مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال چهارم، شماره۱، بهار ۱۳۸۸ ، صفحات ۵۶-۴۹

مقایسه تولید زانتان در تخمیر حالت جامد و غوطه ور با *زانتوموناس کمپستریس* در مقیاس آزمایشگاهی

کیانوش خسروی دارانی[۱]، غزاله فرهادی[۲]، محمدامین محمدی‌فر[۳]، زهرا هادیان[۴]، فریبا سید احمدیان[۵]، رزیتا کمیلی فنود[۵]، نسرین حاج سید جوادی[۵]، پالیز کوهی‌کمالی[۵]، زینت کمالی [۶]

۱- نویسنده مسئول: پژوهشگر گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، پست الکترونیکی: kiankh@yahoo.com

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر

۳- استادیار گروه آموزش صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۴- پژوهشیار، گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۵- کارشناس آزمایشگاه، گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۶- کارشناس ارشد تغذیه، معاونت پژوهشی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۸۸/۳/۵

چکیده

سابقه و هدف: صمغ زانتان، بیوپلیمر بسیار مهمی است که در بسیاری از صنایع به ویژه صنعت غذا کاربردهای متنوعی دارد. در این تحقیق، تولید میکروبی آن از باکتری *زانتوموناس کمپستریس* PTCC1473 بر ملاس نیشکر و شیره خرما در تخمیر غوطه‌ور و ضایعات خشک خرما (پس از شیره‌گیری) در تخمیر حالت جامد مقایسه شد.

مواد و روش‌ها: ترکیب شیمیایی سوبستراها از نظر درصد وزن خشک سلولی، نیتروژن، قند، رطوبت، خاکستر و pH اندازه‌گیری شد. از محیط‌های کشت YMB (Yeast malt broth) و YMA (Yeast malt agar) برای نگهداری و تلقیح استفاده شد. گرمخانه‌گذاری مایه تلقیح در شیکر انکوباتور (دما ۲۸°C و دور ۲۰۰ rpm به مدت۷۲ ساعت) انجام گرفت. جهت تعیین وزن خشک سلولی، محیط تخمیر رقیق و سانتریفوژ شد (۲۱۰۵۵ *xg* ، ۵۰ min و دمای ۵°C). محلول رویی برای جداسازی زانتان از رسوب توده سلولی جدا شد. پس از رسوب زانتان با ایزوپروپانول، محلول سازی مجدد و جداسازی با سانتریفوژ (۲۰۵۶ *xg*)، وزن خشک زانتان معین شد. طراحی آزمایش به روش پلاکت برمن (Plackett Burman design) PBD انجام شد.

یافته‌ها: تأثیر نوع و غلظت منابع کربن (شیره خرما و ملاس نیشکر)، نیتروژن (نیترات آمونیوم و فسفات دی آمونیوم) و فسفر (K_2HPO_4 و KH_2PO_4)، دما، زمان، دور همزن، میزان و سن تلقیح بر راندمان تولید بررسی شد. بیشترین تأثیر معنی‌دار به نوع منابع کربن و نیتروژن محیط کشت مربوط بود.

نتیجه‌گیری: مقایسه نتایج حاصل از دو روش تخمیر نشان داد که راندمان (درصد وزنی گزانتان به قند مصرفی) و بهره دهی (g/g.day نسبت زانتان تولید شده به قند مصرف شده در واحد زمان) تولید در تخمیر غوطه‌ور (۲۲/۴، ۷/۴۶) بیشتر از حالت جامد (۱۷/۹ و ۹/۸۸) است. همچنین، ضمن اثبات برتری شیره خرما به ملاس نیشکر و ضایعات خشک خرما، با تغییر ترکیب و شرایط فیزیکی شیمیایی محیط کشت، راندمان تولید زانتان افزایش یافت.

واژگان کلیدی: زانتان، تخمیر غوطه‌ور، تخمیر بستر جامد، شیره خرما، ملاس نیشکر

• مقدمه

صمغ زانتان یک بیوپلیمر پلی‌ساکاریدی طبیعی است که به روش میکروبی از کشت باکتری *زانتوموناس کمپستریس* تولید می‌شود (۱). طبق گزارش وزارت بازرگانی، در سال ۱۳۸۵ میزان واردات این صمغ به ایران ۷۰ تن بوده است (۲). میزان مصرف سالیانه پلی ساکاریدهای میکروبی در حال افزایش است، به طوری که مصرف از سال ۲۰۰۰ در آمریکا با نرخ رشد ۷٪ افزایش یافته است (۲، ۱). زانتان به عنوان مخلوط کننده، تنظیم

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

ویسکوزیته (viscosity) ، کمک به تشکیل ژل و انعقاد در بسیاری از صنایع به کار می‌رود (۳، ۱). سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA) در نوزدهم مارس ۱۹۶۹ این صمغ را به عنوان افزودنی مجاز به مواد غذایی (تغلیظ، ایجاد ژل، کنترل تشکیل کریستال‌های یخ در غذاهای منجمد) معرفی کرد (۱). خاصیت سودوپلاستیسیته صمغ زانتان باعث می‌شود که ماده غذایی، احساس دهانی بهتر و رهاسازی طعم بیشتری داشته باشد. کاربردهای زانتان در صنایع غذایی عبارتند از: پایدار و تغلیظ کننده در محصولات آردی، تسهیل پمپاژ و کاهش زمان فرایند حرارتی کنسرو در غذاهای کنسروی، افزایش ویسکوزیته سیال و یکنواخت‌سازی مخلوط در مخلوط‌های پودری، افزایش پایداری امولسیون و تسهیل پمپاژ در سس سالاد، افزایش ویسکوزیته و پایداری حرارتی مواد معطر در انواع سس و عصاره گوشت، پایداری امولسیون پنیر و نوشیدنی‌های شیری، بهبود خواص فیزیکی و ارگانولپتیک پنیر در محصولات لبنی کابرد دارد (۳-۱).

