فصلنامه علمی - پژوهشی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۴، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰

بهینه‌سازی شرایط تولید اگزوپلی ساکارید توسط *لوکونوستوک دکسترانیکوم* جدا شده از پنیر سنتی سوریه

مهند حاج مصطفی[۱*]، بسام العقله[۲]، قاسم عاشوری[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۲

چکیده

تولید پلی‌ساکاریدهای لاکتیکی (با توجه به گراس بودن آن‌ها) می‌تواند به‌عنوان جایگزین ارزشمندی برای پلی ساکاریدهای میکروبی تولید شده فعلی باشد. در این تحقیق به بررسی منابع کربن و نیتروژن مناسب برای تولید اگزو پلی ساکاریدها[1] (EPSs) توسط لوکونوستوک دکسترانیکوم (Leuconostoc dextranicum) که یک باکتری گرامی است (Fraqueza. 2015)، پرداخته شد. نتایج بررسی‌های انجام شده نشان داد که گلوکز (Glu) در مقایسه با قندهای دیگر و پپتون در مقایسه با منابع نیتروژن دیگر، باعث تولید EPSs بیشتری در محیط کشت شدند. لذا در ادامهٔ تحقیق تنها از گلوکز و پپتون جهت بهینه کردن شرایط تولید EPSs استفاده شد. به منظور بررسی تأثیر و بهینه سازی شرایط تولید EPS، سه پارامتر دما، pH و زمان انکوباسیون، هر کدام در پنج سطح انتخاب شده و به طور جداگانه بهینه شدند. سپس برای دستیابی به سطوحی از متغیرهای مستقل که در نتیجه به کارگیری آن ها، بهترین محصول از واکنش به دست می‌آمد، بهینه سازی انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده، دمای انکوباسیون ۴۰ °C، pH برابر ۵/۵ و زمان تخمیر ۴۸ ساعت به عنوان بهترین شرایط برای تولید آزمایشگاهی EPSs انتخاب شدند. به طور خلاصه نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که می توان از باکتری بومی لوکونوستوک دکسترانیکوم و محیط کشت ارزان قیمت شیر پس چرخ (Skimmed milk) برای تولید این محصول با ارزش استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: اگزو پلی ساکاریدها، باکتری‌های اسید لاکتیک، لوکونوستوک دکسترانیکوم، شیر پس چرخ

۱- دانشجوی دکترای پژوهشکده زیست فناوری و مهندسی زیستی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران
*(نویسنده مسئول: mustafa.muhannad@gmail.com)
۲- محقق درکمیسیون ملی بیوتکنولوژی دمشق، دمشق، سوریه
۳- دانشجوی دکترای پژوهشکده زیست فناوری و مهندسی زیستی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

1. Exopolysaccharides

مقدمه

از نیمه دوم قرن حاضر استفادهٔ هوشمندانه از میکروارگانیسم ها منجر به تولید صنعتی مواد متعددی مانند حلال ها، آنزیم ها، آنتی بیوتیک ها و پلی ساکارید ها شده است. افزایش تقاضا برای کاربرد های صنعتی پلیمر های طبیعی مختلف، باعث افزایش توجه به استفاده از اگزو پلی ساکارید ها (EPSs) ساخته شده توسط میکروارگانیسم ها شده است.

EPS ها، پلی ساکارید های بلند زنجیره ای از واحد های تکرار شونده قندی و غیر قندی هستند که شاخه دار نیز می باشند. واحد های قندی عمدتا گلوکز[۱]، گالاکتوز[۲] و رامنوز[۳] هستند (Welman and Maddox 2003). پلی ساکارید های میکروبی ترکیبات برون ریزی هستند که از سلول به بیرون ترشح می شوند و مقدار و ساختمان شیمیایی آن ها، بستگی به نوع میکروارگانیسم تولید کننده و سوبسترای کربنی دارد که در اختیار آنان قرار می گیرد (De Vuyst *et al*. 2001; Peant *et al*. 2005).

پلی ساکارید ها بر اساس موقعیت خود نسبت به سلول دسته بندی می شوند. برخی از آن ها به صورت داخل سلولی در سیتوزول[۴] قرار گرفته اند و به عنوان منبع کربن یا انرژی مطرح می باشند. گروه دوم، به عنوان اجزای دیواره سلولی نظیر پپتیدوگلیکان[۵] و تیکوئیک اسید [۶] شناخته می شوند. گروه سوم آن هایی هستند که در خارج از دیواره سلولی واقع می شوند. گروه اخیر به دو شکل وجود دارند یکی به صورت کپسوله[۷] که ارتباط بسیار نزدیکی با دیواره سلولی دارد و دیگری که به محیط خارج ترشح می شود. البته در برخی از موارد هر دو نوع پلی ساکارید (شکل کپسوله وشکل ترشحی) توسط یک میکروب تولید می شوند که در چنین حالتی تشخیص نوع پلی ساکارید مشکل است (Tallon *et al*. 2003).

