	۲	۲	۱	۱	۲	۲	۱	۱	۲	۲	۱	۱	۲	۲	۱
۱۴	۲	۲	۱	۱	۲	۲	۱	۲	۱	۱	۲	۲	۱	۱	۲
۱۵	۲	۲	۱	۲	۱	۱	۲	۱	۲	۲	۱	۲	۱	۱	۲
۱۶	۲	۲	۱	۲	۱	۱	۲	۲	۱	۱	۲	۱	۲	۲	۱

* هر ردیف یک حالت آزمایش شونده و هر ستون تغییرات یک عامل است. عوامل بررسی شده در ستونها عبارتند از: ستون ۱: P(پتاسیم دی هیدروژن فسفات)، ۲: Mg (سولفات منیزیم)، ٤: S (سولفات سدیم)، ۸: N (کلرید آمونیوم)، ۱۵: Fe (کلرید آهن III)، ۳: برهم کنشهای P×Mg، ۵: برهم کنشهای P×S، ٦: Mg×S، ۷: Fe×N ، ۹: N×P، ۱۰: N×Mg، ۱۱: S×Fe، ۱۲: S×N ، ۱۳: Mg×Fe و ۱٤: P×Fe

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- نتایج اولیه حاصل از آزمایشات بهینه سازی (در هر ردیف نتیجه یکی از حالات مختلف آزمایش شده بر اساس آرایه متعامد L_{16} آورده شده است، معیارهای مورد بررسی عبارتند از: مقدار توده سلولی و زانتان تولید شده و ویسکوزیته صمغ)

حالت مورد بررسی	وزن خشک زانتان(g/l)	ویسکوزیته ظاهری (cP)	وزن خشک توره سلولی(g/l)
۱	۱۳/٦۸	۲۳۰۰	٤/٦۲
۲	۱۱/۰۹	۱٥۱۷	۲/۱٦
۳	۱۲/۱	۹۷۳	٤/٦۲
٤	۱۲/۸٤	۱۸۹۹	۱/۸۹
٥	۱۸/۲٥	۱۸۸۱	۳/۲۲
٦	۱٤/۱۲	۲۰۰۰	۲/۰۷
۷	۱٥/٤٤	۲۳٦۰	۳/۰۲
۸	۱٥/۲۳	۲٤٤۰	۲/۸۱
۹	۱٤/۸۳	۲۳٦۰	۳/٦۱
۱۰	۱٤/۷	۲۱۹۷	۱/۹۹
۱۱	۱٦/٤٤	۲۰٥۳	۲/٥۱
۱۲	۱٤/٤۲	۱۹۲٥	۲/٤
۱۳	۲۱/٤۸	۲۲۱۲	۲/۲۷
۱٤	۱۷/۸٦	۲۱۹٦	۲/۲٥
۱٥	۹/۹٥	۱۷۲۳	۲/۲۷
۱٦	۱٦/۳۸	۲۲۰۰	۱/۹٤

مواد و روشها

محیطهای کشت: محیط کشت YMA متشکل از(g/l): عصاره مخمر (۳) ، عصاره مالت (۳) ، D – گلوکز (۱۰) ، آگار(۱٥)، پپتون (٥) با pH ۷ ± ۰/٥ می باشد (۱۹). اجزاء محیط کشت YMB عبارتند از (g/l): عصاره مخمر(۳)، عصاره مالت (۳) ، D – گلوکز (۱۰) ، پپتون (٥) که با pH ۷ ± ۰/٥ تهیه می شود. محیط کشت سنتتیک به کار رفته دارای (g/l): ساکارز ۳۰، سولفات آمونیوم ۳/۳۳ ، فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۷/۲ ، اسید سیتریک ۲، اسید بوریک ۰/۰۰۷۲ ، کربنات کلسیم ۰/۰۲۹ ، سولفات منیزیم . ۷ آبه ۰/۲٤ ، اکسید روی ۰/۰۰٦ ، کلرید آهن (III) ٦ آبه ۰/۰۰٤۲ ، اسید کلریدریک یک نرمال ۱/۹۳ ml و با ۰/٥ ± pH ۷ تنظیم شد(۲٥).

میکروارگانیسم: سویه مورد استفاده در این پژوهش سویه بومی b82 باکتری *Xanthomonas campestris* بود که در مطالعات پیشین به منظور تولید زانتان جدا و آزمایش شده بود(۱ و ۲۹).

مراحل تولید : کشت تازهٔ باکتری در محیط YMA (۲۲) به محیطهای پیش کشت حاوی ml ۲۰ محیط YMB در ارلنهای ۱۰۰ml تلقیح شد و در گرمخانه لرزان با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و دور rpm ۱٤۰ به مدت ٥ ساعت گرماگذاری شد. بعد از اینکه جذب نوری کشت در طول موج ٦۲۰nm به ۰/۱ ± ۰/٤ رسید، ٥ درصد (V/V) از آن به محیط تولید تلقیح شد. تولید در فلاسکهای شیار دار ml ٥۰۰ و حاوی ml ۱۰۰ محیط کشت سنتتیک با شرایط

www.SID.ir

Archive of SID

گرماگذاری مشابه، به مدت ٦٨ ساعت انجام گردید (۲۰، ۲۸).

اندازه گیری توده سلولی: برای این منظور رقیق سازی کشت باکتری به صورت محلول ۱۰ درصد با اختلاط ml ۱۰مایع کشت ، ml ۱۵ الکل و ml ۷۵ آب مقطر انجام گرفت.

مخلوط حاصل با همزن مغناطیسی به خوبی همگن شد، سپس با استفاده از سانتریفیوژ با دور rpm ۱٤۰۰، در دمای ٤ درجه سانتی گراد رسوب دهی شد (۲۲). رسوب حاصله شامل تودهٔ سلولهای زانتوموناس بود که پس از قرار گرفتن در فور ٦۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت خشک شده و وزن آن با کمک ترازویی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم محاسبه گردید(۳۰).

