نشریه علوم دانشگاه خوارزمی
جلد ۱۲، شماره ۴
تاریخ چاپ پاییز ۱۳۹۲

طراحی بیوراکتور برای افزایش تولید سورفکتین حاصل از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* NLIM ۰۱۱۰

حسین امانی؛ دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی

چکیده

بیوسورفکتانت‌ها در صنایعی مانند صنعت نفت، صنایع غذایی، دارویی و آرایشی کاربرد زیادی دارند. خواص بیوسورفکتانت‌ها از قبیل کاهش کشش سطحی، امولسیون کنندگی و تجزیه‌پذیری زیاد اجازه می‌دهد که آن‌ها جانشین خوبی برای سورفکتانت‌های شیمیایی شوند. در این تحقیق، از باکتری *باسیلوس سابتیلیس*[۱] NLIM ۰۱۱۰ برای تولید نوعی بیوسورفکتانت لیپوپپتیدی (سورفکتین) درون یک بیوراکتور جدید استفاده شد تا مشکلات ناشی از تشکیل شدید کف که در اثر تولید بیوسورفکتانت ایجاد می‌شود حل شود. برای غلبه بر تشکیل سریع کف، یک ظرف جمع‌آوری کف به بیوراکتور اضافه شد. هدف دیگر این پژوهش، خالص‌سازی و تعیین ساختار بیوسورفکتانت تولید شده و همچنین مشخص کردن شرایط بهینه دور همزن و هوادهی در بیوراکتور برای رسیدن به بیش‌ترین مقدار تولید سورفکتین است. در این تحقیق، تولید سورفکتین با آنالیزهای FTIR و H NMR اثبات شد. بررسی‌های سینتیکی همچنین نشان داد تولید سورفکتین وابسته به رشد باکتری است. نتایج دیگر نشان داد که تولید در شرایط بهینه (۳۰۰ rpm و ۱/۵ vvm) در بیوراکتور سبب به‌دست آمدن مقادیر[۲] $Y_{P/S}$ (mg/g)[۳], $Y_{P/X}$ (mg/g), V(mg/l.h)[۴] به‌ترتیب ۵۹۵ و ۲۵۰ و ۵۷ می‌شود. بنا بر این، این نتایج نشان‌گر پتانسیل خوب *باسیلوس سابتیلیس* NLIM ۰۱۱۰ برای تولید سورفکتین و همچنین مؤثر بودن تکنیک استفاده شده برای تولید بیوسورفکتانت است.

مقدمه

امروزه تقاضای فراوان برای سورفکتانت‌ها، بیش‌تر با سورفکتانت‌های شیمیایی برآورده می‌شود، اما این ترکیبات برای محیط زیست سمی و غیرقابل تجزیه‌اند. این ترکیبات ممکن است به‌صورت تجزیه نشده در محیط انباشته شوند یا فرایندهای تولید آن‌ها و محصولات جانبی‌شان از نظر زیست‌محیطی زیان‌آور باشد. در ضمن، سخت‌تر شدن قوانین حفاظت از محیط زیست و تلاش روزافزون گروه‌ها و سازمان‌های مختلف برای حفظ اکوسیستم‌ها، سبب شده که توجه به بیوسورفکتانت‌ها، به‌عنوان جای‌گزین‌های مناسب سورفکتانت‌های شیمیایی، روز

واژه‌های کلیدی: بیوسورفکتانت، باسیلوس سابتیلیس، سورفکتین، بیوراکتور
دریافت ۹۱/۱۲/۱۹ پذیرش ۹۲/۴/۱۰

*نویسنده مسئول hamani@nit.ac.ir

۱. *Bacillus subtilis* ۲. yield of biosurfactant on substrate ۳. yield of biosurfactant on biomass
۴. volumetric production rate

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-10-12]

به روز افزایش بیش‌تری پیدا کنند [۱]، [۲]، [۳]، [۴]. مولکول‌های فعال سطحی که به‌وسیلهٔ باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها تولید می‌شوند، بیوسورفکتانت نامیده می‌شوند. بیوسورفکتانت‌ها در صنعت نفت و پتروشیمی، صنایع غذایی، نوشابه‌ها، مواد آرایشی، داروسازی، متالوژی، شیمی خاک، زراعت، شوینده‌ها، ازدیاد برداشت، کود شیمیایی و صنایع دیگر کاربرد دارند. بنا بر این آشنایی با این ترکیبات زیستی اهمیت بسیاری دارد. خواص منحصر به‌فرد بیوسورفکتانت‌ها از قبیل کاهش کشش سطحی[۱] و بین‌سطحی[۲]، سمیت کم، تولید نسبتاً ارزان (به‌دلیل استفاده از مواد اولیه ارزان)، امولسیون کنندگی، قابلیت تولید کف، تجزیه‌پذیری زیاد و پذیرش محیطی اجازه می‌دهد که آن‌ها جانشین خوبی برای سورفکتانت‌های شیمیایی باشند [۳]، [۴]، [۵]، [۶]، [۷]، [۸]. بیوسورفکتانت‌ها می‌توانند بین دو فاز و بین فازهای مختلف که قطبیت متفاوتی دارند مثل، نفت / آب، هوا/ آب و یا آب/سطح جامد مجتمع شوند و در ضمن، به‌عنوان عوامل مرطوب‌کنندهٔ سطوح جامد نیز مطرح هستند [۸]، [۹]، [۱۰]. سورفکتین[۳] تولید شده با نژادهای مختلف *باسیلوس سابتیلیس* از مؤثرترین بیوسورفکتانت‌ها با قابلیت کشش سطحی تا mN/m ۲۵ است. ساختار سورفکتین لیپوپپتید سیکلیك متشکل از ۷ اسید آمینه متصل به گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل یك اسید چرب ۱۴ کربنی است [۱۱]-[۲۶].

