

بهینه سازی تولید بیوپلیمر پولولان توسط *Aureobasidium pullulans* از ضایعات انار

حمیرا میرزایی^۱، فرامرز خدائیان چگینی^{۲*}، محمد جوان نیکخواه^۳

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

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

۳. استاد، گروه گیاه پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۱۲ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۶/۳/۲۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۴/۳)

چکیده

در این مطالعه بهینه سازی شرایط تخمیر جهت تولید پولولان از ضایعات انار توسط *Aureobasidium pullulans* (با شماره دستیابی KY767023) مورد بررسی قرار گرفت. روش بهینه یابی سطح پاسخ به منظور بررسی اثرات سه عامل pH اولیه، درصد تلقیح و نسبت رطوبت اولیه به سوبسترا بر میزان تولید پولولان در محیط سوبسترای جامد (SSF) مورد استفاده قرار گرفت. نتایج این آزمایشات نشان داد که حداکثر تولید پولولان در شرایط بهینه (pH اولیه: ۷/۷۵، درصد تلقیح: ۵٪ حجمی/حجمی و نسبت رطوبت اولیه به سوبسترا: ۲/۵) $50/5 \pm 0/35$ g/kg است. بررسی ویژگی های فیزیکی شیمیایی پولولان به دست آمده در شرایط بهینه نیز مورد مطالعه قرار گرفت. فعالیت امولسیفایری پولولان استخراجی ۶۳ درصد و پایداری امولسیون محلول پولولان به ترتیب در دمای ۴ °C و ۲۵ °C پس از ۳۰ روز نگهداری، ۶۰/۵ و ۵۸/۵ درصد گزارش شد. نتایج حاصل از اندازه گیری ویسکوزیته در غلظت های مختلف نشان داد که محلول پولولان در غلظت های پایین (۰/۱-۰/۵ درصد حجمی/ وزنی) دارای رفتار جریان نزدیک به نیوتنی بوده و با افزایش غلظت محلول، از نیوتنی به رقیق شونده با برش تغییر رفتار می دهد. بررسی طیف سنجی FT-IR پولولان بدست آمده از ضایعات انار حضور پیوندهای (۱→۶) α را در واحدهای مالتوتریوز تایید می کند.

واژه های کلیدی: پولولان، ضایعات انار، روش سطح پاسخ، درصد تلقیح، FT-IR

مقدمه

و آن را پولولان نامگذاری کردند. جرم مولکولی پولولان بسته به نوع سویه میکروبی، شرایط محیط کشت و نوع سوبسترا مورد استفاده از چندین تا ۲۰۰۰ کیلو دالتون متفاوت است (Sharma, Rekha & 2007).

پولولان و مشتقات آن به طور گسترده در صنایع غذایی، داروسازی، فیبرسازی و الکترونیک به کار می روند. از جمله کاربردهای آن در صنایع غذایی می توان به عنوان پوشش و تولید فیلم های خوراکی، جایگزین نشاسته در فرمولاسیون مواد غذایی کم کالری، عامل قوام دهنده، کاربرد در امولسیون ها و عامل انکپسولاسیون اشاره کرد (Kaneo et al., 2001). همچنین به عنوان یک افزودنی غذایی در بسیاری از کشورها مورد پذیرش قرار گرفته است و دارای نشان GRAS^۱ در امریکا نیز می باشد (Choudhury et al., 2012; FDA, 2002).

با وجود کاربردهای متعدد پولولان در صنایع مختلف، محدودیت عمده استفاده از آن، قیمت بالای آن بوده است که تا حدود سه برابر قیمت سایر پلی ساکارید هایی همچون دکستران و زانتان می باشد (Oguzhan & Yangilar, 2013). استفاده از

پولولان یک هموپلی ساکارید خطی، خارج سلولی، خنثی و محلول در آب است. این بیوپلیمر با ترکیب شیمیایی $(C_6H_{10}O_5)_n.H_2O$ از واحدهای مالتوتریوز با پیوند (۱→۶) α تشکیل شده است. مالتوتریوز خود نیز از سه واحد گلوکز با پیوند (۱→۴) α می باشد. وجود پیوندهای متناوب (۱→۴) α و (۱→۶) α موجب افزایش حلالیت آن در آب سرد و گرم شده است (Madi et al., 1997; Leathers, 2003). پولولان عمدتاً توسط شبه مخمر *آئروباژیدیوم پولولانس* (*Aureobasidium pullulans*) تولید می شود. این شبه مخمر به طور گسترده در مکان های مرطوب به ویژه روی سطح برگ گیاهان مختلف، تنه درختان، خاک، روی صخره ها، آب و بافت های حیوانی یافت می شود (Sutherland, 1998; Chen et al., 2012). اولین مطالعات مربوط به تولید اگزوپلی ساکارید از سویه های *آئروباژیدیوم پولولولانس* توسط Bauer (1938) و جداسازی و تعیین خصوصیات آن توسط Bernier (1958) انجام شد. سپس Bender et al. (1959) به بررسی ساختار این بیوپلیمر پرداختند

هیدروژن فسفات، منیزیوم سولفات، هیدروکلریک اسید، سدیم هیدروکسید و سدیم کلرید از شرکت مرک آلمان، پولولان تجاری از شرکت هایاشیبارا ژاپن، اتانول ۹۶٪ از شرکت رازی و روغن آفتابگردان از شرکت اوپلا ایران فراهم شد.

میکروارگانسیم

سویه بومی *Aureobasidium Pullulans* با شماره دستیابی KY767023 از برگ گیاه فیکوس (*Ficus elastic*) جداسازی گردید. تهیه کشت خالص به روش نوک هیف روی محیط کشت PDA صورت گرفت و پس از دو هفته نگهداری در انکوباتور با دمای °C ۲۵ به یخچال با دمای °C ۴ منتقل شد.

آماده سازی مایه تلقیح

برای تهیه مایه تلقیح، یک لوپ کامل از شبه مخمر A. *Pullulans* از محیط کشت PDA به ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی لیتری محتوی مایه تلقیح استریل (ساکارز ۱ g/l، عصاره مخمر ۲ g/l، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۵ g/l، منیزیوم سولفات ۰/۲ g/l، سدیم کلرید ۱ g/l) با pH برابر با ۵/۵ منتقل گردید. سپس ارلن مایرها در دمای °C ۲۵ به مدت سه روز داخل انکوباتور شیکردار (Stuart, orbital incubator S150) با دور rpm ۱۸۰ قرار داده شدند (Mehta et al., 2014).

