

بررسی تولید رامنولپید درون راکتور زیستی به عنوان یک مدل توسط گونه *Pseudomonas aeruginosa* NP2

حسین امانی*⁺

بابل، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده مهندسی شیمی

چکیده: رامنولپیدها در زمره‌ی بهترین بیوسورفکتانت‌های شناخته شده هستند که دارای کاربردهای مفیدی در ازدیاد برداشت نفت، صنایع دارویی، غذایی و آرایشی می‌باشند. در این پژوهش، تولید رامنولپید توسط گونه *Pseudomonas aeruginosa* NP2 درون یک راکتور زیستی بررسی می‌شود. این مطالعه نشان می‌دهد باکتری *Pseudomonas aeruginosa* NP2 می‌تواند با روغن آفتاب گردان به عنوان تنها منبع کربنی، مقدار چشمگیری رامنولپید در یک راکتور زیستی ۲.۵ لیتری تولید کند. نتیجه‌های این پژوهش نشان داد، بیشترین میزان تولید رامنولپید به ۱۳.۵ g/L پس از ۸۰ ساعت کشت می‌رسد. در این پژوهش همچنین دیده شد تولید رامنولپید در فاز لگاریتمی رشد شروع و تا فاز سکون ادامه پیدا کرد. تولید دو نوع رامنولپید، RL1 و RL3، توسط این میکروارگانیسم با HPLC و TLC مورد تأیید قرار گرفت. سرانجام رامنولپید تولید شده توانست فعالیت سطحی خوبی از خود نشان دهد به طوری که کشش سطحی را از ۶۸ mN/m به ۲۶ mN/m رساند. بنابراین، باکتری *Pseudomonas aeruginosa* NP2 می‌تواند یک مدل مناسب برای تولید رامنولپید در راکتورهای زیستی نیمه صنعتی باشد.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفکتانت، فرمانتاسیون، رامنولپید، کشش سطحی، سودوماس آرجینوزا.

KEY WORDS: Biosurfactant, Fermentation, Rhamnolipid, Surface tension, *Pseudomonas aeruginosa*.

