تولید رامنولیپید با سودوموناس آئروجینوزا[1] در محیط کشت حاوی آب پنیر تیمار شده

فاطمه رفیعی: دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس

مهناز مظاهری‌اسدی، مهرداد آذین: پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

چکیده

بیوسورفاکتانت‌ها ترکیب‌های فعال سطحی هستند که سودوموناس‌ها و به‌ویژه سودوموناس آئروژینوزا[1] از بهترین میکروارگانیسم‌های تولید کننده آن‌ها، است. هدف در این پژوهش, بررسی تولید را منولیپید بود و در آن از محیط پایه نمك‌های معدنی 3M با منبع کربنی آب پنیر (Whey) استفاده شد. این باکتری لاکتوز منفی است و جهت استفاده از آب پنیر به‌عنوان منبع کربن و انرژی، نیاز است که از پروسه هیدرولیز آنزیمی استفاده شود و لذا این تیماربا آنزیم لاکتاز (زمان: ۳ ساعت، دما:۴۰ درجه سانتی‌گراد، pH: ۶/۵) انجام گرفت. به منظورتولید رامنولیپید شرایط مختلفی از قبیل تعیین محیط کشت واجد آب پنیر مناسب با ترکیبات مختلف، زمان گرمخانه‌گذاری (۷۲، ۶۰، ۴۸، ۳۶، ۲۴ ساعت) و مدت زمان اثر آنزیم (۱ تا ۸ ساعت) بررسی شد. در این میان بهترین محیط، محیط نمك‌های معدنی 3M به همراه آب پنیرصد درصد هیدرولیز شده با آنزیم (درجه حرارت ۳۰درجه سانتی‌گراد) در ۷ pH در دمای C °۳۳بود. بیش‌ترین میزان تولید در ۶۰ ساعت به دست آمد. در این بررسی‌ها مشخص شد که با توجه به سویهٔ فوق می‌توان از آب پنیر هم علیرغم آن‌که باکتری در شرایط عادی نمی‌تواند از آن به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کند ولی با یک تیمار ساده آنزیمی می‌تواند در حد منبعی چون گلوکز و ملاس رامنو لیپید تولید کرد. در بهترین شرایط، میزان تولید رامنولیپید حدود۲ گرم (معادل با ۰/۷۳۲گرم قند رامنوز) و توانایی امولسیفکاسیون نفت خام توسط این محصول برابر با ۹۷% به دست آمد.

مقدمه

بیوسورفاکتانت‌ها مولکول‌های آمفی پاتیك هستند. این مواد ترکیب‌های فعال سطحی هستند که بین فاز های مایع با قطب‌های متفاوت و پیوندهای هیدروژنی قرار می‌گیرند و می‌توانند کشش سطحی

واژه‌های کلیدی: *آب پنیر، رامنولیپید، سودوموناس آئروجینوزا*

دریافت ۸۷/۴/۱۹ پذیرش ۸۸/۱۰/۲

mxmazaheriassadi@yahoo.com

۱. *Pseudomonas aeruginosa*

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-23]

بین سطوح را هم درمحلول‌های آبی و هم در مخلول‌های هیدروکربنی کاهش دهند[۲] ،[۱].

رامنولیپیدها از مهم‌ترین بیوسورفاکتانت‌ها هستند که اکثراً با سویه‌های مختلفی از سودوموناس تولید می‌شوند [۳].

اصلی‌ترین نقش فیزیولوژیکی بیوسورفاکتانت‌ها، توانایی میکروارگانیسم‌ها در رشد بر روی سوبستراهای غیرقابل حل در آب است و به این صورت امکان متابولیسم و جذب مناسب‌تر مواد فراهم می‌شود. علاوه بر آمیزندگی منابع کربن، بیوسورفاکتانت‌ها در چسبندگی سلول‌های میکروبی به هیدروکربن‌ها هم نقش دارند. این خواص و تولید ترکیبات با فعالیت سطحی با یك‌دیگر اجازه رشد روی بعضی از منابع کربنی را می‌دهند. آن‌ها با پایین آوردن نیروی کشش سطحی و بین‌سطحی و همچنین به دلیل دارا بودن خاصیت امولسیفایری برای افزایش بازیافت میکروبی نفت (MEOR)[۱] از منابع نفتی و نیز برای تسهیل جریان نفت در مسیر لوله‌های انتقال نفت به کار می‌روند. با روش‌های اولیهٔ پمپ کردن ممکن است فقط در حدود ۳۰ درصد نفت از مخازن و منابع نفتی بازیافت شوند. از آن‌ها می‌توان در کنترل‌های محیطی مانند حذف آلودگی‌های خاك و کنترل نشت لکه‌های نفتی در دریاها و تجزیه وسم‌زدایی از پساب‌های صنعتی استفاده کرد. بیوسورفاکتانت‌ها می‌توانند در این مورد با درجهٔ خلوص بسیار پایینی عمل کنند به‌طوری‌که تمام مایع سلولی (سوپرناتانت) می‌تواند وارد عمل شود و به‌علاوه عمل‌کردشان انتخابی است وبه مقدار کم استفاده می‌شوند[۱] ،[۴] ،[۵] ،[۶] ،[۷]، [۸] .

برای تولید رامنولیپید با باکتری سودوموناس آئروژینوزا از آب پنیر به‌عنوان منبع کربنی می‌توان استفاده کرد. آب پنیر محصول فرعی کارخانجات پنیرسازی است و بسته به روش تولید ۶۰ تا ۹۰ درصد از مواد تشکیل دهندهٔ شیر را دارا است. با توجه به آمار ارائه شده به وسیلهٔ شرکت سهامی صنایع شیر ایران با تولید بیش از ۲۷۷۳۰ تن پنیر مقدار۲ میلیون تن در سال آب پنیر تولید می‌شود که این مقدار وارد فاضلاب شده و به دلیل دارا بودن مواد آلی مشکلات زیادی را در آلودگی محیط زیست ایجاد می‌کند[۹]. بنا بر این با کاربرد پساب‌ها در تهیهٔ بیوسورفاکتانت‌ها یك ماده بی‌ارزش به یك ماده باارزش و سودمند تبدیل می‌شود. همچنین با استفادهٔ بهینه از آب پنیر یکی از معضلات عمدهٔ آلودگی محیط زیست در صنایع لبنی حل می‌شود. با توجه به میزان BOD این محصول که در حدود ۳۵ هزار الی ۴۵ هزار میلی‌گرم در لیتر است میزان آلودگی ۱۰۰ لیتر آب پنیر به اندازهٔ فاضلاب محل زندگی ۴۵ انسان است.