جدول۳ – نتایج اولیه حاصل از بهینه سازی میزان تولید زانتان*

فاکتور	درجه آزادی فاکتور	مجموع مربعات	واریانس	در صد سهم هر عامل
Mg	۱	۲۱/٦۵	۲۱/٦۵	۱۷/۷۸
Mg× S	۱	۱٦/٤۲	۱٦/٤۲	۱۳/٤۹
S× N	۱	۱٤/۸٤	۱٤/۸٤	۱۲/۱۹
P	۱	۱۱/۰۷	۱۱/۰۷	۹/۰۹
S	۱	۱۰/۹۱	۱۰/۹۱	۸/۹٦
P× Fe	۱	۹/۸۱	۹/۸۱	۸/۰٦
Fe× N	۱	۹/۷۲	۹/۷۲	۷/۹۸
Fe	۱	۸/۰۵	۸/۰۵	٦/٦۱
P× S	۱	٦/٤٤	٦/٤٤	۵/۲۹
P× Mg	۱	٤/۰۵	٤/۰۵	۳/۳۲
S ×Fe	۱	۳/٤۷	۳/٤۷	۲/۸۵
N× P	۱	۲/۹۳	۲/۹۳	۲/٤۰
N	۱	۱/۹۱	۱/۹۱	۱/۵٦
N× Mg	۱	۰/۳۸	۰/۳۸	۰/۳۱
Mg× Fe	۱	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰٤
error	۰	۰	۰	۰

* بر اساس وارد کردن نتایج زانتان تولید شده مندرج در جدول ۲، در نرم افزار RDWIN2 برای تحلیل نتایج طرح آزمایش تاگوچی و در نهایت محاسبه میزان تأثیر گذاری هر پارامتر در مقدار تولید صمغ زانتان

اندازه گیری زانتان: محلولهای کشت بدون سلول حاصل از سانتریفیوژ با ۲ برابر حجم متانول به خوبی مخلوط شده و بعد از ورتکس شدن، در سانتریفیوژ با دور rpm ۸۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه رسوب دهی شدند. وزن رسوب زانتان پس از خشک کردن محاسبه شد(۲٦).

ویسکوزیته ظاهری: ویسکوزیته محلول فرمانتاسیون که مخلوطی از محیط کشت مصرف نشده ، توده سلولی و زانتان تولید شده بود، به وسیله ویسکومترAnton Paar با سوزن شماره ۳ و دور rpm ٦۰ سنجش شد (۲۰).

طراحی آزمایشها با روش تاگوچی: اثر برهم کنشی پنج فاکتور به روش تاگوچی (Taguchi) بررسی شد. این ۵

www.SID.ir

Archive of SID

فاکتور شامل P (KH_2PO_4) و Mg ($MgSO_4$) و S (Na_2SO_4) و N (NH_4Cl) و Fe ($FeCl_3$) بوده و برهم کنشهای آنها شامل P×Mg، P×S ، Mg×S ، Fe×N ، N×P ، N×Mg ، S×Fe ، S×N ، Mg×Fe ، P×Fe مطالعه شد.

در این آزمایش از آرایه های متعامد L_{16} که دارای درجه آزادی ١٦ است برای طراحی آزمایش استفاده شد (جدول ١). برای تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده از نرم افزارهای RDWIN2 و EXCELL استفاده شد. تحلیلهای اولیه به کمک نرم افزار RDWIN2 انجام شد و سپس پردازش نهایی داده ها با EXCELL انجام گرفت.

با توجه به دامنه های به دست آمده از آزمایشات تک فاکتوری، دو حد بالا و پایین قابل قبول از تراکم فاکتور مورد نظر به لحاظ تولید محصول به عنوان دو سطح بررسی در نظر گرفته شدند (٢). سطوح ١ و ٢ در مورد هر فاکتور بر حسب گرم بر لیتر به این شرح بودند. برای KH_2PO_4؛ ١: ٤/٤ و ٢ : ٥/٨ ، $MgSO_4$ ؛ ١: ٠/١٤ و ٢ : ٠/٢٤ ، Na_2SO_4 ؛ ١: ٠/٢٨ و ٢ : ٢/٠ ، NH_4Cl ؛ ١: ١/٢ و ٢ : ٠/٩ و $FeCl_3$ بر حسب (mg/l)؛ ١: ١/٦٨ و ٢: ٣/٣٦

جدول٤ – نتایج اولیه حاصل از بهینه سازی ویسکوزیته ظاهری (cP) *

فاکتور	درجه آزادی فاکتور	مجموع مربعات	واریانس	در صد سهم هر عامل
Fe	١	٣٠٤١٥٦	٣٠٤١٥٦	١٤/٤٩
S×N	١	٣٠١٩٥٢	٣٠١٩٥٢	١٤/٣٨
P×Mg	١	٣٠١٤٠٠	٣٠١٤٠٠	١٤/٣٥
Mg×S	١	٢٣٩٦١٢	٢٣٩٦١٢	١١/٤١
Mg	١	١٩٩٨٠٨	١٩٩٨٠٨	٩/٥١
Fe×N	١	١٩٥٨٠٨	١٩٥٨٠٨	٩/٣٢
P	١	١٣٩٨٧٦	١٣٩٨٧٦	٦/٦٦
P×Fe	١	١٠٤٠٠٨	١٠٤٠٠٨	٤/٩٥
Mg×Fe	١	٨١٥١٢	٨١٥١٢	٣/٨٨
S	١	٧٤٢٦٠	٧٤٢٦٠	٣/٥٣
P×S	١	٦٧٣٤٠	٦٧٣٤٠	٣/٢٠
N×Mg	١	٤٠٨٠٤	٤٠٨٠٤	١/٩٤
S×Fe	١	٣٠٢٧٦	٣٠٢٧٦	١/٤٤
N	١	١٦٣٨٤	١٦٣٨٤	٠/٧٨
N×P	١	١٨٤٨	١٨٤٨	٠/٠٨
E	٠	٠	٠	٠

* بر اساس وارد کردن نتایج حاصل از ویسکوزیته مندرج در جدول ٢ ، در نرم افزار RDWIN2 برای تحلیل نتایج طرح آزمایش تاگوچی و در نهایت محاسبه میزان تأثیر گذاری هر پارامتر در ایجاد ویسکوزیته

نتایج و بحث

نتایج حاصل از انجام آزمایشها در جدول ٢، ٣، ٤ و ٥ آورده شده است. پس از ثبت نتایج تحلیل واریانس نتایج انجام شده و میزان اهمیت هر یک از فاکتورها بررسی شد . در مرحله بعد با کنار گذاشتن فاکتورهای غیر مهم، پاسخ (میزان تولید زانتان) در شرایط بهینه تخمین زده شد و دامنه

www.SID.ir

Archive of SID

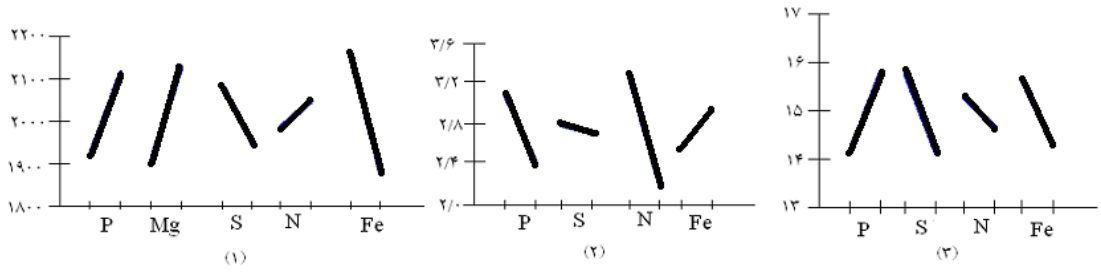
تغییرات پاسخ در این شرایط به دست آمد . در این مطالعه فاکتورهای مؤثر بر فرآیند تولید زانتان با بیان میزان اثر آنها، شناسایی (جدول ٦، ۷ و۸) و بر اساس میزان تولید زانتان (g/l) بهینه شدند.