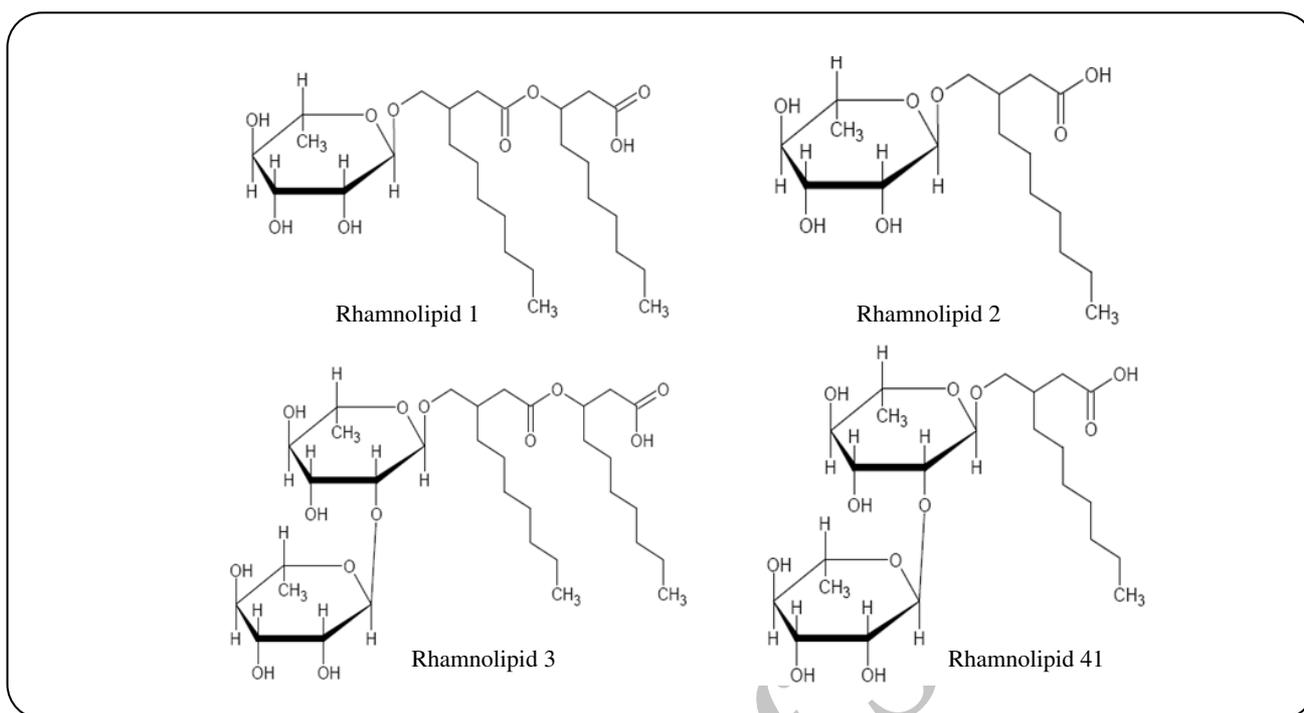
مقدمه

برای محیط زیست یا انسان مضر باشند. یکی از هدف‌های استفاده از مواد موجود در طبیعت، استفاده از مواد قابل بازگشت به محیط زیست است. کاربردهای اصلی بیوسورفکتانت‌ها در صنایع غذایی، دارویی و نفتی می‌باشد. از جمله این کاربردها می‌توان تولید داروها، پاکسازی مخزن‌های ذخیره نفت خام، ازدیاد برداشت نفت از مخازن زیر زمینی نفت، آسان‌تر کردن انتقال نفت در خطوط انتقال و کاربردهای زیست محیطی نظیر پاک‌سازی مناطق آلوده به نفت و ... اشاره کرد. اگرچه بیشتر پژوهشگران

گروهی از میکروارگانیسم‌های موجود در طبیعت قادر به ترشح مواد برون سلولی می‌باشند که از جمله این مواد می‌توان آنزیم‌ها و ترکیبات فعال‌کننده سطحی به نام بیوسورفکتانت‌ها را نام برد. اهمیت بیوسورفکتانت‌ها در مقایسه با انواع سنتزی در این است که از نظر نوع و ویژگی نسبت به انواع سنتزی گستردگی بیشتری را دارند و همچنین از روش زیستی هم قابل تجزیه هستند. سورفکتانت‌های شیمیایی بیشتر ترکیب‌هایی هستند که به آهستگی تجزیه می‌شوند و در طول تجزیه ممکن است

+E-mail: hosn1_amani@yahoo.com

*عده دار مکاتبات



شکل ۱- ساختمان چهار نوع رامنولیپید گوناگون تولید شده توسط باکتری *Pseudomona aeruginosa* [۶].

در مقیاس آزمایشگاهی، اگرچه این کار مشکلاتی را در عملیات و ایمنی فرایند پدید می‌آورد ولی در مقیاس صنعتی و نیمه صنعتی، تشکیل کف خطرهای بیشتری را فراروی تولید اقتصادی قرار می‌دهد. تشکیل کف اغلب نامناسب می‌باشد زیرا می‌تواند در طی تخمیر حجم راکتور را پرنموده و باعث کارایی نامناسب آن شود. در بسیاری از موارد، عملیات در راکتورها باید متوقف شده یا مواد شیمیایی ضد کف به مواد موجود افزوده شوند تا از تولید بیش از حد کف جلوگیری شود. افزودن ضد کفها باعث کاهش انتقال جرم شده و بازده تولید را کم می‌کند. پس تشکیل کف مشکل شایعی در بسیاری از تخمیرهای میکروبی به ویژه در جایی که بیوسورفکتنتها تولید می‌شوند به حساب می‌آید. بنابراین باید به روشی تشکیل کف کنترل شود [۹، ۱۰]. در این پژوهش از تولید کف به عنوان یک نقطه قوت در تولید بیوسورفکتنت استفاده شده است زیرا غلظت بیوسورفکتنت در کف چندین برابر مقدار آن در محیط کشت است و با بیرون کشیدن کف به طراحی یک راکتور زیستی پرداخته شده است. هدف از این پژوهش بررسی تولید و خالص سازی رامنولیپید تولید شده توسط گونه *Pseudomonas aeruginosa* NP2 درون یک راکتور زیستی به عنوان یک مدل بومی تولید می‌باشد.

بیوسورفکتنتها را به عنوان متابولیت اولیه در نظر گرفته‌اند، اما برخی از آنها نیز این ترکیبها را جز متابولیت‌های ثانویه به حساب آورده‌اند [۵-۱].

بیوسورفکتنتهای تولید شده توسط سویه‌های *Pseudomona aeruginosa* در دسته گلیکولیپیدها قرار می‌گیرند. با توجه به پتانسیل این مواد در صنایع گوناگون، تولید موفقیت‌آمیز گلیکولیپیدها در راکتور زیستی دارای تولید کلان کاری ضروری است. گلیکولیپیدهایی که دارای یک یا دو ملکول رامنوز در اتصال به یک یا دو ملکول بتا هیدروکسی کربوکسیلیک اسید می‌باشند رامنولیپید نامیده می‌شوند. ساختمان ۴ نوع رامنولیپید در شکل ۱ نشان داده شده است [۸-۶].

در طی تولید میکروبی بیوسورفکتنتها به خاطر هوادهی و همزدگی، کف بیش از حدی تولید می‌شود زیرا این مواد سبب کاهش کشش سطحی می‌شوند. به‌طور کلی کف توسط به‌هم‌زدگی شدید و هوادهی لازم برای تأمین مقدار کافی اکسیژن به تخمیر هوازی آن بیشتر ایجاد می‌شود. تشکیل کف سبب پیدایش مشکلاتی مانند، جداسازی ناخواسته فرآورده، مواد غذایی و سلولها همراه با کف می‌شود. پدیده تشکیل بیش از حد کف در راکتور زیستی در بیشتر کشت‌های میکروبی مشکلاتی را به همراه می‌آورد.

