تاریخ چاپ: تابستان ۱۳۹۰

تولید رامنولیپید توسط باکتری سودوموناس ائروجینوزا[1] از ملاس چغندر قند تیمار شده

رضا رمضانی: گروه زیست شناسی، دانشگاه ازاد اسلامی واحد ملارد
مهناز مظاهری اسدی، مهرداد آذین: پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران
mxmazaheriassadi@yahoo.com

چکیده

بیوسورفاکتانت‌ها محصولات طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها هستند که در حد بالایی دارای ویژگی فعالیت سطحی‌اند. گلیکولیپیدها، فسفولیپیدها و اسیدهای چرب، لیپوپپتیدها و لیپوپروتئین‌ها، بیوسورفاکتانت‌های پلیمریك و بیوسورفاکتانت‌های ویژه از انواع اصلی بیوسورفاکتانت‌ها هستند. رامنولیپید نوعی بیوسورفاکتانت از گروه گلیکولیپیدهاست که توسط باکتری سودوموناس ائروجینوزا[1] تولید می‌شود. در این تحقیق از باکتری سودوموناس ائروجینوزا[2] استفاده شد که از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. این باکتری در محیط کشت نمک‌های معدنی 3M واجد ملاس کشت داده شد. قند موجود در ملاس، ساکاروز است که باکتری سودوموناس ائروجینوزا نمی‌تواند از آن به‌عنوان منبع کربنی استفاده کند ولی سویه مورد استفاده در این تحقیق به دلیل آن‌که دست ورزی‌های ژنتیکی بر روی آن انجام شده است، قادر به استفاده از قند ساکاروز است به شرط آن‌که آلودگی‌های شیمیایی موجود در ملاس حذف شود. لذا از روش تیمار شیمیایی ملاس، خالص‌سازی شده و در دسترس میکروارگانیسم قرار گرفت. رامنولیپید تولید شده با آزمایش‌های سنجش قند به روش فنل- سولفوریک اسید و توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام (با استفاده از سنجش میزان گلوکز) ارزیابی شد. آزمایش‌ها با روش ANOVA تجزیه و تحلیل آماری شدند. نتایج بیان‌گر آن بود که بدون ملاس، بهترین شرایط برای تولید رامنولیپید شامل نسبت کربن به نیتروژن =۱۸، ۷ pH، ۳۳° c= دما با میزان هوادهی=rpm ۲۰۰ و درصد تلقیح=۱/۵ در زمان ۹۶ ساعت است. میزان رامنوز تولید شده ۰/۱۶۱ گرم در لیتر (رامنولیپید=۰/۳۶۷گرم در لیتر) و درصد توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام ۵۳ % بود. در حالی که در ملاس تیمار شده، تولید رامنولیپید با میزان تلقیح ۲% (v/v) از پیش کشت به محیط کشت تولید دارای نسبت C/N=۱۶، pH ۶/۸، در دمای ۳۰°c با شدت هم زدن ۲۰۰ $rev.min^{-1}$ و در زمان ۹۶ ساعت به‌دست آمد. در چنین شرایطی میزان رامنوز تولید شده، ۰/۲۲ گرم در لیتر (معادل ۰/۶۶گرم رامنولیپید در لیتر) و درصد توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام آن برابر ۵۵/۵% محاسبه شد.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفاکتانت، رامنولیپید،سودوموناس ائروجینوزا، ملاس چغندر قند
دریافت ۸۷/۴/۱۹ پذیرش۸۹/۵/۲۵

۱. *Pseudomonas aeruginosa* ۲. *P. aeruginosa* MM1011

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-05]

مقدمه

بیوسورفاکتانت‌ها، مولکول‌های آمفی فیلیك هستند که شامل بخش‌های هیدروفوبیك و هیدروفیلیك هستند. ویژگی سورفاکتانت، از تعادل بین بخش‌های هیدروفیلیك و هیدروفوبیك آن تعیین می‌شود به همین دلیل، بیوسورفاکتانت‌ها می‌توانند در مرز بین فازهای مایع با درجات مختلف قطبیت و پیوندهای هیدروژنی مانند نفت/آب قرار گیرند[۱]. بیوسورفاکتانت‌ها به دلیل دارا بودن مزیت‌هایی از قبیل: سمیت پایین، قابلیت تجزیه بیولوژیك، قدرت فراوان تولید کف، سازگاری بهتر با محیط (فعالیت ویژه در درجه حرارت‌های زیاد، pH و درجه شوری)، قابلیت دسترسی آسان به دلیل تنوع ساختاری، و توانایی سنتز شدن از منابع غذایی گوناگون نسبت به سورفاکتانت‌های سنتتیك شیمیایی ارجحیت دارند [۲].همچنین در تولید بیوسورفاکتانت‌ها می‌توان از منابع کربنی ناخالص مانند ملاس استفاده کرد، ولی مواد اولیه به‌کار رفته برای تولید سورفاکتانت‌های شیمیایی حتماً باید خالص باشند.

بیوسورفاکتانت‌ها به دلیل کاربرد وسیع در صنایع مختلف از قبیل پتروشیمی، داروسازی، پزشکی، آرایشی، غذایی، کشاورزی، نساجی، چرم‌سازی، کاغذسازی و ... از اهمیت بسیاری برخوردارند.

یکی از موارد استفاده بیوسورفاکتانت‌ها در صنایع نفت و پتروشیمی بازیافت نفت است. آلودگی دریاها با نفت خام از مشکلات بزرگ جهانی محسوب می‌شود؛ در حالی که با استفاده از سورفاکتانت‌ها یا بیوسورفاکتانت‌ها به دلیل دارا بودن خاصیت امولسیفایری می‌توان آن‌ها را از سطح آب‌ها جمع‌آوری کرد. بیوسورفاکتانت‌ها به دلیل افزایش بازیافت نفت[۱] (MEOR) حائز اهمیت هستند و در پاك‌سازی منابع ذخیره و لوله‌های انتقال نفت به‌کار می‌روند [۲]،[۳]، [۲۲].

