بررسی تولید رامونولیپید توسط میکروارگانیسم *سودوموناس ائروجینوزا* جدا شده از مخازن نفتی

حمید راشدی*+، اسماعیل جمشیدی
تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی شیمی

مهناز مظاهری اسدی
تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده بیوتکنولوژی

بابک بنکدارپور
تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی شیمی

چکیده: دراین تحقیق ازمیکروارگانیسم‌های جداسازی شده ازچاه‌های نفت ایران جهت تولید بیوسورفاکتانت استفاده شد. پس از جداسازی این میکروارگانیسم و شناسایی آن معین شد که از نوع سودوموناس ائروجینوزا (P.aeruginosa) است. هدف از این تحقیق، بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری سودوموناس ائروجینوزا به منظور تولید رامونولیپید است که برای این کار از محیط نمک‌های معدنی استفاده شده است و در این آزمایش‌ها فاکتورهای متفاوت مورد بررسی قرار گرفته است. در آزمایش‌های انجام شده به منظور بررسی بهترین محیط کشت برای تولید رامونولیپید به‌وسیله‌ی باکتری سودوموناس ائرجینوزا، مشاهده شد در بین محیط نمک‌های معدنی ۱M، ۲M، ۳M و ۴M، بهترین محیط کشت، محیط ۳M است که در آن از گلوکز به‌عنوان منبع کربنی استفاده شده است. در بررسی‌های انجام شده درمورد تولید رامونولیپید در زمان‌های متفاوت گرمخانه‌گذاری درشرایط درصد تلقیح =۲، C/N = ۱۶ ، ۲۰۰rpm= میزان هوادهی، pH = ۶٫۸ و ۳۰°C = دما، مشخص شد که بیشترین میزان تولید در محیط ۳M واجد ملاس در زمان ۹۶ ساعت انجام می‌گیرد. در آزمایش‌های انجام شده بیشترین درصد امولسیفیکاسیون نفت خام ۸۲٫۵ بوده که درشرایط C/N = ۲۸ ، ۲= درصد تلقیح، ۲۰۰rpm= میزان هوادهی، pH = ۷٫۵ و ۳۵°C = دما است.

واژه‌های کلیدی: *بیوسورفاکتانت، رامونولیپید، سودوموناس ائروجینوزا، ملاس، محیط نمک‌های معدنی.*

KEY WORDS: *Biosurfactant, Rhamnolipid, Pseudomonas aeruginosa, Molasses, Mineral Solution.*

مقدمه

بیوسورفاکتانت‌ها، مولکول‌های آمفی‌فیلیک هستند که شامل بخش‌های هیدروفوبیک و هیدروفیلیک باشند که بخش هیدروفیلیک آنها در سرمولکول که قطبی است قرار گرفته و بخش هیدروفیلیک (لیپوفیلیک) آنها در انتهای مولکول، که غیرقطبی است. بخش هیدروفیلیک می‌تواند شامل یک کربوهیدرات، یک آمینواسید، یک پپتید حلقوی، یک فسفات، یک کربوکسیلیک اسید، الکل و ... و بخش هیدروفوبیک شامل اسیدهای چرب با زنجیره بلند، اسیدهای چرب هیدروکسیل‌دار یا

*عهده دار مکاتبات
+E-mail: Rashedi@tco.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

آلفا ـ آلکیل ـ بتا ـ هیدروکسی اسید چرب باشد [۱، ۳ و ۵].

ویژگی یک سورفاکتانت، از تعادل بین بخش‌های هیدروفیلیک و هیدروفوبیک آن تعیین می‌شود به همین دلیل، بیوسورفاکتانت‌ها می‌توانند در مرز بین فازهای مایع مانند نفت / آب با درجه‌های متفاوت قطبیت و پیوندهای هیدروژنی قرار گیرند [۳ و ۵].

بیوسورفاکتانت‌ها به دلیل دارا بودن مزیت‌هایی از قبیل: سمیت پایین نسبت به بیوسورفاکتانت‌های شیمیایی، قابلیت تجزیه بیولوژیک، بالا بودن قدرت تولید کف، سازگاری بهتر با محیط (فعالیت ویژه در دماهای بالا، pH و درجه شوری)، قابلیت دسترسی آسان به دلیل تنوع ساختاری و توانایی سنتز شدن از منابع غذایی گوناگون نسبت به سورفاکتانت‌های سنتتیک شیمیایی ارجحیت دارند [۲و۹].

بیوسورفاکتانت‌ها به دلیل کاربرد وسیع در صنایع متفاوت از قبیل: پتروشیمی، داروسازی، پزشکی، آرایشی، غذایی، کشاورزی، نساجی. چرم‌سازی وکاغذ و ... از اهمیت بسیار بالایی برخوردارند. بیوسورفاکتانت‌ها توسط برخی باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای در طول رشد روی منابع کربنی متفاوت به‌ویژه مواد هیدروفوبیک مانند هیدروکربن‌ها تولید می‌شوند. آنها هیدروکربن‌ها را در محیط رشدشان امولسیفیه می‌کنند تا بتوانند به سهولت آنها را مصرف کنند [۱۲].