لاکتوز عمده‌ترین ترکیب ماده خشك آب پنیر را تشکیل می‌دهد و مقدار آن درآب پنیر تقریباً معادل لاکتوز موجود در شیر است. میزان مواد مختلف موجود در آب پنیر با توجه به روش‌های مختلف به شرح جدول۱ است.

برای قابل استفاده بودن لاکتوز با باکتری سودوموناس آئروژینوزا باید از هیدرولیز استفاده کرد. دراین فرایند

۱. Microbial Enhanced Oil Recovery

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-23]

آنزیم محلول به آب پنیر اضافه شده و این عمل باید در دما و pH خاص و به مدت معین بسته به نوع آنزیم صورت گیرد. لاکتوز در اثر عمل آنزیم لاکتاز به قندهای تشکیل دهنده آن تبدیل می‌شود [۱۰].

تمامی میکروارگانیسم‌ها برای رشد نیاز به منابع کربن، نیتروژن، هیدروژن، اکسیژن و به میزان کم‌تر گوگرد وفسفر دارند. در صنعت، پساب‌ها و مواد غذایی غنی که قیمت پایینی هم دارند برای تأمین این نیاز بسیار مورد توجه هستند. در تولید سورفاکتانت‌های شیمیایی درجهٔ خلوص مواد اهمیت دارد ولی در تولید بیوسورفاکتانت‌ها می‌توان از مواد غذایی ناخالص نیز که دارای بهای کم‌تر و مناسب‌ترند استفاده کرد. چون نیاز به کربن بیش‌تر از سایر عناصر است بنا بر این منابع کربن باید از سوبستراهای ارزان قیمت انتخاب شود. پس از کربن اهمیت نیتروژن در تولید بیوسورفاکتانت بیش‌تراز بقیهٔ عناصراست. نسبت کربن به نیتروژن نیزدر تولید بیوسورفاکتانت بسیارمهم است[۱۱]. پساب‌هایی چون آب پنیر، شیره خرما و ملاس از منابع غنی کربنی و نیتروژنی هستند.

گورا سنتوز[۱] و همکارانش در سال ۱۹۸۴ مشاهده کردند که بیش‌ترین میزان رامنولیپید در نسبت کربن به نیتروژن ۱۸-۱۶به‌دست می‌آید ودر پایین‌تر از این مقدار یعنی حدود ۱۱هیچ رامنولیپیدی مشاهده نمی‌شود[۲۰].

اسیدها و بازها هم برای کنترل pH مورد نیازهستند. در بین اسیدها، اسیدفسفریك، اسیدهیدروکلریك و اسیدسولفوریك و در بین بازها هیدروکسیدسدیم و هیدروکسیدآمونیوم بیش‌ترین استفاده را دارند [۱۱].

عنصر منگنز هم محدود کنندهٔ رشد است که میزان آن باید تنظیم شود [۱۸] ،[۱۹]. فاکتورهای مختلف و شرایط رشد هم مانند میزان اکسیژن، درجه حرارت، میزان هوادهی در رشد و تولید محصول موثرند[۱۳]، [۱۰]،[۱۴]،[۱۵] ،[۱۶] ،[۱۷] .

بیوسورفاکتانت‌ها نسبت به سورفاکتانت‌های شیمیایی مزایای زیادی دارند که مهم‌ترین آن‌ها سمیت کم‌تر، قدرت تجزیه زیستی بیش‌تر، قدرت تطابق محیطی بیش‌تر، قابلیت تجزیه شدن بالاتر و سازگاری زیستی(به‌همین دلیل در صنایع آرایشی، غذایی و دارویی از آن‌ها استفاده می‌شود)، کف‌زایی بیش‌تر، فعالیت و حساسیت بالاتر در درجه حرارت‌های بالا و pH بالا، توانایی تولید از مواد زائد و پساب‌های غنی و ارزشمند از نظرغذایی مثل: آب پنیر، ملاس، شیره خرما و... است [۲۰].

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم

سویهٔ استفاده شده در این تحقیق MM1011 سودوموناس آئروژینوزا[۱۸] بود که از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

۱.Guerra-Santos

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-23]

مواد

- محیط نمک‌های معدنی 3M واجد آب پنیر: ترکیب‌های آب پنیر طبق جدول ۱ و محیط کشت 3M به شرح جدول ۲ است.
- محیط‌های .N.A[۱] و .N.B[۲]
- محلول‌های ۱ نرمال HCl، ۱ نرمال سود استریل و ۶ نرمال سود استریل، اسید کلریدریك با نرمالیته‌های مختلف (۳۷ %)، محلول ۵ % فنل در آب و دی اتیل اتر
- قند رامنوز (قرص۱ گرمی)، کاغذ pH متر(pH: 1-12) مرک[۳] پودر آب پنیر، نفت خام پالایشگاه آبادان (Crude Oil) و آنزیم لاکتوزیم[۴] 3000 L HPG

جدول ۱. میزان ترکیبات ماده خشك آب پنیر

ترکیب	انعقاد آنزیمی (مایه پنیر)	تخمیر لاکتیکی	انعقاد اسیدی
لاکتوز	۷۰-۸۰	۶۰-۷۰	۶۵-۷۵
پروتئین	۵/۱۳-۹	۵/۱۳-۹	۹-۱۳
ازت غیر پروتئین	۶-۸	۵-۷	۳-۵
مواد معدنی	۵/۷-۹	۹-۱۴	۹-۱۳
اسیدیته برحسب اسید لاکتیك	۵-۱۱	۵-۸	۴-۵

جدول ۲. ترکیب محیط نمك‌های معدنی 3M و شرایط کشت

مواد افزوده شده به ازای هر گرم گلوکز	مقدار
$NaNO_3$	۱۳۷.۵ (mg)
$MgSO_4.7H_2O$	۲۲ (mg)
KCl	۵۵ (mg)
NaCl	۵۵ (mg)
$CaCl_2.2H_2O$	۲.۷۵ (mg)
$FeSO_4.7H_2O$	۲۷.۵ (μ g)
$ZnSO_4.7H_2O$	۸۲.۵ (μ g)
$MnSO_4.7H_2O$	۸۲.۵ (μ g)
H_3BO_3	۱۶.۵ (μ g)
$CoCl_2.6H_2O$	۸.۳ (μ g)
$CuSO_4.5H_2O$	۸.۳ (μ g)
$NaMoO_4.2H_2O$	۵.۵ (μ g)
H_3PO_4 ρ=1.71 (gml^{-1})	۸.۲۵ (μ l)
Glucose	۱۸.۲
Distilled Water	۱۰۰۰ml
pH	۷ ± ۰.۲
Shaking Rate	۱۵۰،۲۰۰،۲۵۰ $rev.min^{-1}$
Temprature	۳۰ °C ±۱
Time	۹۶h