تخمیر ضایعات پوست انار (سوبسترای جامد)

برای تهیه محیط کشت جامد (SSF)^۳، ضایعات انار خشک و پودر گردید. سپس ۱۰ گرم پودر پوست انار به عنوان محیط کشت جامد در داخل ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی لیتری وارد کرده و پس از تنظیم میزان رطوبت و pH، نمونه ها در دمای °C ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه استریل شدند. پس از رسیدن دمای محیط کشت به دمای محیط، مطابق طرح آزمایشات درصدهای مشخصی از مایه تلقیح به ارلن مایرهای محتوی محیط کشت جامد منتقل شد. سپس نمونه ها در انکوباتور (Shimaz Co. Iran) در دمای °C ۲۵ به مدت ۷ روز نگهداری شدند (Sugumaran et al., 2014).

استخراج پولولان

به منظور استخراج پولولان از محیط کشت جامد، حدود ۵ برابر حجم محیط کشت، آب با دمای °C ۴ اضافه گردید. در مرحله بعد نمونه ها با دور ۱۵۰۰۰ × g و دمای °C ۴ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در این مرحله توده سلولی^۴ به طور

ضایعات مختلف هم به لحاظ اقتصادی و هم حفظ محیط زیست مناسب است. مطالعات زیادی بر روی کاهش هزینه تولید با استفاده از منابع متنوع کربنی همچون تفاله روغن زیتون (Youssef et al., 1998)، آب پنیر (Roukas, 1999)، ملاس (Göksungur et al., 2004)، سیب زمینی شیرین (Wu et al., 2009)، نارگیل (Thirumavalavan et al., 2009)، دانه پالم آسیایی (Sugumaran et al., 2013)، شربت ذرت (Sharma et al., 2013) و ضایعات نشاسته سیب زمینی (Göksungur et al., 2013; Wu et al., 2016) انجام گرفته است.

انار با نام علمی *Punica granatum* به طور گسترده در بسیاری از کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری کشت می شود (Fischer et al., 2011). ایران مرکز تنوع ارقام و یکی از بزرگترین کشورهای تولید کننده انار در جهان است به طوریکه با تولید بیش از یک میلیون تن در سال، حدود یک چهارم صادرات جهانی انار را بر عهده دارد (Salehi et al., 2016). با توجه به کاربرد انار در تولید صنعتی انواع فراورده های جانبی شامل کنسانتره، مربا، آب و رب انار، مقدار قابل توجهی پوست و هسته انار به صورت ضایعات باقی می ماند. برای مثال در فرآیند تولید آب انار، به ازای ۱ تن انار، ۶۶۹ کیلوگرم ضایعات حاصل می شود که ۷۸٪ آن پوست و ۲۲٪ آن هسته انار می باشد (Moorthy et al., 2015). ضایعات انار با داشتن ۰/۲۲ ± ۴۰/۰۰ درصد رطوبت، ۰/۳ ± ۳۱/۳۸ درصد قند، ۰/۱۰ ± ۸/۷۲ درصد پروتئین، ۰/۱۰ ± ۹/۴۰ درصد چربی و ۰/۳ ± ۱/۳۹ درصد نیتروژن، یکی از ضایعات با ارزش صنعت غذا به حساب می آید (Ullah et al., 2012). بنابراین به منظور کاهش هزینه های تولید و همچنین کاهش آلودگی های زیست محیطی می توان با استفاده از ضایعات مختلف از جمله پوست انار، محصولاتی با ارزش افزوده بالا تولید نمود. هدف از این مطالعه نیز بهینه سازی تولید پولولان توسط شبه مخمر آئروبازیوم پولولولانس از ضایعات پوست انار با استفاده از روش سطح پاسخ^۱ (RSM) و تعیین خصوصیات فیزیکوشیمیایی پولولان تولیدی می باشد.

مواد و روش ها

مواد اولیه

پوست انار وارپتهه ملس ساوه از شهرستان ساوه، استان مرکزی تهیه گردید. محیط PDA^۲، ساکارز، عصاره مخمر، پتاسیم دی

3. Solid state fermentation
4. Biomass

1. Response surface methodology
2. Potato Dextrose Agar

با دور $g \times 10000 \times$ هموزنیزه شد. در مرحله بعد نمونه‌ها در فالتون‌های مدرج به مدت پنج دقیقه با دور $g \times 4000$ سانتریفیوژ شدند و بلافاصله حجم لایه امولسیون شده اندازه‌گیری شد و محاسبه فعالیت امولسیفایری طبق معادله ۲ انجام شد (Hosseini et al., 2016).

$$\text{رابطه ۲)} \times 100 = \frac{\text{حجم لایه امولسیون شده}}{\text{حجم کل محلول}} \times \text{فعالیت امولسیفایری (درصد)}$$

برای اندازه‌گیری پایداری امولسیفایری، نمونه‌ها پس از یک و ۳۰ روز نگهداری در دمای 4°C و 25°C ، به مدت ۵ دقیقه با دور $g \times 4000$ سانتریفیوژ شدند. سپس پایداری امولسیفایری از معادله ۳ محاسبه گردید.

$$\text{رابطه ۳)} \times 100 = \frac{\text{حجم امولسیون نگهداری شده}}{\text{حجم امولسیون اولیه}} \times \text{پایداری امولسیفایری (درصد)}$$

آنالیز آماری

به منظور بهینه‌سازی عوامل موثر بر تولید پولولان از روش سطح پاسخ (RSM) و طرح مرکب مرکزی (CCD) ^۲ استفاده شد. بر اساس انجام آزمایشات مقدماتی، سطوح و دامنه تغییرات هریک از متغیرهای مستقل (pH، درصد تلقیح (v/v) و نسبت رطوبت به سوپسترا) در جدول ۱ آمده است.