جدول ۱- اجزای محیط کشت تولید رامنولیپید.

محلول A	
غلظت (گرم در لیتر)	نام ترکیب
۰٫۰۵	MgSO _۴ ·7H _۲ O
۰٫۱	KCl
۱٫۵	NaNO _۳
محلول B	
غلظت (گرم در لیتر)	نام ترکیب
۲۵۰	روغن آفتاب گردان
محلول C	
غلظت (گرم در لیتر)	نام ترکیب
۲۳	Na _۲ HPO _۴ ·۲H _۲ O
۱۱	NaH _۲ PO _۴ ·۲H _۲ O
محلول D	
غلظت (گرم در لیتر)	نام ترکیب
۲	Na-Citrate·۲H _۲ O
۰٫۲۸	FeCl _۳ ·۶H _۲ O
۱٫۴	ZnSO _۴ ·۶H _۲ O
۱٫۲	CoCl _۲ ·۵H _۲ O
۱٫۲	CuSO _۴ ·۵H _۲ O
۰٫۸	MnSO _۴ ·H _۲ O

pH محلول برابر ۶٫۵ با NaOH تنظیم می‌شود.

محیط پیش کشت

از محیط LB^(۱) (شامل Yeast extract، تریپتون و NaCl به ترتیب ۵، ۱۰ و ۱۰ گرم در لیتر) به عنوان پیش کشت برای تولید رامنولیپید استفاده شد. یک لوپ باکتری به محیط پیش کشت که درون ارلن ۲۵۰ میلی لیتری قرار داشت در شرایط استریل اضافه شد و سپس ارلن درون شیکرانکوباتور در ۳۷ °C و ۱۲۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد.

محیط کشت

اجزای اصلی محیط کشت در جدول ۱ بیان شده است. تمامی ترکیب‌ها از فراورده‌های شرکت مرک خریداری شده است. برای تهیه محیط کشت به اندازه ۵۰۰ میلی لیتر، ابتدا محلول‌های A و B و C به صورت جداگانه اتوکلاو شدند سپس محلول D به خاطر حساسیت به گرما با صافی‌های ۰٫۲۲ میکرونی استریل شد. در شرایط استریل محلول‌های A و C به نسبت مساوی با حجم‌های ۲۵۰mL با هم مخلوط شده و پس از افزودن ۱۲۵g روغن آفتاب‌گردان اتوکلاو شده به آن، ۰٫۵ میلی لیتر از محلول D به آن افزوده شد.

اتوکلاو

برای استریل کردن محیط‌های کشت از اتوکلاو برقی استفاده شد. زمان استریل ۲۰ دقیقه در دمای ثابت ۱۲۱ °C بود.

شیکر انکوباتور

برای هم زدن محیط کشت و تأمین درجه حرارت مناسب از شیکر انکوباتور مدل (Kuhner shaker X,climo-shaker ISF1_X) استفاده شد.

دستگاه کشش سطحی

سنجش کشش سطحی نمونه‌ها توسط دستگاه تنسیومتر (Krusk k10T) به روش Du Nouy Ring Method اندازه‌گیری شد. در این روش حلقه دستگاه که از جنس آلیاژ پلاتین می‌باشد در مایع غوطه ور می‌شود، نیروی وارد بر حلقه غوطه ور شده بر روی صفر تنظیم می‌شود و حلقه به آرامی از درون مایع به خارج کشیده می‌شود. نیروی مورد نیاز برای خارج کردن حلقه از سطح مایع، بیشترین نیروی ثبت شده توسط دستگاه، به عنوان کشش سطحی مایع در نظر گرفته می‌شود.

این پژوهش در راستای یک پژوهش کاربردی به منظور بررسی ازدیاد برداشت نفت با رامنولیپید تولید شده توسط یک گونه بومی ایرانی به عنوان یک مدل آزمایشی در مخازن نفتی می‌باشد.