۱.Nutrient Agar ۲.Nutrient Broth ۳.Merck ۴. Lactozyme

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-23]

روش‌ها

رسم منحنی رشد باکتری و سنجش قندهای لاکتوز و رامنوز

چون باکتری سودوموناس آئروژینوزا در انتهای فازلگاریتمی تولید رامنولیپید می‌کند، بنا بر این برای به‌دست آوردن این زمان نیاز به تهیهٔ منحنی رشد بود تا زمان تلقیح پیش کشت[1] به محیط کشت مشخص شود [۲۱]. برای این منظور یك لوپ از کلنی را از محیط .N. A برداشته و به ۱۰۰ میلی‌لیتراز محیط .N.B استریل اضافه شد، سپس محیط در شیکر انکوباتور با دور $150\ rev.min^{-1}$ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. از ابتدا به فاصلهٔ زمانی یك ساعت به میزان هر بار ۳ میلی‌لیتر از محیط در شرایط استریل برداشته شد و میزان جذب آن در ۶۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۴]. این کار ادامه داشت تا زمانی که باکتری وارد فاز رکود شد [۲۲].

برای تعیین میزان لاکتوز موجود در آب پنیر نیز از رسم منحنی استاندارد قند لاکتوز استفاده شد. بدین منظور ۵-۱ میکرومول قندلاکتوز به کار برده شد و برای سنجش آن از روش DNS[2] استفاده شد. برای سنجش لاکتوز یك میلی‌لیتر نمونه، یك میلی‌لیتر سود ۴ نرمال و ۰/۵میلی‌لیتر محلول DNS باهم ترکیب شدند. این ترکیب ۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد، پس از آن محلول سرد شده و با پنج میلی‌لیتر آب سرد ترکیب گردید و جذب نمونه در ۵۴۰nm اندازه‌گیری شد و با ترسیم منحنی تغییرات غلظت در برابر جذب نور، میزان لاکتوز موجود در آب پنیر با آن مقایسه و اندازه‌گیری گردید.

برای یافتن میزان تولید رامنولیپید نیاز به داشتن منحنی استاندارد قند رامنوز است. بدین منظور از غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۰/۰۹ گرم در لیتر رامنوز استفاده شده و باروش فنل سولفوریك اسید میزان جذب درطول موج ۴۸۰ نانومتر سنجیده شد که در صفحه ۹ شرح داده شده است. در این روش از $NaHCO_3$ ۰/۱ مولار به‌عنوان حلال قندها استفاده شد و برای تهیه شاهد هم از محلول ۰/۱ مولار $NaHCO_3$ استفاده شد و با توجه به آن منحنی استاندارد رامنوز رسم گردید [۲۳].

تهیهٔ محیط کشت 3M با منبع کربنی آب پنیر

میزان آب پنیر مورد نیاز بر اساس میزان گلوکز محیط 3M محاسبه شد طوری که ۱.۸۲ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر قند داشته باشد. ابتدا مقدار ۴/۵ گرم پودرآب پنیر(تهیه شده در پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی با اسپری درایر[1]) به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و سپس با آنزیم لاکتاز LHPG ۳۰۰۰ (از کمپانی novozyme دانمارك) هیدرولیز گردید. طبق دستورالعمل سازنده، شرایط اپتیمم لازم برای عمل‌کرد آنزیم pH ۶.۵، دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد و مقدار فعالیت۵۰۰۰ واحد به ازای یك لیتر آب پنیر انتخاب شد. پس از رساندن دمای آب پنیر به ۴۰ درجه سانتی‌گراد، به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط،۰/۱۷ میلی‌لیترآنزیم اضافه گردید و در دمای ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد

۱. Pre-culture ۲. Di-Nitro-Salicylic Acid

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-23]

در بن ماری شیکردار در دور ۳۲۰rpm و تا مدت ۸ ساعت نگهداری شد. هر یک‌ساعت، میزان گلوکز حاصل از هیدرولیز با کیت گلوکز اکسیداز (شرکت شیم آنزیم- تهران- ایران) اندازه‌گیری شد. چون پس از رساندن pH آب پنیر به ۶/۵، آب پنیر رسوب می‌داد، به دلیل بررسی اثر این رسوب از دو متد استفاده شد. در روش اول آنزیم بعد از رسوب‌زدایی آب پنیر با سانتریفیوژ در دور ۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه و در روش دوم همراه با رسوب، اثر داده شد. پس از تنظیم pH، محیط به مدت ۱۲ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شد. محلول‌های نمکی نیز ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ °C استریل گردید و پس از سرد شدن به یک‌دیگر اضافه شدند [۲۴].

تعیین محیط کشت واجد آب پنیر مناسب با ترکیبات مختلف

به منظور تعیین محیط کشت حاوی آب پنیر مناسب برای تولید رامنولیپید ترکیبات مختلفی را وارد محیط کشت کرده تا بهترین محیط مشخص گردد. یک سری محیط با پروتئین و رسوب و دیگری بدون پروتئین و یا پروتئین کم‌تری تهیه شدند. چون پروتئین‌های آب پنیر منبع نیتروژنی هستند به بعضی از محیطها نیتروژن اضافه شد. جدول ۱ میزان ترکیبات خشک آب پنیر مصرفی را بیان‌گر است.

در ضمن چون آب پنیر دارای نمک‌های مختلفی است به بعضی از محیطها، نمک‌های محیط 3M به طور کامل اضافه شد و به بعضی از محیطها نمک‌های محیط 3M به جز آن‌هایی که در آب پنیر به مقدار مورد نیاز وجود داشت اضافه گردیدند. این محیطها پس از تنظیم شرایط در pH ۷ و میزان تلقیح (v/v) ۲% از محیط پیش کشت بامیزان جذب نوری $OD_{۶۱۰,nm}$ = ۱ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و میزان همزدن ۲۰۰ $rev.min^{-1}$ به مدت ۸۰ ساعت در درون شیکر- انکوباتور گرمخانه‌گذاری شده و ارزیابی شدند [۲۴].

ترکیب محیطها به قرار زیر بود:

۱- محیط سانتریفیوژ شده و پروتئین‌گیری شده با نمک‌های معدنی محیط 3M با منبع نیتروژن $NaNO_3$.

۲- محیط سانتریفیوژ شده همراه با تنها نمک‌های Mg، Mo، Cu، Co، Mn و $NaNO_3$ به مقدارموجود در ترکیب 3M .

۳- محیط سانتریفیوژ نشده بدون نمک‌های 3M و بدون منبع نیتروژنی.

۴- محیط سانتریفیوژ نشده با تنها نمک‌های Mg، Mo، Cu، Co، Mn و $NaNO_3$ به مقدارموجود در ترکیب 3M .