طی تولید میکروبی بیوسورفکتانت‌ها به‌علت هوادهی و هم‌زدگی کف زیادی تولید می‌شود زیرا این مواد کشش سطحی را کاهش می‌دهند. به‌طورکلی به‌هم زدگی شدید و هوادهی لازم برای تأمین مقادیر کافی اکسیژن، مقدار کف را بیش‌تر می‌کند. تشکیل کف سبب پیدایش مشکلاتی مانند جداسازی ناخواستهٔ محصول، مواد غذایی و سلول‌ها همراه با کف می‌شود. تشکیل کف غالباً امری نامناسب است زیرا می‌تواند در طی تخمیر حجم راکتور را پرکند و باعث کارایی نداشتن مناسب آن شود. اضافه کردن ضد کف‌ها انتقال جرم و بازدهٔ تولید را کاهش می‌دهد. پس تشکیل کف مشکل شایعی در بسیاری از تخمیرهای میکروبی به‌ویژه در جایی است که بیوسورفکتانت‌ها تولید می‌شوند، بنا بر این باید به‌طریقی تشکیل کف کنترل شود [۵]، [۱۸]، [۲۶]. در این تحقیق از تولید کف به‌عنوان نقطهٔ قوت در تولید سورفکتین استفاده کرده‌ایم، زیرا غلظت بیوسورفکتانت در کف چندین برابر مقدار آن در محیط کشت است، بنا بر این بیوراکتور را به‌گونه‌ای طراحی کرده‌ایم که برای جمع‌آوری کف مناسب باشد.

با توجه به این که فناوری تولید بیوسورفکتانت‌ها و کاربرد آن‌ها در صنایع نیازی ضروری است و کشور ما نیز یکی از وارد کنندگان این گونه مواد اولیه است، در این پژوهش در نظر است تا امکان تولید سورفکتین به‌وسیلهٔ گونه *باسیلوس سابتیلیس* NLIM ۰۱۱۰ جدا شده از مناطق بومی ایران بررسی گردد.

۱. Surface Tention ۲. Interficial Surface Tention ۳. Surfactin

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-10-12]

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم: باکتری *باسیلوس سابتیلیس*[۱] NLIM ۰۱۱۰ از بانک میکروبی آزمایشگاه ملی میکروبیولوژی صنعتی[۲] دانشگاه الزهرا تهیه شد.

پیش کشت: از نوترینت براث[۳] که به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C و دور ۱۵۰ rpm قرار داده به‌عنوان پیش کشت برای تولید سورفکتین استفاده شد.

ترکیب محیط کشت: رشد سویه به‌صورت هوازی در محیط E[۴] انجام شد [۲۵]. برای تهیهٔ محیط کشت ابتدا محلول A شامل ۱ گرم بر لیتر $NaNO_3$، ۰/۵ گرم بر لیتر پیست اکستراکت[۵]، ۵۰ گرم بر لیتر NaCl ، ۱۰ گرم بر لیتر سوروس[۶]، ۱۳/۹ گرم بر لیتر K_2HPO_4، ۲/۷ گرم بر لیتر KH_2PO_4، محلول B شامل ۲۵ گرم بر لیتر $MgSO_4$ و محلول C شامل ۱۰۰ گرم بر لیتر $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ به‌صورت جداگانه به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C اتو کلاو می‌شوند و سپس محلول D شامل ۰/۱ گرم بر لیتر $ZnSO_4.7H_2O$، ۰/۱ گرم بر لیتر $FeSO_4.7H2O$، ۰/۰۱ گرم بر لیتر $CuSO_4.5H2O$، ۰/۰۱ گرم بر لیتر $AlK(SO_4)_2$، ۰/۱ گرم بر لیتر $CaCl_2.2H_2O$، ۱ گرم بر لیتر NaCl، ۳ گرم بر لیتر $MnSO_4.H_2O$، ۰/۵ گرم بر لیتر EDTA، ۰/۰۰۳ گرم بر لیتر $NiCl_2.6H_2O$، ۰/۰۰۵ گرم بر لیتر Na_2SeO_4، ۰/۰۱ گرم بر لیتر بوریک اسید[۷]، ۰/۰۱ گرم بر لیتر $Na_2MoO_4.2H2O$، به‌علت حساسیت به حرارت با فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی استریل می‌شود. در شرایط استریل ۱۰میلی‌لیتر از محلول‌های B و C و D به یک لیتر از محیط A افزوده می‌شود.

اتو کلاو: برای استریل کردن محیط‌های کشت و بیوراکتور از اتو کلاو برقی استفاده شد. زمان استریل ۲۰ دقیقه در دمای ثابت ۱۲۱°C است.

دستگاه شیکر انکوباتور: برای تهیهٔ پیش کشت، فلاسک‌های حاوی نوترینت براث تلقیح شده در شرایط حرارتی و هوادهی مناسب، درون شیکر انکوباتور مدل کهنر[۸] انکوبه گردید.

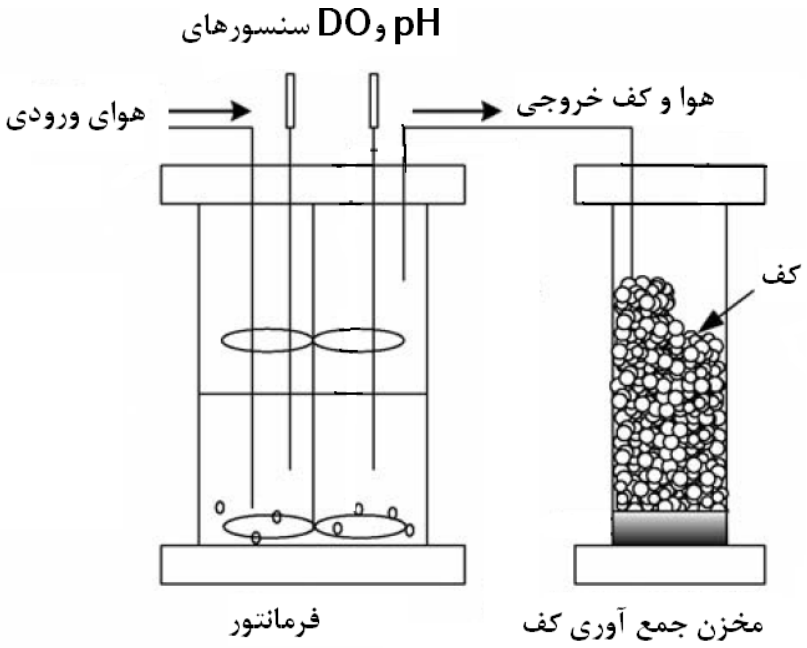
بیوراکتور: تولید سورفکتین در بیوراکتور اینفورز[۹] انجام پذیرفت. به‌منظور جداسازی کف از کشت‌های ناپیوسته، سیستمی به‌کار رفت که در آن ستون تفکیک کف به بالای بیوراکتور اضافه شد. تخمیر کننده ۲/۵ لیتری با ۲ همزن راشتون هرکدام به قطر ۴۵ میلی‌متر، هم زده شد. همزن‌ها ۵۰ میلی‌متر از یکدیگر فاصله داشتند و پایین‌ترین همزن در فاصلهٔ ۱ سانتی‌متری از پایهٔ تخمیر کننده قرار گرفته بود. سه تیغه با فاصله‌بندی یکسان در تخمیر کننده و عرض ۱ cm متصل به دیواره مخزن بودند. ستون تفکیک کف به فضای بالای تخمیر کننده متصل شد. فرمانتور دارای سنسورهای کنترل دما، سرعت همزدن، سرعت هوادهی، DO و pH[۱۰] است.