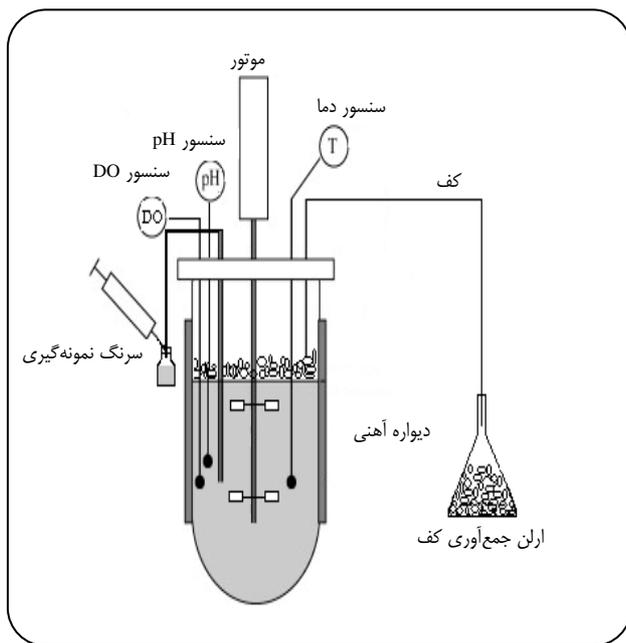
بخش تجربی

باکتری

باکتری *Pseudomonas aeruginosa* NP2 از بانک میکروبی آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه الزهرا تهیه شد.

(۱) LB-medium

راکتور زیستی



شکل ۲- شمای راکتور زیستی مورد استفاده برای تولید بیوسورفکتانت و چگونگی جمع‌آوری کف.

اندازه‌گیری بیومس

به منظور جداسازی باکتری‌ها، نمونه‌های گرفته شده از محیط کشت درون راکتور زیستی در دستگاه سانتریفوژ (Multifuge 1S-R, Heraeus) درون لوله‌های ویژه از قبل وزن شده در $120.86 \times g$ و $4^\circ C$ سانتریفوژ شد. سوپرناتانت برای انجام کلیه آزمایش‌ها به منظور بررسی میزان تولید بیوسورفکتانت مورد استفاده قرار گرفت. رسوب باقیمانده یا بیومس پس از سانتریفوژ، ۲ بار با آب نمک ۰.۹٪ شستشو داده شد. پس از آن بیومس به مدت ۲۴ ساعت در دمای $100^\circ C$ خشک شده، سپس توزین شد [۸-۶].

استخراج و خالص‌سازی رامنولیبید

به ۱ mL از نمونه گرفته شده محیط کشت، ۱۰ میکرولیتر H_3PO_4 و ۱.۲۵ mL اتیل استات اضافه شد [۸، ۷]. مدت ۳۰ دقیقه در $120.86 \times g$ در $4^\circ C$ سانتریفوژ شده و سپس فاز آلی آن جدا شد. برای اطمینان بیشتر از جداسازی، یک بار دیگر فاز آبی با ۱.۲۵ mL اتیل استات استخراج شد. بعد از تبخیر اتیل استات در دمای $50^\circ C$ و 2000 rpm درون یک تبخیر کننده، رامنولیبید زرد رنگ ظاهر شد. شکل ۳ فازهای تفکیک شده را بعد از سانتریفوژ نشان می‌دهد.

همان‌گونه که در قسمت مقدمه بیان شد در زمان تولید بیوسورفکتانت‌ها به‌خاطر اثرهای ناشی از هوادهی و همزدن، کف زیادی تشکیل می‌شود که به سمت بالای راکتور زیستی حرکت می‌کند. بنابراین مطابق شکل ۲، با قرار دادن یک شلنگ رابط ویژه به طوری که یک طرف آن به راکتور زیستی متصل بوده و طرف دیگر آن نیز درون یک ظرف دیگر بود، جمع‌آوری کف ممکن شد. تخمیر کننده 2.5 لیتری با 2 همزن راشتون هرکدام به قطر 45 mm ، به هم زده شد. همزن‌ها 50 میلیمتر از یکدیگر فاصله داشتند و پایین‌ترین همزن در فاصله 1 سانتیمتری از پایه تخمیرکننده واقع شده بود. سه تیغه با فاصله‌بندی یکسان در تخمیر کننده و عرض 1 cm متصل به دیواره مخزن بودند. فرماتور دارای سنسورهای کنترل دما، سرعت همزدن، سرعت هوادهی، pH، DO^(۱) بود. برای تولید رامنولیبید، 500 mL محیط کشت در شرایط استریل به درون فرماتور اتوکلاو شده ریخته و پس از سرد شدن 25 میلی لیتر از محیط پیش کشت (۵ درصد حجمی) به آن اضافه شد. نمونه‌گیری‌ها در زمان‌های گوناگون انجام شد.

تعیین غلظت بحرانی تشکیل میسل^(۲) (CMC)

مقدار CMC بستگی به حلالیت سورفکتانت در فاز آبی داشته و به‌عنوان معیاری برای ارزیابی کارایی یک سورفکتانت استفاده می‌شود. غلظت بحرانی تشکیل میسل‌ها به غلظتی از سورفکتانت گفته می‌شود که در بالاتر از این مقدار میسل‌ها به طور مرتب تشکیل می‌شوند. در این غلظت سطح بین دو مایع به طور کامل با سورفکتانت پر شده و هیچ فضایی بین دو مایع باقی نمی‌ماند. با افزایش میزان سورفکتانت میزان میسل تشکیل شده بیشتر می‌شود. قبل از رسیدن به میزان CMC کاهش کشش سطحی به مقدار زیادی با غلظت سورفکتانت افزایش می‌یابد. بعد از رسیدن به CMC، کاهش کشش سطحی دیگر دیده نمی‌شود. هرچه این غلظت کمتر باشد آن بیوسورفکتانت کارا تر است. برای تعیین CMC کشش سطحی مایع در غلظت‌های گوناگون به روش رینگ اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری غلظت روغن آفتاب‌گردان