افزایش بازیافت نفت به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اهداف تولید بیوسورفاکتانت‌ها همواره مطرح بوده است. عمل متحرك‌سازی، توسط محلول‌های سورفاکتانت به‌منظور به دام انداختن نفت بعد از طغیان آب در صنایع نفت به مدت طولانی مورد استفاده قرار می‌گرفت. برای بازیافت مؤثر نفت، سورفاکتانت باید بتواند کشش سطحی و درون سطحی بین نفت و آب را در مخازن نفتی به طور چشمگیری کاهش داده و باعث تسهیل جریان نفت شود. بررسی‌های آزمایشگاهی رشد میکروبی در مخازن نفتی نشان داده است که تولید سورفاکتانت‌ها یك فاکتور اولیه برای افزایش رقیق‌سازی نفت است. در حال حاضر از سورفاکتانت‌های باکتریایی برای پاك کردن تانك‌های ذخیره نفت نیزاستفاده می‌شود. همچنین بازیافت میکروبی نفت توسط بسیاری از شرکت‌های وابسته به نفت امریکای شمالی در دست پیگیری است [۱۲]،[۱۱]،[۵]،[٤].

برای بازیافت میکروبی نفت با استفاده ازبیوسورفاکتانت‌ها از سه روش اصلی استفاده می‌شود. در روش اول می‌توان میکروفلورایی را که داخل مخازن نفت وجود دارد به‌واسطهٔ مواد غذایی مورد نیازشان تحریك کرد که تولید بیوسورفاکتانت کنند و برای بازیافت نفت فعال شوند. در روش دوم، می‌توان خود میکروارگانیسم‌های

۱. Microbial Enhanced Oil Recovery

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-05]

اختصاصی را برای تولید بیوسورفاکتانت تحریك و آن‌ها را وارد مخازن نفتی کرد تا باعث افزایش نفت از مخازن شوند و سرانجام در روش سوم می‌توان بیوسورفاکتانت به‌دست آمده از فعالیت میکروارگانیسم‌ها را جدا کرد و در بازیافت، مورد استفاده قرار داد. استفاده از سوبستراهای زائد (پساب‌ها) و ارزان قیمت مانند ملاس، آب پنیر و ... برای رشد میکروارگانیسم‌ها نسبتاً مقرون به صرفه است. ملاس، در حقیقت محصول فرعی کارخانجات قند است که در شرایط کار معمول، دیگر نمی‌توان قند آن را کریستالیزه کرد. میزان محصول ملاس هر کارخانه تقریباً ۱/۳ محصول شکر آن کارخانه است و باید به نحوی از این ملاس که درصد زیادی از مواد اولیه را دارد استفاده کرد. ملاس کاربردهای فراوانی دارد که به دو صورت مورد استفاده قرار می‌گیرد.

ملاس برحسب منشأ تولید آن و نوع ماده اولیه (چغندر قند یا نیشکر) دارای مشخصات مختلفی است. در این تحقیق از ملاس چغندر قند با مشخصات زیر استفاده شد: آب۲۰%، ساکاروز ۴۹%، خاکستر ۱%، قند انورت + رافی نوز ۱% و مواد آلی غیر قندی ۲۰%.

ملاس چغندر قند دارای مقادیر زیادی مواد آلوده کنندهٔ محیط زیست و دارای BOD زیادی است که مانع تخمیر می‌شود و ضمناً باید توجه داشت که فاضلاب صنایع مصرف کننده ملاس را نمی‌توان به مجاری آب رودخانه‌ها هدایت کرد.

میکروارگانیسم

میکروارگانیسم مورد استفاده در این تحقیق باکتری سودوموناس ائروجینوزا MM 1011 است که از کلکسیون میکروارگانیسم‌های عفونی و صنعتی ایران، پژوهشکده بیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

مواد مورد استفاده

- محیط نمك‌های معدنی 3 M (جدول۱) واجد گلوکز یا ملاس: قبل از افزودن ملاس، ابتدا آماده‌سازی آن به شرح زیر انجام گرفت:

۴ گرم ملاس را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کردیم پس از صاف کردن، ۱ میلی‌لیتر HCl غلیظ به آن اضافه گردید تا pH محیط اسیدی (در حدود ۲) شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفوژ شده محلول رویی به مدت ۱۲ دقیقه اتوکلاو گردید به محیط کشت اضافه شد [۵]،[۳].

- محیط‌های N. B.[۱] و N. A.[۲]
- نفت خام[۳] پالایشگاه آبادان

۱. Nutrient Broth ۲. Nutrient Agar ۳. Crude Oil

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-05]

- محلول‌های ۱ نرمال HCl، ۱ و ٦ نرمال سود استریل، اسید کلریدریك (۳۷ %) با نرمالیته‌های مختلف، ۵ % فنل در آب و دی‌اتیل‌اتر سرد
- قند رامنوز (قرص ۱ گرمی)، کاغذ pH متر Merck (pH: ۱-۱۲)، ملاس چغندر قند

جدول ۱. ترکیب محیط نمك‌های معدنی 3M

ترکیبات به ازای هر گرم گلوکز	مقدار
$NaNO_3$ (mg)	۱۳۷/۵
$MgSO_4.7H_2O$ (mg)	۲۲
KCl (mg)	۵۵
NaCl (mg)	۵۵
$CaCl_2.2H_2O$ (mg)	۲/۷۵
$FeSO_4.7H_2O$ (μ g)	۲۷/۵
$ZnSO_4.7H_2O$ (μ g)	۸۲/۵
$MnSO_4.7H_2O$ (μ g)	۸۲/۵
H_3BO_3 (μ g)	۱٦/۵
$CoCl_2.6H_2O$ (μ g)	۸/۳
$CuSO_4.5H_2O$ (μ g)	۸/۳
$NaMoO_4.2H_2O$ (μ g)	۵/۵
H_3PO_4 (density=1.71 gml^{-1}) (μ l)	۸/۲۵
Glucose	۱۸/۲
Distilled Water	۱۰۰۰ml
pH	۷ ± ۰/۲