اکثر تحقیقات در زمینه تولید میکروبی زانتان بر غربال کردن (screening)ریزسازواره‌ها و مطالعه اثر متغیرهای محیط کشت بر راندمان تولید متمرکز هستند (۶-۴، ۲). باکتری *زانتوموناس کمپستریس* برای تولید زانتان به منابع کربن، نیتروژن، فسفر و همچنین مواد مغذی کم مقدار مانند پتاسیم، آهن و کلسیم نیاز دارد. بهینه‌سازی نوع و غلظت منابع یاد شده، به ویژه منبع کربن بر بازدهی تولید صمغ و هزینه تولید، مؤثر است. ساکارز و گلوکز در محدوده ۵-۲ درصد (وزن به حجم) بیشترین استفاده را داشته اند (۲). در بسیاری از منابع، از K_2HPO_4 و KH_2PO_4 (به طور توام یا جداگانه) به عنوان منبع فسفر استفاده شده است (۱۳-۱۰، ۸، ۷). مطالعه تأثیر منابع مختلف نیتروژن در تولید صمغ از باکتری *زانتوموناس کمپستریس* (۱۵، ۱۴) نشان داد که استفاده از منبع نیتروژن آلی به کاهش کیفیت محصول و افزایش هزینه تخلیص منجر می‌شود (۱۵) در حالی که نیترات آمونیوم و فسفات دی آمونیوم، مؤثرترین منابع افزاینده راندمان تولید هستند (۵). غلظت ترکیبات محیط کشت و شرایط عملیاتی نظیر دما، دور همزن، زمان تخمیر و pHبر رشد سلول و تولید محصول مؤثر هستند (۱۷ ،۱۶، ۹). زمان تولید مایه تلقیح ۲۴ تا ۲۵ ساعت و دمای فرایند ۳۰°C-۲۸ گزارش شده است (۱۷ ،۱۶، ۹، ۱). pH تأثیر چندانی در تولید محصول ندارد؛ اما در pH خنثی تولید توده سلولی، افزایش می‌یابد (۱۷، ۱۶، ۹، ۱).

تولید میکروبی زانتان به روش تخمیر حالت جامد با سوبستراهای مختلف (تفاله سیب و مالت، ضایعات مرکبات، پساب زیتون، چغندر قند، آب پنیر، باقی‌مانده‌های محلول در آب کاساوا، باگاس کاساوا، سیب زمینی و دانه های قهوه) به منظور فائق آمدن به مشکل پیدایش ویسکوزیته زیاد ناشی از تولید زانتان در کشت غوطه‌ور گزارش شده است (۲۱-۱۹). محققان به دنبال یافتن راه حل برای زیاد نگه داشتن اکسیژن محلول و در عین حال، کاهش انرژی مصرفی توسط سامانه هوادهی هستند. به نحوی که راندمان تولید در اثر افزایش رقت محیط، کم نشود و مشکلات زیست محیطی ناشی از حجم زیاد پساب به وجود نیاید (۲۲).

در ایران با توجه به تولید انواع خرما و در اختیار داشتن ۲۰٪ کل تولید خرمای جهان، شیره و ضایعات خرما در دسترس است. *طاهر* و همکاران در سال ۱۳۸۵ برای اولین بار امکان استفاده از خرمای ضایعاتی به عنوان محیط کشت صنعتی تولید زانتان با باکتری *زانتاموناس کمپستریس* را بررسی کردند و درباره اثر غلظت منبع فسفر (K_2HPO_4)، نیتروژن (NH_4NO_3) و کربن (شیره خرما) با استفاده از طرح CCD (central composite design) به تحقیق پرداختند. آنها سطح مناسب متغیرهای یاد شده را به ترتیب g/L ۸، ۳ و ۸۶ گزارش کردند. حداکثر غلظت بیوپلیمر تولیدی با توجه به سطوح بهینه g/L ۱۳/۲ به دست آمد (۲). پژوهش حاضر در ادامه تحقیق آنها و به منظور بررسی امکان استفاده از میزان کمتر منابع کربن و نیتروژن انجام شد.

هدف این طرح پژوهشی که در قالب طرح تحقیقاتی مصوب انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور طراحی شد، معرفی محیط کشت صنعتی ارزان و در دسترس برای تولید زانتان است. به این منظور، شیره خرما و ضایعات صنعتی مربوط به صنایع غذایی (ملاس

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

نیشکر و ضایعات خرما) جهت تولید زانتان در تخمیر حالت جامد و غوطه‌ور، بررسی و عوامل مؤثر بر رشد و تولید (منبع کربن، نیتروژن و فسفر) مطالعه شد. بهینه‌سازی تولید صمغ با استفاده از طرح رویه پاسخ صورت گرفته و خواص رئولوژیک صمغ حاصل، مورد مطالعه قرار گرفت.