این بیوسورفاکتانت‌ها نه تنها خارج سلولی بوده بلکه نقش مهمی در تجزیه مواد غیر محلول در آب به واسطه عمل انحلال کاذب یا امولسیفیکاسیون بازی می‌کنند که این خاصیت برای کمپلکس هیدروکربن‌های آلیفاتیک و آروماتیک، اختصاصی است و یک مرحله مهم در مصرف هیدروکربن‌ها است [۵ و ۷]. از نشریات علمی بر می‌آید چند سویه از *سودوموناس‌ها* یافت شده‌اند که مواد فعال سطحی تولید می‌کنند. این ترکیب‌ها از نوع گلیکولیپید هستند. ویژگی‌های شیمیایی این ماکرومولکول‌ها زمانی که *سودوموناس* روی منابع کربن هیدروفوبیک یا لیپوفیلیک رشد می‌کند باعث شده آنها را به رامونولیپیدها نسبت دهند (*Jarnis* و *Jhonson* سال ۱۹۴۹) [۳و۶].

سویه‌های مشخصی از *سودوموناس‌ها* شناخته شده‌اند که مقدارهای زیادی از گلیکولیپیدها را شامل یک یا دو مولکول *Rhamnose* متصل به یک یا دو مولکول بتا ـ هیدروکسی دکانوئیک اسید به‌نام رامونولیپیدها تولید می‌کنند [۱۹].

هدف از این تحقیق، بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری *سودوموناس ائروجینوزا* به منظور تولید رامونولیپید است که برای این کار از محیط نمک‌های معدنی استفاده شده است و در این آزمایش‌ها فاکتورهای متفاوت مورد بررسی قرار گرفته است. در آزمایش‌های انجام شده به‌منظور بررسی بهترین محیط کشت برای تولید رامونولیپید توسط باکتری *سودوموناس ائرجینوزا*، مشاهده شد در بین محیط نمک‌های معدنی ۱M، ۲M، ۳M و ۴M بهترین محیط کشت، محیط ۳M است که در آن از گلوکز به‌عنوان منبع کربنی استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

برای انجام آزمایش‌های بهینه‌سازی شرایط تولید بیو-سورفاکتانت رامونولیپید توسط باکتری *Pseudomonas aeruginosa* از مواد و محیط‌های کشت زیر که ازکارخانه‌های Merck آلمان تهیه شده استفاده شده است :

میکرواورگانیسم مورد استفاده

سویه‌ای که برای تولید رامونولیپید استفاده می‌شود *Pseudomonas aeruginosa* است. این باکتری از چاه‌های نفت ایلام و سیری جداسازی شده است.

محیط‌های کشت مورد استفاده

محیط نمک‌های معدنی[۱] ۱M، ۲M، ۳M و ۴M.

برای تهیه محیط‌های ذکر شده، بهتر است کلیه نمک‌های معدنی و عنصرهای جزیی ذکر شده در جدول ۱ جداگانه در آب مقطر حل شده سپس به یکدیگر اضافه شده و به مدت ۱۲ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو و پس از سرد شدن به محلول قندی اضافه شوند.

نکته‌ای که در مورد تهیه این محیط‌ها باید مورد توجه قرار گیرد این است که در اثر زمان زیاد اتوکلاوگذاری به دلیل وجود گلوکز در محیط، واکنش میلارد اتفاق می‌افتد که باعث کاراملیزه شدن قند محیط شده و قند از محیط خارج شده و رنگ محیط نیز قهوه‌ای می‌شود. پس به منظور جلوگیری از این واکنش، ابتدا گلوکز را جداگانه در آب حل کرده و به مدت ۵ دقیقه در در دمای ۱۱۵ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو کرده و تحت شرایط استریل به محلول‌های نمکی اضافه می‌شود.

(۱) Mineral Salt Medium

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱ـ محیط‌های مورد استفاده در این تحقیق.