آنالیز داده‌ها در سطح احتمال ۵ درصد و با استفاده از نرم افزار آماری مینی تب (Minitab, State College, PA, USA) Version 17.2.1 انجام شد. نتایج آزمایشگاهی حاصل از طرح مرکب مرکزی با استفاده از معادله چند جمله‌ای درجه دوم (معادله ۴) بررسی شد. در این معادله Y پاسخ پیش بینی شده، C_0, C_1, C_{ii}, C_{ij} ضرایب ثابت، X_i و X_j متغیرهای مستقل هستند. برای بررسی دقت مدل نیز از ضریب تبیین (R^2) و آزمون عدم برازش استفاده گردید. تمام شکل‌ها با استفاده از اکسل (Excel 2013) و Design Expert (Design-Expert 7.0, Delaware, USA) رسم شدند.

$$\text{رابطه ۴)} \quad Y = C_0 + \sum_{i=1}^3 C_i X_i + \sum_{i=1}^3 C_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j < i} C_{ij} X_i X_j$$

نتایج و بحث

بهینه‌سازی تولید پولولان

برای انجام آزمایشات بهینه‌سازی از روش سطح پاسخ استفاده شد. در این روش از طرح مرکب مرکزی (CCD) با شش تکرار در نقطه مرکزی و تعداد ۲۰ تیمار برای بهینه‌سازی اثر سه فاکتور pH، درصد تلقیح (v/v) و نسبت رطوبت به سوپسترا استفاده شد. ماتریس طرح نتایج بدست آمده و پیش بینی شده در جدول ۲ نشان داده شده است.

کامل از روشناور^۱ جدا شد. سپس دو برابر حجم روشناور، اتانول با دمای 20°C - اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 4°C نگهداری گردید. در مرحله آخر جهت استخراج پولولان، نمونه‌ها با دور $g \times 15000$ و دمای 4°C به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت اگزوپلی ساکارید بدست آمده تا رسیدن به وزن ثابت در آون (Shimaz Co. Iran) با دمای 50°C قرار داده شد (Sugumaran & Ponnusami, 2017).

اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی

طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR)

این روش عمدتاً برای شناسایی ترکیبات آلی جهت تعیین نوع گروه عاملی و پیوندهای موجود در مولکول‌های آن به کار می‌رود. طیف سنجی مادون قرمز پولولان به روش آماده سازی با قرص پتاسیم برماید در محدوده $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ و با دقت 4 cm^{-1} انجام شد. در این روش $1/5 \text{ mg}$ از پولولان تولیدی با 250 mg پودر KBr به خوبی مخلوط شده سپس توسط اسپکترومتر FT-IR (Perkin Elmer Co., MA, USA) مورد بررسی قرار گرفت.

ویسکوزیته ظاهری

محلول پولولان در غلظت‌های مختلف $0/1, 0/5, 1, 2$ درصد حجمی/ وزنی تهیه گردید. سپس ویسکوزیته ظاهری آنها با دستگاه ویسکومتر چرخشی قابل برنامه ریزی (LVDV-II Pro, Brookfield Engineering Inc., USA) با استفاده از اسپیندل ULA در دمای 25°C و در محدوده سرعت برشی 0 تا 140 بر ثانیه اندازه‌گیری شد. سپس رفتار رئولوژیکی نمونه‌ها مطابق معادله ۱ مورد بررسی قرار گرفت و مقادیر ضریب قوام (K) بر حسب میلی پاسکال ثانیه و شاخص رفتار جریان (n) به وسیله نمودارهای تنش برشی در مقابل سرعت برشی و با استفاده از قانون توان به وسیله نرم افزار آماری مینی تب (Minitab, State College, PA, USA) Version 17.2.1 بدست آمد.

$$\text{رابطه ۱)} \quad \sigma = K \left[\left(\frac{du}{dy} \right) \right]^n$$

در فرمول فوق؛ σ ، نشان دهنده تنش برشی؛ $\left(\frac{du}{dy} \right)$ ، سرعت برشی؛ K، ضریب قوام و n شاخص رفتار جریان می‌باشد.

خاصیت امولسیفایری

جهت تعیین فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیفایر، 5 میلی لیتر روغن آفتابگردان به 5 میلی لیتر محلول صمغ پولولان ($1/5$ درصد حجمی/ وزنی) محتوی $0/2$ درصد سدیم آزید به عنوان باکتری کش، اضافه شد. سپس به مدت سه دقیقه در هموزنایزر

جدول ۱- سطوح و مقادیر متغیرهای مستقل

| متغیرها | نماد | +α | +۱ | ۰ | -۱ | -α |
|-----------------------|-------|------|----|------|-----|------|
| pH | x_1 | ۷/۷۵ | ۷ | ۶/۲۵ | ۵/۵ | ۴/۷۵ |
| درصد تلقیح (v/v) | x_2 | ۲۵ | ۲۰ | ۱۵ | ۱۰ | ۵ |
| نسبت رطوبت به سوبسترا | x_3 | ۲/۵ | ۲ | ۱/۵ | ۱ | ۰/۵ |

جدول ۲. سطوح متغیرهای مستقل و نتایج مربوط به میزان تولید پولولان

| تیمار | x_1 | x_2 (/v/v) | x_3 | مقدار به دست آمده (g/Kg) | مقدار پیش بینی شده (g/Kg) |
|-------|-------|-----------------|-------|-----------------------------|------------------------------|
| ۱ | ۵/۵ | ۱۰ | ۱/۰ | ۵/۵ | ۳/۶ |
| ۲ | ۷ | ۱۰ | ۱/۰ | ۹/۰ | ۸/۰۰ |
| ۳ | ۵/۵ | ۲۰ | ۱/۰ | ۵/۸ | ۷/۸۸ |
| ۴ | ۷ | ۲۰ | ۱/۰ | ۶/۴ | ۶/۶۸ |
| ۵ | ۵/۵ | ۱۰ | ۲/۰ | ۱۷/۲ | ۱۶/۷۵ |
| ۶ | ۷ | ۱۰ | ۲/۰ | ۳۴/۵ | ۳۲/۲۵ |
| ۷ | ۵/۵ | ۲۰ | ۲/۰ | ۱۰/۰ | ۱۰/۸۲ |
| ۸ | ۷ | ۲۰ | ۲/۰ | ۱۹/۰ | ۲۰/۷۲ |
| ۹ | ۶/۲۵ | ۱۵ | ۱/۵ | ۱۹/۰ | ۱۷/۴۳ |
| ۱۰ | ۶/۲۵ | ۱۵ | ۱/۵ | ۱۶/۴ | ۱۷/۴۳ |
| ۱۱ | ۶/۲۵ | ۱۵ | ۱/۵ | ۱۵/۶ | ۱۷/۴۳ |
| ۱۲ | ۶/۲۵ | ۱۵ | ۱/۵ | ۱۸/۰ | ۱۷/۴۳ |
| ۱۳ | ۴/۷۵ | ۱۵ | ۱/۵ | ۵/۶ | ۵/۲۴ |
| ۱۴ | ۷/۷۵ | ۱۵ | ۱/۵ | ۱۹/۰ | ۱۹/۵۴ |
| ۱۵ | ۶/۲۵ | ۵ | ۱/۵ | ۱۰/۰ | ۱۲/۷۱ |
| ۱۶ | ۶/۲۵ | ۲۵ | ۱/۵ | ۸/۰ | ۵/۴۶ |
| ۱۷ | ۶/۲۵ | ۱۵ | ۰/۵ | ۱/۶ | ۱/۷۹ |
| ۱۸ | ۶/۲۵ | ۱۵ | ۲/۵ | ۲۹/۰ | ۲۸/۹۹ |
| ۱۹ | ۶/۲۵ | ۱۵ | ۱/۵ | ۱۸/۴ | ۱۷/۷۴ |
| ۲۰ | ۶/۲۵ | ۱۵ | ۱/۵ | ۱۷/۶ | ۱۷/۷۴ |