• مواد و روش‌ها

سویه: باکتری *زانتوموناس کمپستریس* به شماره PTCC-1473 از *سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران* به صورت لیوفیلیزه خریداری و در محیط GYC (حاوی گلوکز تک آبه، آگار، کربنات کلسیم و عصاره مخمر به میزان g/L ۲۰، ۱۷، ۲۰ و ۱۰) کشت و هر دو هفته پاساژ شد. مایه تلقیح از کشت شیب دار ۲۴ ساعته محیط کشت YMA (عصاره مخمر، عصاره مالت، پپتون، آگار و گلوکز به میزان g/L ۳، ۳، ۵، ۱۵ و ۱۰) در محیط کشت استریل YMB (YMA فاقد آگار) تهیه و در شیکر انکوباتور rpm ۲۰۰، دمای °C ۲۸ به مدت زمان h ۲۴ قرار گرفت (۴۳، ۴۱، ۱). کنترل سایز تلقیح به روش مستقیم شمارش با لام توما انجام شد (۲۲، ۱).

سوبسترا: شیره خرما و ضایعات خشک حاصل از شیره‌گیری خرما از شرکت *دمباز جنوب* و ملاس نیشکر از کارخانه *قند هفت تپه* تهیه شد. ضایعات خشک خرما آسیا و غربال شد. ذرات با قطر متوسط cm ۱٫۵-۰٫۵ برای آنالیز و انجام عملیات انتخاب شد. اندازه‌گیری درصد خاکستر با کمک کوره الکتریکی با دمای °C۵۲۵ تا سفید شدن کامل صورت گرفت. اندازه گیری ازت به روش کلدال انجام شد. pH ظرف حاوی محیط کشت شیره خرما و مواد کم مقدار با استفاده از هیدروکسید سدیم ۵ نرمال و اسید هیدروکلریدریک، خنثی شد. اندازه‌گیری قند محلول ضایعات خرما به روش فنل سولفوریک اسید انجام شد. در محیط کشت تخمیر غوطه‌ور، برای پرهیز از انجام واکنش میلارد، شیره خرما و ملاس جدا از منبع نیتروژن و سایر مواد محیط کشت، استریل شد. گرمخانه‌گذاری در دمای °C۲۸ به مدت زمان h ۷۲ در دور rpm۲۰۰ صورت گرفت. (۲۲، ۲). پس از خنک شدن محیط‌های کشت و کنترل رطوبت سوبسترای جامد، تلقیح یکنواخت (از نظر تعداد باکتری در واحد حجم و سن تلقیح (Seed size and age) به محیط‌های تخمیر صورت گرفت. ارلن‌های تلقیح شده به داخل انکوباتور با دمای °C۲۸ به مدت زمان h ۷۲ منتقل شدند. همه آزمایش‌ها سه بار تکرار شد (۲۰، ۱۹).

اندازه‌گیری بیومس: محیط کشت تخمیر پس از همگن‌سازی به مدت ۵۰ دقیقه در $۱۱۷۶۰ \times g$ در دمای °C۵ سانتریفوژ شد. محلول رویی جهت جداسازی زانتان در ظرفی نگهداری و رسوب توده سلولی در دمای °C۸۰ به مدت زمان h ۲۴ گرمخانه‌گذاری، خشک و توزین شد (۹، ۱).

اندازه‌گیری زانتان: محلول رویی حاصل از سانتریفوژ محیط تخمیر مجدد داخل لوله‌های سانتریفوژ قرار گرفت و با دو برابر حجم پروپانل ٪۹۹ در دمای °C۵ و xg ۱۱۷۶۰ به مدت min ۵۰ سانتریفوژ شد. رسوب زانتان خشک توزین شد (۲۲، ۱).

روش‌های آماری: آنالیزهای آماری توسط نرم افزار $SPSS_{11}$ انجام شد. پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، نتایج مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و نتایج کمّی به دست آمده، به صورت میانگین± انحراف معیار و با سطح اطمینان ٪۹۵ ارائه شد. طراحی آزمایش با روش PBD انجام شد.

• یافته‌ها

مقایسه تولید زانتان در تخمیر حالت جامد و غوطه‌ور: تولید زانتان در تخمیر حالت جامد و غوطه‌ور بررسی و دو سامانه تخمیر از نظر راندمانِ تولید و رشد با یکدیگر مقایسه شدند. به این منظور از ضایعات خشک خرما در تخمیر حالت جامد، قند خرما و ملاس نیشکر در تخمیر حالت غوطه ور استفاده شد. شرایط تخمیر از نظر زمان، سن و میزان تلقیح در هر دو سامانه یکسان بود. جدول ۱ راندمان تولید و بازدهی دو سامانه تخمیر را نشان می‌دهد. مقایسه یافته‌ها نشان داد که راندمان تولید در سامانه غوطه‌ور با سوبسترای قند خرما بیشتر است (سطح اطمینان ٪۹۵).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

جدول ۱- مقایسه* تولید زانتان با سوبستراهای ملاس نیشکر و قند خرما در تخمیر غوطه‌ور و ضایعات خشک خرما در تخمیر حالت جامد

متغیر وابسته	تخمیر حالت جامد بر ضایعات خشک خرما	تخمیر غوطه ور بر ملاس نیشکر	تخمیر غوطه ور بر قند خرما
درصد مصرف قند (نسبت قند مصرف شده به کل)	۳۰/۱۵±۰/۱۱	۶۷/۵۴± ۰/۱۳	۸۸/۱۵± ۰/۱۱
زانتان تولیدی در واحد حجم# (g/L)	۱۵/۳۶±۰/۰۶	۷/۱۱±۰/۰۴	۹/۹۵ ± ۰/۰۳
راندمان تولید زانتان (%w/w)	۱۳/۳۰ ± ۰/۰۴	۱۵/۱۵ ± ۰/۰۵	۱۸/۴ ± ۰/۰۴
بازدهی (g/g.day)	۴/۴۳	۴/۴۷	۷/۴۶

* همه داده‌ها با سه بار تکرار و دامنه اطمینان ۹۵٪ گزارش شده است.