Per(g) Glucose	Medium			
	۱M	۲M	۳M	۴M
$(NH_4)_2SO_4$(mg)	۲۲۰	۲۲۰	۱۳۷/۵	۱۳۷/۵
$NaNO_3$(mg)	۱۱۰	۱۶۲		
K_2HPO_4(mg)	۵۵			
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$(mg)	۲۲۰	۲۲	۲۲	۱۱
KCl(mg)	۱۱	۵۵	۵۵	۲۷/۵
NaCl(mg)		۵۵	۵۵	۲۷/۵
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$(mg)	۱۱	۲/۷۵	۲/۷۵	۱/۴
Yeast exteract (mg)	۰/۶۶			
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$(μg)	۱/۱		۲۷/۵	۲۷/۵
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$(μg)	۸۲/۵	۱/۱	۸۲/۵	۵/۸۲
$MnSO_4 \cdot 7H_2O$(μg)	۸۲/۵	۸۲/۵	۸۲/۵	۸۲/۵
H_3BO_3(μg)	۱۶/۵	۸۲/۵	۱۶/۵	۱۶/۵
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$(μg)	۸/۳	۱۶/۵	۸/۳	۸/۳
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$(μg)	۸/۳	۸/۳	۸/۳	۸/۳
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$(μg)	۵/۵	۸/۳	۵/۵	۵/۵
H_3PO_4(π=۱/۷۱ gml^{-1})(μl)		۵/۵	۸/۲۵	
Glucose	۱۸/۲			
D.w	۱۰۰۰Ml			
*p*H	۷±۰/۲			
Shakering rate	۱۵۰, ۲۰۰, Rpm			
Temp	۳۰ °C±۱			
Time	۹۶ h			

دستگاه‌ها

لامینرفلو (Laminar Air Flow) مدل LB۲۴۴۸ ساخت کارخانه Holten دانمارک.

اسپکتروفتومتر Pharmacia Biotech Novaspecll ساخت انگلستان.

شیکر و انکوباتور Gallenkamp ساخت انگلستان.

سانتریفوژ یخچال‌دار ساخت کارخانه Shimadzu ژاپن.

ورتکس Heidolph ساخت آلمان.

ترازوی مدل Libror EB۴۳۰۰D ساخت کارخانه Shimadzu ژاپن.

آون خلاء ساخت کارخانه Heraeus سوئد.

اتوکلاو ساخت کارخانه Gettinge سوئد.

فور ساخت کارخانه Memmert آلمان.

دستگاه NMR ساخت کارخانه Varian آمریکا.

دستگاه Mass Spectrometry مدل Finningan TSQ–۷۰ ساخت آمریکا.

بن ماری شیکردار GCA/Precision Scientific ساخت آمریکا.

مقایسه‌ی میزان تولید رامونولیپید در محیط های کشت ۱M، ۲M، ۳M و ۴M

این آزمایش به منظور انتخاب محیط بهینه برای تولید رامونولیپید انجام شد که در بخش نتیجه‌ها مورد بررسی قرار

Archive of SID
www.SID.ir

گرفته‌اند. به منظور بررسی میزان تولید رامونولیپید از روش‌های جداسازی زیر و ارزیابی ماده حاصل استفاده شده است:

سانتریفوژ کردن

این عمل پس از اتمام زمان گرمخانه‌گذاری انجام می‌شود که به منظور جداسازی باکتری‌ها از محیط، محیط کشت با دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی جدا شده و برای انجام آزمایش‌های بعدی به منظور سنجش میزان تولید رامونولیپید مورد استفاده قرار گرفت [۵ و ۹]. رسوب به‌دست آمده به مدت ۵ تا ۷ ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و سپس توزین شد.

تعیین توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام

در این آزمایش از لوله‌های با قطر یکسان استفاده شد. ابتدا ۵ میلی‌لیتر ازمایع رویی آزمایش‌های متفاوت که pH آنها روی ۷ تنظیم شده بود داخل لوله ریخته و مقدار ۵ میلی‌لیتر نفت خام به آن اضافه شد (برای همه آزمایش‌ها از ۳ بار تکرار استفاده شد). سپس تمام لوله‌ها هرکدام به مدت یک دقیقه به شدت همگن[۱] شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

در ادامه ضخامت لایه نفت امولسیفیه شده اندازه‌گیری شده و ضریب امولسیفیکاسیون با استفاده از رابطه (۱) به دست آمد. در این مرحله یک لوله محیط کشت فاقد باکتری نیز به عنوان شاهد مورد آزمایش قرار گرفت [۲، ۵ و ۶].

$$\text{ضریب امولسیفیکاسیون} = \frac{\text{ضخامت لایه نفت امولسیفیه شده}}{\text{ضخامت کل محلول}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

سنجش کمی قند رامونوز

برای اندازه‌گیری میزان قند رامونوز یکی از روش‌های زیر استفاده شده‌است:

الف- ۳ میلی‌لیتر از مایع رویی برداشته و pH آن با کلریدریک اسید ۱ نرمال به ۰/۱ ± ۲ رسانده شد. به منظور بهتر جدا شدن، محلول حاصل به‌مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس با حجم برابر با کلروفرم ـ متانول مخلوط شده، فاز آلی آن جدا شده (عمل جدا شدن ۳ بار تکرار شد) و حلال آن در ۴۰ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط خلا تبخیر شد. البته درصورت عدم وجود شرایط خلا می‌توان آن را زیر هود گذاشت تا تبخیر شود. رسوب به‌دست آمده در ۳ میلی لیتر $NaHCO_3$ ۰/۱ مولار حل شده و برای سنجش میزان قند رامونوز آماده شد.