۵- محیط سانتریفوژ نشده با همهٔ نمک‌های محیط 3M و منبع نیتروژنی $NaNO_3$.

۶- آب پنیر خالص بدون اضافه کردن آنزیم و بدون نمک‌ها.

به منظور جداسازی باکتری‌ها از محیط کشت پس از تولید و اتمام زمان گرماخانه‌گذاری محیط کشت با دور ۶۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی برای انجام کلیه آزمایش‌های استفاده شده قرار گرفت [۲۲]، [۲۴].

۱.Alfalaval

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-23]

تعیین توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام (سنجش کیفی)

در این آزمایش ۵ میلی‌لیتر از مایع رویی به داخل لوله‌های با قطر یکسان ریخته شد و pH آن با سود ۲ نرمال به ۷ رسانده شد. سپس ۵ میلی‌لیتر نفت خام به لوله‌ها اضافه گردید. این مخلوط به مدت یك دقیقه باشیکر لوله کاملا همگن شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۰ ـ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این زمان درصد امولسیفیکاسیون از تقسیم طول لایه نفت امولسیفای شده به طول کل مخلوط به‌دست آمده و در ۱۰۰ ضرب شد. برای تمامی نمونه‌ها یك نمونه استاندارد که از ۵ میلی‌لیتر آب + یك قطره Span + ۵ میلی‌لیتر نفت خام تشکیل شده بود و یك شاهد که محیط مایع رویی مورد آزمایش بدون تلقیح میکروارگانیسم بود در نظر گرفته شد [۲۳]، [۲۴]، [۲۵].

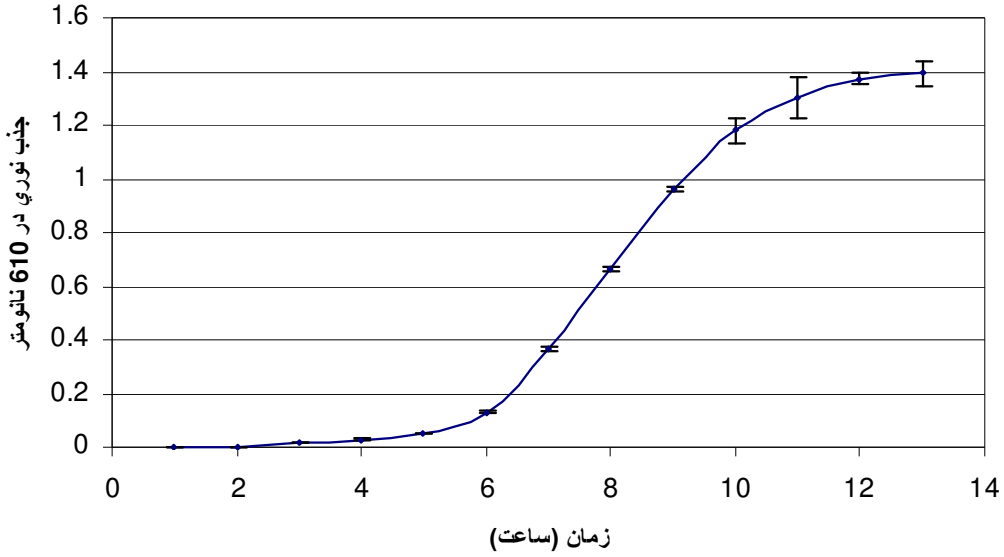
اندازه‌گیری قند رامنوز به روش فنل سولفوریك اسید (سنجش کمی)

ابتدا باید قند از لیپید در رامنولیپید جدا می‌شد. برای این کار pH مایع رویی با استفاده از اسید کلریدریك ۲.۵ نرمال به ۲ رسانده شد و به‌منظور جداسازی بهتر به مدت یك شبانه روز در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری گردید. برای سنجش قند رامنوز ۳ میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته شده و با دی اتیل اتر سرد با حجم مساوی مخلوط شده فاز رویی (آلی) استخراج گردید. این عمل سه بار تکرار شد تا قند کاملا جدا شود. این حلال در هوای آزاد تبخیر گردید [۴] ، [۲۶]، [۳۰] . رسوب به‌دست آمده در ۳ میلی‌لیتر $NaHCO_3$ ۰/ ۱ مولار حل گردید تا به غلظت اصلی برسد. ۲ میلی‌لیتر از محلول قندی برداشته و ۱ میلی‌لیتر فنل ۵ % به آن اضافه شد. سپس ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریك غلیظ (۹۸%-۹۵%) به محلول فوق اضافه گردید این عمل با سرعت انجام پذیرفت تا تشکیل بخار نمایان شود. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه به حالت سکون نگهداری شد تا واکنش‌های لازم انجام پذیرد. پس از این مدت برای به دست آوردن محصول یك‌نواخت، لوله‌ها همگن شده سپس در آب ۳۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد سرد گردیده، جذب نوری آن‌ها در طول موج ۴۸۰nm اندازه‌گیری شد. به دلیل غلظت بالای قند در نمونه‌ها محلول‌های قندی اولیه در $NaHCO_3$ ۰/۱ مولار به میزان ۱۰ تا ۱۰۰ برابر رقیق شدند [۲۳]،[۲۴].

نتایج و بحث

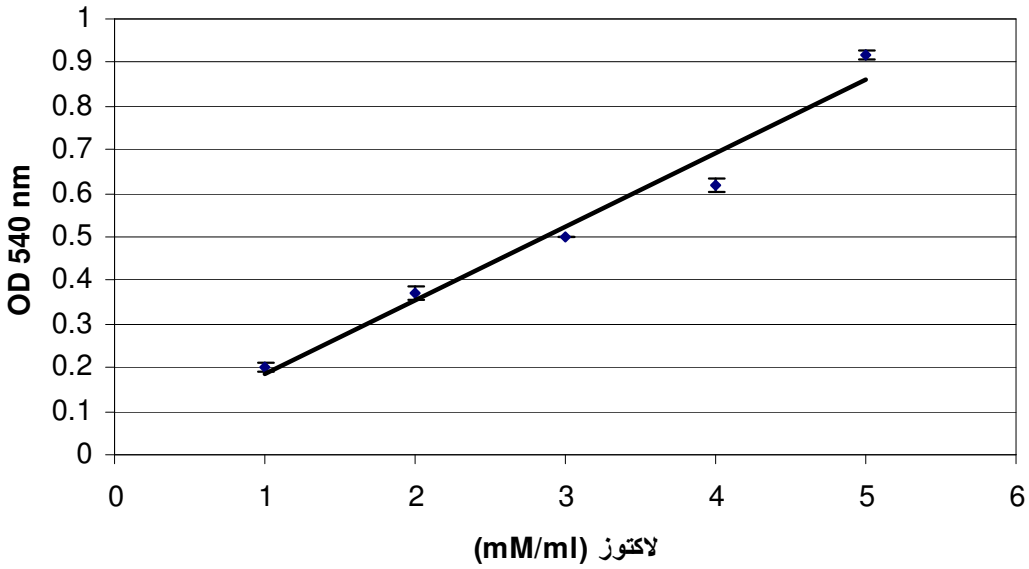
منحنی رشد سودوموناس آئروژینوزا طبق روش مذکور ترسیم شد. با توجه به نمودار ۱، بهترین زمان تلقیح که جذب آن در $OD_{۶۱۰nm}$ برابر با ۱ باشد زمان ۹ ساعت بوده که در انتهای فاز لگاریتمی و ابتدای فاز استراحت است.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-23]