---

۱. *Bacillus subtilis* ۲. National Laboratory of Industrial Microbiology ۳. Nutrient Broth
۴. E-medium ۵. yeast extract ۶. sucrose ۷. boric acid
۸. Kuhner shaker X,climo-shaker ISF1_X ۹. Infors HT, Minifors, Germany
۱۰. Dissolved Oxygen

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-10-12]

شلنگی که به مخزن جمع‌آوری کف استریل متصل است، جمع‌آوری کف را میسر می‌سازد (شکل۱). برای تولید سورفکتین، مقدار ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت در شرایط استریل به درون فرمانتور اضافه گردید سپس۵۰ میلی‌لیتر از پیش کشت (۵ درصد حجمی) به بیوراکتور در شرایط استریل اضافه گردید و نمونه‌گیری‌ها در زمان‌های مختلف انجام شد. برای بررسی تکرارپذیری، تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.



شکل ۱. شماتیکی از بیوراکتور طراحی شده

اندازه‌گیری قند: اندازه‌گیری قند با استفاده از کیت ارزیابی قند[۱] طبق دستورالعمل آن انجام گرفت. این کیت با استفاده از روش نورسنجی (اسپکتروسکوپی) غلظت قند را اندازه‌گیری می‌کند.

اندازه‌گیری بیومس: به‌منظور جداسازی باکتری‌ها، محیط کشت در دستگاه سانتریفوژ هرئوس[۲] درون لوله‌های مخصوص از قبل وزن شده در ۱۲۰۸۶×g و ۴°C سانتریفوژ شد. فاز بالایی (سوپرناتانت) برای انجام همهٔ آزمایش‌ها به‌منظور بررسی میزان تولید بیوسورفکتانت استفاده شد. رسوب باقی‌مانده یا بیومس پس از سانتریفوژ، ۲ بار با آب نمک ۰/۹% شستشو داده شد. پس از آن بیومس به‌مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۱۰۰°C خشك و سپس توزین شد [۲۵].

استخراج سورفکتین: محیط کشت به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۰۸۶×g در ۴°C سانتریفوژ و مایع رویی پس از فیلتر شدن (۰/۲۲μ m واتمن)، pH آن با اسید کلریدریک ۳ مولار به ۲ رسانده شد تا عمل رسوب‌گذاری انجام شود. برای خالص‌سازی، سورفکتین خام ۳ بار با حجم یکسانی از دی‌کلرومتان استخراج گردید. بعد از تبخیر فاز آلی، سورفکتین تصفیه شده به‌دست آمد [۵]، [۲۵]. سنجش کشش سطحی نمونه‌ها با دستگاه تنسیومتر[۳] به‌روش حلقه

۱. Cat. No. 10716251035, D-Glucose, UV- method ۲. Multifuge1S-R,Heraeus ۳. kruss k10T

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-10-12]

اندازه‌گیری شد. در این روش حلقهٔ دستگاه که از جنس آلیاژ پلاتین است، در مایع غوطه‌ور می‌گردد و به آرامی از درون مایع به خارج کشیده می‌شود. نیروی مورد نیاز برای خارج کردن حلقه از سطح مایع، به‌عنوان کشش سطحی مایع در نظر گرفته می‌شود. برای دقت بیش‌تر، کشش سطحی هر نمونه سه مرتبه اندازه‌گیری می‌شود.

طیف‌های ^{1}H NMR ,[2]FTIR

طیف‌سنجی مادون قرمز: طیف مادون‌قرمز را می‌توان مانند اثر انگشت در انسان برای شناسایی مولکول‌ها به‌کار گرفت. با مقایسهٔ طیف مادون قرمز دو ماده می‌توان پی برد که آیا واقعاً آن‌ها مشابه هستند یا نه. اگر تمام جذب‌ها در طیف دو مولکول بر یک‌دیگر منطبق شوند آن وقت به احتمال قریب به یقین دو ماده یک‌سانند. در این تحقیق از دستگاه FTIR[1] یا دستگاه تبدیل فوریه مادون قرمز استفاده شد. برای این منظور، سورفکتین جامد ابتدا در برمید پتاسیم جامد به‌صورت یک‌نواخت مخلوط و فشرده شد و سپس درون دستگاه قرار گرفت.

رزونانس مغناطیس هسته‌ای (NMR): این رزونانس در ناحیهٔ فرکانس رادیویی طیف قرار دارد. H NMR ما را از تعداد هیدروژن مطلع می‌سازد. در حالی‌که طیف‌سنجی مادون‌قرمز اطلاعاتی در بارهٔ نوع گروه‌های عاملی موجود در مولکول در اختیار ما قرار می‌دهد . مجموعه اطلاعات داده شده از مادون قرمز و رزونانس مغناطیسی هسته‌ای اغلب برای تشخیص ساختمان یک مولکول مجهول کافی است. H NMR در ۲۹۸ K در دستگاه NMR[1] انجام شد.