تعیین مقدار غلظت روغن آفتاب‌گردان به روش وزنی صورت گرفت. 2 mL فاز آلی (هگزان) به ظروف از قبل وزن شده انتقال و پس از تبخیر هگزان، ظروف مورد نظر توزین شدند.

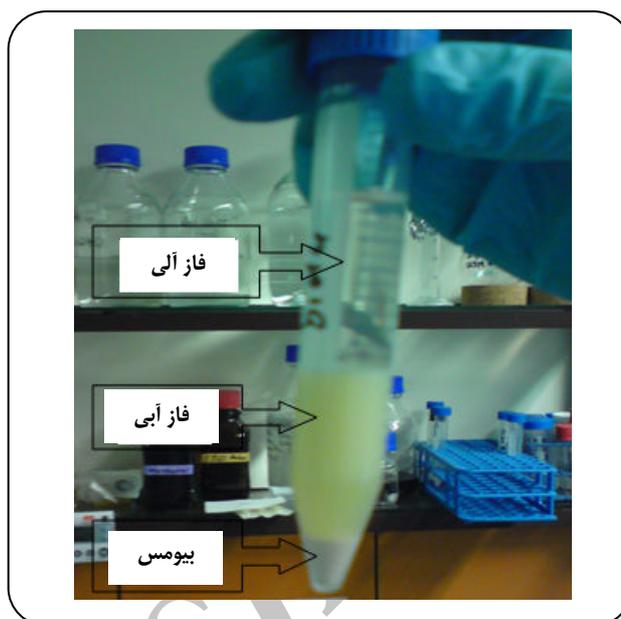
(۱) Dissolved Oxygen

(۲) Critical micelle concentration

۶- انتقال به دستگاه HPLC برای تجزیه
 ۷- استفاده از محلول ۹۵٪ اب مقطر و ۵٪ متانول به عنوان فاز متحرک در دستگاه
 از آنجایی که رامنولیپید ۱ و رامنولیپید ۳ برای کالیبراسیون دستگاه HPLC ضروری است، جداسازی این دو ماده از همدیگر با دستگاه MPLC^(۱) (BUCHI Control Unit C-620) صورت گرفت. ۵ mL از رامنولیپید به دست آمده از مرحله استخراج با اتیل استات درون دستگاه تزریق شد [۱۱].

فاز متحرک به صورت پله‌ای یا با فاصله به ستون جداسازی فاز متحرک (Lot-91108-10030-30) تزریق شد. محلول‌های خروجی در ظروف شیشه‌ای (درون هر کدام به اندازه ۲۰ mL) برای تجزیه جمع‌آوری شد. روش کار به ترتیب زیر صورت گرفت:

- ۱- شروع با ۱۰۰٪ کلروفرم به مدت ۵ دقیقه
- ۲- با نسبت کلروفرم به متانول برابر ۶۰ به ۴۰ به مدت ۴۵ دقیقه
- ۳- ۱۰۰٪ متانول به مدت ۱۰ دقیقه



شکل ۳- نمونه‌ای از روش استخراج و خالص سازی رامنولیپید تولید شده.

اندازه گیری غلظت رامنولیپید

برای تعیین غلظت رامنولیپید از دستگاه HPLC^(۱) (Agilent 1100 Series) استفاده شد. ستون استفاده شده در دستگاه C18 با قطر ۵ میکرومتر و شدت جریان تزریق ۰/۸ mL/min بود. در صورتی که از روغن آفتاب گردان برای منبع کربنی استفاده شود ابتدا باید به‌وسیله هگزان روغن باقی مانده در محیط کشت را جدا نموده و اندازه‌گیری نمود. نکته مهم در اندازه‌گیری غلظت رامنولیپید این است که ابتدا باید دستگاه را کالیبره نمود. برای این منظور رامنولیپید (۳و۱ با غلظت‌های ۰ و ۰/۲۵ و ۰/۵ و ۰/۷۵ و ۱ گرم بر لیتر به دستگاه تزریق شد و مساحت‌های زیر نمودار ثبت شد. آماده سازی دستگاه HPLC برای تعیین غلظت رامنولیپید به روش زیر به ترتیب صورت گرفت:

- ۱- آماده کردن محلول A (۴۰ میلی مولار ۴ - برمو فناکیل برمید در استونیتریل)
- ۲- آماده کردن محلول B (۲۰ میلی مولار ۳ - اتیل آمونیوم در استونیتریل)
- ۳- آماده کردن محلول C (مخلوط نمودن محلول A و B به نسبت مساوی)
- ۴- حل نمودن نمونه‌ها در ۳۶۰ میکرولیتر استونیتریل
- ۵- افزودن ۴۰ میکرولیتر از محلول C به نمونه‌ها

کروماتوگرافی لایه نازک^(۲) (TLC)

برای اثبات خالص بودن و تولید رامنولیپید از کروماتوگرافی لایه نازک (25% 60 F254 plates) استفاده شد. فاز متحرک شامل کلروفرم: متانول: استیک اسید (۲:۱۵:۶۵) بود که این فاز متحرک باعث جدایی ۴ نوع رامنولیپید می‌شد. بعد از این مرحله کاغذ درون محلول سولفوریک اسید: اسید استیک (۵۰:۱) آغشته کرده و بعد از خشک شدن از آن عکس گرفته می‌شد. از استاندارد جنیل^(۴) (United States, Saukville) به‌عنوان شاهد استفاده شد [۷، ۸]. استاندارد جنیل شامل رامنولیپیدهای ۱و۲و۳و۴ می‌باشد که توسط *P. aeruginosa* تولید می‌شود.

نتیجه‌ها و بحث

شرح مسیر زمانی تخمیر ناپیوسته تولید رامنولیپید با استفاده از راکتور زیستی

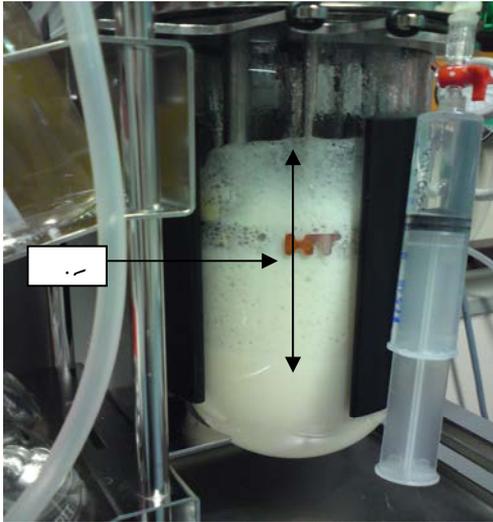
در زمان‌های معلوم از راکتور زیستی در حال کار با استفاده از سرنگ ویژه برای بررسی تولید رامنولیپید نمونه‌گیری شد. شکل ۴ راکتور زیستی را در حال تولید رامنولیپید در لحظه شروع شدن کف نشان می‌دهد.

(۱) High performance liquid chromatography

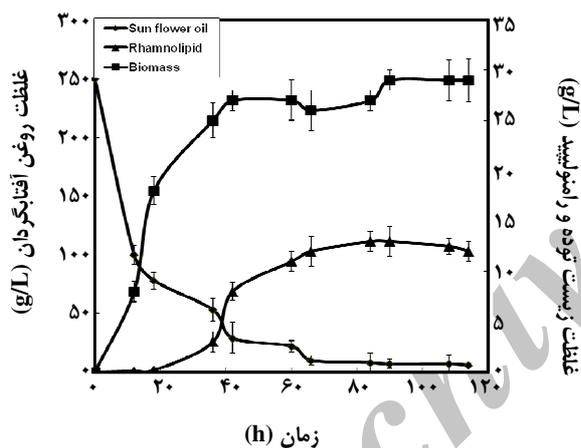
(۲) Medium performance liquid chromatography

(۳) Thin layer chromatography

(۴) Jeneil



شکل ۴- راکتور زیستی در حال تولید رامنولیپید و کف به وجود آمده در آن.



شکل ۵ - نمودار رشد سلولی، تولید رامنولیپید و مصرف روغن آفتاب گردان شرایط 37°C و 600 rpm و 0.5 vvm در راکتور زیستی.

نتیجه‌های منحنی رشد و تولید رامنولیپید در شکل ۵ نشان داده شده است. در این آزمایش منبع کربنی روغن آفتاب گردان انتخاب شد. بیشترین مقدار تولید رامنولیپید و بیومس به ترتیب در حدود 13.5 g/L و 28 g/L به دست آمد. همچنین نتیجه‌ها نشان داد روغن آفتاب گردان توسط باکتری به خوبی مصرف می‌شود. برای اثبات تولید رامنولیپید بعد از استخراج آن به وسیله اتیل استات دوباره به بررسی تولید آن به وسیله آزمایش کروماتوگرافی لایه نازک پرداخته شد. از شاهد و استاندارد جنیل برای تشخیص رامنولیپید استفاده شد. نتیجه‌های کروماتوگرافی لایه نازک در شکل ۶ نشان داده شده است. چنانچه که در این شکل دیده می‌شود باکتری استفاده شده در این پژوهش توانسته است رامنولیپید (۳) را تولید کند. همچنین از این شکل مشخص است که در روز اول رامنولیپید بسیار کمی تولید شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت تولید رامنولیپید در فاز سکون صورت گرفته است. این نتیجه با نتیجه‌های ذکر شده توسط دیگر پژوهشگران مانند مولر و همکاران^(۱) [۸] و هورمان و همکاران^(۲) [۷] و سیلداک و همکاران^(۳) سازگار است [۱۲]. این یافته‌ها نشان دهنده معتبر بودن نتیجه‌های این پژوهش می‌باشد. برای بررسی تکرارپذیری، کلیه آزمایش‌ها سه بار به طور و در شرایط یکسان انجام شد.