روش‌ها

رسم منحنی رشد باکتری سودوموناس ائروجینوزا و منحنی استاندارد قند رامنوز

این آزمایش به منظور زمان تلقیح مناسب باکتری از محیط کشت اولیه به محیط کشت اصلی انجام شد. به این منظور، با لوپ، کلونی باکتری از محیط .N. A به ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط .N. B وارد شد. با فواصل زمانی یك ساعت، تحت شرایط استریل، ۲ میلی‌لیتر از محیط برداشته شده جذب آن در ٦۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و این کار تا زمانی ادامه یافت که باکتری وارد فاز ایستا شد [٦]،[۷].

برای محاسبهٔ میزان تولید رامنولیپید با توجه به میزان جذب نوری آن در طول موج ٤۸۰ نانومتر، منحنی استاندارد قند رامنوز رسم شد. برای انجام این آزمایش از غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۰/۰۹گرم در لیتر رامنوز خالص استفاده شده و میزان جذب آن سنجیده شد. در این آزمایش از $NaHCO_3$، ۰/۱ مولار برای حل کردن قند رامنوز استفاده شد و برای تهیه محلول شاهد نیز از همان محلول ۰/۱ مولار $NaHCO_3$ استفاده گردید [٦].

بررسی زمان‌های مختلف گرما گذاری در محیط 3M

به‌منظور تعیین مدت زمان مناسب گرما گذاری برای تولید بیش‌تر محصول، باکتری در زمان‌های مختلف از ۲٤ تا ۱۲۰ ساعت در محیط کشت 3M واجد ملاس در دمای ۳۰°c، pH٦/۸، دور همزن=۲۰۰rpm و میزان

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-05]

تلقیح سوسپانسیون اولیه باکتری با OD_{610nm}=۱ برابر با ۲% حجمی کشت داده شد.

پس از انجام آزمایش‌های مختلف به منظور جداسازی باکتری‌ها از محیط کشت با دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤°c سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی جدا شده برای سنجش میزان تولید رامنولیپید استفاده شد [۹]،[۱۵]،[۸]،[٤].

توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام

در این آزمایش از لوله‌های با قطر یکسان استفاده شد. ابتدا ٥ میلی‌لیتر از مایع رویی که pH آن روی ۷ تنظیم شده بود داخل لوله ریخته شد و مقدار ٥ میلی‌لیتر نفت خام به آن اضافه گردید. هر کدام از لوله‌ها با ورتکس کردن به مدت یك دقیقه به شدت همگن شد و سپس به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۰°c-۲٥ نگه‌داری شد. طول لایهٔ نفت امولسیفیه شده اندازه‌گیری شد و ضریب امولسیفیکاسیون با استفاده از فرمول زیر به‌دست آمد. در این مرحله یك لوله محیط کشت استریل نیز به‌عنوان شاهد مورد آزمایش قرار گرفت [۱۷] ،[۱٤]،[۹].

$$\text{ضریب امولسیفیکاسیون} = \frac{\text{طول لایهٔ نفت امولسیفیه شده}}{\text{طول کل محلول}} \times ۱۰۰$$

سنجش کمی قند رامنوز

برای سنجش کمی قند رامنوز ابتدا باید رامنوز را از بخش لیپیدی جدا کرد. برای این منظور، ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی با اسید کلریدریك ۱ نرمال به pH ۲ ± ۰/۱ رسانده شد محلول حاصل به مدت یك شبانه روز در ٤ درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس با حجم مساوی با دی‌اتیل اتر سرد شده مخلوط شده فاز آلی آن پس از سه بار استخراج، جدا شده و حلال آن در دمای ٤۰°c تحت شرایط خلأ تبخیر شد. البته در صورت عدم وجود شرایط خلأ، می‌توان آن‌را زیر هود گذاشت تا تبخیر شود. رسوب به‌دست آمده در ۲ میلی‌لیتر $NaHCO_3$ ۰/۱ مولار حل شده و برای سنجش میزان قند رامنوز، آماده شد. به ۲ میلی‌لیتر از محلول قندی آماده شده،۱ میلی‌لیتر فنل ٥ % اضافه گردید. سپس به سرعت نزدیك سطح محلول، ٥ میلی‌لیتر اسید سولفوریك غلیظ (۹۸% - ۹٥%) ریخته شد. باید توجه داشت که پیپت حاوی اسید سولفوریك نباید داخل محلول شود. این محلول به مدت ۱۰ دقیقه به‌حالت سکون نگه داشته شد. سپس همگن گردید تا محلول یکنواخت شود. لوله‌ها در آب ۳۰°c-۲۰ سرد شده سپس جذب نوری آن‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر درطول موج nm ٤۸۰ اندازه‌گیری شد [٦].

بررسی میزان تولید رامنولیپید در شرایط مختلف

برای انجام آزمایش‌ها در شرایط مختلف، ٥ فاکتور دما، pH، دور شیکر (میزان هوادهی)، میزان تلقیح سوسپانسیون میکروبی و نسبت C/N بر اساس روش تاگوچی و با استفاده از آرایه L8 و به شرح جدول ۲ بررسی شدند که نتایج آن در جدو ل ۳ ذکر شده است.