مشاهده شده می‌باشد و تنها ۳/۰۶٪ از کل تغییرات توسط مدل پیشنهادی قابل توصیف نبوده است. آنالیز داده‌ها و حل معادله ۲ به منظور دستیابی شرایط مناسب برای تولید پولولان نشان داد که بیشترین میزان تولید پولولان در شرایط بهینه (pH: ۷/۷۵، درصد تلقیح: ۵ v/v و نسبت رطوبت به سوبسترا: ۲/۵) ۵۲/۵۰ g/Kg است.

(رابطه ۵)

$$Y = -133.4 + 29.0 X_1 + 6.10 \times X_2 - 10.3 \times X_3 - 2.378 X_1 \times X_1 - 0.0865 X_2 \times X_2 - 2.35 X_3 \times X_3 - 0.373 X_1 \times X_2 + 7.40 X_1 \times X_3 - 1.020 X_2 \times X_3$$

نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) در جدول ۳ نشان می‌دهد که راندمان تولید پولولان در سطح اطمینان ۹۵٪ معنی دار ($P < 0.05$) و آزمون عدم برازش مربوط به آن، غیر معنی دار ($P > 0.05$) بوده است. بنابراین معادله ۵ (Y: مقدار پولولان بدست آمده در شرایط آزمایشگاهی، X_1 : pH، X_2 : درصد تلقیح (v/v)، X_3 : نسبت رطوبت به سوبسترا) که نوعی رابطه ریاضی جهت دستیابی به شرایط بهینه از طریق ارتباط بین متغیرها می‌باشد، به خوبی با داده‌ها برازش می‌شود. ضریب تبیین R^2 این مدل ۹۶/۹۴٪ و ضریب تبیین تعدیل شده آن (Adj- R^2) ۹۳/۵۳٪ است که نشان دهنده قابلیت مدل در توضیح ۹۶/۹۴٪ تغییرات

جدول ۳. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) مدل سطح پاسخ درجه دوم برای تولید بهینه پولولان

| منبع | درجه آزادی | مجموع مربعات | میانگین مربعات | ارزش F | ارزش P |
|-----------------|------------|--------------|----------------|--------|--------|
| رگرسیون | ۱۰ | ۱۲۶۰/۳۲ | ۱۲۶/۰۳۲ | ۲۸/۴۹ | ۰/۰۰۰ |
| بلوک ها | ۱ | ۰/۴۳ | ۰/۴۲۶ | ۰/۱۰ | ۰/۷۶۳ |
| خطی | ۳ | ۹۹۶/۸۹ | ۳۳۲/۲۹۷ | ۷۵/۱۱ | ۰/۰۰۰ |
| درجه دوم | ۳ | ۱۲۸/۸۳ | ۴۲/۹۴۲ | ۹/۷۱ | ۰/۰۰۴ |
| اثرات متقابل | ۳ | ۱۲۹/۳۱ | ۱۰۲/۴۳ | ۹/۷۴ | ۰/۰۰۳ |
| خطای باقی مانده | ۹ | ۳۹/۸۲ | ۴/۴۲۴ | | |
| عدم برازش | ۵ | ۴۳/۳۲ | ۶/۴۸۵ | ۳/۵۱ | ۰/۱۲۴ |
| خطای خالص | ۴ | ۷/۳۹ | | | |
| کل | ۱۹ | ۱۳۰۰/۱۳ | | | |

نتایج نشان داد با افزایش میزان تلقیح از ۵٪ تا ۱۰٪ حجمی/حجمی، میزان تولید پولولان افزایش می‌یابد (شکل ۱-ج). در حالی که در درصدهای تلقیح بالا به دلیل محدودیت دسترسی میکروارگانیسم به مواد مغذی، میزان تولید کاهش می‌یابد (Sharma et al., 2013). بنابراین انتخاب مقدار بهینه درصد تلقیح جهت ایجاد تعادل در میزان تولید بیومس و حداکثر تولید پولولان ضروری است.

طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR)

طیف سنجی مادون قرمز بر اساس جذب تابش و بررسی جهش‌های ارتعاشی مولکول‌ها و یون‌های چند اتمی صورت می‌گیرد. این روش عمدتاً برای شناسایی ترکیبات آلی جهت تعیین نوع گروه عاملی و پیوندهای موجود در مولکول‌های آن به کار می‌رود. زیرا طیف‌های این ترکیبات معمولاً پیچیده هستند و تعداد زیادی پیک‌های ماکسیمم و مینیمم دارند که می‌توانند برای اهداف مقایسه‌ای به کار گرفته شوند (Islam et al., 2014). عدد موجی بین ۶۵۰ تا ۱۲۰۰ بر سانتی متر اغلب اثر انگشت مولکول‌ها نامیده می‌شود چراکه امکان تشخیص گروه‌های شیمیایی اصلی در پلی‌ساکاریدها را میسر می‌سازد. مطابق شکل ۲ ناحیه جذبی قوی ۳۵۰۰-۳۳۰۰ بر سانتی متر مربوط به گروه های هیدروکسیل واحدهای قندی بوده که به طور گسترده در ساختار پلی‌ساکاریدها مشاهده می‌شود. پیک موجود در ناحیه ۳۰۰۰-۲۸۰۰ بر سانتی متر، نشان دهنده پیوند های متقارن و نامتقارن C-H آلکان‌ها در نمونه مورد نظر می‌باشد (Choudhury et al., 2011). عدد موجی ۱۶۲۵/۸۷ بر سانتی متر مربوط به پیوند O-C-O و عدد موجی ۱۴۶۵/۱۳ بر سانتی متر نشان دهنده پیوند C-O-H در ساختار واحدهای تشکیل دهنده پلی‌ساکاریدها است. همچنین طیف جذبی ۱۱۶۶/۶۸ بر سانتی متر، حضور پیوندهای C-O-C در اتصالات گلیکوزیدی را تایید می‌کند. طیف جذبی مربوط به پیوند C-O در پلی

در نهایت جهت تایید پیش بینی مدل، سه واحد آزمایشی تحت شرایط بهینه (pH: ۷/۷۵، درصد تلقیح: ۷/۷ v/v و نسبت رطوبت به سوبسترا: ۲/۵) تکرار شد. راندمان تولید پولولان ۰/۳۵ g/Kg ± ۵۰/۵۰ بدست آمد که نشان دهنده قابلیت بالای مدل در پیش بینی میزان تولید تحت شرایط مختلف است.