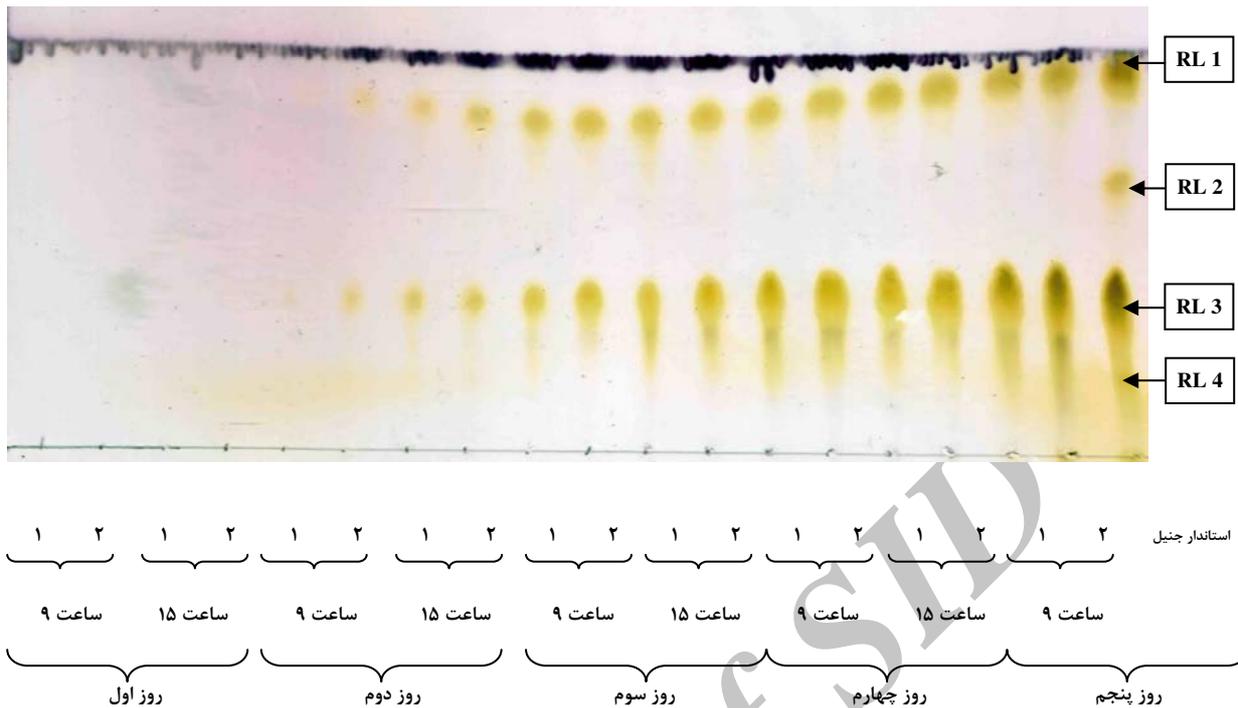
نتیجه‌های بررسی تولید بیوسورفکتانت، توسط سویه

(۱) Müller et al.

(۲) Hörmann et al.

(۳) Syladat et al.

(۴) Benincasa et al.



شکل ۶ - نتیجه‌های کروماتوگرافی لایه نازک برای رامنولیبید تولید شده در بیوراکتور در زمان‌های گوناگون. چهار لکه سمت راست به عنوان شاهد از استاندارد جنیل به دست آمده است.