EPS ها توسط باکتری تولید کننده به عنوان منبع انرژی مصرف نمی شوند زیرا باکتری های تولید کننده لایه چسبنده[۸] معمولا قادر به شکستن EPS هایی که خود تولید می کنند، نیستند. EPS ها، پلیمرهایی با وزن مولکولی بالا هستند و کاربردهای صنعتی گسترده دارند و در زمینه هایی مانند غذاها ، بهداشت (دارو و داروسازی، ایجاد برداشت‌های دندانی)، بازیافت روغن، مواد آرایشی و به عنوان رنگ های پایه آب بکار می روند. همچنین این ترکیبات می توانند اثرات ثانویه ای به عنوان امولسیفایر[۹]، پایدار کننده، تشکیل دهنده سوسپانسیون، کنترل کننده کریستالیزاسیون، عامل کنترل رئولوژیکی در سیستم های

[1] Glucose
[2] Galactose
[3] Rhamnose
[4] Cytosol
[5] Peptidoglycan
[6] Teichoic acid
[7] Encapsulation
[8] Slime
[9] Emulsifier

آبی، تشکیل فیلم و کپسوله کردن ایفا کنند (Nwodo *et al*. 2012). درحال حاضر بیشتر پلی ساکارید های مورد استفاده در صنعت غذا، از منابع گیاهی (نظیر نشاسته و پکتین) و علف های دریایی (آلجینات[1]، کاراجینان[2]) یا حیوانی تأمین می شوند. عدم مطابقت ساختار پلی ساکارید های گیاهی یا حیوانی با نیاز های موجود در این صنعت، نیاز به انجام برخی اصلاحات شیمیایی بر روی آن ها را می طلبد. از سوی دیگرمحدویت منابع طبیعی و منع قانونی برای کاربرد پلی ساکارید های اصلاح شده شیمیایی موجب ورود نسل جدیدی از پلی ساکاریدها که همان پلی ساکاریدهای میکروبی می باشند به بازار شده است (De Vuyst and Degeest 1999; Mekhici *et al*. 2017).

بسیاری از گونه های باکتری های گرم مثبت و گرم منفی، قارچ ها و بعضی از جلبک ها قادر به سنتز EPSs می باشند، ولیکن از میان عوامل مختلف تولید کننده آن ها، باکتری های اسید لاکتیک نظیر، پروپیونی باکتری ها[3] و بیفیدوباکتری ها[4] بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. سال ۱۸۷۸ که مصادف است با کشف باکتری تولید کننده اگزو پلی ساکارید، به عنوان سر آغاز استفاده از EPS های تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیک در مواد غذایی، محسوب می شود. به علت اهمیت گسترده پلی ساکارید ها در فراورده های غذایی و صنعتی، جستجو برای یافتن گونه های بدون خطر اسید لاکتیک که تولید کننده پلی ساکارید باشند همچنان ادامه دارد (De Vuyst and Degeest 1999).

با توجه به مفید بودن باکتری های اسید لاکتیک و نقش مهم آن ها به عنوان آغازگر تخمیری، همچنین با لحاظ کردن این نکته که منبع میکروبی تولید برخی از پلی ساکارید های طبیعی که در حال حاضر تولید می شود از لحاظ بدون خطر بودن کاملاً تأیید شده نیست، تولید پلی ساکارید های لاکتیکی (با توجه به گراس[5] بودن آن‌ها) می تواند به عنوان جایگزین ارزشمندی برای تولید پلی ساکارید های میکروبی تولید شده فعلی باشد (Kumar *et al*. 1998). شرایط ثابتی که بتوان در آن EPSs میکروبی را با راندمان بالا تولید کرد، وجود ندارد، زیرا میکروارگانیسم ها از نظر استفاده از منابع کربن و نیتروژن، دما و pH بهینه با یکدیگر متفاوت اند. راندمان تولید EPSs توسط باکتری های اسید لاکتیک، بستگی به ترکیب محیط کشت (کربن و نیتروژن) ، شرایط رشد میکروارگانیسم نظیر دما،pH، فشار اکسیژن و شرایط انکوباسیون و نوع سویه میکروبی مورد استفاده دارد (Degeest et al. 2001; Macedo *et al*. 2002).

در این تحقیق به بررسی منابع کربن و نیتروژن مناسب برای تولید EPSs توسط *لوکونوستوک دکسترانیکوم* که یک باکتری گراس است (Benmechernene et al. 2013, Emmanuel *et al*. 2017) پرداخته شد. سپس به منظور بررسی

[1] Alginate
[2] Carrageenan
[3] Propionibacterium
[4] Bifidobacterium
[5] GRAS (Generally Recognized as Safe)

تأثیر و بهینه سازی شرایط تولید EPSs، سه پارامتر دما، pH و زمان انکوباسیون، هر کدام در پنج سطح انتخاب و به طور جداگانه بهینه شدند. از آنجا که محیط MRS یک محیط سنتتیک بوده که گاهی در دسترس نیست و از طرفی جهت تولید انبوه، نسبتاً گران قیمت است، تصمیم گرفته شد تا جایگزین برای آن انتخاب شود. محیط کشت شیر پس چرخ[1] (SM) در مقایسه با محیط کشت MRS یک محیط کاملاً ارزان قیمت بوده و در تجاری کردن فرآیندهای تخمیری قابل استفاده است. . در سال ۲۰۰۶، آسلایم و همکاران میزان EPSs تولید شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیر گونه *بولگاریکوس*[2] و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*[3] در محیط کشت M17/MRS مایع و محیط کشت SM را بررسی کردند. بر اساس نتایج بدست آمده از تحقیق آنها، میزان EPSs تولید شده در SM در مقایسه با محیط کشت MRS، بیشتر بود (Aslim *et al* 2006). تولید مقدار بیشتر EPSs در محیط کشت SM در مقایسه با محیط کشت MRS احتمالاً به این دلیل است که وقتی لاکتوز هیدرولیز می شود، گالاکتوز بر عکس گلوکز توسط باکتری مصرف نمی شود بلکه در محیط کشت باقی می ماند و در سنتز EPSs به کار می رود (Gassem *et al* 1997). بنابراین در این مطالعه و با توجه به اینکه تولید EPSs در محیط کشت SM در مقایسه با محیط کشت MRS مایع بیشتر است، محیط کشت SM جهت مرحله بهینه کردن شرایط تولید آزمایشگاهی EPSs توسط باکتری *لوکونوستوک دکسترانیکوم* که از پنیر سنتی سوریه تهیه شده از مخلوط شیر بز و گوسفند جدا شده بود (Mustafa *et al*. 2015) مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل هیدروکسید سدیم (تولید شده از شرکت مرک)، نیترات پتاسیم (تولید شده از شرکت مرک)، اسید سولفوریک (تولید شده از شرکت شارلوا با خلوص ٪ ۹۵-۹۷) ، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (تولید شده توسط شرکت مرک، با خلوص ٪ ۹۹)، اسید تری کلرو استیک (تولید شده از شرکت مرک)، الکل ایزو آمیلیک (تولید شده از شرکت مرک)، فنول (تولید شده توسط شرکت مرک)، اتانول مطلق (تولید شده توسط شرکت شارلوا، با خلوص ٪ ۹۹/۸) ، قندها (تولید شده توسط شرکت مرک)، بی کربنات سدیم (تولید شده توسط شرکت مرک، با خلوص ٪ ۹۹/۵) ، محیط کشت MRS از نوع آزمایشگاهی (تولید شده توسط شرکت *میکرومدیا* مجارستان)، شیر پس چرخ