مطابق جدول (۳) منبع منیزیم با داشتن تأثیر ۱۵/۵۳ درصد بر میزان تولید زانتان مهم ترین فاکتور مؤثر در تولید این صمغ تحت شرایط تعریف شدهٔ مورد بررسی توسط *X. campestris* strain b82 می باشد و با توجه به نتایج نشان داده در شکل ۱ باید به میزان ۰/۲٤ g/l به صورت سولفات منیزیم به محیط تولید افزوده شود. در حالی که برای تولید کمترین مقدار توده سلولی ، به دلیل تداخل اثر منبع منیزیم و نیتروژن، مقادیر کمتری (۰/۱٤ g/l) از این منبع نیاز است. درجه اهمیت این منبع روی رشد سلولی و ایجاد ویسکوزیته در مرتبه سوم قرار داشت و بهینه رشد باکتری نیز در غلظت ۰/۲٤ g/l سولفات منیزیم به دست آمد.

جدول۵ – نتایج اولیه حاصل از بهینه سازی میزان توده سلولی ظاهری (g/l) *

فاکتور	درجه آزادی فاکتور	مجموع مربعات	واریانس	در صد سهم هر عامل
N	۱	٤/۸۱	٤/۸۱	۲۲/۰٦
P	۱	۱۱/۷٦	۱۱/۷٦	۸/۰۷
N×Mg	۱	۱/٦۱	۱/٦۱	۷/۳۸
N×P	۱	۱/۳۳	۱/۳۳	٦/۱۰
Mg	۱	۰/۹۱	۰/۹۱	٤/۱۷
Fe	۱	۰/۵۲	۰/۵۲	۲/۳۸
Fe×S	۱	۰/۳۳	۰/۳۳	۱/۵۱
S×N	۱	۰/۱۹	۰/۱۹	۰/۸۷
P×S	۱	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۵۵
Mg×S	۱	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۵۰
P×Fe	۱	۰/۰٤	۰/۰٤	۰/۱۸
Mg×Fe	۱	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۱۳
S	۱	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۹
Fe×N	۱	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۹
P×Mg	۱	۰	۰	۰
error	۰	۰	۰	۰

* بر اساس وارد کردن نتایج حاصل از توده سلولی مندرج در جدول ۲ ، در نرم افزار RDWIN2 برای تحلیل نتایج طرح آزمایش تاگوچی و در نهایت محاسبه میزان تأثیر گذاری هر پارامتر در مقدار توده سلولی ایجاد شده



شکل ۱– نمودارهای حاصل از اثرات اصلی فاکتورها در (۱) میزان ویسکوزیته ظاهری (۲) میزان توده سلولی (۳) میزان زانتان. شکل ۱-۱: با تغییر غلظت P,Mg و N از سطح یک به دو میزان ویسکوزیته افزایش می یابد، در حالی که در مورد S و Fe سطح یک مورد بررسی ویسکوزیته بیشتری حاصل می کند. شکل ۱-۲: سطح یک منابع P,S و N و سطح دو Fe باعث تولید بیشتر توده سلولی می شود. شکل ۱-۳: سطح یک منابع Fe,S و N و سطح دو P باعث تولید بیشتر زانتان می شود.

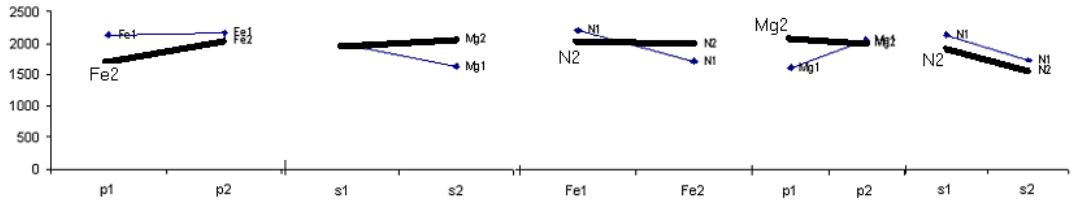
www.SID.ir

Archive of SID

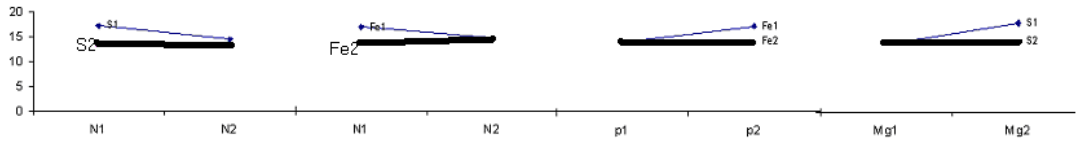
جدول٦ – نتایج نهایی حاصل از بهینه سازی میزان تولید زانتان برحسب گرم بر لیتر *

فاکتور	درجه آزادی فاکتور	مجموع مربعات	واریانس	نسبت واریانس	مجموع خالص مربعات	در صد سهم هر عامل
Mg	۱	۲۱/٦٥	۲۱/٦٥	۷/۸۸	۱۸/۹۰	۱٥/٥۳
Mg× S	۱	۱٦/٤۲	۱٦/٤۲	٥/۹۷	۱۳/٦۷	۱۱/۲۳
S× N	۱	۱٤/۸٤	۱٤/۸٤	٥/٤۰	۱۲/۰۹	۹/۹۳
P	۱	۱۱/۰۷	۱۱/۰۷	٤/۰۲	۸/۳۲	٦/۸۳
S	۱	۱۰/۹۱	۱۰/۹۱	۳/۹۷	۸/۱٦	٦/۷۰
P× Fe	۱	۹/۸۱	۹/۸۱	۳/٥۷	۷/۰٦	٥/۸۰
Fe× N	۱	۹/۷۲	۹/۷۲	۳/٥۳	٦/۹۷	٥/۷۲
Fe	۱	۸/۰٥	۸/۰٥	۲/۹۳	٥/۳۰	٤/۳٥
error	۷	۱۹/۲۳	۲/۷٤			۲٦/۲٦

* بعد از کنار گذاشتن برخی فاکتورها براساس تست اهمیت و داده پردازی مجدد اطلاعات برای به دست آوردن میزان تاثیرگذاری هر پارامتر در مقدار زانتان تولید شده، از تأثیر فاکتورهای P× S ، P× Mg ، S ×Fe ، N× P ،N× Mg ، N ،Mg× Fe چشم پوشی شده است.