نتایج

تولید سورفکتین با استفاده از بیوراکتور: تأثیر میزان هوادهی وهمزدن برای رسیدن به حداکثر میزان تولید بیوسورفکتانت و تولید کلی آن طبق جدول ۱ طراحی شد. تأثیر میزان هوادهی و همزدگی برتولید بیوسورفکتانت و تولید کلی آن در آزمایش‌ها انجام گرفته بررسی شد. همچنین از این جدول مشخص است که مقدار تولید کلی و حداکثر تولید با افزایش مقدار هوادهی از ۰/۵ به ۱/۵ vvm (یعنی ۱-۳ $L\ min^{-1}$) و نیز با افزایش مقدار همزدگی از ۲۰۰ به ۳۰۰ rpm شروع به زیاد شدن کردند. اما افزایش بیش‌تر در میزان همزدگی تا ۳۵۰ rpm سبب افزایش بیش‌تر میزان تولید بیوسورفکتانت نگردید. در مقابل، هر دو با افزایش بیش از حد میزان همزدگی، کاهش یافتند (یعنی ۳۵۰rpm). جدول ۱ نشان می‌دهد که عملیات در میزان همزدگی ۳۰۰rpm و میزان هوادهی ۱/۵vvm سبب به‌دست آمدن بهترین مقدار تولید کلی به‌اندازهٔ ۵۷ mg/(l. h) گردید. شرح مسیر زمانی برای نمونهٔ تخمیر ناپیوسته بیوسورفکتانت با غلظت اولیهٔ ساکاروز ۱۰ g/l و میزان هوادهی و همزدگی به‌ترتیب ۳۰۰rpm، ۱/۵ vvm در شکل ۲ نشان داده شده است. چنان‌که در شکل ۲ دیده می‌شود، تولید بیومس و بیوسورفکتانت پس از مدت تقریباً ۴۴ h از کشت، به حداکثر مقادیر خود یعنی ۴۲۰۰ mg/l و ۲۵۰۰ mg/l رسیدند. در این بیوراکتور، کف زیادی بین ساعت ۱ تا ۶ تولید شد و در انتهای کار ۱۰۰ ml کف جمع شد.

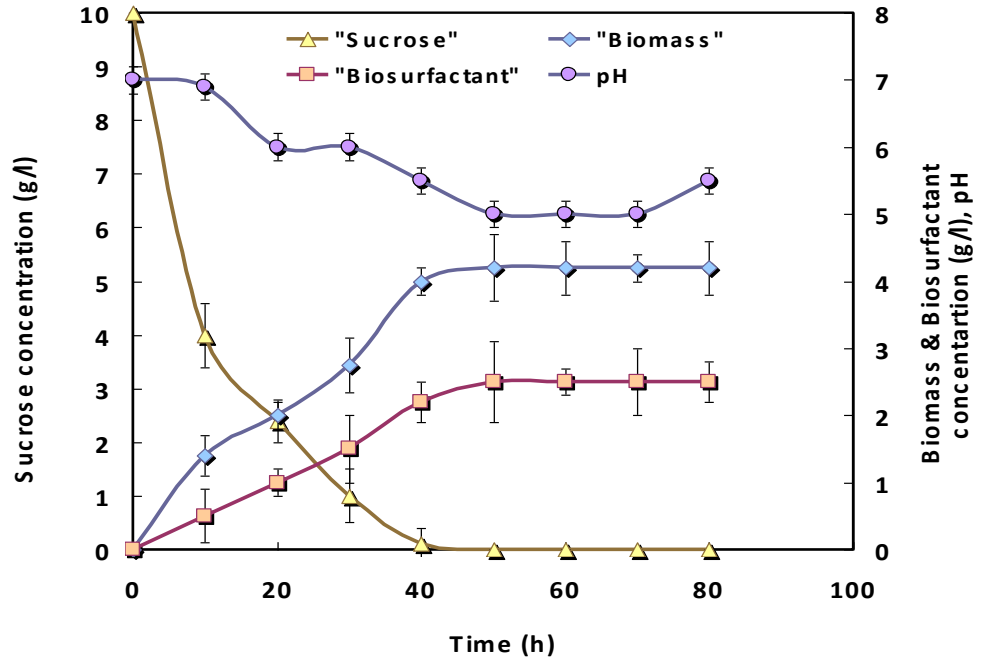
۱. Nuclear Magnetic *Resonance* ۲. *Fourier Transform Infrared*
۳. Perkin-Elmer grating 1430 IR (Norwalk, CT) ۴. Bruker, 300 MHz AX 300 NMR spectrometer

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-10-12]

غلظت بیوسورفکتانت در کف ۳ برابر غلظت در محیط کشت درون راکتور است. همچنین در جدول ۲ مقادیر $Y_{P/X}$ (mg/g), $Y_{P/S}$ (mg/g) و V(mg/l h) تحت شرایط عملیاتی بهینه (rpm =۳۰۰، میزان هوادهی۱/۵=vvm) را که به‌ترتیب ۵۹۵ و ۲۵۰ و۵۷ به‌دست آمده است نشان می‌دهد.