ب- در این روش ۲میلی لیتر از مایع رویی را برداشته و pH آن با کلریدریک اسید ۱ نرمال به ۰/۱ ± ۲ رسانده شد. محلول حاصل طبق روش اول به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد و سپس با حجم برابر با دی‌اتیل اتر سرد شده مخلوط شده فاز آلی آن پس از سه بار استخراج، جدا شده و حلال آن در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط خلا تبخیر شد. البته درصورت عدم وجود شرایط خلا می‌توان آن را زیر هود گذاشت تا تبخیر شود. رسوب به دست آمده در ۲ میلی‌لیتر $NaHCO_3$ ۰/۱ مولار حل شده و برای سنجش میزان قند رامونوز آماده شد.

سنجش کمی قند رامونوز به روش فنل- سولفوریک اسید

به ۲ میلی‌لیتر محلول قندی آماده شده به دو روش بالا، ۱ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد اضافه شد، سپس به سرعت نزدیک سطح محلول، ۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ (۹۵ تا ۹۸ درصد) ریخته شد.

باید توجه داشت که پیپت حاوی سولفوریک اسید نباید داخل محلول شود. این محلول به مدت ۱۰ دقیقه به حالت سکون نگه داشته شد، سپس همگن شد تا محلول یکنواخت شود. لوله‌ها در آب با دمای ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد سرد شده سپس جذب نوری آنها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در λ=۴۸۰nm اندازه گیری شد [۲۱].

روش استخراج رامونولیپید

برای استخراج رامونولیپید از روش زیر استفاده شد:

pH حجم مورد نظر از مایع رویی با سولفوریک اسید ۱ مولار به ۳ رسانده شد. سپس با چهار برابر حجم اتیل استات مخلوط شده، فاز آلی آن جدا شد (پس به ازای هر ۲۵ میلی‌لیتر محلول تهیه شده ۳ گرم).

(۱) Vortex

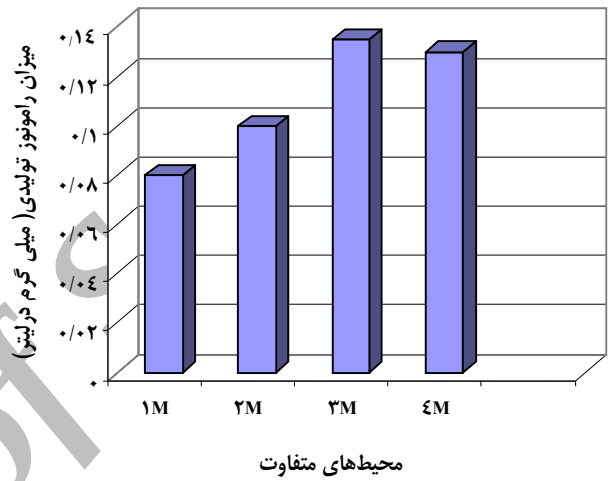
Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲ـ مقدارهای رامونوز تولید شده در محیط‌های کشت ۱M، ۲M، ۳M و ٤M در زمان ۷۲ ساعت.

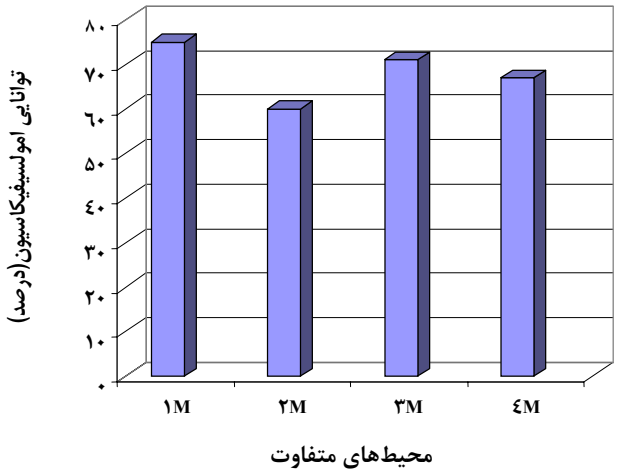
محیط کشت	۱M	۲M	۳M	۴M
میزان رامونوز (گرم در لیتر)	۰/۰۹	۰/۱۱	۰/۱۴	۰/۱۳۸

جدول ۳ـ درصد توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام در محیط کشت‌های ۱M، ۲M، ۳M و ٤M در زمان ۷۲ ساعت.

محیط کشت	۱M	۲M	۳M	۴M
درصد توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام	۰/۰۹	۰/۱۱	۰/۱۴	۰/۱۳۸



شکل ۱ـ بررسی میزان تولید رامونولیپید در محیط‌های کشت ۱M، ۲M، ۳M و ٤M با استفاده از تخمین قند رامونوز به روش فنل ـ سولفوریک اسید.