[1] Skimmed milk (SM)
[2] Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus
[3] Streptococcus thermophilus

(SM) (تولید شده توسط شرکت میکرومدیا)، عصاره مخمر (تولید شده توسط شرکت میکرومدیا)، پپتون[1] (تولید شده توسط شرکت میکرومدیا)، کازئین (تولید شده توسط شرکت مرک)، سولفات آمونیوم (تولید شـده از شرکت مرک) و کیسه دیالیز بود. همچنین باکتری *لوکونوستوک دکسترانیکوم* از پنیر سنتی جدا سازی شد و درکمیسیون ملی بیوتکنولوژی دمشق در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد و زیر گلسیرول ٪ ۲۵ نگهداری شد (برای شناسایی باکتری از آزمون های مورفولـوژیکی و فیزیولوژیکی و سیستم های API استفاده شد) (Haj-Mustafa *et al*. 2015).

روش‌ها

آماده کردن کشت میکروبی

در طول فعالیت های آزمایشگاهی، جهت آماده کردن کشت میکروبی، لوله اپندروف که در فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی گراد نگهداری می‌شد، از فریزر خارج و پس از ذوب شدن در شرایط کاملا استریل، در زیر هود و در کنار شعله به ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت MRS مایع استریل انتقال یافت. باکتری به مدت یک شبانه روز (۱۶ ساعت) در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد انکوبه شد و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. جهت انجام آزمون ها، کشت ثانویه ای از کشت فعال شده، در شرایط مشابه تهیه و به عنوان کشت تازه در آزمایشات استفاده گردید (Haj-Mustafa *et al*. 2015).

آماده سازی مایه تلقیح

جهت تهیه مایه تلقیح، باکتری *لوکونوستوک دکسترانیکوم* در محیط MRS مایع استریل تلقیح شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای۳۲ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس این آبگوشت فعال شده در شرایط کاملاً استریل، در زیر هود و در کنار شعله به فالکون استریل انتقال یافت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه تحت g ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد و سوپرناتانت آن دور ریخته شد. رسوب باکتریایی حاصل در آب مقطر استریل (۱۰ میلی لیتر) حل شده و بلافاصله مستقیماً به ظرف تخمیر حاوی محیط کشت SM مایع (٪ ۱۰ وزنی/حجمی) استریل منتقل شد (Kimmel et al. 1998; Haj-Mustafa *et al*. 2015).

انتخاب منبع کربن مناسب جهت تولید EPSs

برای انتخاب مناسب ترین منبع کربن جهت تولید EPSs، محیط کشت SM مایع با هر یک از قند های ساکارز، گلوکز، لاکتوز، فرکتوز و مالتوز (با غلظت ٪ ۲۰ وزنی/حجمی) به طور جداگانه غنی سازی شد، سپس توانایی تولید EPSs توسط

[1] Peptone

باکتری *لوکونوستوک دکسترانیکوم* با آن قندها مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت پس از مقایسه مقدار EPSs تولید شده در هر یک از قندهای مورد مطالعه، یکی از آن ها براساس بیشترین میزان تولید جهت ادامهٔ آزمایشات انتخاب شد (Haj-Mustafa *et al*. 2015).

انتخاب منبع نیتروژن مناسب برای تولید EPSs

جهت بهبود میزان تولید EPSs توسط باکتری منتخب، محیط کشت SM به طور جداگانه با منابع نیتروژن مختلف (عصاره مخمر، پپتون، کازئین، نیترات پتاسیم و سولفات آمونیوم با غلظت های ٪ ۵ وزنی/حجمی) غنی سازی شد و اثر هر یک از این منابع نیتروژنی بر روی سطح تولید EPSs مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت یکی از آن ها بر اساس بیشترین سطح تولید برای ادامهٔ آزمایشات انتخاب شد.

در کلیهٔ آزمایشات مربوط به بندهای ۲-۳ و ۲-۴ فرآیند تخمیر در فلاسک های یک لیتری حاوی ۵۰۰ میلی لیتر از محیط کشت SM استریل شده (٪ ۱۰ وزنی/حجمی، ۱۱۰ درجه سانتی گراد، ۶ دقیقه)، ۱ درصد (حجمی/حجمی) مایه تلقیح و منبع قند و نیتروژن استریل شده (بر حسب غلظت مورد استفاده در هر Run) در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی گراد، pH ۶/۰ و در دور rpm ۱۰۰ و به مدت ۳۶ ساعت انجام گرفت. لازم به ذکر است اندازه گیری مقدار EPSs در بند های مذکور، در سه تکرار انجام شد (Haj-Mustafa *et al*. 2015).