نمودار ۱. منحنی رشد باکتری سودوموناس آئروجینوزا.Error bar ها نشان‌دهندهٔ انحراف معیار۳ تکرار است

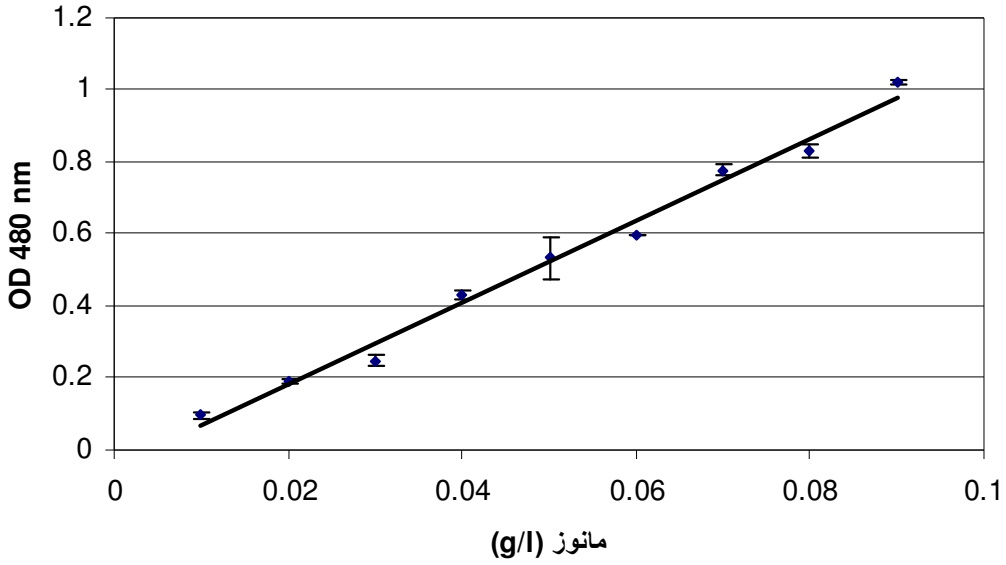
منحنی استاندارد قند لاکتوز به‌صورت نمودار ۲ حاصل شد که طبق آن لاکتوز موجود در آب پنیر ۴۶ گرم در لیتر است.



نمودار ۲. منحنی استاندارد قند لاکتوز. Error barها نشان‌دهندهٔ انحراف معیار ۳ تکرار است

در مورد منحنی استاندارد قند رامنوز از غلظت‌های ۰/۰۹ ـ ۰/۰۱ گرم در لیتر استفاده شده و به روش فنل سولفوریك اسید میزان جذب آن در $OD_{۴۸۰nm}$ طبق نمودار ۳ به‌دست آمد.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-23]



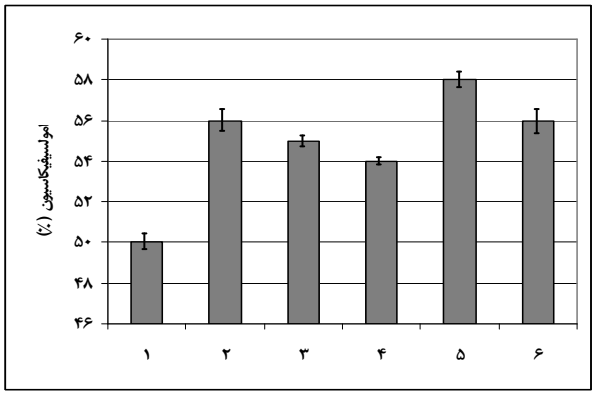
نمودار۳. منحنی استاندارد قند رامنوز Error barها نشان‌دهندهٔ انحراف معیار ۳ تکرار است

هیدرولیز آنزیمی آب پنیر با آنزیم لاکتاز 3000 L HPG

در این بررسی هم از آب پنیر بدون رسوب گیری و هم از آب پنیر رسوب گیری شده استفاده گردید. نتایج نشان داد که هیدرولیز در آب پنیر با رسوب، بیشتر است و بیشترین میزان هیدرولیز در ۴ ساعت انجام پذیرفت که میزان هیدرولیز در این زمان ۱۰۰% بوده و به طور کامل یك مول لاکتوز به یك مول گلوکز و یك مول گالاکتوز تبدیل شد.

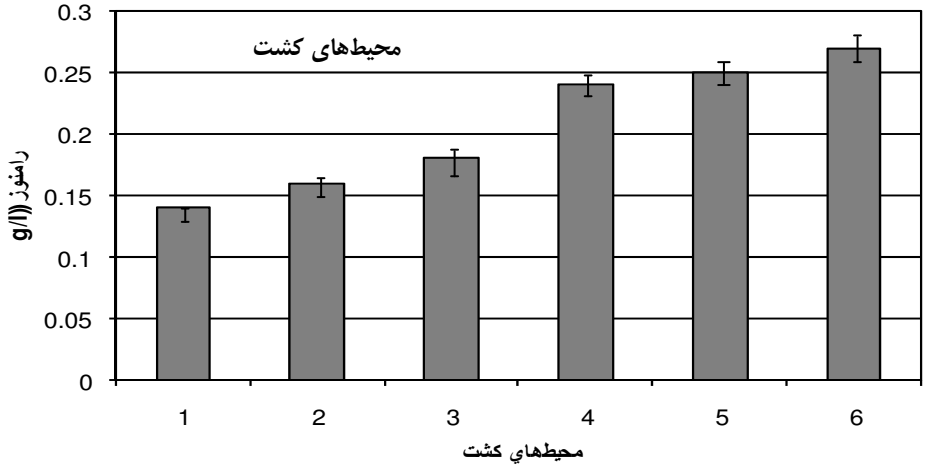
تعیین محیط کشت حاوی آب پنیر مناسب در تولید رامنولیپید

طبق روش کار بیان شده بهترین محیط، محیط حاوی آب پنیر هیدرولیز شده دارای تمامی نمك‌های موجود در محیط 3M و همچنین دارا بودن $NaNO_3$ به‌عنوان منبع نیتروژنی (محیط ۵) انتخاب شد که در همهٔ آزمایش‌ها هم از این ترکیب استفاده گردید. در این محیط میزان قند رامنوز تولید شده ۰/۲۵۳گرم در لیتر و درصد امولسیفیکاسیون نفت خام حدود ۶۰ % است (نمودارهای۴ و ۵).