شکل ۲ـ تاثیر محیط کشت‌های ۱M، ۲M، ۳M و ٤M بر تولید رامونولیپید با استفاده از درصد توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام.

بررسی میزان تولید رامونولیپید درمحیط‌های کشت ۱M، ۲M، ۳M و ۴M

الف ـ بررسی میزان تولید رامونولیپید درمحیط‌های کشت ۱M، ۲M، ۳M و ٤M با استفاده از تخمین قند رامونوز به روش فنل ـ سولفوریک اسید

باکتری *سودوموناس ائروجینوزا* در محیط ۱M، ۲M، ۳M و ۴M کشت داده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH= ۶/۸ میزان هوادهی با دور ۲۰۰rpm، درصد تلقیح = ۲ و با گلوکز ۱۸/۲ گرم در لیتر گرمخانه‌گذاری شد. نتیجه‌های به‌دست آمده از سنجش میزان رامونو به روش فنل ـ سولفوریک اسید در جدول ۲ می‌باشد.

ب‌ـ بررسی میزان تولید رامونوز درمحیط کشت‌های نمک‌های معدنی با استفاده از توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام

درصد توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام در محیط‌های ۱M، ۲M، ۳M و ۴M در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH= ۶/۸ و میزان هوادهی با دور ۲۰۰rpm، درصد تلقیح = ۲ و با گلوکز ۱۸/۲ گرم در لیتر و مدت زمان ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد که نتیجه‌های این آزمایش در جدول ۳ گزارش شده است. مقدارهای گزارش شده به ترتیب ۶۷، ۷۱، ۶۰ و ۷۰ درصد هستند که با توجه به نتیجه‌های ارایه شده بیشترین درصد امولسیفیکاسیون نفت خام مربوط به محیط ۳M و کمترین آن متعلق به محیط ۲M است (شکل ۲).

از مقایسه این روش با روش فنل ـ سولفوریک اسید مشاهده شد که این دو روش تفاوت چندانی با یکدیگر نداشته و بهترین محیط برای تولید رامونولیپید، محیط ۳M است.

ج ـ بررسی میزان وزن خشک سلول‌ها درمحیط کشت ۱M، ۲M، ۳M و ٤M

وزن خشک سلول‌ها در محیط‌های کشت متفاوت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH= ۶/۸ میـزان هوادهی بـا دور ۲۰۰rpm،

Archive of SID

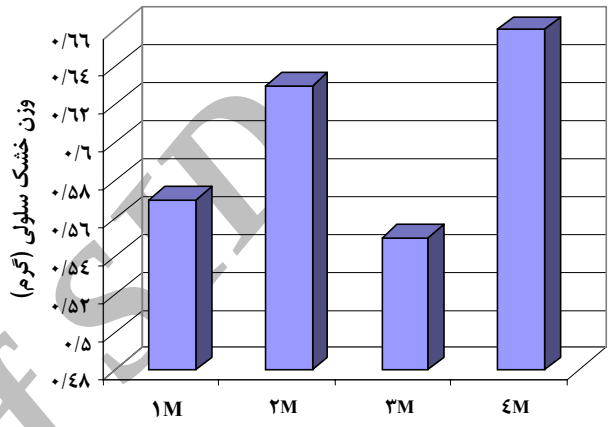
www.SID.ir

جدول ٤ـ بررسی وزن خشک سلول‌ها درمحیط کشت ۱M، ۲M، ۳M و ٤M در زمان ۷۲ ساعت.

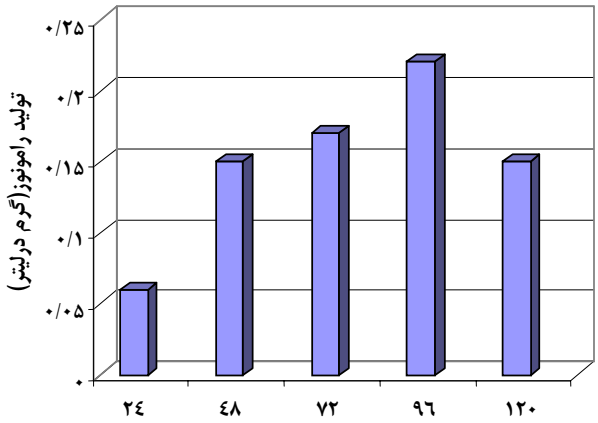
محیط کشت	۱M	۲M	۳M	۴M
وزن خشک سلولی (گرم)	۰/۵۷	۰/۶۳	۰/۵۵	۰/۶۶

جدول ۵ ـ تاثیر زمان‌های مختلف گرمخانه‌گذاری درتولید رامونولیپید.