کل زانتان تولید شده در تخمیر حالت جامد در ۱ لیتر آب فروشویی و استخراج شد.

انتخاب محدوده متغیرها

منبع کربن: پس از اتمام بررسی‌های اولیه و اثبات ارجحیت شیره خرما نسبت به ملاس نیشکر در افزایش راندمان تولید زانتان ، سه غلظت ۲، ۶ و ۱۰ درصد وزنی از آن برای بررسی‌های بعدی انتخاب و مقدار قند قابل احیا در ۱۰۰ گرم آن محاسبه شد.

منبع نیتروژن: طبق نتایج حاصل از این پژوهش و گزارش سایر محققان نیترات آمونیوم و فسفات دی آمونیوم بیشترین تأثیر را بر راندمان تولید زانتان نشان داده اند (۱۸، ۱۷، ۱۴، ۵). از این رو، این دو منبع و در سطوح ۳، ۶ و ۹ g/L به محیط کشت افزوده شد. PBD مطابق جدول ۲ برای بررسی مقدار و ترتیب اهمیت متغیرها و سطوح انتخاب شده برای آنها به کار رفت. طبق این طراحی، جهت بررسی ۱۱ متغیر نیاز به انجام ۱۲ آزمایش بود. PBD در بسیاری از پژوهش‌های بیوتکنولوژی، مورد توجه خاص محققان قرار گرفته است. از نظر سیستماتیک، استفاده از این طراحی در شرایطی توصیه می‌شود که تعداد متغیرها بیش از ۶ باشد و محقق لازم بداند، اهمیت و ترتیب آنها را در محدوده خاصی از تغییرات بررسی کند (۲۵-۲۳). بدیهی است پس از استفاده از این طراحی و شناسایی و غربال متغیرهای موثر، در مراحل بعدی از روش هایی استفاده می‌شود که برهمکنش متغیرهای مؤثر را تعیین کنند و با کمک نرم افزار رویه پاسخ متغیر وابسته بر حسب تغییرات متغیرهای مستقل رسم می‌گردد. نتایج حاصل از انجام طراحی PBD در جدول ۲ ارائه شده است. بعد از انجام این ۱۲ آزمایش و به دست آمدن نتایج، محاسبات زیر برای هر سری از آزمایش‌ها انجام شد.

۱- ضریب هر متغیر از رابطه $A_i = 1/N \sum x_i k_i$ محاسبه شد که در آن xi= مقدار عددی راندمان، i= متغیر، ki= علامت مثبت یا منفی برای هر متغیر در یک ستون، N= تعداد آزمایشات، A0 = میانگین راندمان‌ها است.

۲- راندمان پیش‌بینی شده برای هر آزمایش از رابطه $Y_i = \sum A_i k_i$ محاسبه شد که در آن Ai= ضریب هر متغیر، ki= علامت مثبت یا منفی هر متغیر در یک ردیف است.

۳-محاسبه خطای استاندارد از رابطه $se^2 = (Y_i - y_i)^2 + (Y_{i+1} - y_{i+1})^2 + ...$ محاسبه شد که در آن yi= راندمان تجربی برای هر آزمایش، Yi= راندمان پیش‌بینی شده برای هر آزمایش است.

۴- خطای تخمینی از رابطه $t_i = \sqrt{S_e^2/N}$ و مقدار t برای هر متغیر از رابطه $t_i = A_i/s_b$ محاسبه شد

قدر مطلق A برای هر متغیر، بیانگر اهمیت آن در آزمایش و علامت A نشان دهنده برتری دو سطح مثبت و منفی نسبت به یکدیگر است. با درجه آزادی ۱۰ و ۱۱ متغیر، مقدار t جدول با t هر متغیر مقایسه می شود و اگر از آن کوچک‌تر باشد، معنی‌داری اثر متغیر مستقل بر متغیر وابسته یا پاسخ سیستم ثابت می شود. در جدول ۲ ضمن شرح طرح آزمایشی برای تولید زانتان از شیره خرما، نتایج حاصل به صورت قند باقی‌مانده (٪) و راندمان تولید زانتان (بر حسب درصد وزنی سوبسترا و قند مصرفی) و بازدهی تولید (g/Kg.day) گردآوری شده است. البته، گزارش نتایج به صورت راندمان رایج‌تر است و برای تحلیل داده‌ها در این تحقیق انتخاب شد. نتایج این محاسبات در جداول ۳ و ۴ خلاصه شده است.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

جدول۲- متغیرهای ۱۱ گانه و سطوح انتخابی آنها در تولید زانتان از قند خرما در تخمیر غوطه ور در PBD