بهینه‌سازی شرایط تولید EPSs درسطح آزمایشگاهی

تولید EPS توسط سویه های باکتری های اسید لاکتیک بسته به شرایط کشت متفاوت است. عوامل محیطی و شرایط خاص کشت مانند pH، دما، نسبت کربن به نیتروژن (C/N)، میزان اکسیژن رسانی و منابع کربن می توانند بر تولید EPS تأثیر بگذارند (Ates. 2015). به منظور بررسی تأثیر و بهینه سازی شرایط تولید EPSs ، سه پارامتر دما (Tem) بر حسب درجه سانتی گراد، pH و زمان (T) بر حسب ساعت در پنج سطح طبق جدول (۱) به کار گرفته شدند. پارامتر ها به صورت جداگانه بهینه شد و به دلیل زیاد بودن تعداد فاکتورها، انجام تمام آزمایشات امکان پذیر نبود، در نتیجه از طراحی فاکتوریل جزئی در قالب CCD برای انتخاب ترکیبات مورد نظر استفاده شد.

جدول ۱: فاکتورهای مورد استفاده برای بهینه سازی تولید EPSs

فاکتورها	سطوح پارامترها				
Tem (°C)	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵
pH	۴/۵	۵/۰	۵/۵	۶/۰	۶/۵
T (h)	۱۸	۲۴	۳۶	۴۸	۷۲

عمل تخمیر برای بهینه سازی شرایط تولید EPSs در فلاسک های یک لیتری حاوی ۵۰۰ میلی لیتر از محیط کشت SM استریل شده (٪ ۱۰ وزنی/حجمی، ۱۱۰ درجه سانتی گراد، ۶ دقیقه)، ۱ درصد (حجمی/حجمی) مایه تلقیح، منبع نیتروژن (پپتون) و منبع کربن گلوکز (Glu) به ترتیب با غلظت های ٪ ۵ و ٪ ۲۰ و در دور rpm ۱۰۰ انجام گرفت. لازم به ذکر است اندازه گیری مقدار EPSs در سه تکرار انجام شد.

جداسازی و خالص سازی EPSs تولید شده توسط باکتری *لوکونوستوک دکسترانیکوم*

جهت جداسازی EPSs، ابتدا مقداری از محیط کشت تخمیر شده برداشته شد و به فالکون های ۵۰ میلی لیتری منتقل شد سپس لوله ها به منظور غیر فعال کردن آنزیم های هیدرولیز کننده پلیمر ها و آزاد کردن EPSs متصل به دیواره سلول ها، در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم حرارت داده شدند (Cerning *et al*. 1998). پس از آن لوله ها در دمای اتاق سرد شدند و به آن ها (۲۵۰ میکرولیتر) تری کلرو استیک اسید (٪ ۸۵) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (Frengova *et al*. 2000). پروتئین ها و سلول ها با سانتریفوژ (در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه تحت g ۸۰۰۰) جدا شدند و به سوپرناتانت حاصل از سانتریفوژ به منظور رسوب دهی EPSs، دو حجم اتانل سرد ٪ ۹۵ اضافه شده و پس از نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت، رسوب حاصل با سانتریفوژ (در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه تحت g ۱۶۰۰۰) جمع آوری شد. EPSs حاصل در آب دیونیزه حل شد و خالص سازی آن با استفاده از غشای دیالیز (با حد آستانه وزن مولکولی برابر با ۱۲ کیلو دالتون)، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد صورت گرفت (روح بخش و حق شناس ۱۳۶۹).

روش سنجش EPSs

جهت تعیین غلظت EPSs خالص شده بر اساس روش دوبایس و همکاران (1956)، منحنی استاندارد همزمان با جذب خوانی نمونه ها رسم شد که در زیر به شرح آن پرادخته می شود.

رسم منحنی استاندار: به منظور رسم منحنی استاندارد از محلول گلوکز، در پنج غلظت ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر استفاده شد. به این ترتیب که به یک میلی لیتر از هر یک از محلول های استاندارد فوق ابتدا یک میلی لیتر محلول فنل ٪ ۵ و پس از آن ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد. محلول ها به مدت نیم ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس میزان جذب آنها در طول موج ۴۸۵ نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد به صورت مقدار جذب محلول ها بر حسب غلظت رسم شد و معادله خط استاندارد محاسبه شد (Goh *et al*. 2005).

اندازه‌گیری مقدار کل کربوهیدرات در نمونه‌های مورد آزمایش: برای اندازه گیری غلظت EPSs هر نمونه، یک میلی لیتر از محلول دیالیز شده برداشته شد و به آن یک میلی لیتر محلول فنل ٪ ۵ و ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد. پس از نیم ساعت نگهداری در دمای اتاق، جذب محلول در طول موج ۴۸۵ نانومتر قرائت شد (Goh *et al*. 2005). جذب نمونه در معادلهٔ خط استاندارد جایگزین و غلظت پلی ساکارید خارج سلولی بر حسب میلی گرم در لیتر گزارش شد. لازم به ذکر است اندازه گیری مقدار EPSs هر نمونه، در سه تکرار انجام شد.

آنالیز آماری

در این تحقیق، تجزیه و تحلیل اطلاعات و رسم نمودار ها به ترتیب با کمک نرم افزار های SPSS و EXCEL انجام شد. برای آنالیز واریانس داده ها از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) تحت نرم افزار IBM SPSS نسخه ۲۱/۰ و در سطح معنی داری ۵ درصد استفاده شد. اختلاف میان آزمایش ها با استفاده از آزمون Duncan (1955) آنالیز شد.