شکل ۲– نمودار حاصل از اثرات اصلی بر هم کنشهای فاکتورها در ویسکوزیته ظاهری: اثرات بر همکنشی فاکتورهـای Mg-S , Fe-N, P-Mg در شرایط مورد بررسی دیده می شود و سطوح بهینه عبارتند از:Mg2-S2 , Fe1-N1, P1-Mg2



شکل ۳– نمودار حاصل از اثرات اصلی بر هم کنشهای فاکتورها در زانتـان: در شـرایط مـورد بررسـی فاکتورهـای Fe N, Fe-P, S-Mg دارای اثرات بر هم کنش می باشند و سطوح بهینه عبارتند از: Fe1-N1, Fe1-P2, S1-Mg2

جدول۷ – نتایج نهایی حاصل از بهینه سازی ویسکوزیته ظاهری برحسب cP *

فاکتور	درجه آزادی فاکتور	مجموع مربعات	واریانس	نسبت واریانس	مجموع خالص مربعات	در صد سهم هر عامل
Fe	۱	۳۰٤۱٥٦	۳۰٤۱٥٦	٦/۸۱	۲٥۹٥۲٤	۱۲/۳٦
S×N	۱	۳۰۱۹٥۲	۳۰۱۹٥۲	٦/۷٦	۲٥۷۳۲۰	۱۲/۲٥
P×Mg	۱	۳۰۱٤۰۰	۳۰۱٤۰۰	٦/۷٥	۲٥٦۷٦۸	۱۲/۲۳
Mg×S	۱	۲۳۹٦۱۲	۲۳۹٦۱۲	٥/۳٦	۱۹٤۹۸۰	۹/۲۸
Mg	۱	۱۹۹۸۰۸	۱۹۹۸۰۸	٤/٤۷	۱٥٥۱۷٦	۷/۳۹
Fe×N	۱	۱۹٥۸۰۸	۱۹٥۸۰۸	٤/۳۸	۱٥۱۱۷٦	۷/۲۰
P	۱	۱۳۹۸۷٦	۱۳۹۸۷٦	۳/۱۳	۹٥۲٤٤	٤/٥۳

www.SID.ir

Archive of SID

P×Fe	۱	۱۰٤۰۰۸	۱۰٤۰۰۸	۲/۳۳	۵۹۳۷٦	۲/۸۲
Error	۰	٤٤٦۳۲	۳۱۲٤۲٤			۳۱/۸۹

* بعد از کنار گذاشتن برخی فاکتورها بر اساس تست اهمیت و داده پردازی مجدد اطلاعات برای به دست آوردن میزان تاثیرگذاری هر پارامتر در میزان ویسکوزیته، از تأثیر فاکتورهای Mg×Fe، S ، P×S، N×Mg، S×Fe، N ، N×P چشم پوشی شده است.

جدول۸ – نتایج نهایی حاصل از بهینه سازی توده سلولی برحسب گرم بر لیتر*

فاکتور	درجه آزادی فاکتور	مجموع مربعات	واریانس	نسبت واریانس	مجموع خالص مربعات	در صد سهم هر عامل
N	۱	٤/۸۱	٤/۸۱	۹۹/۰۳	٤/۷٦	۲۱/۸٤
P	۱	۱۱/۷٦	۱۱/۷٦	٤۲/۱۱	۱۱/۷۱	۷/۸۵
N×Mg	۱	۱/٦۱	۱/٦۱	۳۳/۱٤	۱/۵٦	۷/۱٦
N×P	۱	۱/۳۳	۱/۳۳	۲۷/۳۸	۱/۲۸	۵/۸۷
Mg	۱	۰/۹۱	۰/۹۱	۱۸/۷۳	۰/۸٦	۳/۹۵
Fe	۱	۰/۵۲	۰/۵۲	۱۰/۷۰	۰/٤۷	۲/۱٦
Fe×S	۱	۰/۳۳	۰/۳۳	٦/۷۹	۰/۲۸	۱/۲۹
S×N	۱	۰/۱۹	۰/۱۹	۳/۹۱	۰/۱٤	۰/٦٤
E	۷	۰/۳٤	۰/۰٤			۳/۳٤

*بعد از کنار گذاشتن برخی فاکتور بر اساس تست اهمیت و داده پردازی مجدد اطلاعات برای به دست آوردن میزان تاثیرگذاری هر پارامتر در مقدار توده سلولی تولید شده، از تأثیر فاکتورهای P×Mg، Fe×N، S ، Mg×Fe ، P×Fe ، Mg×S ، P×S چشم پوشی شده است.

ساترلند(Sutherland) نیز با آزمایشهای خود بر روی *Klebsiella aerogenes* نشان داد که برای تولید بهینه پلی ساکارید محیط یونی متشکل از پتاسیم و منیزیم و کلسیم مورد نیاز است و تأثیر کاتیونهای دو ظرفیتی به عنوان کوفاکتورهای آنزیمهایی است که مستقیماً در سنتز پلی ساکارید نقش داشتند(۳۳). آزمایشهای Duckworth نیز در سال ۱۹۷۷ اثبات کرد که فعالیت برخی آنزیمهای متصل به غشا که در بیوسنتز پلیمرهای خارج سلولی *Bacillus licheniformic* ATCC 9945 نقش دارند وابسته به غلظت منیزیم است(۳). بر اساس آزمایشهای Hsieh برای تولید پلی ساکارید در *Ganoderma lucidum* بهینه رشد سلولی و تولید توده سلولی در یک غلظت معین از منیزیم (۱ g/l) رخ می دهد(۱۱). نتایج حاضر نشان می دهد که افزایش غلظت منیزیم هم بر تولید زانتان و هم بر رشد توده سلولی می افزاید. این امر با افزایش ویسکوزیته نیز تأیید گردید. از آنجایی که منیزیم باعث روشن شدن متابولیسمهای سنتز پلی ساکارید می گردد(۱۵)، اثر تحریکی آن بر میزان تولید قابل پیش بینی است، زیرا سولفات منیزیم کوفاکتور برخی ازآنزیمها بوده و در غشاء و دیواره سلولی موجود است(۱۵). به علاوه ماده مذکور برای پایداری ریبوزومها درسلول نیز مورد نیاز است(۵و۱۸). لذا افزایش سولفات منیزیم اثرات مثبتی روی رشد *X. campestris* دارد(۱۱). این درحالی است که غالب محققان(Rosalam 2006, Garcia-Ochoa 1992) اظهار داشته اند که محدودیت در میزان منبع منیزیم باعث تحریک تولید صمغ در میکروارگانیسم ها می شود. باید توجه شود که غلظتهای مورد بررسی در آزمایشهای Garcia-Ochoa (g/l) ۰/۱۰۱ ، ۰/۳۰٤ و ۸/۵۹ از $MgCl_2$ بود و بهینه غلظت به دست آمده از آزمایشهایشان g/l ۰/۱۰۱ $MgCl_2$ بود؛ که مقدار معادل g/l ۰/۲٤ $MgSO_4$ می باشد. بنابراین غلظت به دست آمده در این آزمایش، با نتایج آنان مطابقت دارد؛ در حالی که چون آنها غلظتهای

www.SID.ir

Archive of SID

بالاتری را مورد بررسی قرار داده اند اظهار داشته اند که افزایش غلظت منیزیم در محیط با کاهش تولید زانتان روبرو است(۱۰ و ۲٤).