جدول ۱. جدول طراحی تولید سورفکتین در انواع میزان هوادهی و همزدن محیط کشت در بیوراکتور طراحی شده

آزمایش	میزان همزدن (rpm)	میزان هوادهی (vvm)	میزان کلی تولید ($mg\ l^{-1}\ h^{-1}$)	بیشترین مقدار غلظت سورفکتین($mg\ l^{-1}$)	بازده سورفکتین $mg\ (g\ sucrose)^{-1}$
۱	۲۰۰	۲	۲۵	۲۳۱۰	۱۷۰
۲	۲۵۰	۲	۳۰	۲۴۱۵	۲۰۰
۳	۳۰۰	۲	۳۸	۲۲۰۰	۲۳۰
۴	۳۵۰	۲	۲۹	۱۸۰۰	۱۱۸
۵	۲۰۰	۱/۵	۲۸	۲۲۰۰	۱۶۰
۶	۲۵۰	۱/۵	۳۳	۲۳۴۰	۲۱۰
۷	۳۰۰	۱/۵	۵۷	۲۵۰۰	۲۵۰
۸	۳۵۰	۱/۵	۳۳	۱۸۰۰	۱۰۰
۹	۲۰۰	۱	۲۵	۱۹۵۰	۱۲۰
۱۰	۲۵۰	۱	۲۹	۲۱۰۰	۱۳۵
۱۱	۳۰۰	۱	۳۴	۲۲۰۰	۲۰۰
۱۲	۳۵۰	۱	۳۱	۱۸۰۰	۱۱۰
۱۳	۲۰۰	۰/۵	۱۷	۱۸۳۰	۹۷
۱۴	۲۵۰	۰/۵	۲۱	۱۹۲۰	۱۱۶
۱۵	۳۰۰	۰/۵	۲۸	۲۰۰۰	۱۳۳
۱۶	۳۵۰	۰/۵	۲۵	۱۴۰۰	۶۸



شکل ۲. نمودار رشد سلولی، تولید بیوسورفکتانت، مصرف ساکاروز، pH تحت شرایط بهینه (۳۷℃ و rpm ۳۰۰ و ۱ /۵vvm) در بیوراکتور طراحی شده

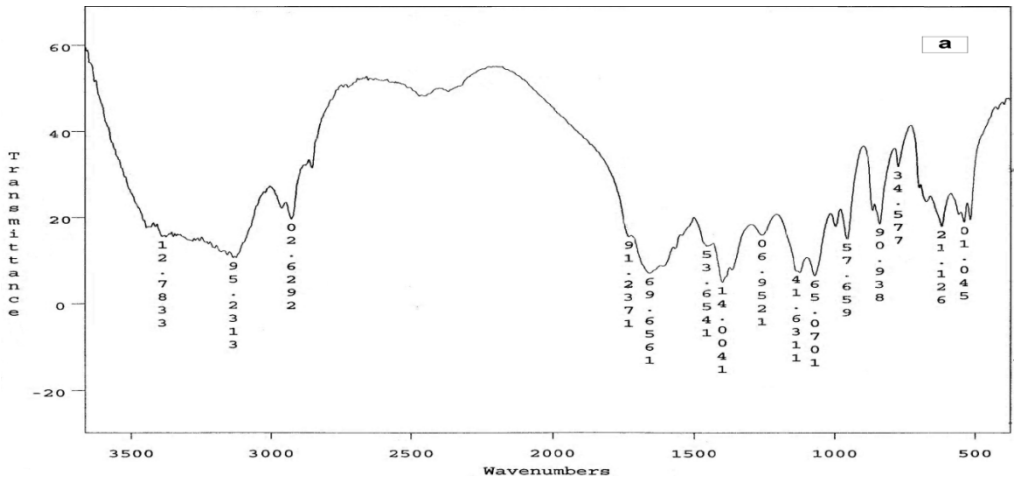
نتیجهٔ FTIR سورفکتین تولید شده: شکل ۳ طیف FTIR سورفکتین تولید شده را نشان می‌دهد. این مشاهده‌ها کاملاً با مشخصات سورفکتین مطابقت دارد.

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-10-12]

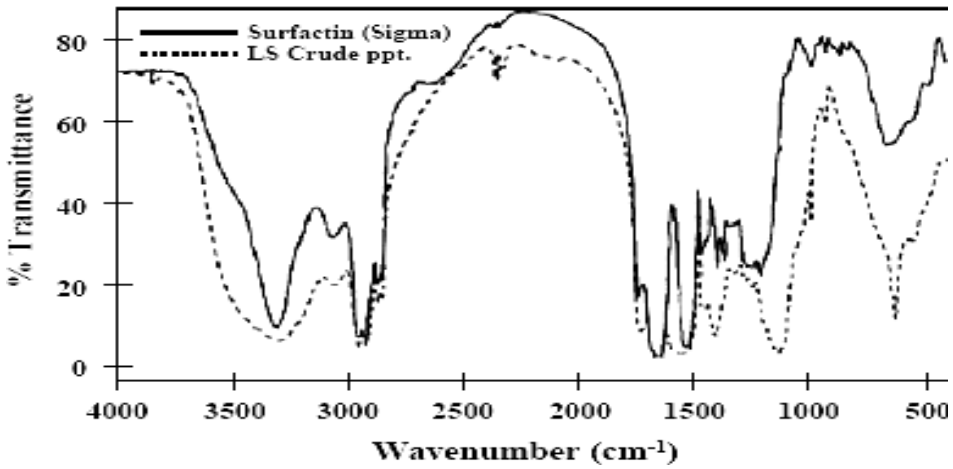
جدول ۲. مقایسهٔ بازده تولید سورفکتین تولید شده با نتایج محققان دیگر

منابع	$Y_{P/S}$ mg g^{-1}	$Y_{P/X}$ mg g^{-1}	$Y_{X/S}$ mg g^{-1}	V mg l^{-1} h^{-1}	بیشترین مقدار تولید سورفکتین (mg l^{-1})	بیشترین مقدار تولید زیست توده (mg l^{-1})	میکروارگانیسم
این مطالعه	۲۵۰	۵۹۵	۴۲۰	۵۷	۲۵۰۰	۴۲۰۰	*باسیلوس سابتیلیس*
[۲۶]	۶۸	۲۶۲	۲۶۰	۹/۷	۱۳۶	۵۲۰	*باسیلوس سابتیلیس*
[۲۷]	۱۶۱			۱۰۶	۶۴۵۰		*باسیلوس سابتیلیس*

(V) volumetric production rate
(Yp/x) yield of biosurfactant on biomass
(Yp/s) yield of biosurfactant on substrate
(Yx/s) yield of biomass on substrate