نتایج و بحث

تعیین منبع کربن برتر جهت تولید EPSs

منابع کربن متفاوتی به منظور تولید EPS های میکروبی استفاده می شوند. انتخاب یک منبع کربن مناسب جهت تولید EPS های میکروبی، بستگی به نوع سویه میکروبی مورد استفاده دارد. برای انتخاب منبع کربن مناسب جهت تولید EPSs توسط باکتری *لوکونوستوک دکسترانیکوم*، این باکتری به طور جداگانه در محیط کشت شیر پس چرخ غنی شده با ٪ ۲۰ از قند های ذکر شده کشت داده شد. جدول ۲ نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین میزان تولید پلی ساکارید خارج سلولی تولید شده توسط *این باکتری* را نشان می دهد. باکتری مورد آزمایش مقدار ۲۱۴/۳۲ تا ۳۳۰/۷۹ میلی گرم EPSs را در هر لیتر از محیط کشت SM مایع تولید کرد که از بین آن ها گلوکز بیشترین و مالتوزکمترین مقدار EPSs را تولید کرد. مادلدو و همکاران (۲۰۰۵) پیشنهاد دادند که تفاوت مقادیر EPSs حاصل از این قندها ممکن است مربوط به اختلاف فعالیت آنزیم های شرکت کننده در سنتز نوکلئوتید های قندی باشد (Madledo *et al*. 2005). تجزیه واریانس حاصل از تأثیر منبع قند بر تولید EPSs (جدول ۲) نشان داد که منبع قند مورد استفاده در محیط کشت بر تولید EPSs توسط باکتری *لوکونوستوک دکسترانیکوم* اثر معنی داری دارد ($P < ۰/۰۵$). در این مطالعه با توجه به نتایج حاصل، از قند گلوکز جهت بهینه کردن شرایط تولید آزمایشگاهی EPSs استفاده شد.

جدول ۲: نتایج آزمون مقایسه میانگین تأثیر نوع قند بر تولید EPSs در محیط کشت SM

نوع قند	EPSs تولید شده (میلی گرم/ لیتر)
ساکارز	۲۸۸/۶۵ ± ۴/۲۸^{c}
لاکتوز	۳۱۲/۸۷ ± ۳/۰۸^{b}
گلوکز	۳۳۰/۷۹ ± ۲/۱۸^{a}
فرکتوز	۲۴۱/۳۶ ± ۸/۲۴^{d}
مالتوز	۲۱۴/۳۲ ± ۵/۱۵^{de}

EPSs بر اساس میزان پلی ساکاریدهای مترشحه برحسب میلی گرم در لیتر با سه تکرار و به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده است.

حروف لاتین کوچک متفاوت، نشان دهندهٔ تفاوت معنی دار ($P <$ ۰/۰۵) است.

بررسی تأثیر ماهیت منبع نیتروژن بر روی تولید EPSs

از آنجا که تولید پلی ساکارید در برخی از سویه های باکتریایی وابسته به رشد است و همچنین برخی از آن ها در ساختمان خود، دارای قندهای آمینه (ازت دار) به صورت ان-استیل گلوکز آمین و یا ان-استیل گالاکتوز آمین هستند (De Vuyst and Degeest 1999) بنابراین استفاده از منابع نیتروژنی، غالباً باعث افزایش تولید EPSs می شود (Kumar *et al*. 2007). در این آزمایش جهت بهبود میزان تولید EPSs توسط باکتری *لوکونوستوک دکسترانیکوم*، محیط کشت Glu- SM با منابع نیتروژنی مختلف غنی سازی شد و اثر نوع منبع نیتروژن بر روی مقدار EPSs و رشد این باکتری بررسی شد. بدین منظور توانایی تولید EPSs توسط باکتری *لوکونوستوک دکسترانیکوم* به طور جداگانه در محیط کشت Glu- SM غنی شده با ٪ ۵ پپتون، ٪ ۵ نیترات پتاسیم، ٪ ۵ عصاره مخمر، ٪ ۵ کازئین و ٪ ۵ سولفات آمونیوم مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت یکی از آن ها جهت ادامهٔ آزمایشات انتخاب شد. نتایج تجزیه واریانس تأثیر منبع نیتروژن بر تولید EPSs (جدول ۳) نشان داد که منابع نیتروژنی مختلف مورد استفاده در محیط کشت، بر تولید EPSs توسط باکتری *لوکونوستوک دکسترانیکوم* اثر معنی داری ($P <$ ۰/۰۵) داشته است. همان طور که در جدول ۳ مشاهده می شود بیشترین میزان EPSs در محیط کشت Glu- SM غنی شده با ٪ ۵ عصارهٔ مخمر و ٪ ۵ پپتون، وکمترین مقدار در محیط کشت Glu- SM غنی شده با کازئین و سولفات آمونیوم تولید شده است. این نتایج نشان دهنده اثر منابع مختلف نیتروژن بر تولید EPSs است. در برخی از مطالعات گزارش شده است برخی از محیط های کشت، به دلیل داشتن عصاره گوشت و عصاره مخمر برای اندازه گیری مقدار EPSs مناسب نیستند؛ زیرا در تعیین ساختار مونومرها دخالت کرده و گلوکومانان[1] های موجود در این ترکیبات، مقدار EPSs تولیدی را بیش از حد واقعی نشان می دهد (Gancel and Novel 1994; Kimmel *et al*. 1998). بنابراین در این مطالعه، پپتون به عنوان منبع نیتروژن مناسب جهت بهینه کردن شرایط تولید آزمایشگاهی EPSs مورد استفاده قرار گرفت.