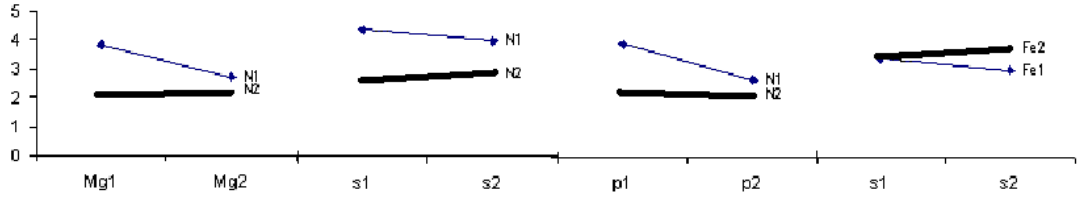
دومین فاکتور مؤثر بر تولید صمغ زانتان توسط سویهٔ b82 ، اثر برهم کنش منبع گوگرد و منیزیم (با تأثیر نسبی ۱۱/۲۳ درصد) بود(جدول ۳) و همان طور که در شکل ۳ دیده می شود؛ ۲/۸ g/l سولفات سدیم به عنوان منبع گوگرد تأمین کننده مقدار بیشینهٔ تولید حاصل از این برهم کنش است که بر اساس نظریات Markovotz اثر افزایشی گوگرد در تولید می تواند ناشی از اثرات مثبت غلظتهای بالای گوگرد در تولید پلی ساکارید های واجد اسیداورونیک باشد(۱۷). برای به دست آمدن ویسکوزیتهٔ بالا (شکل ۲) نیز ، این مقدار گوگرد مورد نیاز است، هرچند که افزایش آن با تشدید رشد سلولی همراه است و باعث افزایش توده سلولی می گردد (شکل ٤). نتایج حاصله از این پژوهش به خوبی نشان داد که اثر منبع گوگرد بیشتر روی تولید زانتان و ایجاد ویسکوزیته است و در تولید توده سلولی فقط ۱/۲۹ درصد تأثیر دارد و به عنوان هفتمین فاکتور مؤثر در تولید توده سلولی با منبع آهن برهم کنش دارد هرچند به دلیل نقش ساختاری گوگرد در میکروارگانیسم ، این منبع برای تحریک رشد مورد نیاز است (۱۸، ۲۱) ولی تأثیر مثبت آن بر رشد با افزایش غلظت آن قابل چشم پوشی است. این تفاوت در نیازمندیهای غذایی برای رشد باکتری و تولید توده سلولی توسط دیگر محققان نیز به اثبات رسیده است. Garcia-Ochoa نشان داد که منبع نیتروژن و فسفر و منیزیم دارای اثر مثبت روی رشد باکتری *Xantomonas campestris NRRL-1459* هستند، در حالی که برای تولید زانتان منابع نیتروژن و فسفر و گوگرد مؤثر هستند (۱۰) و مشابه این نتیجه در مورد باکتری *Klebsiella aerogenes* و *E.coli* توسط Sutherland (۳۲) و باکتریهای دریایی نیز توسط Nicholes دیده شده است(۲۳) . بر اساس نظریات Zhang در ترکیب سلولی باکتری ۰/۰۲ تا ۱ درصد گوگرد وجود دارد (۳۸) که بر اساس آزمایشات Strobel برای تأمین نیازمندیهای رشد باکتری در محیط کشت ۰/۱ تا ۱ درصد منبع گوگرد افزوده می گردد(۳۱) و در این مطالعه نشان داده شد که برای تولید بهینه پلی ساکارید ۲/۸ g/l (معادل ٦/۳ درصد گوگرد) در محیط کشت مورد نیاز است. اثرات مثبت افزایش غلظت گوگرد در میزان تولید زانتان با نتایج Markovotz در سال ۱۹۷۷ تطابق دارد (۱۹). Garcia-Ochoa نشان داد که بهینه غلظت سولفات سدیم برای تولید زانتان ۰/۰۸۹ g/l می باشد(۱۰) در حالی که این مقدار بسیار کمتر از مقدار به دست آمده در این مطالعه است. علت این اختلاف می تواند ناشی از تفاوت در نیازمندی غذایی، سویه ها و شرایط متفاوت آزمایش باشد. با توجه به اینکه بر اساس طرح آزمایش فاکتوریل که مورد استفاده Garcia-Ochoa بود، منبع کربن در تولید زانتان بی اهمیت شناخته شد که این مطلب نشان دهنده خطای بالای موجود در این روش است؛ بنابر این دور از انتظار نیست که در مورد انتخاب غلظت بهینه منبع گوگرد خطا وجود داشته باشد.

مهم ترین فاکتوری که در تولید توده سلولی نقش دارد (از بین فاکتورهای بررسی شده در این پژوهش) منبع نیتروژن است (جدول ۷) ، در حالی که اهمیت منبع نیتروژن در میزان تولید صمغ(جدول ۳) و ایجاد ویسکوزیته(جدول ۵) در برهم کنش با اثر منبع گوگرد است. برهم کنشهای منبع گوگرد و نیتروژن با ۹/۹۳ درصد اثر سومین فاکتور مؤثر در تولید بهینه صمغ زانتان است. بر اساس شکل ۳ اعمال این اثر با ۲/۸ g/l سولفات سدیم و ۱/۲ g/l کلرید آمونیوم انجام گرفت. غلظت بهینه منبع گوگرد در این مرحله تأیید کننده غلظت به دست آمده در مرحله قبل(اثر برهم کنشی منبع گوگرد و منیزیم در تولید زانتان) بود . تراکم این مقدار از منبع نیتروژن برای ایجاد ویسکوزیته بالا و تحریک رشد سلولی مورد نیاز است . این مقدار از منبع نیتروژن برای تأمین فعالیتهای آنزیمهای خاص کافی بوده و اجازه رشد مناسب و تحریک سنتز پلی ساکارید را به