زمان گرمخانه‌گذاری (ساعت)	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰
رامونوز (گرم در لیتر)	۰/۰۶	۰/۱۵	۰/۱۷	۰/۲۲	۰/۱۵



شکل ۳ـ بـررسی وزن خشک سلول‌ها درمحیط کشت ۱M، ۲M، ۳M و ٤M با استفاده از درصد توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام.



شکل ٤ـ تاثیر زمان‌های متفاوت گرمخانه‌گذاری در تولید رامونوز.

درصد تلقیح = ۲ و با گلوکز ۱۸/۲ گرم در لیتر و مدت زمان ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتیجه‌های ارایه شده در جدول ۴ مقدارهای متفاوت وزن خشک سلول‌ها به ترتیب ۰/۶۶، ۰/۵۵، ۰/۶۳ و ۰/۵۷ گرم به ازای هر صد میلی‌لیتر محیط کشت است (شکل ۳).

بررسی زمان‌های متفاوت گرمخانه‌گذاری درمحیط ۳M واجد ملاس در زمان‌های ۲۴ تا ۱۲۰ ساعت، با استفاده از تخمین قند رامونوز به روش فنل ـ سولفوریک اسید

زمان‌های متفاوت گرماخانه‌گذاری باکتـری *P.aeruginosa* در محیط کشت ۳M با منبع کربن ملاس در زمان‌های ۲۴ تا ۱۲۰ ساعت (با شرایط : C/N =۱۶ ، ۲= درصد تلقیح، ۲۰۰rpm= میزان هوا دهی، *p*H =۶ ، °C ۳۰= دما) مورد آزمایش و بررسی قرار گرفت. رامونوز تولید شده در زمان‌های مذکور با استفاده از روش فنل ـ سولفوریک اسید سنجیده شد. نتیجه‌های حاصل در جدول ۵ گزارش شده است.

در زمان صفر به دلیل عدم رشد، رامونوزی مشاهده نشد. در زمان ۲۴ کمترین میزان رامونو را داشتیم که مقدار آن ۰/۰۶ گرم به ازای هر لیتر است. به تدریج مقدار آن در زمان‌های ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت بیشتر شده که مقدار آنها به ترتیب ۰/۱۵ و ۰/۱۷ گرم درهر لیتر است. این مقدار در زمان ۹۶ ساعت به اوج خود رسیده و برابر با ۰/۲۲ گرم در هر لیتر است و بعد از آن در زمان ۱۲۰ساعت میزان رامونوز کاهش یافته که برابر با ۰/۱۵ گرم به ازای هر لیتر است بنابراین، بهترین زمان گرمخانه‌گذاری ۹۶ ساعت است (شکل ۴).

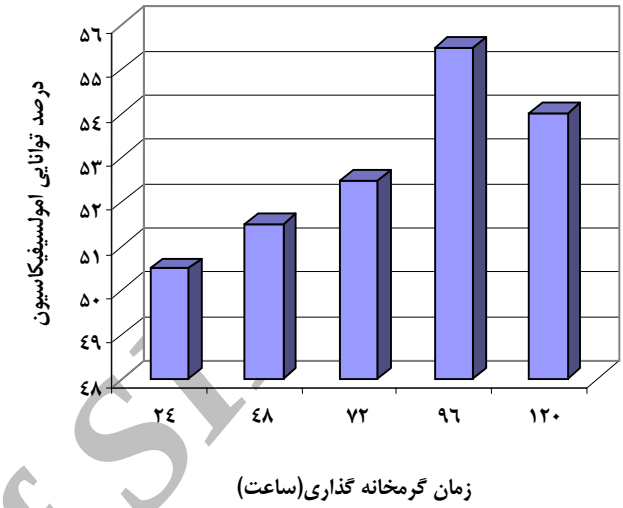
مقایسه میزان تولید رامنولیپید درمحیط ۳M واجد ملاس درزمان‌های ۲۴ ساعت تا ۱۲۰ ساعت با استفاده از درصد توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام

درصد توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام توسط رامونولیپید تولید شده در محیط ۳M واجد ملاس، در زمان‌های ۲۴ ساعت تـا ۱۲۰ ساعـت بـا شرایـط : C/N =۱۶ ، ۲= درصـد تلقیـح ،

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ٦ـ تاثیر زمان‌های متفاوت گرمخانه‌گذاری در توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام.

زمان گرمخانه‌گذاری (ساعت)	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰
درصد توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام	۵۰/۵	۵۱/۵	۲۵/۵	۵۵/۵	۵۴



شکل ۵ ـ تاثیر زمان‌های مختلف گرمخانه‌گذاری در توانایی امولسیفیکاسیون نفت خام.