[1] Glucomannan

جدول ۳: نتایج آزمون مقایسه میانگین تأثیر نوع نیتروژن بر تولید EPSs در محیط کشت Glu- SM

نوع نیتروژن	EPSs تولید شده (میلی گرم/ لیتر)
پپتون	۳۲۲/۶۱ ± ۸/۱۳^{ab}
نیترات پتاسیم	۲۹۸/۳۶ ± ۲/۱۷^{c}
عصاره مخمر	۳۳۷/۱۹ ± ۳/۴۲^{a}
کازئین	۲۸۴/۱۱ ± ۱/۸۵^{de}
سولفات آمونیوم	۲۸۷/۴۲ ± ۳/۵۵^{d}

EPSs بر اساس میزان پلی ساکاریدهای مترشحه برحسب میلی گرم در لیتر با سه تکرار و به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده است.

حروف لاتین کوچک غیر یکسان، نشان دهندهٔ تفاوت معنی دار ($P <$ ۰/۰۵) است.

بهینه‌سازی شرایط تولید EPSs

اثر دمای انکوباسیون (Tem)

برای بررسی اثر دما روی میزان تولید EPSs و دستیابی به دمای بهینه تولید، باکتری *لوکونوستوک دکسترانیکوم* در دماهای مختلف ذکر شده در جدول ۱ کشت داده شد. همان طور که در جدول (۴) نشان داده شده است، بیشترین مقدار تولید EPSs در دمای ۴۰ °C رخ داد ولی با ادامه افزایش دما به ۴۵ °C ، مقدار تولید EPSs کاهش نشان داد. این نتایج با یافته های چندین نویسنده قابل مقایسه است که بیشترین مقدار تولید EPSs توسط باکتری های اسید لاکتیک در دمای کشت بالاتر دیده می شود، زیرا دماهای بالا برخی از مسیرهای کاتابولیکی را که انرژی را برای باکتری های اسید لاکتیک فراهم می کند، متوقف می کند، بنابراین سنتز سلولی محدود می شود و سنتز EPSs افزایش پیدا می کند (De Vuyst *et al*. 2001; Laws *et al*. 2001).

جدول ۴: نتایج تأثیر دمای مختلف انکوباسیون بر مقدار تولید EPSs

دما (Tem) برحسب °C	EPSs تولید شده (میلی گرم/ لیتر)
۲۵	۱۶۷/۱۲ ± ۵/۰۲^{e}
۳۰	۲۲۳/۷۲ ± ۶/۱۱^{d}
۳۵	۳۱۲/۰۲ ± ۸/۰۹^{bc}
۴۰	۳۴۳/۳۲ ± ۶/۱۷^{a}
۴۵	۲۷۸/۴۷ ± ۱۰/۲۳^{b}

EPSs بر اساس میزان پلی ساکاریدهای مترشحه برحسب میلی گرم در لیتر با سه تکرار و به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده است.

حروف لاتین کوچک غیر یکسان، نشان دهندهٔ تفاوت معنی دار ($P <$ ۰/۰۵) است.

اثر pH

همانطور که در جدول (۵) دیده می شود بیشترین مقدار EPSs در pH های حدود ۵/۵ و ۶ رخ می دهد و لی با ادامه افزایش pH به بیش از ۶، مقدار تولید EPSs کاهش می یابد. در ارتباط با چگونگی اثر pH بر تولید EPSs مطالعات بسیاری صورت گرفته و نتایج نشان داد، اثر pH به شرایط آزمایش و نوع سویهٔ میکروبی بستگی دارد (Gassem *et al*. 1997). این تحقیقات پیشنهاد کردند بیشترین مقدار تبدیل قند به EPSs، در pH ۵/۸، در حالی که تبدیل قند به بیومس، به طور مؤثری در pH ۶/۲ رخ می دهد (Kimmel *et al*. 1998). بنابراین کاهش میزان EPSs تولید شده با افزایش pH را می توان به افزایش میزان تبدیل قند به بیومس یا احتمالاً به فعالیت آنزیم های تجزیه کننده EPSs نسبت داد.

جدول ۵: نتایج تأثیر pH های مختلف بر مقدار تولید EPSs

pH	EPSs تولید شده (میلی گرم/ لیتر)
۴/۵	۱۵۸/۳۶ ± ۸/۹۲^{e}
۵/۰	۲۷۲/۷۲ ± ۶/۸۷^{c}
۵/۵	۳۴۹/۵۳ ± ۴/۱۷^{a}
۶/۰	۳۱۱/۶۲ ± ۳/۱۵^{b}
۶/۵	۲۱۵/۹۶ ± ۸/۳۷^{d}

EPSs بر اساس میزان پلی ساکاریدهای مترشحه برحسب میلی گرم در لیتر با سه تکرار و به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده است.

حروف لاتین کوچک غیر یکسان، نشان دهندهٔ تفاوت معنی دار ($P < ۰/۰۵$) است.

اثر مدت زمان انکوباسیون (T)

جدول (۶) نشان داد، با افزایش مدت T مقدار تولید EPSs حاصل، افزایش یافت و بهترین مدت زمان برای رسیدن به حد اکثر مقدار، حدود ۴۸ ساعت است، ولی با ادامه فرآیند تخمیر میزان تولید EPSs کاهش پیدا می کند که این امر می تواند به علت فعالیت آنزیم های تجزیه کننده (گلیکوهیدرولاز[1]) EPSs باشد که معمولا در انکوباسیون طولانی مدت اتفاق می افتد (De Vuyst and Degeest 1999).