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-05]

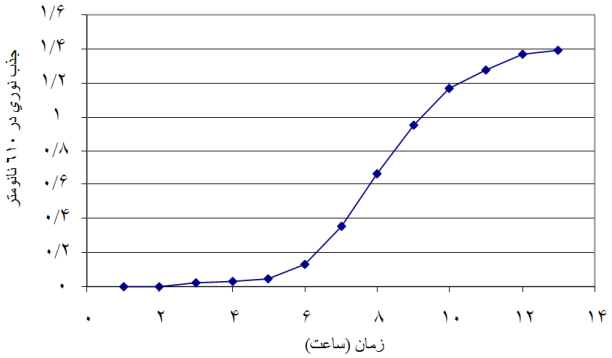
جدول ۲. طراحی آزمایش‌ها بر اساس روش تاگوچی برای بررسی تأثیر دما، pH، دور شیکر، درصد تلقیح و در صد C/N

شماره آزمایش	دما	pH	دور شیکر	درصد تلقیح	C/N
۱	۲۷	٦/٥	۱۷۰	۱/٥	۱٦
۲	۲۷	٦/٥	۲۰۰	۳/٥	۱۸
۳	۲۷	۷	۱۷۰	۳/٥	۱۸
٤	۲۷	۷	۲۰۰	۱/٥	۱۸
٥	۳۳	٦/٥	۱۷۰	۱/٥	۱۸
٦	۳۳	٦/٥	۲۰۰	۳/٥	۱٦
۷	۳۳	۷	۱۷۰	۳/٥	۱٦
۸	۳۳	۷	۲۰۰	۱/٥	۱۸

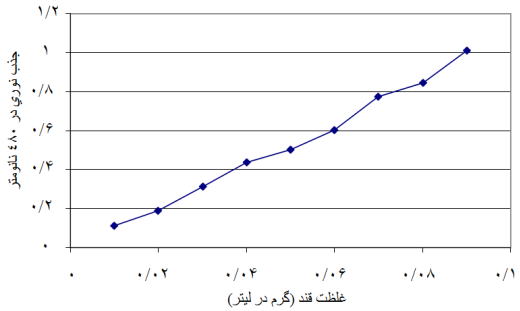
نتایج

برای رسم منحنی رشد باکتری سودوموناس ائروجینوزا، طبق روش کار مشخص شد که زمان مناسب برای تلقیح سوسپانسیون اولیه باکتری (پیش کشت) به محیط‌های کشت اصلی، انتهای فاز لگارتیمی است که طبق شکل ۱ در زمان ۹ ساعت پس از کشت باکتری در محیط کشت .N. B اتفاق می‌افتد.

در روش فنل سولفوریك اسید به دلیل این‌که میزان رامنوز به طور مستقیم سنجیده می‌شود و از روی رامنوز به‌طور تقریبی میزان رامنولیپید گزارش می‌گردد بنا بر این به داشتن منحنی استاندارد رامنوز (شکل ۲) نیاز داریم. در این بررسی از غلظت‌های ۰/۰۹ـ ۰/۰۱ گرم در لیتر استفاده شده و به روش فنل سولفوریك اسید میزان جذب آن در طول موج ٤٨٠nm به‌دست آمد.



شکل ۱. منحنی رشد باکتری سودوموناس آئروجینوزا در محیط کشت .N.B

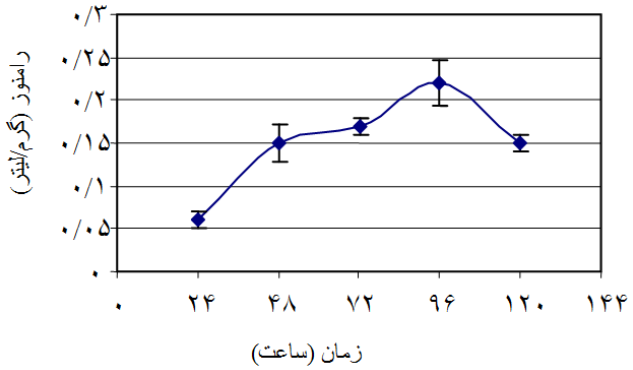


شکل ۲. منحنی استاندارد قند رامنوز

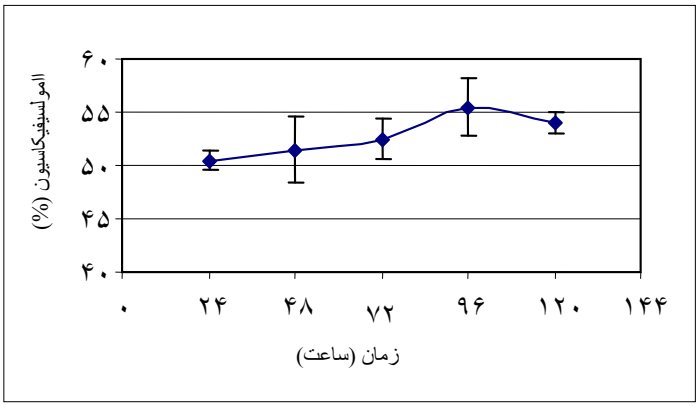
[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-05]

بررسی زمان‌های مختلف گرماگذاری در محیط 3M واجد ملاس

اثر زمان‌های مختلف گرماگذاری باکتری سودوموناس ائروجینوزا در محیط کشت 3M با منبع کربنی ملاس بین زمان‌های ۲٤ تا ۱۲۰ ساعت مورد آزمایش و بررسی قرار گرفت. میزان قند رامنوز تولید شده و توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام در زمان‌های مذکور سنجیده شد و نشان داده شد که بیش‌ترین میزان آن‌ها پس از ۹٦ ساعت و به‌ترتیب برابر با ۰/۲۲ گرم درلیتر و ۵۵/۵% است (شکل‌های۳ و ٤).