	متغیرهای مستقل											متغیرهای وابسته				
شماره آزمایش	سن تلقیح (day)	نوع منبع فسفر	منبع نیتروژن (g/L)	میزان تلقیح (cfu/ml)	دور همزن (rpm)	منبع نیتروژن	زمان (h)	دما[۶] (°C)	غلظت منبع P (g/L)	غلظت منبع C (g/L)	منبع کربن	قند باقیمانده (/. w/w)	راندمان[*] (g/Kg)	مصرف قند (g/L)	راندمان[#] (% w/w)	بازدهی (g/Kg.day)
۱	۱	KH_2PO_4	۰/۲	۱۰۶	۳۰۰	ADP[۳]	۵۰	۳۰	۱۴	۴۰	ملاس	۸/۴۵±۰/۷۴	۹۱/۶۲±۷/۰۵	۱/۲۷±۰/۰۷	۲۱/۶۲±۰/۲۱	۷/۷۲±۰/۶۶
۲	۲	KH_2PO_4	۰/۲	$۱۰^{۷}$	۲۰۰	AN[۴]	۵۰	۳۰	۱۲	۴۰	خرما[۵]	۸/۴۴±۰/۲۴	۵۲/۳۶±۳/۹۸	۰/۷۲±۰/۰۳	۲۱/۲۸±۰/۲۲	۴/۳۵±۰/۳۳
۳	۱	K_2HPO_4	۰/۱	$۱۰^{۶}$	۳۰۰	AN	۷۲	۳۰	۱۲	۴۰	خرما	۷/۹۱±۰/۵۰	۳۹/۲۴±۶/۶۰	۰/۸۰±۰/۰۵	۱۴/۱۱±۰/۵۷	۲/۶۱±۰/۴۳
۴	۲	KH_2PO_4	۰/۱	$۱۰^{۷}$	۳۰۰	AN	۷۲	۳۰	۱۴	۳۰	ملاس	۱۰/۳۵±۰/۴۸	۹/۲۴±۱/۳۲	۱/۲۶±۰/۲۰	۲/۱۸±۰/۴۸	۰/۶۱±۰/۰۸
۵	۱	K_2HPO_4	۰/۲	$۱۰^{۷}$	۲۰۰	ADP	۷۲	۳۰	۱۲	۳۰	ملاس	۵/۴۸±۰/۳۷	۲۰/۴۹±۳/۹۷	۰/۶۶±۰/۰۹	۱۶/۲۱±۰/۴۶	۱/۳۶±۰/۲۶
۶	۲	K_2HPO_4	۰/۱	$۱۰^{۶}$	۲۰۰	ADP	۵۰	۳۰	۱۴	۳۰	خرما	۸/۶۷±۰/۴۱	۵۷/۰۵±۷/۹۵	۱/۲۵±۰/۰۴	۱۳/۶۳±۰/۳۱	۴/۷۵±۰/۶۶
۷	۲	K_2HPO_4	۰/۱	$۱۰^{۷}$	۳۰۰	ADP	۵۰	دوگانه	۱۲	۴۰	ملاس	۶/۵۰±۰/۸۹	۱۹/۵۵±۵/۳۰	۱/۰۳±۰/۰۴	۵/۸۳±۰/۴۹	۱/۶۲±۰/۴۴
۸	۱	KH_2PO_4	۰/۱	$۱۰^{۶}$	۲۰۰	AN	۵۰	دوگانه	۱۲	۳۰	ملاس	۱۳/۰۳±۰/۲۴	۶/۴۲±۰/۶۵	۰/۱۲±۰/۰۱	۱۴/۸۷±۰/۳۸	۰/۵۳±۰/۱۲
۹	۲	KH_2PO_4	۰/۲	$۱۰^{۶}$	۳۰۰	ADP	۷۲	دوگانه	۱۲	۳۰	خرما	۱۰/۰۴±۱/۰۴	۴۱/۴۳±۸/۸۳	۰/۵۶±۰/۰۹	۲۰/۳۲±۰/۲۹	۲/۴۲±۰/۳۶
۱۰	۲	K_2HPO_4	۰/۲	$۱۰^{۶}$	۲۰۰	AN	۷۲	دوگانه	۱۴	۴۰	ملاس	۱۳/۵۶±۰/۹۱	۴۲/۰۵±۷/۹۵	۰/۵۹±۰/۰۸	۲۱/۳۳±۰/۶۱	۲/۷۹±۰/۵۳
۱۱	۱	KH_2PO_4	۰/۱	$۱۰^{۷}$	۲۰۰	ADP	۷۲	دوگانه	۱۴	۴۰	خرما	۱۱/۴۵±۰/۳۵	۶۲/۶۸±۵/۳۰	۰/۸۵±۰/۰۵	۰/۹۶±۰/۰۳	۱۲/۵۳±۱/۰۶
۱۲	۱	K_2HPO_4	۰/۲	$۱۰^{۷}$	۳۰۰	AN	۵۰	دوگانه	۱۴	۳۰	خرما	۱۴/۹۸±۰/۴۹	۶۲/۱۱±۳/۹۸	۰/۳۹±۰/۰۴	۰/۸۶±۰/۰۱	۶/۵۲±۰/۵۹

[*] وزن زانتان تولید شده به کل وزن سوبسترا؛

[#] نسبت غلظت زانتان تولید شده به قند مصرف شده (درصد وزنی قند خرما)؛ [۳] آمونیوم دی فسفات؛ [۴] آمونیوم نیترات؛ [۵] شیره خرما؛ [۶] دما در ۲۴ h اول، ۲۸°C و در ۴۸ h بعد ۳۲°C.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

جدول ۳- محاسبه راندمان پیش بینی شده و مقایسه آن با راندمان تجربی در فرایند تولید زانتان از شیره خرما در PBD ($A_0 = 15.6$ ،$S_e^2 = 0.421$ $S_b = 0.187$)