نمودار۴. تاثیر محیط‌ها کشت مختلف بر توانایی امولسیفیکاسیون نفت Error barها نشان‌دهندهٔ انحراف معیار ۳ تکرار است

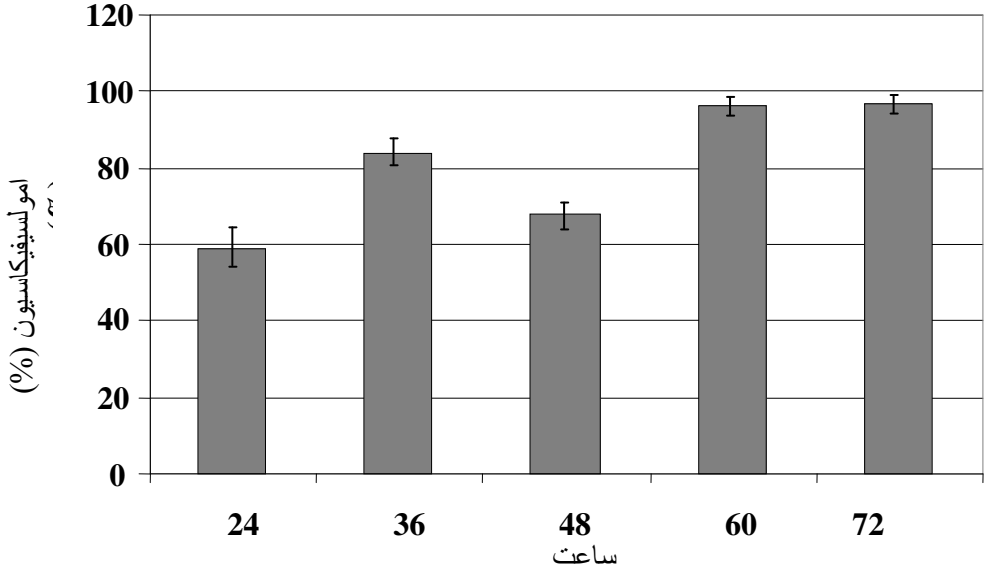
[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-23]



نمودار۵. تاثیر نمک‌های معدنی مختلف حاوی آب پنیر بر تولید رامنولیپید (سنجش شده بر اساس رامنوز)
Error barها نشان‌دهندهٔ انحراف معیار ۳ تکرار است

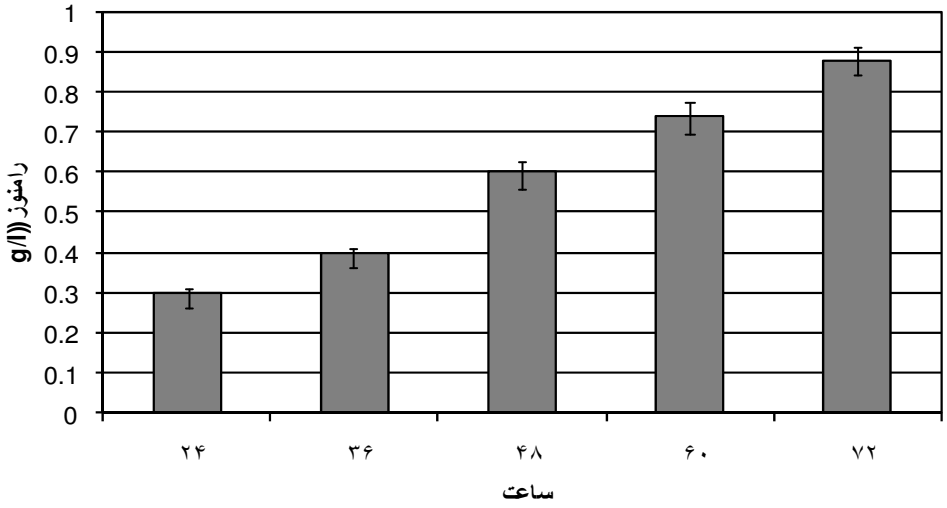
تاثیر زمان در تولید رامنولیپید

در این بررسی بین زمان‌های ۲۴ تا ۷۲ ساعت بررسی شد و طبق نتایج حاصل، مناسب‌ترین زمان تولید بین ۶۰ و ۷۲ ساعت است. میزان قند رامنوز تولید شده ۰/۷۳۹ گرم در لیتر و درصد امولسیفیکاسیون نفت خام حدود ۹۷% به‌دست آمد. کمترین میزان تولید را منولیپید در زمان ۲۴ ساعت است و با گذشت زمان بر میزان تولید محصول اضافه شده تا در ۶۰ ساعت به ماکزیمم مقدار خود می‌رسد (نمودارهای ۶ و ۷).



نمودار۶. تاثیر زمان‌های مختلف گرمخانه گذاری بر تولید رامنولیپید (سنجش توانایی امولسیفیکاسیون نفت)

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-23]



نمودار ۷. تاثیر زمان‌های مختلف گرمخانه گذاری بر تولید رامنولیپید

با آزمایش‌هایی که در مورد توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام انجام شد مشخص گردید هر چه میزان مایع رویی حاوی رامنولیپید بیش‌تر شود نفت خام نیز بیش‌تر امولسیفای شده و با ارتفاع کم‌تری در لوله‌های آزمایش مشاهده گردیده و در لوله‌های حاوی مایع رویی کم‌تر که حاوی رامنولیپید کم‌تری نیز است نفت، قسمت اعظم لوله را فرا می‌گیرد.

بسیاری از میکروارگانیسم‌ها توانایی تجزیه هیدروکربن‌ها را با تولید بیوسورفاکتانت‌های خارج سلولی دارا هستند که نقش مهمی در تجزیه مواد نا محلول در آب به وسیلهٔ امولسیفیکاسیون دارند. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که آب پنیر سوبسترای مناسبی برای تولید بیوسورفاکتانت خارج سلولی با باکتری سودوموناس ائروژینوزا MM 1011 است. میزان رشد در آب پنیر بیش‌تراز پساب‌های دیگر و محیط سنتزی است و این احتمالاً به دلیل در دسترس بودن بهتر نیتروژن در آب پنیر، در مقایسه با محیط‌های سنتزی است [این نتایج با نتایج دیگر محققان مطابقت دارد[۲۶]،[۲۴].