۲۰۰rpm= میزان هوادهی، ۶= *pH* ، ۳۰ °C= دما مورد سنجش قرار گرفت که نتیجه‌های آن در جدول ۶ گزارش شده است. با بررسی جدول مشاهده شد ضریب‌های امولسیفیکاسیون نفت توسط رامونولیپید تولید شده در زمان ۲۴ ساعت، ۵۰/۵ درصد است که رفته رفته بر میزان آن افزوده می‌شود. در زمان ۴۸ ساعت به ۵۱/۵ درصد، در زمان ۷۲ ساعت به ۵۲/۵ درصد و در زمان ۹۶ ساعت به بیشترین مقدار خود یعنی ۵۵/۵ درصد رسیده است و پس از آن در زمان ۱۲۰ ساعت کاهش یافته و به ۵۴ درصد رسیده است (شکل ۵).

با مقایسه این روش سنجش، با روش فنل سولفوریک اسید مشاهده شد که نتیجه‌های حاصل از این دو روش تفاوت چندانی با یکدیگر ندارند.

نتیجه‌ها و بحث

در آزمایش‌های انجام شده به منظور بررسی بهترین محیط کشت برای تولید رامونولیپید توسط باکتری *سودوموناس ائرجینوزا* مشاهده شد در بین محیط نمک‌های معدنی ۱M، ۲M، ۳M و ۴M بهترین محیط کشت، محیط ۳M است که در آن از گلوکز به‌عنوان منبع کربنی استفاده شده است.

قابل ذکر است محیط ۴M نیز تولید بالایی را ارایه داده است. همچنین مشاهده شد که در بین محیط‌های نمک‌های معدنی واجد ملاس نیز محیط ۳M واجد ملاس بیشترین تولید را نسبت به بقیه حاصل می‌کند و محیط ۴M واجد ملاس در رتبه دوم قرار دارد. در آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق که با نفت خام انجام شد با اضافه کردن رامونولیپید حاصل از فعالیت باکتری *سودوموناس ائروجینوزا* در محیط ۳M واجد ملاس مشاهده شد که این ماده روی نفت خام فعالیت امولسیفایری از خود نشان می‌دهد.

Guerra-Santos و همکارانش در سال ۱۹۸۴ نیز بهترین محیط برای تولید رامونولیپید را محیط ۳M پیشنهاد کردند. با توجه به آزمایش‌های انجام شده در این تحقیق، این مسأله را می‌توان به تفاوت در ترکیب‌های موجود در این ۴ محیط نسبت داد که بیشترین تفاوت بین آنها در $FeSO_4.7H_2O$ و H_3PO_4 دیده می‌شود که در محیط ۳M و ۴M مساوی و بیشتر از بقیه بوده و در آزمایش‌های انجام شده در محیط ۳M بیشترین میزان تولید رامونولیپید را به خود اختصاص دادند.

مناسب‌ترین غلظت آهن برای تولید رامونولیپید ۲۷/۵ گرم به ازای هر گرم گلوکز است که این عنصر از $FeSO_4.7H_2O$ تأمین می‌شود. *Mulligan* و همکارانش در سال ۱۹۸۹، تأثیر متابولیسم فسفات بر تولید رامونولیپید توسط باکتری *سودوموناس ائروجنیوزا* را مورد بررسی قرار داده و به این نتیجه رسیدند که متابولیسم فسفات تأثیر مثبت بر تولید بیوسورفاکتانت دارد [۶ و ۷].

در این مورد می‌توان گفت یا باکتری پس از اتمام منبع کربن و انرژی بعد از ۹۶ ساعت، از رامونولیپید به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کرده و یا این‌که باکتری‌های گرم منفی مانند *سودوموناس ائروجنیوزا* به‌طور معمول با پدیده‌ی Qorum sensing، سنتز رامونولیپید 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 رامونوزیل ترانسفراز منجر می‌شود. هنگامی‌که تعداد باکتری‌ها در اثر اتمام منبع کربن و

Archive of SID
www.SID.ir

انرژی از حد کافی برای تولید سیگنال کاهش یابد، میزان فعالیت آنزیم رامونوزیل ترانسفراز نیز کاهش یافته در نتیجه از تولید رامونولیپید کاسته می‌شود [۲].

در بررسی‌های انجام شده درمورد تولید رامونولیپید در زمان‌های متفاوت گرمخانه‌گذاری درشرایط درصد تلقیح =۲، C/N =۱۶، ۲۰۰rpm= میزان هوا دهی، pH = ۶/۸ و ۳۰ °C = دما، مشخص شد که بیشترین میزان تولید در محیط ۳M واجد ملاس در زمان ۹۶ ساعت انجام می‌گیرد. در زمان ۲۴ ساعت، تولید رامونوز برابر ۰/۰۶ گرم در لیتر، در زمان ۰/۱، در زمان ۷۲ ساعت و ۰/۱۷ در زمان ۹۶ ساعت ۰/۲۲، و در زمان ۱۲۰ ساعت برابر با ۰/۱۵ گرم در لیتر است.