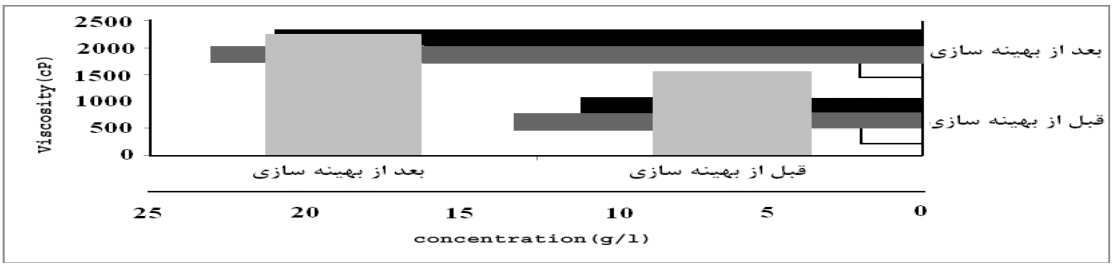
www.SID.ir

Archive of SID

سلولها می دهد (۱۵) آزمایشاتEl-Salam بر روی سویه *X. campestris E-NRC-3* نشان داد که با استفاده از کلرید آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن با غلظت ۲/۲۹ g/l بیشترین زانتان تولید می شود در حالی که با جایگزینی اکی مولار با دیگر منابع نیتروژن همچون پپتون ، عصاره مخمر، پساب روغن کشی ذرت ، اوره ، فسفات امونیوم، فسفات هیدروژن آمونیوم، فسفات دی هیدروژن آمونیوم، نیترات آمونیوم و نیترات سدیم میزان تولید کاهش یافت (٦) در حالی که Souw نشان داد که از بین ۲۱ اسید آمینه و ۷ نمک آمونیومی و سدیم نیترات و اوره ؛ گلوتامات در غلظت بهینه خود (۱۵ mM) بیشترین زانتان(g/Kg of dry weight of culture medium ۳۳) را تولید کرد و از بین مواد معدنی سدیم نیترات(۱۰ mM) و نیترات آمونیوم (۷/۵ mM) برای سویه *X. campestris NRRL-1459* بر سولفات آمونیوم(۷/۵ mM) ارجحیت داشتند (۳۱). گزارشات Goto در سال ۱۹۷۳ نشان داد که اسیدهای آمینه گلوتامیک، پرولین، هیستیدین و لوسین برای تولید پلی ساکارید در *Pseudomonad aueroginosa* مناسب هستند (٦) و نتایج آزمایشات Souw در سال ۱۹۷۹ حاکی از اثر مهاری اسید آمینه های سرین ، آرژنین، تریپتوفان و لیستین بر تولید زانتان بود (٦). این تنوع در نوع و غلظت بهینه منبع نیتروژن نشان می دهد که سویه ها در نیازمندی غذایی به منبع نیتروژن متفاوت رفتار می کنند. نتایج Flores و همکارانش بر روی سویهٔ *X. campestris NRRL-1459 S4L* حاکی از اثر گذاری ۸/٦g/l کلرید آمونیوم در صفات رئولوژیک زانتان بوده و غلظتهای کمتر اثری نداشتند (۸). در حالی که Casa با آزمایش سویه *X. campestris NRRL-1459* نشان داد که نیتروژن اولیه محیط تولید، اثر مشخصی بر محتوای پیروات زانتان حاصله دارد. پیرویلاسیون در ۰/۵۷ g/l منبع نیتروژن (نیترات آمونیوم) بیشترین میزان را داراست و با افزایش بیشتر غلظت نیتروژن در محیط تولید میزان پیرویلاسیون کاهش می یابد. همچنین نشان داد که منبع نیتروژن روی محتوی استات زانتان اثرخاصی ندارد. Marquet نشان داد که سویهٔ B-1459S-4L با استفاده از دی آمونیوم فسفات مقدار فراوانی زانتان با کیفیت بالا تولید می کند. در حالی که با جایگزینی منبع نیتروژن با نیترات سدیم و مخمر آبجوی اتولیز شده، مواد محلول در آب پسماند تخمیر الکلی، ویسکوزیته زانتان به طور مشخصی کاهش می یابد. در حالی که طی این پژوهش دیده شد که از بین فاکتورهای به کار رفته برهم کنش منبع نیتروژن و گوگرد با ۱۲ درصد تأثیر، دومین فاکتور مؤثر در ایجاد ویسکوزیته زانتان حاصل از سویه b82 است.



شکل ٤- نمودار حاصل از اثرات اصلی بر هم کنشهای فاکتورها در توده سلولی : در شرایط مورد بررسی فاکتورهای FeS دارای اثرات بـر هم کنش می باشند و سطوح بهینه عبارتند از: Fe2-S2



شکل ٥- مقایسه میزان تولید زانتان(g/l) توده سلولی (g/l) محصول خام (g/l) ویسکوزیته (cP) قبل و بعد از بهینه شدن

www.SID.ir

Archive of SID

منبع فسفات چهارمین فاکتور مؤثر در تولید زانتان توسط سویهٔ b82 با ٦/۸۳ درصد اثر بود. غلظت بهینه منبع فسفات ۵/۸ g/l بود که به شکل فسفات دی هیدروژن پتاسیم به محیط افزوده شد. نیاز به فسفر در محیط کشت به دلیل نقش بافری فسفات و تأمین برخی نیازمندیهای میکروارگانیسم است (۱۳) و باعث تحریک رشد سلولی و تولید پلی ساکارید می شود (۲۲). فسفر در مسیر تولید زانتان یک عنصر کلیدی محسوب می شود (۲۲). نتایج طرح آزمایش به کار رفته اثبات می کرد که اهمیت فسفر بیشتر در تولید توده سلولی بود در حالی که اهمیت این فاکتور برای تولید صمغ و ویسکوزیته کمتر است (به ترتیب چهارمین و سومین فاکتورمهم).علت اهمیت فسفر برای رشد توده سلولی به دلیل نقش ساختاری فسفرو همچنین به عنوان تأمین کننده منبع انرژی و تنظیم کننده واکنشهای متابولیسم می باشد. البته فسفر در مسیر بیوسنتز زانتان نیز نقش تنظیمی دارد (۸) و برای فعالیت آنزیمهای اختصاصی مسیر بیوسنتز زانتان (فسفومانوزایزومراز، GDP مانوز پیروفسفریلاز و GDP مانوز دهیدروژناز) که کاتالیز کننده مسیر سنتز پلی ساکارید هستند(۱۱) مورد نیاز است. همچنین نقش بافری فسفات در محیط نیز شایان اهمیت است (۱۳). آزمایشات Souw نیز نشان داد که تولید زانتان در *X. campestris NRRL-1459* تحت کنترل فسفات است و غلظتهای بیش از سطح بهینه (٦/۸ g/l =۵۰mM)تولید زانتان را مهار می کند (۳۰) که این غلظت مشابه غلظت بهینه به دست آمده در این مطالعه بر روی سویهٔ b82 است. Zhang نشان داد که در ترکیب سلولی میکروارگانیسم ها ۱ درصد تا ۳ درصد فسفر وجود دارد (۳۸) که برای تأمین آن $m.mole\ l^{-1}$ ۳۰۰-۰/۳ (معادل ۳۰/٦-۰/۰۳۰٦ g/l) فسفات به محیط کشت افزوده می شود در حالی که غلظتهای بالاتر از $m.mole\ l^{-1}$ ۱۰ (معادل ۱/٦ g/l) اثر مهار کنندگی برای تولیدات باکتری دارد (٤). نتایج Sutherland بر روی باکتریهای *E.coli* و *Klebsiella aerogenes* نشان داد که حضور مقدار فراوان پلی ساکارید در شرایط محدودیت منبع فسفر بود (۳۳). Garcia-Ochoa در سال ۱۹۹۲ نشان داد که فسفر باید در مقادیر کم باشد زیرا دارای اثر منفی روی رشد و تولید است (۱۰). نتایج مطالعات Vuyst در سال ۱۹۹٤نشان داد که افزایش غلظت فسفات معدنی باعث کاهش تشکیل زانتان و همچنین محتوی کم پیروات در زانتان حاصله می گردد (۳٤)، در حالی که Marquet در سال ۱۹۸۹ نشان داد که برای به دست آوردن پلی ساکارید با پیروات بالا بسیار مهم است که سطح کل فسفات حداقل ۰/۲۵ درصد باشد و همچنین غلظتهای بیش از ۰/۳۵ درصد هیچ اثری روی پیروات یا بازده تولید ندارد. طی این مطالعه دیده شد که در مورد سویهٔ b82 منبع فسفر در برهم کنش با منبع منیزیم سومین فاکتور مؤثر در ایجاد ویسکوزیته(۱۲ درصد تاثیر) است (جدول ۵) و این مطلب با نتایج دیگر پژوهشگران تفاوت دارد زیرا دیده شد که برای ایجاد ویسکوزیتهٔ بالا در محیط و همچنین افزایش تولید توده سلولی به میزان کمتری از منبع فسفر نیازدارد در حالی که تولید زانتان در این سویه نیازمند فسفر بیشتری است.