در رابطهٔ با سودوموناس ائروژینوزا و تولید رامنولیپید میزان C/N اهمیت زیادی دارد. طبق نظریهٔ گورا سنتوز و همکارانش در سال ۱۹۸۴ بهترین میزان C/N برابر۱۸ است و تولید در C/ N کم‌تر از ۱۱ خیلی کم است و در این تحقیق تولید درC/N:۱۷ مشاهده شد. دررابطه با منابع کربنی مختلف مثل ملاس، شیره خرما، اتانول، روغن‌های گیاهی، گلوکز و گلیسرول، منبع کربنی آب پنیر منبع ارزانقیمت و اقتصادی‌تری است و علاوه بر قیمت ارزان آن با استفاده از آب پنیر مشکل آلوده کنندگی آن هم حذف می‌شود و مقرون به صرفه‌تر است.

در بررسی‌های انجام شده مشخص شد که از میان محیط‌های پایه مختلف، محیط 3M با منبع نیتروژنی $NaNO_3$ بهترین محیط پایه است]. منبع کربنی این محیط لاکتوز هیدرولیز شده در آب پنیر است.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-23]

در بررسی‌هایی که برای یافتن بهترین زمان برای تولید رامنولیپید انجام شد مشاهده شد که در ۶۰ ساعت بالاترین میزان تولید و در ۷۲ ساعت اندکی کاهش می‌یابد. این احتمالاً بیان‌گر آن است که باکتری از رامنولیپید به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاه کرده است.

در مورد استفاده از منبع نیتروژنی با توجه به نتایج مشاهده شد، اضافه کردن نیتروژن به میزان کم باعث افزایش تولید می‌شود که احتمالاً به این دلیل است که به دلایلی منابع نیتروژنی موجود در آب پنیر از دسترس سلول باکتری خارج هستند و یا آنزیم لاکتاز اضافه شده ممکن است تاثیراتی روی منابع نیتروژنی داشته و یا آن را غیر قابل مصرف نماید. چون پس از بالا بردن pH و اضافه کردن آنزیم، رسوبی حاصل شده و از حالت حلالیت کامل خارج می‌شود، ممکن است بدین صورت نیتروژن آب پنیر خارج از دسترس باکتری قرار گیرد و تاثیر گذار نباشد و این با آزمایشات مشخص شد.

علاوه بر منابع نیتروژنی، آب پنیر حاوی املاح مختلفی است که بعضی از این املاح در محیط پایه3M وجود دارند بنابراین با اضافه کردن آب پنیر به محیط کشت، این املاح هم اضافه می‌شدند.

در سال ۱۹۸۶ همچنین ثابت کردند که با محدودکردن غلظت‌های نمک‌های منیزیم، کلسیم، سدیم، پتاسیم و عناصر نادر، بازدهٔ رامنولیپید DSM 265 سودوموناس ائروژینوزا بهتر می‌شود. در این تحقیق هم با استفاده از محیط 3M که میزان نمک‌های آن در حد میکروگرم هستند نیز این شرایط وجود دارد.

در روش‌های سنجش مهمترین روش‌ها، سنجش قند به روش فنل سولفوریك اسید و امولسیفیکاسیون نفت خام است که نتایج تقریبا مشابهی را نشان دادند.

نتایج تحقیقات زهانگ[۱] در سال ۱۹۹۲ و هیویین[۲] در سال ۲۰۰۹ نشان داد که pH مناسب ۷/۵-۶/۵ است و ساختار رامنولیپید به pH در دامنهٔ ۸-۶ حساس است. در pH کمتر از۶ بخش رامنوزیل حد اقل۵۰% فاقد بار و رامنولیپیدها به شکل وزیکول‌های مشابه لیپوزوم هستند. در pH بین ۶ و ۶/۶ رامنولیپیدها به شکل ساختار دو لایه‌ای یا لیپید مجتمع است و در pH بالای ۶/۸ هنگامی که بخش رامنوزیل بار منفی دارد شکل میسلی نمایان می‌شود.

در رابطه با دمای مناسب چون سودوموناس ائروژینوزا باکتری مزوفیل است، در دمای۳۷-۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد بیش‌ترین میزان تولید را دارد.

طبق نظریهٔ کوچ[۳] و همکاران (۱۹۸۸) و بابو[۴] و همکارانش (۱۹۹۶) بهترین میزان تلقیح هنگامی است که میزان جذب در OD۴۸۰ نانومتر برابر ۱ باشد و با آزمایش‌هایی که در این تحقیق انجام شد ، پس از ۹ ساعت گرمخانه‌گذاری این میزان به یك رسید. طبق نمودار منحنی رشد سودوموناس ائروجنیوزا ملاحظه شد که

۱. Zhang ۲. Hua Yin ۳. Koch ۴. Babu

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-23]

زمان ۹ ساعت دقیقاً در انتهای فاز لگاریتمی و ابتدای فاز استراحت که بیش‌ترین میزان تولید است قرار دارد و این دو جواب با هم منطبق است و تولید محصول خوبی نتیجه می‌شود .

ترکیب رامنولیپید تولیدی قند رامنوز و اسید چرب است. درگزارش نتایج در این تحقیق ، میزان بیوسورفاکتانت تولیدی به صورت میزان رامنوز گزارش شده است. طبق نظریه گورا سنتوز و همکارانش در سال ۱۹۸۶ نسبت بین رامنوز و رامنولیپید بدین صورت است که ۳۰۰ میلی گرم رامنوز برابر با ۶۸۵ میلی گرم رامنولیپید است که تقریباً بیشتر از دو برابر است.

همچنین طبق نظریه مرسد[1] و همکارانش در سال ۱۹۹۳ ، راشدی و همکارانش در سال ۲۰۰۶ برای تعیین میزان رامنولیپید از روی میزان رامنوز از یك ضریب ۳ استفاده می‌شود که نسبت رامنولیپید به رامنوز است که این مقدار بسیار تقریبی و تخمینی است. این نظریه برای اولین بار به‌وسیلهٔ منرسا[2] و همکارانش نیز در سال ۱۹۹۱ گزارش شد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق از باکتری سودوموناس ائروژنیوزا برای تولید رامنولیپید استفاده شد. به‌طورکلی تحقیق فوق بیان‌گر آن بود که از ترکیبی با ارزش غذایی فراوان چون آب پنیر، می‌توان برای تولید بیوسورفاکتانت استفاده نمود. از منبع کربنی آب پنیر به‌عنوان محیط پایه استفاده شد و چون سویه مورد نظر قادر به استفاده ازقند لاکتوزآب پنیر نبود هیدرولیز آنزیمی روی آب پنیرصورت پذیرفت و از هیدرولیزات حاصل در آزمایش‌ها استفاده گردید. در شرایط مختلف، تولید رامنولیپید با روش فنل سولفوریک اسید بررسی شد. همچنین تاثیر رامنولیپید بر امولسیفیکاسیون نفت خام نیز بررسی و تأیید گردید. آب پنیر به اندازه ملاس(گزارش تحقیق قبل) به‌عنوان منبع کربن و انرژی اهمیت دارد و میزان تولید رامنولیپید نیز در هر کدام از منابع کربن و انرژی ذکر شده تقریباً مساوی است.