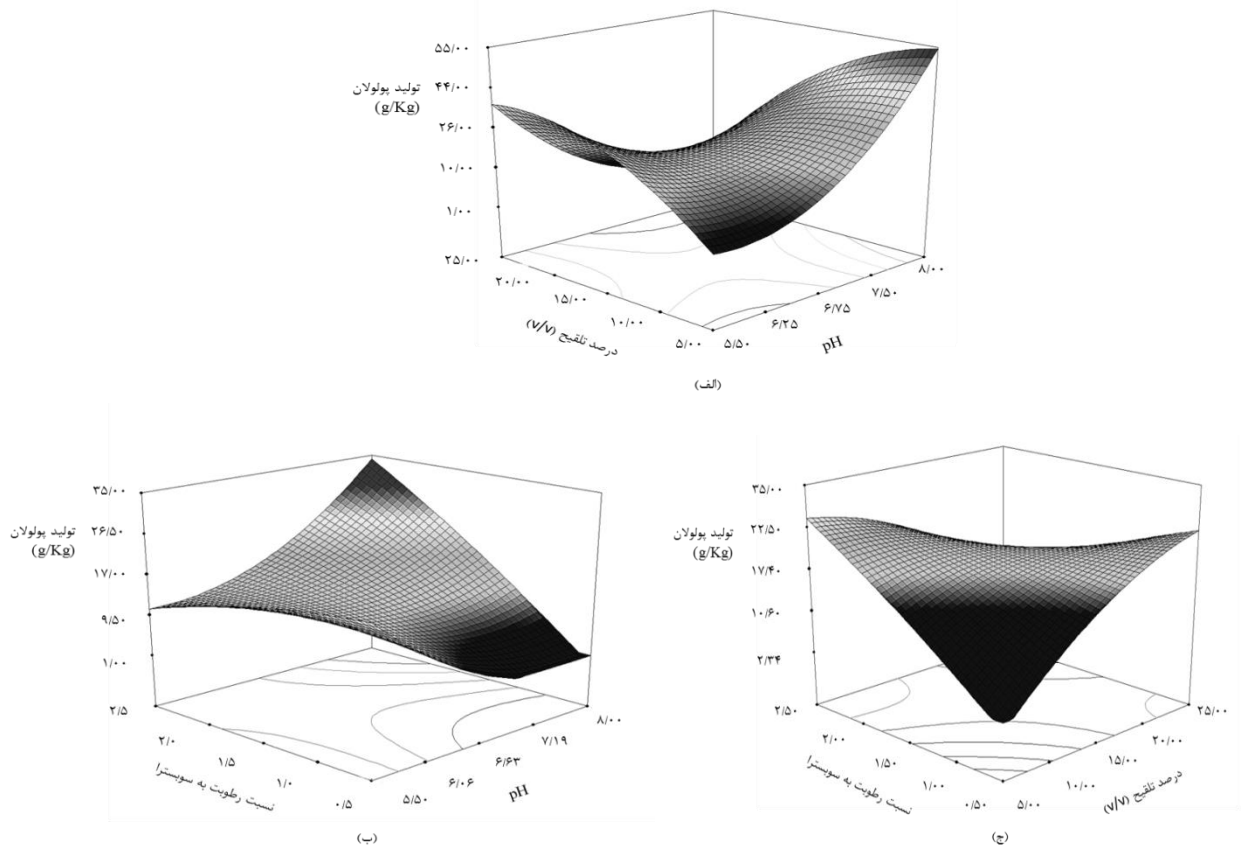
معادله ۲ نشان می‌دهد که متغیر pH در حالت خطی (۲۹/۰) بیشترین اثر را در مقایسه با سایر متغیرها بر راندمان تولید پولولان دارد. شکل ۱-الف نشان می‌دهد که با افزایش pH تا حد ۷/۷۵ میزان تولید پولولان نیز افزایش می‌یابد. لازم به ذکر است که pH بهینه برای تولید پولولان توسط سویه‌های مختلف متفاوت است. عامل pH با تاثیر روی مورفولوژی و فعالیت‌های متابولیکی سلول نقش بسزایی در میزان تولید آنزیم‌های متابولیکی و در نتیجه آن تولید پولولان دارد (Prajapati et al., 2013).

یکی از مهمترین فاکتورهای موثر در تخمیر محیط جامد، میزان رطوبت اولیه است که به نوع سوبسترای جامد مورد استفاده بستگی دارد. مطابق شکل ۱-ب در یک pH ثابت با افزایش رطوبت اولیه تا نسبت ۲/۵ برابر میزان تولید پولولان افزایش می‌یابد. رشد و فعالیت متابولیکی میکروارگانیسم نیز به میزان زیادی تحت تاثیر میزان رطوبت و اکسیژن موجود در محیط می‌باشد. به طوریکه افزایش رطوبت بیش از حد به دلیل پرکردن منافذ سوبسترا در حالت جامد منجر به کاهش سرعت انتقال اکسیژن می‌گردد. همچنین رطوبت کم سوبسترا سرعت انتقال مواد مغذی به میکروارگانیسم را با مشکل مواجه می‌کند (Sugumar et al., 2014).

یکی دیگر از عوامل موثر بر تولید پولولان درصد تلقیح است که میزان بار میکروبی اولیه و طول مدت فاز تاخیر به آن بستگی دارد. در واقع درصد تلقیح با تاثیر روی مورفولوژی و الگوی رشد میکروارگانیسم بر میزان تولید پولولان موثر است.