ردیف	راندمان تجربی	پیش بینی شده
۱	۲۱٫۵۷	۲۱٫۰۲
۲	۲۱٫۲۶	۲۴٫۴۰
۳	۱۴٫۳۷	۱۷٫۵۱
۴	۲٫۰۸	۱٫۶۰
۵	۱۱٫۳۷	۱۴٫۵۳
۶	۱۳٫۴۶	۱۲٫۹۳
۷	۵٫۷۵	۸٫۹۳
۸	۱۵٫۳۳	۲٫۸۰
۹	۲۰٫۴۶	۲۳٫۵۵
۱۰	۲۱٫۱۵	۲۰٫۵۷
۱۱	۲۱٫۴۶	۲۰٫۶۲
۱۲	۱۹٫۲۴	۱۸٫۷۱

جدول ۴ - ضرایب متغیر و مقدار t برای ۱۱ متغیر در فرایند تخمیر غوطه ور تولید زانتان از شیره خرما در PBD

متغیر	ضریب متغیر	مقدار t
نوع منبع فسفر	-۰٫۰۰۳	-۰٫۰۱۶
غلظت منبع کربن	۰٫۱۴۶	۰٫۷۸۰
نوع منبع کربن	۰٫۱۸۱	۰٫۹۶۷
غلظت منبع فسفر	۰٫۰۱۴	۰٫۰۷۴
دمای تخمیر	-۰٫۰۱۲	-۰٫۰۶۴
زمان تخمیر	۰٫۰۳۶	۰٫۱۹۲
نوع منبع نیتروژن	۰٫۰۶۰	۰٫۳۲۰
دور همزن	-۰٫۰۱۷	-۰٫۰۹۰
میزان تلقیح	-۰٫۰۳۶	-۰٫۱۹۲
غلظت منبع نیتروژن	۰٫۲۱۹	۱٫۱۷۱
سن تلقیح	-۰٫۰۱۲	-۰٫۰۶۴

نتایج به دست آمده از جداول مذکور نشان می‌دهد که نوع منبع فسفر، دمای تخمیر، دور همزن و سن تلقیح در سطح کم، باعث کارایی بیشتری در تولید خواهند شد. از سوی دیگر، کاربرد بقیه متغیرها در سطح زیاد، جهت افزایش راندمان توصیه می‌شود. متغیرها با توجه به قدر مطلق ضرایب آنها، به ترتیب اهمیت عبارتند از: غلظت منبع نیتروژن، نوع و غلظت منبع کربن و نوع منبع نیتروژن. طراحی PBD نشان داد که غلظت منبع نیتروژن نسبت به بقیه متغیرها از اهمیت بیشتری برخوردار است. با درجه آزادی ۱۰، مقدار t جدول در سطح اطمینان ۷۵ و ۹۰٪ به ترتیب برابر با ۰٫۶۹۹۸ و ۱٫۳۷۲۱ است. مقایسه مقادیر t متغیرها با مقدار t جدول در سطح اطمینان ۷۵٪ نشان داد که نوع منبع نیتروژن و نوع و غلظت منبع کربن به صورت معنی‌داری بر تولید، مؤثر بوده است. در تولید زانتان از شیره خرما، بالاترین راندمان تولید برابر با ۲۱٫۶۲ گرم زانتان تولید شده به ازای گرم قند مصرف شده، بیشترین بازدهی برابر با ۱۲٫۵۳ g/Kg.day و بیشترین میزان تولید زانتان برابر با ۹۱٫۶۲ گرم به ازای کیلوگرم سوبسترا به دست آمد.

مناسب‌ترین غلظت منبع قند برای تولید زانتان از قند خرما ۴۰ g/L است. گزارش‌های پیشین نیز حاکی از تأثیر غلظت منبع کربن بر بازدهی تولید صمغ است. محدوده غلظت گلوکز برای تولید زانتان ۲ تا ۵٪ وزنی گزارش شده است. در غلظت‌های کمتر از ۲٪ میزان تولید سلول، کم و در بیش از ۵٪ بازدارنده تولید خواهد بود (۱۴، ۵). همچنین، نوع و غلظت منبع نیتروژن، اثر معنی‌دار بر راندمان تولید دارد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نیترات آمونیوم بهتر از آمونیوم دی فسفات بر تولید زانتان مؤثر است و هر دو این منابع در غلظت ۰٫۲ بهتر از سطح ۰٫۱ عمل کردند. طبق گزارش سایر محققان هم نیتروژن از منابع غذایی مهم زانتوموناس است (۱۴). تحقیقات Letisse و Garcia نشان داد که از بین منابع معدنی نیترات آمونیوم و فسفات دی آمونیوم به ترتیب بیشترین راندمان تولید زانتان را باعث می شوند (۴، ۵).

نتایج نشان می‌دهد که برای تولید زانتان باکتری‌های جوان‌تر (۱ روزه) مورد نیاز است. به عبارت دیگر، افزایش سن تلقیح به کاهش راندمان تولید منجر می‌شود. علت این پدیده می‌تواند به دلیل پیدایش زودرس فاز سکون و کوتاهی فاز لگاریتمی رشد باشد. همچنین، با کاهش میزان باکتری از 10^7 به 10^6 (cfu/ml) بازدهی و میزان تولید در تمام آزمایش‌ها افزایش یافت. با افزایش مدت زمان تخمیر (۷۲ h) نیز میزان تولید اسید و راندمان افزایش پیدا کرد. همچنین، ثابت شد که اِعمال گرمخانه گذاری دو مرحله ای (اِعمال دمای دو گانه) منجر به افزایش راندمان تولید زانتان می‌شود.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