برهم کنش منبع آهن و فسفر (۵/۸۰ درصد اثر نسبی) ششمین فاکتور مؤثر در تولید زانتان است. غلظت mg/l ۱/٦۸ کلرید فریک به عنوان منبع آهن و g/l ۵/۸ فسفات دی هیدروژن پتاسیم به عنوان منبع فسفات تأمین کننده مقدار بیشینه تولید حاصل از برهم کنش این دو عنصر بود. غلظت به دست آمده برای منبع فسفات نیز نتایج مراحل قبل – اثر منبع فسفر به تنهایی – را تأیید کرد. آهن در مرکز کاتالیتیک بسیاری از آنزیمها در میکروارگانیسم ها وجود دارد و در زنجیره تنفسی و تولید انرژی نقش دارد (۱۸) بررسی نتایج این پژوهش نشان می دهد که آهن بیشتر بر رشد باکتری مؤثر است و اثر آن بر روی تولید زانتان و ایجاد ویسکوزیته بسیار کم(به ترتیب ۵/۸ درصد و ۷ درصد) است. نتایج دیگر محققان نیز نشان می دهد که آهن به عنوان فاکتور محدود کننده رشد مطرح است و غلظتهای میکرومولار آن برای رشد و تکثیر باکتری

www.SID.ir

Archive of SID

ضروری است (۳۷) در واقع آهن نقش حیاتی در ارتباطهای گیاه و عامل فیتوپاتوژن دارد و باعث بروز نشانه های ازدیاد حساسیت در گیاه غیر میزبان و ایجاد نشانه های بیماری در گیاه میزبانی می گردد (۳۲) و ایفای این نقش بدون تأثیر بر اگزوپلی ساکارید مترشحه است (۲) لذا با توجه به اینکه غلظتهای میکرومولار آهن در آب مصرفی به عنوان حلال محیط کشت وجود دارند و تنظیم غلظت آن در تولید زانتان اهمیت ندارد؛ بنابراین نیاز باکتری به ماده مذکور بدون افزودن هیچ گونه منبع آهن به محیط کشت تأمین خواهد شد.

نتایج این پژوهش نشان داد که در تولید زانتان می توان از اثر برهم کنشی منبع گوگرد و فسفر، منیزیم و فسفر، گوگرد و آهن، فسفر و نیتروژن، منیزیم و نیتروژن، آهن و منیزیم و همچنین اثر منبع نیتروژن به تنهایی چشم پوشی کرد. مقایسه نتایج اولیه (قبل از بهینه سازی) و بعد از بهینه سازی در شکل ۵ آمده است.

این نتایج بخوبی نشان می دهد که نیازمندیهای غذایی رشد توده سلولی و تولید زانتان و ایجاد ویسکوزیته در سویه های مختلف با هم متفاوت می باشند.

بر این اساس مقدارهای بهینه (g/l) عبارتند از: فسفات (۵/۸) از فسفات پتاسیم، منیزیم (۰/۲٤) از سولفات منیزیم، گوگرد (۲/۸) از سولفات سدیم، نیتروژن (۱/۲)از کلرید آمونیوم، آهن (۱/٦۸ mg/l) از کلرید فریک .

این نتایج مشابه آزمایش شماره ۱۳ است که پاسخ به دست آمده از آن ۲۱/٤۸ g/lاست که تأیید کننده غلظت بهینه به دست آمده از تحلیل نتایج می باشد.(۱۸/۷۸ g/l=Y_{OPT})

دامنه بالایی و پایینی جواب با اطمینان ۹۵ درصد برابر با ۱٦/۱۱ – ۲۱/٤۵ g/l است.

منابع

۱- عزیزی م.، ۱۳۸۵، بررسی اثرات ترکیبات کانی بر تولید صمغ گزانتان و مطالعه میانکنش های بیوپلیمر_ کاتیون، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه الزهرا، ۱۳۱ صفحه

2. Chatterjee S., 2002, *rpfF* Mutants of *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae are deficient for virulence and growth under low iron conditions, Molecular Plant-Microbe Interactions, 15 (5) , 463–471
3. Duckworth M, 1977, Teichoic acids , in Sutherland I.W , Surface carbohydrates of the prokaryotic cell , Academic press, 177-208
4. Dunn G.M, 1985, Nutritional requirements of microorganisms, in: Yong I.M, Comperhensive biotechnology, Pergamon Press, 1, 113-122
5. Egli T, 2000, Nutrition of microorganisms, in: Lederberg J, Encyclopedia of microbiology, 3, 431-447
6. El-salam M.H.Abd, 1994, Bioconversion of sugarcane molasses into xanthan gum, journal of biotechnology, 33, 103-106
7. Finnerty W.R., 2000, Biopolymers, production and uses of, in: Lederberg J, Encyclopedia of microbiology, V.3, 431-447
8. Flores Candia J.L., 1999, Effect of nitrogen source on pyrovate content and reological properties of xanthan, Biotechnology progress, 15, 446-452
9. Flores Candia J.L., Deckwer W.D., 1999 , Xanthan gum , in : Flickinger M.C. , Encyclopedia of bioprocess technology : ferementation , biocatalysis and bioseparation , 5 , 2695-2711
10. Garcia – Ochoa F, 1992, Nutritional study of *Xanthomanas campestris* in xanthan gum production by factorial design experiments, Enzyme microbiology and technology, 14: 991-996
11. Hsieh C. , Tseng M.H., Li C.J., 2006 , Production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (CCRC 36041) under limitations of nutrients , Enzyme and Microbial Technology 38 (2006) 109–117
12. Hsu C-H, Lo Y.M., 2003, Characterization of xanthan gum biosynthesis in a centrifugal,

www.SID.ir

Archive of SID

packed-bed reactor using metabolic flux analysis , Process biochemistry, 38, 1617-1625