پولولان است (جدول ۴). ناحیه جذبی در ۸۵۱/۹۸ بر سانتی متر مربوط به D-α گلوکوپیرانوزید، پیک مربوط به ناحیه ۷۷۴/۱۸ بر سانتی متر نشان دهنده پیوندهای D-α (۱→۴) گلوکوپیرانوزید و ناحیه جذبی ۹۹۳/۹۸ بر سانتی متر نیز مربوط به حضور پیوندهای D-α (۱→۶) گلوکوپیرانوزید در ساختار این بیوپلیمر است (Wang et al., 2014).

ساکاریدهای مختلف بسته به تکرار واحدهای تشکیل دهنده و محل قرارگیری گروه های عاملی O-H به صورت محوری یا استوایی، متفاوت است به طوری که در ساختار پولولان طول موج مربوط به این پیوند، ۱۱۱۱/۶۶ گزارش شده است (Shingel, 2002). پیک های مربوط به محدوده طول موج ۱۵۰۰-۶۵۰ بر سانتی متر به صورت اختصاصی نشان دهنده ساختار بیوپلیمر

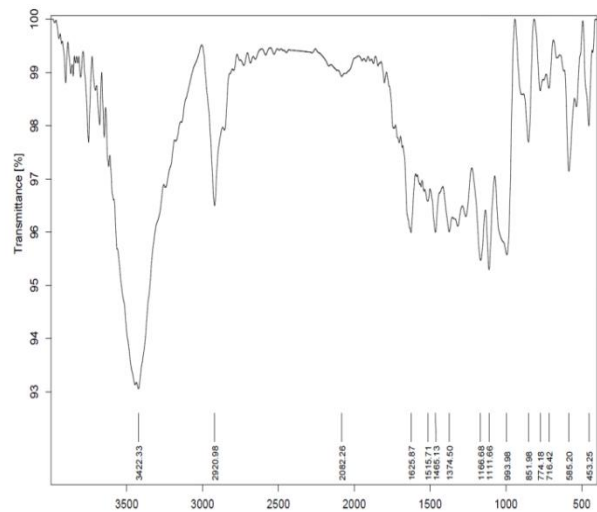


شکل ۱. نمودار سه بعدی مربوط به تاثیرات pH، درصد تلقیح (v/v) و نسبت رطوبت به سوبسترا بر میزان تولید پولولان در محیط ضایعات انار

جدول ۴. طیف های جذبی پولولان صنعتی و پولولان تولید شده توسط

Aureobasidium Pullulans

| گروه های عاملی | عدد موجی پولولان تجاری (cm ⁻¹) | عدد موجی پولولان تولید شده در ضایعات انار (cm ⁻¹) |
|--------------------------|--|---|
| O-H | ۳۳۹۹/۴ | ۳۴۲۲/۳۳ |
| C-H | ۲۹۲۴/۷ | ۲۹۲۰/۹۸ |
| O-C-O | ۱۶۵۱/۹ | ۱۶۲۵/۸۷ |
| C-O-H | ۱۴۱۸/۶ | ۱۴۶۵/۱۳ |
| C-O-C | ۱۱۵۶/۰ | ۱۱۶۶/۶۸ |
| C-O | ۱۰۲۴/۰ | ۱۱۱۱/۶۶ |
| D-α گلوکوپیرانوزید (۱→۶) | ۱۰۲۲/۱ | ۹۹۳/۹۸ |
| D-α گلوکوپیرانوزید | ۸۵۲/۸ | ۸۵۱/۹۸ |
| D-α گلوکوپیرانوزید (۱→۴) | ۷۵۶/۰ | ۷۷۴/۱۸ |



شکل ۲. طیف مادون قرمز (FT-IR) پولولان تولید شده در محیط ضایعات

انار

ویسکوزیته ظاهری

به منظور بررسی رفتار جریان، چهار محلول پولولان با غلظت های ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد حجمی/ وزنی تهیه گردید. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می شود، با افزایش غلظت محلول ها، ویسکوزیته ظاهری نیز افزایش یافته است. اما رفتار جریان محلول های پولولان در غلظت های مختلف متفاوت بوده است. با توجه به جدول ۵، ضریب شاخص قوام (K) بین ۰/۵۴ تا ۱/۵۷۷ است که با افزایش غلظت محلول پولولان افزایش می یابد در حالیکه مقدار عددی شاخص رفتار جریان (n) بین ۰/۳۵ تا ۰/۹۶ است که با افزایش غلظت محلول پولولان کاهش می یابد. بنابراین محلول پولولان در غلظت های پایین ۰/۱ و ۰/۵ درصد حجمی/ وزنی دارای رفتار نسبتاً نیوتنی بوده به طوریکه افزایش نرخ برش تاثیر معنی داری ($p < 0.05$) روی ویسکوزیته نداشته است، در حالیکه با افزایش غلظت محلول پولولان به ۱ درصد حجمی/ وزنی رفتار جریان تغییر کرده و با افزایش نرخ برش، ویسکوزیته کاهش یافته است که این نشان دهنده رفتار جریان از نوع رقیق شونده با برش یا همان سودوپلاستیک می باشد.

با توجه به نتایج بدست آمده می توان بیان داشت که محلول های پولولان در غلظت های پایین دارای رفتار نسبتاً نیوتنی بوده اما با افزایش غلظت، از نیوتنی به رقیق شونده با برش تغییر رفتار می دهند. این رفتار سودوپلاستیکی در محلول های غلیظ تر می تواند مربوط به شکسته شدن اتصالات فیزیکی ضعیف بین بیوپلیمرها در اثر افزایش نرخ برش بوده که سبب کاهش ویسکوزیته تا رسیدن به یک میزان ثابت می شود. در حالی که در غلظت های پایین تر به دلیل کمتر بودن این اتصالات فیزیکی، افزایش نرخ برش تاثیر معنی داری بر ویسکوزیته ندارد (McClements, 2015). همچنین لازم به ذکر است که نتایج مشاهده شده در این تحقیق با گزارشات بسیاری از محققین مطابقت دارد (Piermaria et al., 2008; Lazaridou et al., 2002; Tsaliki et al., 2004).