• بحث

در این تحقیق، تولید زانتان توسط *باکتری زانتوموناس کمپستریس* PTCC1473 از ملاس نیشکر و شیره خرما در تخمیر غوطه‌ور صورت گرفت. همچنین، تولید با استفاده از ضایعات خشک خرما (پس از شیره‌گیری) در تخمیر حالت جامد نیز انجام و نتایج مقایسه شد. سوبستراهای سه گانه یاد شده، هم از نظر قیمت و هم از نظر قابلیت دسترسی در کشور، برای انواع تولیدهای بیوتکنولوژیک (از قبیل زانتان) مناسب هستند. یکی از امتیازات بستر جامد نسبت به تخمیر غوطه‌ور، کاهش فاضلاب تولیدی و هزینه تولید و کاهش حجم ضایعات کارخانه است. همچنین، پس از استخراج زانتان از کشت تخمیر شده و از بین بردن میکرو ارگانیسم ها، می‌توان از مواد باقی‌مانده به عنوان خوراک دام استفاده کرد.

مقایسه نتایج حاصل از دو روش تخمیر نشان داد که راندمان (درصد وزنی زانتان تولیدی به قند مصرفی) و بهره‌دهی (productivity) (g/g.day) تولید در تخمیر غوطه‌ور (۲۲٫۴٪، ۷٫۴۶) از حالت جامد (۱۳٫۳٪، ۴٫۴۳) بیشتر است.

ادامه تحقیق در تخمیر غوطه‌ور و با استفاده از طراحی PBD، تأثیر نوع و غلظت منابع کربن (C) (شیره خرما و ملاس نیشکر)، نیتروژن (N) (نیترات آمونیوم و فسفات دی آمونیوم) و فسفر (P) (K_2HPO_4 و KH_2PO_4)، دما، زمان، دورهمزن، میزان و سن تلقیح بر راندمان تولید بررسی شد. نتایج حاکی از تأثیر زیاد نوع منابع C و N بود. سایر محققان هم در مقالات خود به این نکته اشاره کرده‌اند (۸، ۷، ۲). نتایج نشان داد که اِعمال گرمخانه-گذاری دو مرحله‌ای به افزایش راندمان تولید زانتان منجر می‌شود. مرحله نهایی تحقیق با متغیرهای شیره خرما و نیترات آمونیوم به عنوان منابع C و N صورت گرفت و دما در ۲۴ ساعت اول فرایند (مرحله رشد) ۲۸°C و در ۴۸ ساعت بعدی (مرحله تولید زانتان) ۳۲°C بود. میزان تولید زانتان در این مرحله از ۱۸٫۴ به ۲۱٫۷۱ گرم زانتان به کیلوگرم قند مصرفی افزایش یافت. همچنین، بهره دهی تولید از ۷٫۴۶ به ۸٫۱۹ (گرم زانتان به کیلوگرم قند در روز) رسید. بهترین مقدار متغیرهای اعمال شده برای تولید بالاترین میزان زانتان از قند خرما عبارت بود از: نوع و غلظت منبع کربن شیره خرما و ۴۰g/L ؛ نوع و غلظت منبع نیتروژن نیترات آمونیوم و ۰٫۲ g/L؛ نوع و غلظت منبع فسفر K_2HPO_4 و ۰٫۲ g/L؛ سن و میزان تلقیح یک روزه و 10^6 cfu/ml، زمان ۷۲ ساعت، دمای دو مرحله ای (دمای ۲۴ h اول، ۲۸°C و در ۴۸ h بعد ۳۲°C) و دور همزن ۳۰۰ rpm.

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از باکتری‌های جوان‌تر (۱ روزه) برای تولید زانتان کارایی بیشتری دارد و افزایش سن تلقیح منجر به کاهش راندمان تولید می‌شود. نتایج مشابه در تحقیق دیگر مشاهده شده است (۲۴، ۲۳). علت این پدیده می‌تواند به لحاظ پیدایش زودرس فاز سکون و کوتاهی فاز لگاریتمی رشد باشد. همچنین، کاهش میزان باکتری از 10^7 به 10^6 cfu/ml بازدهی و میزان تولید را افزایش داد. نتایج نشان داد که غلظت نسبی کربن به نیتروژن (C/N) در فرایند تولید زانتان اثر معنی‌داری دارد. این نکته در گزارش سایر محققان هم اعلام شده است (۱۵، ۱۴، ۷). تفسیر این مشاهده این است که در فاز رشد سلولی (۲۴ h اول فرایند) محدودیت این نسبت به تحریک رشد سلول منجر می‌شود، در حالی که در فاز تولید محصول زانتان (۴۸ h بعدی) افزایش این مقدار (محدودیت منبع نیتروژن) موجب افزایش تولید زانتان می‌شود. نتایج این تحقیق که مطابق مقالات سایر محققان است حاکی از این است که با افزایش غلظت منبع نیتروژن در غلظت ثابت منبع کربن، سرعت رشد ویژه و بازدهی سلول افزایش می‌یابد، اما نرخ تولید زانتان و بازدهی آن کم می‌شود (۱۴-۱۲، ۶، ۵). یافته‌ها نشان داد که بهینه‌سازی شرایط فیزیکی شیمیایی محیط تخمیر و شرایط تلقیح، نقش مهمی در فرایند تولید زانتان و افزایش راندمان تولید دارد. نتایج مشابهی در مورد استفاده از سوبستراهای دیگر در تولید زانتان گزارش شده است (۹-۷).