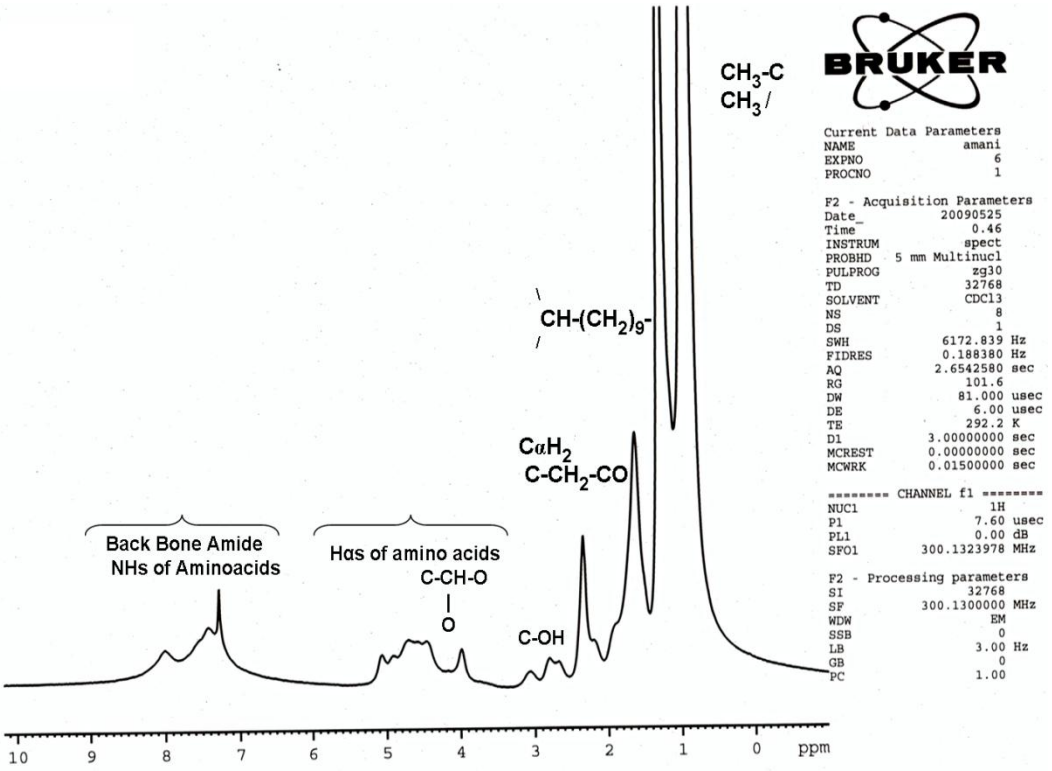
شکل ۳. الف) طیف FTIR سورفکتین تولید شده از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* ۰۱۱۰ NLIM تحت شرایط بهینه بیوراکتور (۳۷ ℃ و ۳۰۰ rpm و ۱/۵ vvm)



شکل ۳. ب) طیف FTIR سورفکتین تجاری موجود در بازار (از شرکت سیگما) و سورفکتین تولید شده به‌وسیلهٔ Fang و همکارانش [۲۰]

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-10-12]

نتیجه H NMR سورفکتین تولید شده: برای اثبات بیش‌تر تولید سورفکتین همچنین از آنالیز H NMR استفاده شد. نتایج در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج به‌دست آمده از این آنالیز نشان می‌دهد که مولکول مورد نظر یک لیپوپپتید یا به‌عبارتی سورفکتین است.



شکل ۴. طیف H NMR سورفکتین تولید شده از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* NLIM ۰۱۱۰ تحت شرایط بهینه بیوراکتور (۳۷ ℃ و ۳۰۰ rpm و ۱/۵ vvm)

بحث

شکل ۲ نشان می‌دهد که بیوسورفکتانت تولید شده لزوماً محصولی همراه با رشد است. با توجه به آزمایش‌های انجام شده در این پژوهش، ارتباط مستقیمی بین تولید سورفکتین، مصرف ساکاروز و رشد باکتری مشاهده شد. به‌عبارت دیگر تولید بیوسورفکتانت وابسته به رشد باکتری است. این نتایج با نتایج تحقیقات دیگر پژوهشگران سازگاری دارد. برای مثال لین[۱] [۱۲] با استفاده از باکتری لینکوفورمیس[۲] و کوپر[۳] [۲۲] با استفاده از باکتری سابتیلیس[۴] *BM12* و چن و همکارانش[۵] [۲۶] با استفاده از باکتری سابتیلیس BBK006 و والتر[۶] [۱۳] با استفاده از باکتری *سابتیلیس* ATCC۲۱۳۳۲ نشان دادند که ارتباطی مستقیم بین تولید سورفکتین و مصرف منبع کربن و رشد باکتری وجود دارد. بنا بر این نتیجه به‌دست آمده از این تحقیق در سطح قابل قبولی است.

۱. Lin ۲. *B.*linchoformis ۳. Cooper ۴. *B.subtilis* ۵. Chen *et al.* ۶. Valter

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-10-12]