خاصیت امولسیفایری

در این مطالعه، خصوصیات امولسیفایری پولولان استخراج شده در شرایط بهینه در غلظت ۱/۵ درصد حجمی/ وزنی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت امولسیفایری پولولان در دمای ۲۵ °C، بلافاصله پس از تشکیل امولسیون برابر با ۶۳ درصد بوده است، که این میزان بیشتر از نتایج گزارش شده در شرایط مشابه توسط Yada et al. (2014) می باشد (۵۶ درصد). پایداری امولسیون ها نیز پس از ۱ و ۳۰ روز نگهداری در دمای ۴ و ۲۵ درجه سلسیوس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی این پارامتر نشان داد که ثبات امولسیون ها پس از یک روز نگهداری در هر دو دمای مورد آزمایش تغییر محسوسی نکرده است، در حالی که این خصوصیت پس از ۳۰ روز نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس برابر با ۶۰/۵ درصد و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برابر ۵۸/۵ بوده است (جدول ۶). با توجه به نتایج بدست آمده می توان بیان داشت که پایداری امولسیون ها در دمای ۴ درجه سلسیوس به مقدار اندکی بیشتر بوده است که این نتیجه مشابه با گزارشات بسیاری از محققین می باشد (Raji et al., 2017). پولولان همچون سایر هیدروکلوئیدها، به دلیل داشتن نواحی آبدوست و آبریز دارای فعالیت امولسیفایری می باشد (Huang et al., 2001). از طرفی این آگزوپلی ساکارید، با ایجاد یک لایه در اطراف قطرات فاز پراکنده و همچنین افزایش ویسکوزیته در اثر جذب آب، سبب کاهش سرعت بهم پیوستن قطرات شده و در نتیجه ثبات امولسیون ها را افزایش می دهد (Wendin & Hall, 2001).

جدول ۶. فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیونی محلول ۱/۵ درصد وزنی/ حجمی پولولان

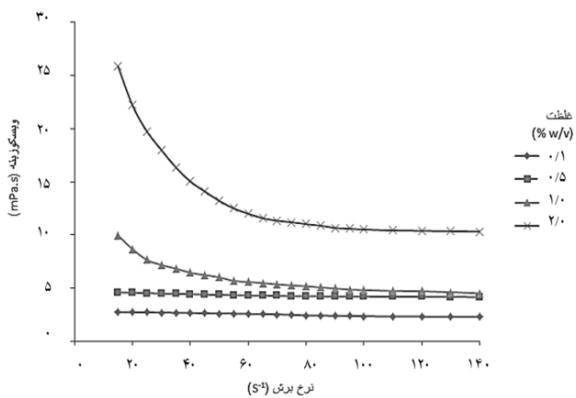
| پایداری امولسیون (%) | | فعالیت امولسیفایری (%) | | دما (درجه سلسیوس) |
|----------------------|----|------------------------|----|-------------------|
| ۲۵ | ۴ | ۲۵ | ۴ | |
| ۳۰ | ۱ | ۳۰ | ۱ | مدت نگهداری (روز) |
| ۵۸/۵ | ۶۳ | ۶۰/۵ | ۶۳ | پولولان |

نتیجه گیری

با توجه به کاربرد گسترده پولولان در صنایع مختلف، به منظور کاهش هزینه های تولید آن می توان از ضایعات مختلف کشاورزی به عنوان سوبسترای جامد استفاده نمود. نتایج این تحقیق نشان داد که ضایعات انار سوبسترای جامد مناسبی جهت تولید این بیوپلیمر توسط سویه بومی *Aureobasidium pullulans* می باشد. با توجه به نتایج آنالیز آماری به روش

جدول ۵. مقادیر ثابت های رئولوژی قانون توان برای غلظت های مختلف محلول پولولان

| غلظت محلول پولولان (% w/v) | K | n |
|----------------------------|-------|------|
| ۰/۱ | ۰/۵۴ | ۰/۹۶ |
| ۰/۵ | ۰/۸۵ | ۰/۹۲ |
| ۱/۰ | ۰/۱۷۶ | ۰/۷۱ |
| ۲/۰ | ۱/۵۷ | ۰/۳۵ |



شکل ۳. بررسی رفتار جریان محلول های پولولان در غلظت های مختلف (۰/۱، ۰/۵، ۱/۰ و ۲/۰ درصد حجمی / وزنی)

سطح پاسخ، بیشترین میزان تولید پولولان در شرایط بهینه pH: ۷/۷۵، درصد تلقیح: ۵ v/v و نسبت رطوبت به سوبسترا: ۲/۵ (۵۲/۵۰ g/Kg) حاصل شد که در مقایسه با سوبستراهای مختلف مورد بررسی توسط سایر محققین مقدار قابل توجهی بوده است. پولولان بدست آمده تحت شرایط بهینه دارای فعالیت امولسیفایری ۶۳ درصد و پایداری امولسیون محلول آن به ترتیب در دمای ۴ °C و ۲۵ °C پس از ۳۰ روز نگهداری، ۶۰/۵ و ۵۸/۵ درصد بوده است. همچنین محلول پولولان در غلظت های پایین دارای رفتار نیوتنی بوده اما با افزایش غلظت، از نیوتنی به رقیق شونده با برش تغییر رفتار می دهد.