منابع

1. G. Goorgiou, S. C. Lin and M.M. Sharma, Surface Active compound from Microorgnisms Biotechnology, Vol. 10 (1992) 16.
2. D. Jitendra Desai and I.M. Banat, *MicrobiaL Production of Surfactants and Their Commercial Potential*, Microb, and Mol. Biol. Rev, Vol.61(1997) 47.
3. D. Jitendra, *Production of Biosurfactants*, Surf. Sci. Series, Vol.48 (1993) 65.
4. W.R. Finnerty and M. E. Singer, Biotch, *A microbial biosurfactant physiology*, biochemistry and applications.Vol.21 (1983) 47.

۳. Mercade ۴. Manresa

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-23]

5. N. Kosaric, Biosurfactant: *Production, properties*, applications, Appl. Chem , Vol.64(1992) 1731.

6. J. Parra, I. Guinea, M. A. Manresa; M. Robert; M. E. Mercade; F. Comelles and M. P. Bosch, *Characterization and Physicochemical Behavior of Biosurfactants*, JAOCS, Vol.66 (1998)32.

7. K. Rolf, *Application of Biosurfactant*, Surf. Sci. Series, Vol. 48 (1993) 3.

8. F. Rosenberg & E.Z. Ron, *High- and Low-molecular-mass microbial surfactants*, Appl. Microbiol. Biotechnol, Vol.52 (1999) 154.

9. Hans; J. Daniel, M. Reuss and C. Syldatk, *Production of Sophorlipids in High Concentration from Deproteinized Whey and Rapeseed Oil in a Two Stage Fed Batch Process Using Candida Bombicola ATCC 22214 and Cryptococcus Curvatus ATCC 20509*, Biotech. Letters, Vol.: 20 (1998) 1153.

10. B. Webb; N.G. Johnson & Alford, *Fundamental of Dairy Chemistry*. West port. Conn., *AVI,* Vol.78 (1974) 989.

11. C.N. Mulligan and B.F.Gibb, *Factors Influencing the economics of Biosurfactant*, Sci. Ser, Vol.48 (1993) 329 .

12. A.Fiechter, A.wards, Biosurfactants: *moving towards industrial application* ,TIBTECH, Vol.10 (1992) 23.

13. C. Sung, Lin, J. Chem. Tech, *Biosurfactants: Recent Advances, Biotechnol*. Vol. 66 (1996) 109.

14. W. Brummer, G.Gunzer, *Laboratory Techniques of Enzyme Recovery in Biotechnology*. Enz. Tech., Vol.7 (1987) 213.

15. D. Haferburg, R. Hommel; H.P. Kleber; S. Kluge; G. Schuster, and H.J. Zschiegner, *Degradation and Synthesis Sinetics of Quorum-Sensing Auto inducer in Pseudomonas aeruginosa Cultivation*, Acta Biotechnol, Vol.7(1987) 353.

16. H. Kim, B.D. Yoom, C.H. Lee; H.H. Sult; H.M. Oh; T. Katsuragi; And. Y. Tanp, *Production and Properties of Lipopeptide Biosurfactant from Bacillus subtilis C9*, J. of Ferm, and Bioeng, Vol. 84 (1997) 41.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-23]

17. A. Koch, J. Reiser; O. kappeli and A. Fiechter, *Genetic Construction of Lactose–Utilizing strains of Pseudomonas aeruginosa and their Sapplication in Biosurfactant production*, Biotech, Vol. 6(1998) 1335.

18. N.J. Pallroli, *Bergy's Mannual of Systematic Bacteria*, (1980) 141-165.

19. J. Brodsky, A.G. Wassink, *Development and Evaluation of Whole Cell Yeast Lactose for Use in Dairy Processing*, Food Science, Vol.51 (1986) 829.

20. L.H. Guerra–Santos, O. Kappeli and A.Fiechter, *Dependence of Pseudomonas aeruginosa Continuous Culture Biosurfactant Production on Nutritional and Environmental Factors*, Appl. Microbiol. Biotechnol, Vol. 24 (1986) 443.

21. M.E. Mangino, Zadow, *Properties of Whey Concentrates in Whey and Lactose Processing*, J. G. Elsevir, London (1992).

22. M.E. Mercade, M. A. Manresa; M. Robert; M. J. Espuny; C. De Anders & Guinea, Olive Oil Mill Effluent (OOME), *New Substrate for Biosurfactant Production*, J. Biores, Tech, Vol.43 (1993) 1.

23. M. Dubois, K. A. Glues, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, Fred Smith, March, *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*, Analytical Chemistry, Vol. 28 (1956) 32.

24. P.S. Babu, A. N.Vaidya, A. S. Bai, R. kapur, A. Juwarkar, P. Khanna, *Kinetics of Biosurfactant, Production by Pseudomonas aeruginosa Strain BS2 from Industrial Wastes*, Biotech. Letters, Vol.18 (1996) 263.

25. G.L. Ghurye, C. Vipulanadan and R.C. Willson, *A Practical Approach to Biosurfactant Production Using Nonaseptic Fermentation of Mixed Cultures*, Bioeng, Vol.44 (1994) 661.

26. D.S.Francy, J. M. Thomas; R.L. Raymond; and C.H.Ward, *Emulsification of Hydrocarbons by Subsurface Bacteria*, J. of Indus. Microbio, 8 (1991) 237.

27. 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, Vol. 51 (1991) 220.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-23]

28. 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*, J. of Indus. Microb, Vol.8(1991) 133**.**

29. H.E. Rashedi, Jamshidi, M. Mazaheri Assadi, andB. Bonakdarpour, *Biosurfactant Production with Glucose as a Carbon Source*, Chem.Biochem. Eng. Q. Vol.20 (2006**)** 99.

30. H. 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.,* Iran. J. Chem. Eng, Vol.25 (2006) 25.

31. Hua Yin, Jing Qiang, Yan Jia, Jinshao Ye, Hui Peng, Huaming Qin, Na Zhang, Baoyan He., *Characteristics of biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa S6 isolated from oil-containing wastewater*, Process Biochem.Vol.44 (2009) 302.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-07-23]