افت pH در حین تولید بیوسورفکتانت می‌تواند ناشی از تشکیل مواد متابولیکی اسیدی در طی تخمیر بیوسورفکتانت باشد. از جدول ۱ مشخص است که مقدار تولید کلی و حداکثر تولید با افزایش مقدار هوادهی از ۰/۵ به ۱/۵ vvm (یعنی ۱-۳ $L\ min^{-1}$) و نیز با افزایش مقدار همزدگی از ۲۰۰ به ۳۰۰ rpm شروع به زیاد شدن کردند. ظاهرًا تغذیهٔ کافی اکسیژن و ضریب انتقال جرمی نقش‌های مهمی را در سینتیک تولید بیوسورفکتانت ایفا می‌کنند. اما افزایش بیش‌تر در میزان همزدگی تا ۳۵۰ rpm سبب افزایش بیش‌تر میزان تولید بیوسورفکتانت نگردید. در مقابل، هر دو با افزایش بیش از حد میزان همزدگی، کاهش یافتند (یعنی ۳۵۰ rpm). این پدیده می‌تواند ناشی از چند عامل باشد. یکی از عوامل ممکن است تشکیل دائمی و شدید کف در اثر میزان زیاد همزدگی باشد که باعث کاهش بهره‌وری تولید بیوسورفکتانت می‌شود. به‌عبارت دیگر با افزایش دور همزن تا ۳۵۰rpm و هوادهی تا ۲ vvm کف بیش از حدی تولید می‌شود که باعث عدم کارایی مؤثر فرمانتور در تولید بیوسورفکتانت می‌گردد، زیرا طی تخمیر مشاهده شد که کل حجم بیوراکتور پر از کف می‌شود. همچنین به علت تولید بیش از حد کف، محیط کشت مایع درون بیوراکتور از حالت تک فاز مایع به حالت دو فازی (مخلوط کف و مایع) تبدیل شد که به‌نظر می‌رسد در صورت دو فاز شدن، باکتری‌های تولید کنندهٔ بیوسورفکتانت به‌علت رفتن به درون حباب‌ها مدت زمان کم‌تری با محیط کشت مایع تماس پیدا می‌کند که کاهش ارتباط آن‌ها با محیط کشت (منابع غذایی) می‌تواند عامل دیگری برای کاهش تولید باشد. کم شدن محیط کشت نیز می‌تواند عامل دیگری برای کم شدن تولید باشد زیرا طی آزمایش همواره مقداری از محیط کشت همراه کف از لولهٔ خروجی بیوراکتور خارج می‌شود. حجم کم‌تر محیط کشت باقی‌مانده در پایان تخمیر این نکته را تأیید می‌شود. بنا بر این برای تولید بیوسورفکتانت‌ها باید در شرایط بهینه‌ای از دور و هوادهی عمل کرد. برای مقایسه بین کار حاضر و پژوهش‌های دیگر محققان بعضی از پارامترها مانند Yp/x (mg /g) ، $Y_{P/S}$ (mg /g) و V (mg/ l h) در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. باید توجه داشت سورفکتین ۶/۴۵ g/l به‌وسیلهٔ یه و همکارانش[۱] [۲۷] زمانی تولید شده است که جریان برگشتی وجود داشته است. چنان‌که در جدول ۲ مشاهده می‌شود باکتری استفاده شده در این تحقیق در مقایسه با گزارش‌های قبلی بازده بیش‌تری دارد [۲۶]، [۲۷]. برای تأیید و اثبات تولید بیوسورفکتانت، طیف FTIR مادهٔ تولید شده از این باکتری و سورفکتین تجاری موجود در بازار مقایسه شد. نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است. در این شکل وجود عضو پپتیدی در ۳۱۳۲-۳۳۸۷-۳۱۳۲ cm^{-1} که نشان‌دهندهٔ پیوند N-H است، در ۱۶۵۰cm^{-1} پیوند CO-N قابل مشاهده است. همچنین حضور یک زنجیرهٔ آلیفاتیک با پیوندهای C-H در, ۱۴۵۶cm^{-1}- ۱۰۷۰ و ۲۹۲۹ cm^{-1} قابل مشاهده است. در ۱۷۳۲ cm^{-1} جذب لاکتون کربنیل نیز دیده می‌شود [۲۸]. این مشاهدات کاملا با مشخصات لیپوپپتید مطابقت دارد. برای اثبات بیش‌تر تولید سورفکتین همچنین از آنالیز H NMR استفاده شد. نتایج به‌دست آمده از این آنالیز (شکل ۴) نشان می‌دهد که مولکول مورد نظر یک لیپوپپتید و به احتمال قوی سورفکتین است. تمامی هیدروژن‌های آمیدی باندهای پپتیدی (NH) در ناحیهٔ

۱. Yeh *et al.*

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-10-12]

۸-۷/۲ ppm و هیدروژن‌های آلفای آمینواسید در ppm ۴/۳-۳/۹۸ ظاهر می‌شوند. آنالیز H NMR همچنین نشان‌دهندهٔ گروه $(CH_3)_2$-CH در ppm δ=۰/۸۵۴ است که حاکی از شاخه‌های انتهایی در یک اسید چرب است. بقیهٔ طیف به‌وضوح حضور بتا هیدروکسی اسید چرب را تأیید می‌کند [۲۸].

نتیجه‌گیری نهایی

در این تحقیق، از باکتری *باسیلوس سابتیلیس* NLIM۰۱۱۰ که یک باکتری بومی جدا شده از مناطق کشاورزی ایران است، برای تولید سورفکتین درون یک بیوراکتور با طراحی جدید استفاده شد تا مشکلات ناشی از تشکیل شدید کف که در اثر تولید بیوسورفکتانت ایجاد می‌شود حل گردد. در این پژوهش اثبات شد که بازیافت کف روش مؤثری برای بازیافت بیوسورفکتانت‌ها از محیط کشت است. برای غلبه بر تشکیل سریع کف، یک ظرف جمع‌آوری کف به بیوراکتور اضافه شد، یا به‌عبارت دیگر تشکیل کف زمانی مؤثر واقع شد که کف تولید شده به‌طور پیوسته جمع‌آوری شد. غلظت بیوسورفکتانت در کف جمع‌آوری شده ۳ برابر غلظت آن در محیط کشت درون راکتور است.

در این تحقیق، همچنین تولید لیپوپپتید با آنالیزهای FTIR و HNMR اثبات شد. بررسی‌های سینتیکی همچنین نشان داد تولید سورفکتین وابسته به رشد باکتری بود. نتایج دیگر نشان داد که تولید در شرایط بهینه (۳۰۰rpm و ۱/۵ vvm) در بیوراکتور سبب به‌دست آمدن مقادیر $Y_{P/X}$ (mg/g), $Y_{P/S}$ (mg/g) و V(mg/l.h) به‌ترتیب ۵۹۵ و۲۵۰ و۵۷ می‌شود. بنا بر این، این نتایج نشان‌گر پتانسیل خوب *باسیلوس سابتیلیس* NLIM ۰۱۱۰ برای تولید سورفکتین و همچنین مؤثر بودن تکنیک استفاده شده برای تولید بیوسورفکتانت است.