به نظر می‌رسد که ادامه این تحقیق می‌تواند با به کارگیری فرایند نیمه‌پیوسته همراه با تغییرات دما صورت پذیرد. همچنین، پیشنهاد می‌شود که تأثیر متقابل متغیرهای مؤثر این تحقیق (منابع کربن و نیتروژن) بررسی و رویه پاسخ متغیرهای وابسته (رشد و تولید) رسم شود. در ادامه این تحقیق استفاده از نتایج حاصل از

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

مرحله تولید صمغ زانتان در فلاسک برای افزایش مقیاس تا تولید در فرمنتور صورت گرفته و خصوصیات رئولوژیک صمغ تولیدی جهت کاربرد در صنایع غذایی بررسی خواهد شد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، در جهت پیشبرد اهداف این تحقیق و حمایت مالی اعلام می‌دارم.

• References

1. Garcia-Ochoa F, Santos VE, Casas JA, Gomez E. Xanthan gum: production, recovery, and properties, Biotechnol Adv. 2000; 18: 549-579.
2. Taher E. Optimization of xanthan production by *Xanthomonas campestris* grown on waste date extract, [dissertation]. Tehran: AmirKabir University of Technology; 2006. [in Persian]
3. Katzbaur B. Properties and applications of xanthan gum, Polymer Degrad. Stab 1998; 59, 81-84.
4. Garcia-Ochoa F, Santos VE, Alcon E. Metabolic structured kinetic model for xanthan production: Enz. Microb Technol. 1998; 23: 75-82.
5. Letisse F, Chevallereau P, Simon JL, Lindley ND. Kinetic analysis of growth and xanthan gum production with Xanthomonas campestrison sucrose, using sequentially consumed nitrogen sources. Appl Microb Biotechnol 2001; 55: 417-422.
6. Garcia-Ochoa F, Santos VE, Alcon A. Xanthan gum: production: An unstructured kinetic model. Enz. Microb Technol 1995; 17: 206-217.
7. Lo YM, Yang ST. Detergents improved xanthan yield and polymer quality in culture of xanthomonas campestris. Enz Microb Technol 1996; 19: 145-149.
8. Leela K, Sharma G. Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. J Biopro Eng 2008; 23: 687-689.
9. Yoo SD, Harcum SW. 1999. Xanthan gum production from waste sugar beet pulp, Bioresource Technol. 70, 105-109.
10. Souw P, Demain AL. Role of citrate in xanthan production by *Xanthomonas campestris*. J Fermentation technol 1980; 58: 411-416.
11. Funahashi H, Yoshida T, Taguchi H. Effect of glucose concentration on xanthan gum production by *Xanthomonas campestrise*. J fermentation technol 1987; 65: 603-606.
12. Pinches A, Pallent LJ. Rate yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentation using complex and chemically defined growth media. Biotechnol Bioeng 1986; 28: 1484-1496.
13. Tait MI, Sutherland IW, Clarke-Sturman AJ. Effect of growth condition on production composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* Expolysacharide. J Gen Microbiol 1986; 132: 1483-1492.
14. Khanlarlou E. Evaluation of different nitrogen sources in xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*, [dissertation] tabriz: University of Tabriz, Faculty of Agriculture. [in Persian]
15. Mousavi A. Optimization of production yield of xanthan gum by isolated strains of Xanthomonas and evaluation of its rheological properties, [dissertation]. Shiraz: University of Shiraz. [in Persian]
16. Cadmus M, Knutson CA. Production of high-pyruvate xanthan gum on synthetic medium, US patent 4,394,447.
17. Eughia Esgalhado M, Carlos Roseiro J, Amaral Collago MT. Interactive effects of pH and temperature on cell growth and polymer production by *Xanthomonas campestris*, Proc. Biochem 1995; 30(7): 667-671.
18. Casas JA, Santos VE, Garcia-Ochoa F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. Enz Microb Technol 2000; 26: 282-291.
19. Stredansky M, Conti E. Xanthan production by solid state fermentation. Proc Biochem 1999; 34: 581–587.
20. Stredansky M, Conti E, Navarini L, Bertocchi C. Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. Proc Biochem 1999; 34: 11–16.
21.Rodrıguez Couto S, Sanroman MA. Application of solid-state fermentation to food industry a review: J Food Eng 2006; 76: 291–302.
22. Farhadi Gh.. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in semi pilot scale, [dissertation]. Tehran: AmirKabir University of Technology; 2008. [in Persian]
23. Khosravi-Darani K, Vasheghani-Farahani E, Shojaosadati SA. Application of the Plackett-Burman design for the optimization of poly(β-hydroxybutyrate) production by *Ralstonia eutropha*. Iran J Biotechnol 2003; 1(3): 155-161.
24. Khosravi Darani K, Zoghi A, Alavi SA, Fatemi SSA. Application of Plackett Burman design for citric acid production from pretreated and untreated wheat straw. Iran J Chem Eng 2008; 27(1): 91-104.
25. Khosravi-Darani K, Zoghi A. Comparison of pretreatment strategies of sugarcane baggase: experimental design for citric acid production. Bioresource Technol 2008; 99: 6986–6993.
26. Garcia-Ochoa F, Santos VE, Alcon A. Structured kinetic model for *Xanthomonas campestris* growth. Enz Microb Technol 2004; 34: 583-594.
27. Rottava I, Batesini G, Fernandes Silva M, Lerin L, Oliveira D, Ferreira Padilha F, et al. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. Carbohydr Polym 2009; 77: 65-71.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]