13. Kalogiannis S., Iakovidou G., Liakopoulou-Kyriakides M., Kyriakidis D.A., Skaracis G.N., 2003, Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses, Process Biochemistry, 1–8.
14. Katzbauer B, 1998, Properties and application of xanthan gum, Polymer degredation and stability, 59, 81-84
15. Katzen F., Becker A., Puhler A., Ielpi L., 1998, Xanthan gum biosynthesis and application: biochemical / genetic perspective , Microbial biotechnology , 50, 145-152
16. Letisse F, Chevallereau P., Simon J.L., Lindley N.D., 2001,Kinetic analysis of growth and xanthan gum production with *Xanthomonas comprestris* on sucrose, using sequentially consumed nitrogen sources, Applied Microbial Biotechnology, 55, 417–422.
17. Lo Yang –ming, 1997, Effect of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomanas campestris* , Applied microbial biotechnology, 47, 689-694
18. Madigan (2000) Brock biology of microorganisms
19. Markovitz A, 1977,Genetics and regulation of bacterial capsular polysaccharide biosynthesis and radiation sensitivity, in Sutherland I.W , Surface carbohydrates of the prokaryotic cell , Academic press,415-462
20. Molina O, 1993, Effect of corn steep liquor on xanthan production by *Xanthomonas campestris*, Biotechnology letters, 15(5), 495-498
21. Moore C.M ,Dihristina T.J., Georgia A., 2000, Metal (U, Fe, Mn , Hg) cycling , in : Lederberg J, Encyclopedia of microbiology , V.3 , 431-447
22. Moreno J, Lopez M.J., Vargas-Garcia C., Vazquez R., 1998, Use of agriculture waste for xanthan production by *Xanthomonas campestris*, Journal of industrial microbiology and biotechnology, 21, 242-246
23. Nichols C.A.M , 2005, Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review, Marine biotechnology,7(4) : 253 – 271
24. Ro-Salam S., England R., 2006, Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas comprestris* sp. Enzyme and Microbial Technology , 39, 197–207
25. Roseiro J.C, Esgalhado ME, Collaco MTA, Emery AN, 1992,Medium development for xanthan production, Process biochemistry,27: 167-175
26. Rosiero J.C, Emery N.A, Simoes P, Estevao F., Amaral-Collaco M.T., 1993, Production of xanthan by in flow cultures of *Xanthomonas campestris* , Applied microbial biotechnology , 38, 709-713
27. Roy R.K , 2001, Design of experimental using the Taguchi approach , A Wily-interscience publication
28. Shu C.H. , Herbest H., Schumpe A., Deckwer W.C., , 1990, Effect of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris* , Biotechnology and bioengineering , 35 ,454 – 468
29. Soudi, M.R. ,Ebrahimi M.,Sharyat-panahi S., 2006 , Xanthan gum production using whey for preculture preparation. In "Modern multidisciplinary applied microbiology: exploring microbes and their interactions". Ed. by Antonio mendez-Vilas. Pub. Wiely-VCH. PP:268-271
30. Souw P., Demain A.L., 1979, Nutritional studies on xanthan production by Xanthomonas campestris NRRL B1459, Applied and enviromental microbiology ,37(6) 1186-1192
31. Strobel R.J., Sullivan G.R., 1999, Experimental design for improvement of fermentations , in:Demain A.L , Manual of industrial microbiology and biotechnology , ASM press , second edition , 80-93
32. Subramoni S, 2005, Growth Deficiency of a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae fur* Mutant in Rice Leaves Is Rescued by Ascorbic Acid Supplementation, MPMI , 18(7), 644–651.
33. Sutherland I.W, 1977, Bacterial exopolysaccharides-their nature and production, in Sutherland I.W , Surface carbohydrates of the prokaryotic cell , Academic press, 27-96
34. Vandamme E.J, Baets S.D., Steinbuchel A., 2002, Polysaccharides I: Polysaccharides from prokaryotes, in: Steinbuchel A, Wiley-Vch, Biopolymers, 5, 259-297
35. Vuyst L.D, Vermeire, A. , 1994, Use of industrial medium for xanthan production by

www.SID.ir

Archive of SID

Xanthomonas campestris NRRL-B-1459, Appllied Microbiology and Biotechnology, 42, 187-191

36. Weuster – Botz D. , 2000 , Experimental design for fermentation media development : Statistical Design or global random search ?, Journal of bioscience and bioengineering , 90(5) 473-483
37. Wiggerich H.G., 2000, The *exbD2* gene as well as the iron-uptake genes *tonB*, *exbB* and *exbD1* of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* are essential for the induction of a hypersensitive response on pepper (*Capsicum annuum*) , Microbiology , 146, 1053–1060
38. Zhang J, Greasham R., 1999, Chemically defined media for commercial fermentations , Appllied Microbiology and Biotechnology , 51, 407- 421

Optimization of some cultural factor of native strain of *Xanthomonas campestris b82* with Taguchi method for production of microbial xanthan gum

Azizi M.[1], Soudi M.R.[1], and Shams S.[2]

[1] Biology Dept., Faculty of Science, Alzahra University, Tehran, I.R. of IRAN

[2] Mathematics Dept., Faculty of Science, Alzahra University, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Xanthan is one of the most important industrial biopolymer which is produced by different strains of genus of *Xanthomonas.* In this study we use Taguchi experimental design for optimization of magnesium, iron, sulfur, nitrogen and phosphorus sources in culture medium of native xanthan producer strain *b82* of *Xanthomonas campestris* which recently has been screened and identified. Our results showed that in optimal condition (phosphate source content with optimal concentration of 5.8 g/l kalium phosphate, magnesium source content with optimal concentration of 0.24 g/l magnesium sulfate, sulfur source content with optimal concentration of 2.8 g/l sodium sulfate, nitrogen source content with optimal concentration of 1.2 g/l ammonium chloride, iron source content with optimal concentration of 1.68mg/l ferric chloride) xanthan production was 16.11-21.45 g/l with Confidence degree 95%.In addition , we showed that concentration of magnesium source is key factor of xanthan production, although nitrogen source is more important for bacterial growth and iron source is the most efficient factor of viscosity production.

Keywords: xanthan, taguchi, magnesium, nitrogen, iron, *Xanthomonas campestris*

www.SID.ir