سپاس‌گزاری

بدین‌وسیله از شرکت مهندسی و توسعهٔ نفت برای تأمین هزینه‌ها و حمایت‌های مادی از این پروژه، تشکر و قدردانی می‌کنیم. همچنین از دکتر محمدرضا صعودی، از دانشگاه الزهرا، به‌دلیل جداسازی باکتری و در اختیار قرار دادن آن تشکر می‌کنیم.

منابع

۱. رضا رمضانی، مهناز مظاهری اسدی، مهرداد آذین، *تولید رامنولیپید توسط باکتری سودوموناس ائروجینوزا از ملاس چغندر قند تیمار شده*، نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم، جلد ۹، شماره ۳ (۱۳۹۰) ۵۲۴-۵۱۱.

۲. فاطمه ربیعی، مهناز مظاهری اسدی، مهرداد آذین، مهرداد، *تولید رامنولیپید با سودوموناس آئروجینوزا در محیط کشت حاوی آب پنیر تیمار شده*، نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم، جلد ۸، شماره ۴ (۱۳۸۷) ۳۱۸-۳۰۳.

3. I. M. Banat, R. S. Makkar, S. S.Cameorta, "Potential applications of microbial surfactants, Appl. Microbiol", Biotechnol, 53 (2005) 495-508.

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-10-12]

4. H. R. Rashedi, M. Mazaheri Assadi, E. Jamshidi, B. Bonakdarpour, "Optimization of the Production of Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* HR Isolated from an Iranian Southern Oil well", I. Journal of Chem. Chem. Eng., 25 (1) (2006) 25-30.

5. M. S. Yeh, Y. H. Wei, J. S. Chang, "Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers", Biotechnol. Prog, 12 (2005) 1329-1334.

6. A. Y. Zekri, R. A. El-Mehaideb, "Microbial and water flooding of fractured carbonate rocks: an experimental approach, SPE No", 75217 presented at the SPE/DOE improved oil recovery symposium held in Tulsa, Oklahoma (2002).

7. A. Abalos, A. Pinaso, M. R. Infante, M. Casals, F. Garcia , A. Manresa, "Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa AT10* from soybean oil refinery wastes", Langmuir, 17 (2001) 1367-1371.

8. R. S. Makkar, S. C. Cameotra, "Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon source", J. Surfactants Deterg, 2 (1999) 237-241.

9. C. Amezcua-Vega, R. Ferrera-Cerrato, F. Esparza-Garcia, E. Ros-Leal, R. Rodriguez-Vazquez, "Effect of combined nutrients on biosurfactant produced by *pseudomonas putida*", J. Environ. Sci. Health, 39 (2004) 2983-91.

10. M. Nitschke, S. G. Coast, "Biosurfactants in food industry", Trends Food Sci. Technol, 18 (2007) 252-259.

11. A. Fiechter, "Integrated system for biosurfactant synthesis", Biotechnology, 2 (1992) 1739-1745.

12. S. C. Lin, "Recovery and Purification of the Lipopeptide Biosurfactant of *Bacillus subtilis* by ultrafiltration", Biotechnol. Techniques, 11 (1997) 413-416.

13. P. J. Valter, Lipopeptides, "An attractive class of microbial surfactants", Prog. Colloid, Polym. Sci., 72 (1986) 12-18.

14 K. Kim, S. Y. Jung, D. K. Lee, J. K. Jung, J. K. Park, D. K. Kim, C. H. Lee, "Suppression of inflammatory responses by Surfactin, a selective inhibitor of platelet systolic phospholipase A2", Biochemical Pharmacology, 55 (1998) 975-85.

15. D. G. Cooper, C. R. Macdonald, S. F. B. Duff, N. Kosaric, "Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions", Appl. Environ. Microbiol, 42 (1981) 408-412.

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-10-12]

16. P. Carrera, P. Cosmina, G. Grandi, "Method of producing surfactin with the use of Mutant of *Bacillus subtilis*", United States patent, Application No. 5227294 (1993).

17. Y. H. Wei, I. M. Chu, "Mn^{+2} improves surfactin production *by Bacillus subtilis*", Biotechnol, Lett. 24 (2002) 479-82.

18. A. K. Brown, A. Kaul, J. Varley, "Continuous foaming for protein recovery: Part I. Recovery of betacasein", Biotech, Bioeng, 62 (1999) 278-90.

19. D. Vollenbrioch, M. Ozel, J. Vater, R. M. Kamp, G. Pauli, "Mechanism of inactivation of enveloped viruses by Surfactin from *Bacillus subtilis*", Biological, 25 (1997) 289-97.

20. X. Fang, Q. Wang , B. Bai, X. C. Liu, Y. Tang, P. J. Shulder, W. A. Goddard, "Engineering rhamnolipid biosurfactants as agents for microbial enhanced oil recovery", SPE No. 106048 (2007).

21. R. Sen, T. Swaminathan, "Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin", Appl. Microbiol, Biotechnol, 47 (1997) 358-63.

22. D. G. Cooper, "Surface active compound from microorganisms", Adv. Applied Microb., 26 (1980) 229-253.

23. I. M. Banat, N. Sarnarah, "Biosurfactant production and use in oil tank", Clean- up, world J. Microbial, Biotechnol, 7 (1991) 80-84.

24. S. Nasr, M. R. Soudi, M. R. Mehrnia, M. H. Sarrafzadeh**,** "Characterization of novel biosurfactant producing strains of *Bacillus spp*. isolated from petroleum contaminated soil", Iranian Journal of Microbiology, 1 (2009) 54-61.

25. N. H. Youssef, K. E. Duncan, D. P. Nagle, K. N. Savage, R. M. Knapp, M. J. McLnerney, "Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms", J.of Microbiol, Meth, 56 (2004) 339-347.

26. C. Y. Chen, S. C. Baker, R. C. Darton, "Batch production of biosurfactant with foam fractionation", Chem. Technol, Biotechnol, 18 (2006) 1923-1931.

27. M. S. Yeh, Y. H. Wei, J. S. Chang, "Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis"*, Process Biochemistry, 41 (2006) 1799-1805.

28. R. M. Silverstein, F. X. Webster, D. Kiemle, "Spectrometric identification of organic compounds" (2005) Edition: 7.

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-10-12]