شکل ۳. میزان رامنوز تولید شده در زمان‌های مختلف گرماگذاری



شکل ٤. درصد توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام در زمان‌های مختلف گرماگذاری

هنگامی که از گلوکز درتولید رامنولیپید استفاده شد، بررسی روش فنل- سولفوریك اسید و توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام در زمان ۹٦ ساعت مؤید آن بود که بیش‌ترین میزان رامنوز تولید شده در شرایط: ۱۸ = نسبت C/N، ۱/۵ = درصد تلقیح، ۲۰۰rpm = میزان هوادهی، ۷ pH، ۳۳°c = دما و برابر با ۰/۱٦۱ گرم در لیتر است که میزان امولسیفیکاسیون نفت خام در این شرایط برابر با ۵۳% مشاهده گردید در حالی‌که به هنگام استفاده از ملاس به‌عنوان منبع کربن و انرژی، میزان امولسیفیکاسیون ۵۵/۵% بود و تولید نیز ۰/۰۵۹ گرم در لیتر افزایش یافت. نتایج به‌دست آمده بر اساس روش تاگوچی برای بررسی تأثیر فاکتورهای مختلف در تولید، به شرح جدول ۳ است.

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-05]

جدول ۳. نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام شده بر اساس روش تاگوچی برای بررسی تأثیر فاکتورهای مختلف

شماره آزمایش	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
رامنوز تولید شده (گرم)	۰/۰۵۵	۰/۰۵۵	۰/۰۵۵	۰/۰٤٥	۰/۰۹	۰/۱۲۰	۰/۰۷۵	۰/۱٦۱

پس از بررسی نتایج به‌دست آمده، جدول آنالیز واریانس (ANOVA) با در نظر گرفتن پنج فاکتور دما، pH، میزان هوادهی، درصد تلقیح و نسبت C/N، با نرم افزار Qualitek4 به‌صورت زیر به‌دست آمد:

جدول ۴. آنالیز واریانس

	Factors	DOF	Sums of Squares	Variance	F-Ratio	Pure Sum	Percent
۱	**دما**	۱	۰/۲۷۳	۰/۲۷۳	۱۹۵/۲۱۷	۰/۲۷۱	۵۸/۱۰۸
۲	**pH**	۱	۰/۰۳۶	۰/۰۳۶	۲۶/۰۲۵	۰/۰۳۵	۷/۴۸۷
۳	**میزان هوادهی**	۱	۰/۱۳۱	۰/۱۳۱	۹۳/۸۲۹	۰/۱۲۹	۲۷/۷۷۳
۴	**درصد تلقیح**	۱	۰/۰۲۰	۰/۰۲۰	۱۴/۹۶۷	۰/۰۱۹	۴/۱۷۸
۵	**C/N**	۱	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	۲/۱۹۳	۰/۰۰۱	۰/۳۵۷
	خطا/موارد دیگر	۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱			۲/۰۹۷
	جمع	۷	۰/۴۶۷				۱۰۰

نتیجه حاصل از جدول ٤ (آنالیز واریانس) بیان‌گر آن است که با توجه به درصدهای به‌دست آمده، فاکتورهای دما، میزان هوادهی، pH، درصد تلقیح و نسبت C/N به‌ترتیب بر افزایش تولید تأثیر دارند و میزان خطا (نقش سایر عوامل) نیز درصد اندکی کسب کرده است.

بحث

بیوسورفاکتانت تولیدی باکتری سودوموناس ائروجینوزا در طول رشد بر روی منابع کربنی مختلف خصوصاً مواد هیدروفوبیك مانند هیدروکربن‌ها تولید می‌شود. این باکتری‌ها هیدروکربن‌ها را در محیط رشدشان امولسیفیه می‌کنند تا بتوانند به سهولت آن‌ها را مصرف کنند. این بیوسورفاکتانت‌ها نه تنها خارج سلولی هستند بلکه نقش مهمی در تجزیهٔ مواد غیرمحلول در آب به‌واسطه عمل انحلال کاذب یا امولسیفیکاسیون ایفا می‌کنند که این خاصیت برای کمپلکس هیدروکربن‌های آلیفاتیك و آروماتیك، اختصاصی است این نتایج مشابه نتایج روزنبرگ[۱] و همکارانش (۱۹۷۹) است. آن‌گونه که از مطبوعات و نوشته‌های علمی برمی‌آید چند سویه از سودوموناس‌ها یافت شده‌اند که مواد فعال سطحی تولید می‌کنند. این ترکیبات از نوع گلیکولیپید هستند. ویژگی‌های شیمیایی این ماکرومولکول‌ها زمانی‌که سودوموناس روی منابع کربن هیدروفوبیك یا لیپوفیلیك رشد می‌کند باعث شده آن‌ها را به رامنولیپیدها نسبت دهند[۱۴]، [۱۳]. با توجه به آزمایش‌های ویژه سنجش رامنولیپید که در این تحقیق انجام گردید مشاهده شد که سودوموناس ائروجینوزا سویه MM1011 تولید رامنولیپید می‌کند که این بیوسورفاکتانت خاصیت فعالیت سطحی و امولسیفایری از خود بروز می‌دهد.

رامنولیپید، در محیطهای شامل گلوکز یا گلیسرول تولید می‌شود. این بیوسورفاکتانت در مراحل انتهایی فاز لگاریتمی[۲] پس از رسیدن به فاز رکود[۳] رشد و همزمان با به مصرف رسیدن نیتروژن محیط، تولید می‌شود [۲۲].

۱. Rosenberg ۲. Late exponential phase ۳. Stationary phase

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-05]

در این تحقیق نیز با توجه به آزمایش‌های انجام شده این نتیجه حاصل شد که باکتری سودوموناس ائروجینوزا پس از رسیدن به فاز رکود در محیط کشت 3M شروع به تولید رامنولیپید می‌کند. تولید بهتر بیوسورفاکتانت‌ها در شرایطی مانند محدودیت نیتروژن و آهن انجام می‌گیرد. پس نتیجه می‌گیریم نسبت کربن به نیتروژن (C/N) در محیط، فاکتور مهمی است که تولید رامنولیپید را تحت تأثیر قرار می‌دهد[۵]، [۱۵].

در آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق که با نفت خام انجام شد با اضافه کردن رامنولیپید حاصل از فعالیت باکتری سودوموناس ائروجینوزا در محیط 3M واجد ملاس مشاهده شد که این ماده روی نفت خام، فعالیت امولسیفایری از خود نشان می‌دهد. قابل ذکر است منابع کربنی قابل حل در آب مانند گلیسرول، گلوکز، مانیتول و اتانول همگی برای تولید رامنولیپید توسط سویه‌های سودوموناس به کار می‌روند. در بررسی‌های انجام شده دراین تحقیق، ملاس به‌عنوان منبع کربنی استفاده شد [۸] محدودیت نیتروژن نه تنها افزایش تولید بیوسورفاکتانت را به دنبال دارد بلکه ترکیب آن را هم تحت تأثیر قرار می‌دهد[۲۱].

تولید حداکثر رامنولیپید بعد از محدود کردن نیتروژن در نسبت C/N معادل ۱۸- ۱۶ اتفاق می‌افتد و حداقل آن در C/N کمتر از ۱۱ تولید می‌شود و آن زمانی است که نیتروژن در محیط محدود نشده است[۱۱] .

در بررسی‌های انجام شده دراین تحقیق در مورد میزان تلقیح مناسب سوسپانسیون اولیه باکتری سودوموناس ائروجنیوزا به محیطهای کشت با منبع کربن قندی که دراین تحقیق از گلوکز و ملاس استفاده شده است با توجه به نتایج حاصل از آزمایش‌های انجام شده می‌توان به این نکته پی برد که مناسب‌ترین میزان تلقیح سوسپانسیون به محیط کشت، ۱/۵% است. با آزمایش‌های انجام شده در زمان‌های مختلف گرمخانه‌گذاری در شرایط ۲= درصد تلقیح و ۲۰۰ rpm = میزان هوادهی، ۶/۸ pH ، ۳۰°c = دما به این نتیجه رسیدیم که بیش‌ترین میزان تولید در محیط 3M واحد گلوکز در زمان ۹۶ ساعت انجام می‌گیرد که برابر با ۰/۲۲ گرم در لیتر است. با توجه به این نتایج مشاهده شد هر چه زمان گرماگذاری افزوده می‌شود میزان تولید نیز افزایش می‌یابد تا این‌که در زمان ۹۶ ساعت به بالاترین میزان خود می‌رسد و پس از آن در زمان ۱۲۰ ساعت دوباره کاهش می‌یابد. در این مورد می‌توان گفت یا باکتری پس از اتمام منبع کربن و انرژی بعد از ۹۶ ساعت، از رامنولیپید به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کند و یا این‌که باکتری‌های گرم منفی مانند سودوموناس ائروجنیوزا معمولاً با پدیدهٔ (Qorum sensing)، سنتز رامنولیپید را آغاز می‌کنند. این سیستم به هنگام تجمع باکتری‌ها به حد کافی برای فعال کردن سیگنال لازم، فعال می‌شود و در نهایت به فعال شدن آنزیم رامنوزیل ترانسفراز منجر می‌گردد. هنگامی‌که تعداد باکتری‌ها در اثر اتمام منبع کربن و انرژی از حد کافی برای تولید سیگنال کاهش یابد، میزان فعالیت آنزیم رامنوزیل ترانسفراز نیز کاهش یافته در نتیجه از تولید رامنولیپید کاسته می‌شود، این مشاهدات با مشاهدات طیف وسیعی از محققینی که برروی تولید سورفاکتانت با این باکتری تحقیق کرده‌اند مشابه است [۱۰]، [۱۲]، [۱۳]، [۱۷]، [۱۸]، [۲۳]، [۲۴]، [۲۵]، [۲۶].

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-05]

در آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق از ملاس و گلوکز به‌عنوان منبع کربنی استفاده شد. نتایج حاصل از ملاس که قند موجود در آن سوکروز است نشان داد که باکتری سودوموناس ائروجنیوزا در حالت طبیعی توانایی استفاده از سوکروز را ندارد ولی به دلیل دستکاری‌های پلاسمیدی که روی سویه مورد استفاده انجام شده می‌تواند از سوکروز موجود در ملاس که حدوداً ٤٩ درصد کل ملاس را تشکیل می‌دهد استفاده کند.

میزان مصرف گلوکز مورد استفاده به‌عنوان منبع کربنی در آزمایش‌های مختلف، ۱/۸۲ درصد است و در استفاده از سوکروز نیز از میزان ۲ درصد آن استفاده شد که معادل با ٤ درصد ملاس در محیط 3M است.

با بررسی تأثیر میزان هوادهی در میزان تولید رامنولیپید مشخص شد که اکثر بیوسورفاکتانت‌ها در شرایط هوازی تولید می‌شوند بنا بر این هوادهی در میزان تولید، نقش به‌سزایی دارد. با مقایسهٔ نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌های مشخص شد که افزایش هوادهی باعث افزایش تولید می‌شود و کشت میکروارگانیسم در دور rpm ۲۰۰ تولید بهتری را به دنبال دارد.

با بررسی تأثیر pH بر میزان تولید رامنولیپید مشخص شد این فاکتور تأثیر زیادی در تولید رامنولیپید دارد. اگر pH رشد در حد پایینی باشد (مثلاً در حدود ٦-٥) کاهش شدید رامنولیپید مشاهده خواهد شد و یا اگر pH از حد معمول بالاتر رود (مثلاً در حدود ۸ و بالاتر از آن) تولید، دوباره کاهش خواهد یافت. نتیجه می‌گیریم pH مناسب برای تولید رامنولیپید، pH حدود خنثی است و این به این دلیل است که هر باکتری در محدودهٔ خاصی از pH می‌تواند رشد کرده و فعالیت کند و در کم‌تر یا بیش‌تر از آن یا از رشد باز می‌ماند یا از فعالیت آن برای تولید محصول کاسته می‌شود.

در آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق، مناسب ترین pH برابر با ۷ و تولید رامنوز ۰/۱٦ گرم در لیتر گزارش شد.

در مورد تأثیر دما نیز باید خاطر نشان کرد که چون باکتری سودوموناس ائروجنیوزا یك باکتری مزوفیل است پس مناسب‌ترین درجه حرارت برای رشد آن ۳۰-۳۷°c است، ولی می‌تواند در دمای بین ٥-٤۲°c نیز رشد کند. خانم رستمزا نیز در پایان نامه خود نتایج مشابهی را با ملاس تیمار نشده ذکر کرده است [۲].

در این تحقیق بیش‌ترین میزان تولید رامنوز در دمای ۳۳°c حاصل شده است. می‌توان نتیجه گرفت که دمای ۳۳°c دمای خوبی برای تولید رامنولیپید توسط سودوموناس ائروجنیوزا در محیط 3M واجد ملاس است.

شرایط محیطی و غذایی، میزان تولید بیوسورفاکتانت رامنولیپید توسط سودوموناس ائروجنیوزا را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بررسی‌های این دانشمندان در مورد فرمولاسیون محیط‌های معدنی نشان داد که بیش‌ترین میزان تولید ترکیب‌های فعال سطحی (از جمله رامنولیپیدها) با به حداقل رساندن غلظت نمك‌های منیزیم، کلسیم، پتاسیم، سدیم و عناصر جزیی حاصل می‌شود [۱۱].

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-05]

بررسی‌ها نشان دادند که زمانی‌که غلظت گلوکز به‌عنوان سوبسترای اولیه به ۷۳ گرم در لیتر رسانده شود در دمای ۳۲-۳٤°c و ٦/٤-٦/۲ pH ، بیش‌ترین میزان بیوسورفاکتانت تولید می‌شود.

میکروارگانیسم‌های تولید کنندهٔ بیوسورفاکتانت‌ها از جمله سودوموناس ائروجنیوزا به‌واسطهٔ تولید بیوسورفاکتانت توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام را دارند که با این خاصیت، باعث افزایش سطح و گلوله گلوله شدن هیدروکربن‌ها می‌شوند که این، مکانیسمی برای مصرف آسان‌تر هیدروکربن‌ها توسط میکرو ارگانیسم‌های مورد نظر است [۷]. هر چه میزان تولید رامنولیپید بیش‌تر باشد درصد امولسیفیکاسیون نفت خام نیز افزایش می‌یابد.

بیوسورفاکتانت‌ها با تشکیل میسل‌ها، باعث محلول‌سازی نفت در آب می‌شوند و تشکیل میکرو امولسیون‌ها را می‌دهند. در آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق بیش‌ترین درصد امولسیفیکاسیون نفت خام ٥٥/٥% بوده است.

با توجه به جدول آنالیز واریانس، میزان خطا (فاکتورهای استفاده نشده) درصد اندکی یافته است که این مطلب، میزان اهمیت فاکتورهای انتخاب شده را تأیید می‌کند [۲].

برای سنجش میزان رامنوز و درصد توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام، از مایع رویی حاصل از سانتریفوژ محیط‌های کشت استفاده شد که مایع رویی به دلیل این‌که رامنولیپید خارج سلولی بوده و پس از سانتریفوژ در مایع رویی باقی می‌ماند حاوی رامنولیپید است.

برای آماده‌سازی مایع رویی حاصل از سانتریفوژ برای سنجش قند رامنوز از سه روش استفاده می‌شود که در روش اول از کلروفرم- متانل در روش دوم از دی‌اتیل اتر سرد شده و در روش سوم از اتیل استات به‌عنوان حلال استفاده می‌شود که چون کلروفرم- متانل نسبت به دو روش دیگر، دیرتر بخار می‌شود پس دو روش دیگر برای آماده‌سازی بهتر است. در این تحقیق از روش دوم با حلال دی‌اتیل اتر سرد شده استفاده شده است.

نتیجه‌گیری نهایی

در این تحقیق، هدف آن بود که از ماده‌ای ارزان قیمت، ولی غنی از لحاظ غذایی برای تولید رامنولیپید توسط باکتری سودوموناس ائروجینوزا استفاده شود که از ملاس به‌عنوان منبع کربنی در محیط کشت استفاده گردید. این باکتری نمی‌تواند قند ملاس (ساکاروز) را به مصرف برساند، ولی سویه مورد استفده به دلیل دست ورزی‌های ژنتیکی انجام شده بر روی آن به راحتی می‌تواند ساکاروز را مصرف کرده و رامنولیپید تولید نماید به شرط آن‌که حذف ناخالصی‌ها بر روی ملاس انجام شود و لذا ملاس خام با اسید کلریدریک تیمار و در دسترس میکروارگانیسم قرار گرفت. در این پژوهش شرایط مختلفی بررسی شده است و آنالیز میزان رامنولیپید تولیدی با روش‌های فنل- سولفوریک اسید، کرروماتوگرافی لایهٔ نازک و تأثیر رامنولیپید بر امولسیفیکاسیون نفت خام بررسی و تأیید گردید. این تحقیق برای اولین بار ارزش ملاس چغندر قند تیمار شده را به‌عنوان منبع کربن برای

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-05]

تولید رامنولیپید آشکار ساخت.

منابع

۱. ادیب فر پرویز، میکروب شناسی پزشکی،(۱۳۷۵) ۵۸۸ -۵۸۷.