REFERENCES

- Bauer, R. (1938) Physiology of *Dellatiull pullulans* de Bary. Zentralbl Bacteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 298, 133-167
- Bender, H., Lehmann, J., & Wallenfels, K. (1959). Pullulan, ein extracelluläres Glucan von *Pullularia pullulans*. *Biochimica et biophysica acta*, 36(2), 309-316.
- Bernier, B. (1958). The production of polysaccharides by fungi active in the decomposition of wood and forest litter. *Canadian Journal of Microbiology*, 4(3), 195-204.
- Chen, J., Wu, S. & Pan, S. (2012). Optimization of medium for pullulan production using a novel strain of *Aureobasidium pullulans* isolated from sea mud through response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 771-774.
- Choudhury, A.R., Bhattacharyya, M.S. & Prasad, G.S. (2012). Application of response surface methodology to understand the interaction of media components during pullulan production by *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(3), 232-237.
- Choudhury, A.R., Saluja, P. & Prasad, G.S. (2011). Pullulan production by an osmotolerant *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3 isolated from flowers of *Caesulia axillaris*. *Carbohydrate polymers*, 83(4), pp.1547-1552.
- FDA, U.S. (2002). Agency Response Letter: GRAS Notice No. GRN 000099 [Pullulan]. College Park, Maryland: US Food and Drug Administration (US FDA). *Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), Office of Food Additive Safety*.
- Fischer, U.A., Carle, R. & Kammerer, D.R. (2011). Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS n. *Food chemistry*, 127(2), 807-821.
- Göksungur, Y., Uçan, A. & Güvenç, U. (2004). Production of pullulan from beet molasses and synthetic medium by *Aureobasidium pullulans*. *Turkish Journal of Biology*, 28(1), 23-30.
- Göksungur, Y., Uzunoğulları, P. & Dağbağlı, S. (2011). Optimization of pullulan production from hydrolysed potato starch waste by response surface methodology. *Carbohydrate polymers*, 83(3), 1330-1337.
- Hosseini, S.S., Khodaiyan, F. & Yarmand, M.S. (2016). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from sour orange peel and its physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 140, 59-65.
- Huang, X., Kakuda, Y. & Cui, W. (2001). Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. *Food Hydrocolloids*, 15(4), 533-542.
- Islam, M. S., Rabbani, M. M., Yang, S. B., Choi, W. S., Choi, J. H., Oh, W., ... & Yeum, J. H. (2014). Poly (vinyl alcohol)/Pullulan Blend Nanofibres Prepared from Aqueous Solutions Using Electrospinning Method. *Polymers & Polymer Composites*, 22(9), 779.
- Kaneo, Y., Tanaka, T., Nakano, T., & Yamaguchi, Y. (2001). Evidence for receptor-mediated hepatic uptake of pullulan in rats. *Journal of Controlled Release*, 70(3), 365-373.
- Lazaridou, A., Roukas, T., Biliaderis, C. G., & Vaikousi, H. (2002). Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(1), 122-132.
- Leathers, T.D. (2003). Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(5-6), 468-473.
- Madi, N. S., Harvey, L. M., Mehlert, A., & McNeil, B. (1997). Synthesis of two distinct exopolysaccharide fractions by cultures of the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers*, 32(3-4), 307-314.
- McClements, D.J. (2015). Food emulsions: principles,

- practices, and techniques, CRC press.
- Mehta, A., Prasad, G.S. & Choudhury, A.R. (2014). Cost effective production of pullulan from agri-industrial residues using response surface methodology. *International journal of biological macromolecules*, 64, 252–256.
- Moorthy, I. G., Maran, J. P., Muneeswari, S., Naganyashree, S., & Shivamathi, C. S. (2015). Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel. *International journal of biological macromolecules*, 72, 1323–1328.
- Oguzhan, P. & Yangilar, F. (2013). Pullulan: production and usage in food industry. *Afr J Food Sci Technol*, 4, 57–63.
- Piermaria, J.A., Mariano, L. & Abraham, A.G. (2008). Gelling properties of kefir, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1520–1527.
- Prajapati, V.D., Jani, G.K. & Khanda, S.M. (2013). Pullulan: an exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydrate polymers*, 95(1), 540–549.
- Raji, Z., Khodaiyan, F., Rezaei, K., Kiani, H., & Hosseini, S. S. (2017). Extraction optimization and physicochemical properties of pectin from melon peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 709–716.
- Rekha, M.R. & Sharma, C.P. (2007). Pullulan as a promising biomaterial for biomedical applications: a perspective. *Trends Biomater Artif Organs*, 20(2), 116–121.
- Roukas, T. (1999). Pullulan production from deproteinized whey by *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22(6), 617–621.
- Salehi, M., Hosseini, S. A. E., Rasoulpour, R., Salehi, E., & Bertaccini, A. (2016). Identification of a phytoplasma associated with pomegranate little leaf disease in Iran. *Crop Protection*, 87, 50–54.
- Sharma, N., Prasad, G.S. & Choudhury, A.R. (2013). Utilization of corn steep liquor for biosynthesis of pullulan, an important exopolysaccharide. *Carbohydrate polymers*, 93(1), 95–101.
- Shingel, K.I. (2002). Determination of structural peculiarities of dexran, pullulan and γ -irradiated pullulan by Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 337(16), 1445–1451.
- Sugumaran, K. R., Gowthami, E., Swathi, B., Elakkiya, S., Srivastava, S. N., Ravikumar, R., ... & Ponnusami, V. (2013). Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from Asian palm kernel: A novel substrate. *Carbohydrate polymers*, 92(1), 697–703.
- Sugumaran, K.R., Jothi, P. & Ponnusami, V. (2014). Bioconversion of industrial solid waste—Cassava bagasse for pullulan production in solid state fermentation. *Carbohydrate polymers*, 99, 22–30.
- Sugumaran, K.R. & Ponnusami, V. (2017). Conventional optimization of aqueous extraction of pullulan in solid-state fermentation of cassava bagasse and Asian palm kernel. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 204–208.
- Sugumaran, K. R., Shobana, P., Balaji, P. M., Ponnusami, V., & Gowdhaman, D. (2014). Statistical optimization of pullulan production from Asian palm kernel and evaluation of its properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 66, 229–235.
- Sutherland, I.W. (1998). Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in biotechnology*, 16(1), 41–46.
- Thirumavalavan, K., Manikkadan, T.R. & Dhanasekar, R., (2009). Pullulan production from coconut by-products by *Aureobasidium pullulans*. *African journal of biotechnology*, 8(2).
- Tsaliki, E., Pegiadou, S. & Doxastakis, G. (2004). Evaluation of the emulsifying properties of cottonseed protein isolates. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 631–637.
- Ullah, N. et al. (2012). Proximate composition, minerals content, antibacterial and antifungal activity evaluation of pomegranate (*Punica granatum L.*) peels powder. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 11(3), 396–401.
- Wang, D. et al. (2014). Efficient production of pullulan using rice hull hydrolysate by adaptive laboratory evolution of *Aureobasidium pullulans*. *Bioresource technology*, 164, 12–19.
- Wendin, K. & Hall, G. (2001). Influences of fat, thickener and emulsifier contents on salad dressing: static and dynamic sensory and rheological analyses. *LWT-Food Science and Technology*, 34(4), 222–233.
- Wu, S. et al. (2016). Production of pullulan from raw potato starch hydrolysates by a new strain of *Aureobasidium pullulans*. *International journal of biological macromolecules*, 82, 740–743.
- Wu, S. et al. (2009). Sweet potato: A novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 645–649.
- Yadav, K. L., Rahi, D. K., & Soni, S. K. (2014). Bioemulsifying potential of exopolysaccharide produced by an indigenous species of *Aureobasidium pullulans* RYLF10. *PeerJ PrePrints*, 2, e726v1.
- Youssef, F., Biliaderis, C.G. & Roukas, T. (1998). Enhancement of pullulan production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture using olive oil and sucrose as carbon sources. *Applied biochemistry and biotechnology*, 74(1), 13–30.