جدول ۶: نتایج تأثیر مدت زمان های مختلف بر مقدار تولید EPSs

زمان (T) به ساعت	EPSs تولید شده (میلی گرم/ لیتر)
۱۸	۱۸۳/۰۳ ± ۱/۷۳^{e}
۲۴	۲۶۴/۱۶ ± ۲/۶۶^{d}
۳۶	۳۱۴/۴ ± ۵/۵۳^{c}
۴۸	۳۵۳/۲۲ ± ۷/۱۷^{a}

[1] Glycohydrolase

زمان (T) به ساعت	EPSs تولید شده (میلی گرم/ لیتر)
۷۲	۳۴۰/۲۲ ± ۶/۳^{ab}

EPSs بر اساس میزان پلی ساکاریدهای مترشحه برحسب میلی گرم در لیتر با سه تکرار و به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده است.

حروف لاتین کوچک غیر یکسان، نشان دهندهٔ تفاوت معنی دار (P <۰/۰۵) است.

در مرحله بعدی پس از بررسی اثرات پارامتر های مورد نظر روی مقدار تولید EPSs، برای دستیابی به سطوحی از متغیر های که در نتیجه به کارگیری آن ها بهترین محصول از واکنش به دست خواهد آمد، بهینه سازی انجام شد (جدول ۷).

جدول ۷: سطوح بهینه متغیرها و مقدار EPSs تولید شده

	فاکتورهای متغیر			EPSs تولید شده (میلی‌گرم/ لیتر)
متغیر	دما (°C)	pH	زمان (h)	
سطح بهینه	۴۰	۵/۵	۴۸	۳۶۸/۳۶ ± ۷/۱۷

با توجه به مقدار EPSs به دست آمده از این آزمایش، مشخص شد که شرایط تعیین شده تا حدودی می تواند برای تولید EPSs با مقدار قابل قبول لحاظ گردد. بنهادریا و همکاران در سال ۲۰۱۷ بیشترین میزان EPS تولید شده توسط باکتری *لوکونوستوک* با استفاده از محیط کشت MRS ساکارزدار را، ۱۶/۲۸ میلی گرم/ میلی لیتر در دمای انکوباسیون ۳۷ °C، pH برابر ۶/۵ و زمان تخمیر ۴۸ ساعت گزارش کردند (Benhadria *et al.* 2017). نیز پراتیما و همکاران (سال ۲۰۱۴) میزان EPS تولید شده توسط *لاکتوکوکوس لاکتیس* در محیط کشت پروتئین وی مایع را بررسی کردند. بر اساس نتایج بدست آمده از تحقیق آنها، بیشترین میزان EPS تولید شده ۱۵۳/۳۹ میلی گرم/ لیتر در دمای انکوباسیون ۲۵ °C، pH برابر ۶/۸ ، میزان گلوکز ۱۰ میلی گرم و ٪ ۱ میزان کازئین هیدرولیز شده بود (Prathima *et al.* 2014). در تحقیق انجام گرفته توسط کیمل و همکاران (سال ۱۹۹۸) ماکزیمم میزان EPS تولید شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* با استفاده از محیط کشت MRS را، ۲۹۵ میلی گرم/ لیتر در دمای انکوباسیون ۳۸ °C، pH برابر ۵/۰ ، میزان منبع نیتروژن (Bacto-casitone) ۳۰ گرم/ لیتر گزارش کردند (Kimmel *et al.* 1998). این تنوع میزان تولید مشاهده شده در بین مطالعات مختلف ممکن است ناشی از تفاوت در نوع میکروارگانیسم های تولید کننده EPS، همچون نوع محیط کشت مورد استفاده برای ارزیابی میزان تولید و اختلاف در شرایط آزمایش باشد.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق پس از بررسی تأثیر شرایط مختلف روی تولید EPSs، دمای انکوباسیون ۴۰ °C، pH برابر ۵/۵ و زمان تخمیر ۴۸ ساعت به عنوان شرایط بهینه تولید پیشنهاد می گردد. به علاوه استفاده از ماده ارزان قیمت شیر پس چرخ (SM) به عنوان سوبسترای محیط کشت بسیار قابل توجه بود. با توجه به اینکه شیر محیط مناسبی برای رشد باکتری های اسید لاکتیکی

است استفاده از این باکتری ها که توانایی تولید EPSs داشته باشند، می تواند گزینه مناسبی جهت بهبود خصوصیات بافتی و سلامتی بخشی از محصولات لبنی تخمیری باشد.

منابع

روح بخش، ع. و. حق شناس، ف. (۱۳۶۹). کنترل بهداشتی مواد خوراکی (نمونه برداری، آزمایش، تفسیر)، انتشارات شرکت سهامی چهر.

Aslim, B., Y. Beyatli and Z. N. Yuksekdag. (2006). Productions and monomer compositions of exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and Streptococcus thermophilus strains isolated from traditional home-made yoghurts and raw milk. Int. J. Food Sci and Technol. 41:973–979.

Ates, O. (2015). Systems biology of microbial exopolysaccharides production. Front Bioeng Biotechnol 3: 200.

Benhadria, M. K., Touil, M. A. T. and Meddah, B. (2017). Optimization of production of Microbial Exopolysaccharides (EPS) with essential oils from two medicinal plants. J. Appl. Biosci. 111(1): 10925-10933.

Benmechernene, Z., Chentouf, H. F., Yahia, B., Fatima, G., Quintela-Baluja, M., Calo-Mata, P. and Barros-Velázquez, J. (2013). Technological aptitude and applications of Leuconostoc mesenteroides bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk. Biomed Res. Int. http://dx.doi.org/10.1155/2013/418132.

Cerning, J., Bouillanne, C. and Desmazeaud, M.J. (1988). Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. Biotechnol. Lett. 10: 255–260.