۲. رستمزا مهسا، تولید بیوسورفاکتانت از باکتری سودوموناس ائروژینوزا، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران (۱۳۷۹).

۳. سجادی اکبر، ملاس و موارد مصرف آن (۱۳٦٦).

4. P. S. Babu, A. N.Vaidya, A. S. Bai, R. kapur, A. Juwarkar, P. Khanna, March, "Kinetics of Biosurfactant, Production by Pseudomonas aeruginosa Strain BS2 from Industrial Wastes", Biotechnoool. Lett., 18 (3) (1996) 263-268.

5. M. M. Burger, L. Glaser, R. M. Burton, "Process for the Production of Rhamnolipids", J. Biol. Chem. 238 (1963) 2595-2602.

6. M. Dubois, K. A. Glues, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, Fred Smith, March, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", Anal. Chem., 28 (3) (1956) 350-356.

7. D. S. Francy, J. M. Thomas, R. L. Raymond, C. H. Ward, "Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria", Journal of Industrial Microbiology, 8 (1991) 237-246.

8. G. Georgiou Sung, Chyrlin and M. M. Sharma, Jan., "Surface-Active Compounds from Microorganisms", Biotechnology, 10 (1992) 60-65.

9. G. L.Ghurye, C. Vipulanadan, R. C. Willson. "A Practical Approach to Biosurfactant Production Using Nonaseptic Fermentation of Mixed Cultures", Biotechnol. and Bioeng., 44 (1994) 661-666.

10. P. S. Babu, A. N.Vaidya, A. S. Bai, R. kapur, A. Juwarkar, P. Khanna, March., "Kinetics of Biosurfactant, Production by Pseudomonas aeruginosa Strain BS2 From Industrial Wastes", Biotechnol, Lett., 18 (3) (1996) 263-268.

11. L. Guerra–Santos. H.; O. Kappeli and A. Fiechter, "Dependence of Pseudomonas aeruginosa Continuous Culture Biosurfactant Production on Nutritional and Envivonmental Factors", Appl. Microbiol. Biotechnol, 24 (1986) 443-448.

12. S. Horowitz, J. N. Gillbert, W. M. Griffin, "Isolation & Characterization of a Surfactant Produced by Bacillus licheniformis", Society for Industrial Microbiology, 86 (1990) 243-

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-05]

248.

13. D. K.Jain, D. L. Collins, T. H. Lee, J. T. Trevors, "A Drop -Collapsing Dest for Screening Surfactant Producing Microorganisms", Journal of Microbiological Methods, 13 (1991) 271-279 .
14. M. A. Manresa, J. Bastida; M. E. Mercade; M. Robert; C. De Andres; M. J. Espuny and J. Guinea, "Kinetic Studies on Surfactant Production by Pseudomonas aeruginosa 44T1", Journal of Industrial Microbiology, 8 (1991)133-136.
15. M. Matsufuji, K. Nakata, A. Yoshimoto, Dec., "High Production of Rhamnolipids By Pseudomonas aeruginosa Growing on Ethanol", Biotechnol. Lett., 1(12) (1997)1213-1215.
16. T. Matsuyama, M. Sogawa, I. Yano, "Direct Colony Thin-Layer Chromatography & Rapid Characterization of Serratia marcescens Mutants Defective in Production of Wetting Agents", Appl. Microbiol, Biotechnol, 53 (5) (1987) 1186-1188.
17. Mercade M. E.; M. A. Manresa; M. Robert; M. J. Espuny; C. De Anders & J. Guinea, "Olive Oil Mill Effluent (OOME), New Substrate for Biosurfactant Production", Bioresource tecnology, 43(1993) 1-6.
18. E. Mercade, M. Robert, M. J. Espuny, M. P. Bosch, M. A. Manresa, J. L. Parra, J. Guinea, "New Surfactant Isolated from Pseudomonas 42A2", JAOCS, 65 (12) (1988).
19. M. Miyazima, M. Iida, H. Iizuka "Microbial Production of Surfactants and their Commercial Potential", J. Ferment, Technol, 63 (1985) 219.
20. C.N.Mulligan, G. Mahmourides, B. F. Gibbs, "The Influence of Phosphate Metabolism on Biosurfactant Production by Pseudomonas aeruginosa", 12 (1989)199-210.
21. Phale P. S., H. S. Savithri, N. A. Rao, C. S. Vaidyanathan, Production of Biosurfactant " Biosur-pm " by Pseudomonas maltiphila CSV 89: Characterization and Role in Hydrocarbon Uptake, Arch. Microbiol, 163(1995) 424-431.
22. K.V. Ramana, N. C. L. N. Chargulu and N. G. Karanth, "A Mathematical Model for the Production of Biosurfactatnts by Pseudomouas aeruginosa CFTR-6: Production of Biomass", J. Chem. Tech. Biotechnol, 51 (1991) 52-538.
23. M. Paquat, "Foaming Properties of Lipopeptides Produced by Bacillus subtilis : Effect of Lipid and Peptide Structural Attributes", J. Agric. Food Chem., 46(3) (1998) 911-916.
24. H.E. Reiling, U. Thanel-Wyss, L. H. Guerra-Santos, R. Hirt, O. Kaeppli, A. Fiechter, "Pilot

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-05]

Plant Production of Rhamnolipid Biosurfactant by Pseudomonas aeruginosa", Appl. Environ. Microb. 1 (5) (1984) 985-989.

25. H. E., Rashedi, H. E. Jamshidi, M. Mazaheri Assadi, and B. Bonakdarpour, "Biosurfactant Production with Glucose as a Carbon Source. Chem. Biochem", Eng. Q. 20 (1) (2006) 99-106.

26. H. R. Rashedi, M. Mazaheri Assadi, E. Jamshidi and 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.

[Downloaded from jsci.khu.ac.ir on 2024-05-05]