در آزمایش‌های انجام شده بیشترین درصد امولسیفیکاسیون نفت خام ۵۵/۵ بوده که درشرایط C/N =۲۸ ، ۲= درصد تلقیح ، ۲۰۰rpm= میزان هوادهی، pH = ۷/۵ و ۳۵ °C = دما می‌باشد.

تاریخ دریافت: ۸۳/۷/۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۴/۴/۶

مراجع

[۱] ادیب‌فر، پرویز؛ "میکروب شناسی پزشکی"، انتشارات دانشگاه تهران، ص‌ص ۵۸۸ ـ ۵۸۷ (۱۳۷۵).

[۲] رستم‌زا، مهسا؛ بررسی تولید بیوسورفاکتانت ، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران (۱۳۷۹).

[۳] سجادی، اکبر؛ "ملاس و موارد مصرف آن" انتشارات موج(۱۳۶۶).

[۴] فاینبرگ، اسمیت؛ ترجمه: حق گویی، حسین؛ "کروماتوگرافی کاغذی، لایه نازک و الکتروفورز"، انتشارات دانشگاه تهران، ص‌ص ۹۵-۸۵ (۱۳۶۷).

[5] Andre, C. , Espuny, M.J., Robert, M., Mercade, M. E., Manrresa, A., Guinea, J., Leeuwenhoek, A.V., *J. Microbiol.*, **40**, 102-110 (in Press).

[6] Arino, S., Marchai, R., Van Decasteel, J.P., Identification and Production of a Rhamnolipidic Biosurfactant by a *Pseudomonas* Species , *Appl Microbiol. Biotechnol*., **45**, 162 (1996).

[7] Artiola, J.F., Ochoa-Loza, F.J., Maier, R.M., Stability Constants for the Complexation of Various Metals with a Rhamnolipid Biosurfactant, *J. Environ. Qual.*, **30**(2), 479 (2001).

[8] Asselinea, C., Montrozier, H., Prome, J. C., Savagnac, A., Wiby, M., Physical, Chemical and Immunological Properties of Lipopolysaccharide Released form Escherichia Coli by Ethylenediaminetetraacetate, *Journal of Biological Chemistry*, **28**, 102 (1972).

[9] Babu, P. S., Vaidya, A. N., Bai, A. S., Kapur, R., Juwarkar, A., Khanna, P., Kinetics of Biosurfactant , Production by *Pseudomonas aeruginosa* Strain BS2 from Industrial Wastes , *Biotech. Letters*, **18** (3), 263 (1996).

[10] Bai, G., Mark, L., Brusseau, Miller, R. M., Influence of Rhamnolipid Biosurfactants in: *Biotechnology*, **1**, 421.

[11] Beeba, J. L., Umbreit, W. W., Microbial Production of Surfactants and their Commerical Potential, *J. Bacteriol.*, **108**, 612 (1971).

[12] Burger, M.M., Glaser, L., Burton, R. M., Role of Lipids in the Biosynthesis of the Bacterial Cell Envelope, *J. Biol. Chem.*, **238**, 2595 (1963).

Archive of SID
www.SID.ir

[13] Cameotra, S. S., Makkar, R.S., Synthesis of Biosarfactants in Extreme Conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 520 (1998).

[14] Cirigliano, M. C., Carman, G. M., Isolation of a Bioemulsifier form Candida Lipolytica, *Appl. Environ. Miicrobiol.*, **50**, 846 (1985).

[15] Cooper, D. G., Paddock, D. A., Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1426 (1983).

[16] Desai, J. D., Sci, J., Biosurfactant Production, Properties and Application, *Ind. Res.*, **46**, 440 (1987).

[17] Daniel, H. J., Reuss, M., Syldatk, C., 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*, **20**, (12), 1153 (1998).

[18] Daniel Hans J., Otto, R., Reuss, M., Syldatk, C., Sophorolipid Production with High yields on Whey Concentrate and Rapeseed Oil without Consumption of Lactose , *Biotech. Letter*, **20** (8), 145 (1998).

[19] Desai, J. D., Ibrahim, M. B., Microbial Production of Surfactants and their Commercial Potential Microbial , *Mol. Biol.*, **61** (1), 47(1997).

[20] Deziel, E. , Paguette, G., Villemur, R., Lepine, F., Bisaillon, J. G., Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (6), 1908 (1996).

[21] Dubois, M., Glues, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Fred Smith, Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry*, **28** (3), 65 (1956).

[22] Artiola, J.F., Ochoa-Loza, F.J., Maier, R.M., Stability Constants for the Complexationof Various Metals with a Rhamnolipid Biosurfactant, *J. Environ. Qual.*, **30** (2), 479(2001).

[23] Maier, R.M., Soberon Chavez ,G., *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid:Biosynthesis and Potential Application, *Biotechnol*, **54**, 625 (2000).

Archive of SID

www.SID.ir