De Vuyst, L. and Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 23: 152-177.

De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F. and Degeest, B. (2001). Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 11: 687–707.

Dubois, M., Gilles, J.K., Hamilton, P.A., Rebers, P.A., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem, 28 (3): 350–356.

Duncan, D. B. (1955). "Multiple range and multiple F tests". Biometrics. 11: 1–42.

Emmanuel, C. K., Kalpy-Julien, C., Lessoy, T. and Esso, A. (2017). Probiotic profiling of *Leuconostoc* species isolated from a traditional fermented cassava product. Afr. J. Microbiol. Res. 11(10): 408-413.

Fraqueza, M. J. (2015). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented

Frengova, G.I., Simova, E.D., Beshkova, D.M. and Simov, Z. I. (2000). Production and monomer composition of exopolysaccharides by yogurt starter cultures. Canadian J. Microbiol. 46: 1123–1127.

Gancel, F. and Novel, G. (1994). Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* cultures. 1. Conditions of production. J. Dairy Sci. 77: 685–688.

Gassem, M.A., Schmidt, K.A. and Frank, J. F. (1997). Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*. J. Food Sci. 62 (1): 171-174.

Goh, K.K.T., Haisman, D.R., Archer, R.H. and Singh, H. (2005). Evaluation and modification of existing methods for the quantification of exopolysaccharides in milk-based media. Food Res. Int. 38: 605–613.

Haj-Mustafa, M., Abdi, R., Sheikh-Zeinoddin, M. and Soleimanian-Zad S. (2015). Statistical study on fermentation conditions in the optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* 519 in skimmed milk base media. *ISBAB*. 4: 521–527.

Kimmel, S.A., Roberts, R.F. and Ziegler, G.R. (1998). Optimization of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a Semi defined Medium. Appl. Environ. Microbiol. 64 (2): 659–664.

Kumar, A.S., Mody, K. and Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides – a perception. J. Basic. Microbiol. 47:103–117.

Laws, A., Gu, Y. and Marshall, V. (2001). Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Biotechnol. Adv. 19: 1–28.

Macedo, M.G., Lacroix, C. and Champagne, C.P. (2002). Combined effects of temperature and medium composition on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in a whey permeate based medium. Biotechnol. Prog. 18: 167-173.

Madledo, P.R. and Gavilàn, C.G. (2005). Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 88: 843–856.

Mekhici, K.B., Meddah, T.T. and Boumédiene M. (2017). Optimization of production of microbial exopolysaccharides (EPS) with essential oils from two medicinal plants. J. Appl. Biosci. 111: 10925-10933.

Mustafa, M. H., Lina, A.A, Oklah, B and Issa, S. (2015). Screening of locally isolated lactic acid bacteria for production of exopolysaccharides (EPS). D. U. J. Agri. Sci. 31 (1): 183-190.

Nwodo, U. U., Green, E. and Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. Int. J. Mol, 13 (11), 14002-14015.

Peant, B., LaPointe, G., Gilbert, C., Atlan, D., Ward, P. and Roy, D. (2005). Comparative analysis of the exopolysaccharide biosynthesis gene clusters from four strains of *Lactobacillus rhamnosus*. Microbiol. 151: 1839–1851.

Prathima, P. C., Lule, V. K., Tomar, S. K. and Singh, A. K. (2014). Optimization of exopolysaccharide production by *Lactococccus lactis* NCDC 191 by response surface methodology. Int J Curr Microbiol App Sci. 3(5): 835-854.

sausages. Int. J. Food Microbiol. 212: 76-88.

Tallon, R., Bressollier, P. and Urdaci M.C. (2003). Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. Microbiol. Res. 154: 705–712.

Welman, A.D. and Maddox I.S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. Trends in Biot. 21 (6): 269-274.

Optimization of EPS production conditions by *Leuconostoc dextranicum* isolated from traditional Syrian cheese

M. Haj Mustafa [1*], B. Al-oklah[2], Gh. Ashouri[3]

Received:2018.5.1
Accepted:2020.9.23

Abstract

Increasing demand for industrial applications of various natural polymers has led to increased attention to the use of exopolysaccharides made by microorganisms. Since most lactic acid bacteria (LAB) are food-grade microorganisms with GRAS status (Generally Recognized As Safe), the use of the secreted EPS as natural alternatives to produce all-natural food products without additives from LAB has received increased attention. In this research, carbon and nitrogen sources suitable for the production of exopolysaccharides (EPSs) by *Leuconostoc dextranicum*, as GRAS bacterium, were investigated. The results showed that glucose (Glu) produced more EPSs in the medium compared to other sugars and peptone compared to other nitrogen sources. Therefore, only glucose and peptone were used to optimize the production conditions of EPSs. In order to investigate the effect and optimization of EPS production conditions, three parameters of temperature, pH and incubation time, each was selected at five levels and optimized separately. Then, optimization was performed to determine the levels at which independent variables attain the best production. Results showed that the best laboratory condition for EPSs production would be yielded at the incubation temperature of 40 °C, pH of 5.5 and fermentation time of 48 hours. In summary, the results of this study showed the potential of *Leu*. *dextranicum* as a native microorganism and the cheap culture medium of skimmed milk for producing such a valuable product.

Keywords: EPSs, Lactic acid bacteria, *Leu. dextranicum*, Skimmed milk

1- Research Institute for Biotechnology and Bioengineering, Isfahan University of Technology, Isfahan
*(Corresponding author: mustafa.muhannad@gmail.com)
2- Researcher at the National Biotechnology Commission of Damascus, Damascus, Syria
3- Research Institute for Biotechnology and Bioengineering, Isfahan University of Technology, Isfahan