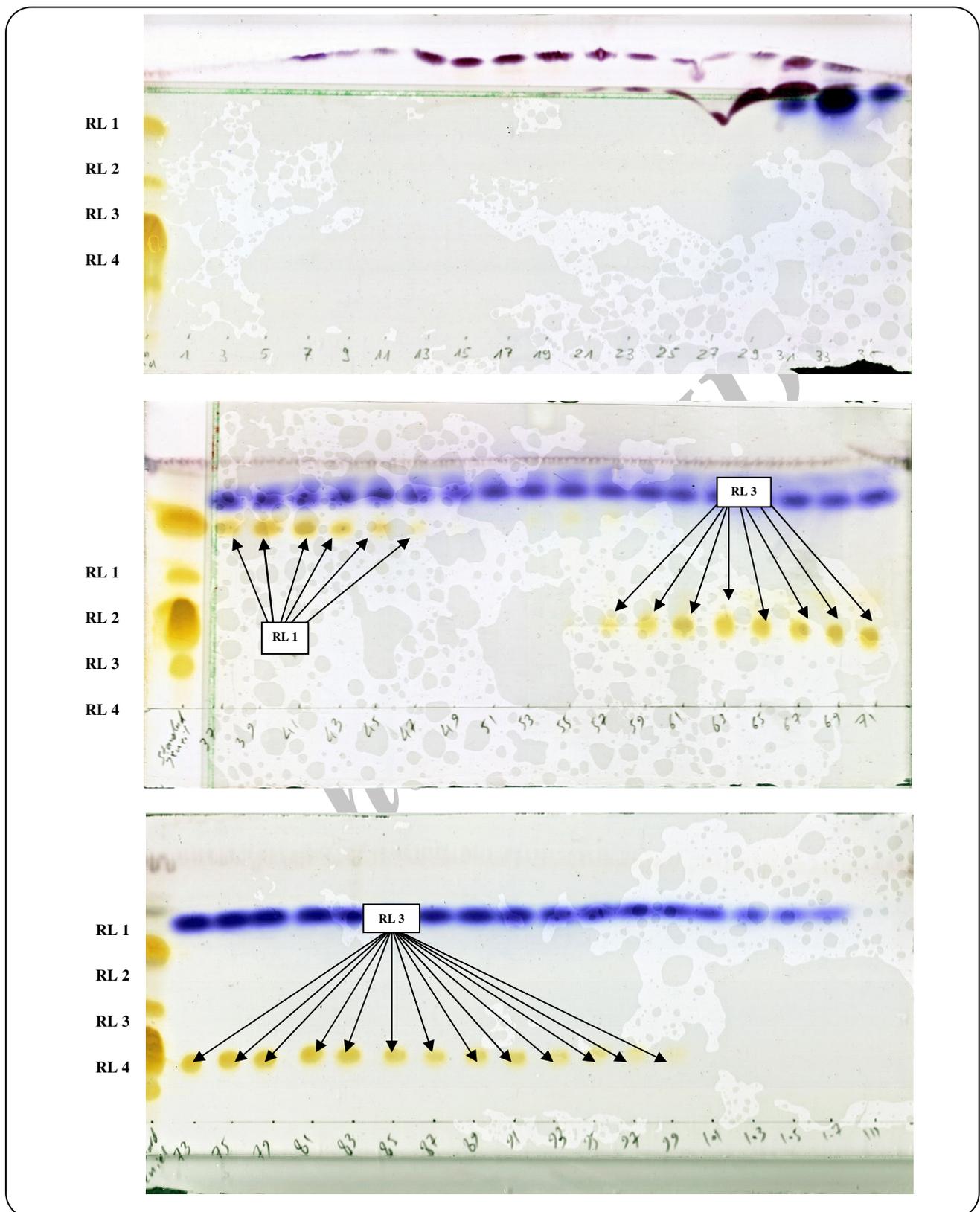
به‌دست آمده از مرحله استخراج با اتیل استات و سپس فاز متحرک به صورت گرادیانی به دستگاه تزریق شد. همچنین برای اثبات جداسازی از روش کار با TLC استفاده شد. نتیجه‌ها در شکل ۷ نمایش داده شده است. همان گونه که در این شکل دیده می‌شود رامنولیبید ۳ و ۱ به طور کامل از هم جدا شده است. نتیجه‌های TLC نشان داد که ظروف ۳۷ تا ۴۷ فقط دارای رامنولیبید نوع ۱ و ظروف ۵۹ تا ۱۰۰ فقط دارای رامنولیبید نوع ۳ می‌باشد. برای جمع‌آوری رامنولیبید ۱، ظروف شیشه‌ای شماره ۳۷ تا ۴۷ و همچنین برای به‌دست آوردن رامنولیبید ۳ ظرف شیشه‌ای شماره ۱۰۰ تا ۵۹ را با هم مخلوط می‌شوند. پس از تبخیر حلال، رامنولیبید ۳ و ۱ به صورت خالص به دست می‌آید. یادآوری می‌شود این دستگاه دارای ظروف شیشه‌ای برای جمع‌آوری محلول‌های خروجی از دستگاه می‌باشد.

همچنین برای اطمینان از جداسازی، دوباره از دو محلول به‌دست آمده آزمایش کروماتوگرافی لایه نازک انجام شد. نتیجه‌ها در شکل ۸ نشان داده شده است. این شکل بیانگر موفقیت‌آمیز بودن عمل جداسازی می‌باشد.

فرایند تولید روغن آفتاب‌گردان به‌عنوان منبع کربنی توانستند رامنولیبید تولید کنند. حجم کاری راکتور ۱/۲ لیتر بود. در طراحی آن‌ها کف مورد نظر به سیستم برگشت داده می‌شد. آنها ۴/۹g/L رامنولیبید به دست آوردند. بنابراین نتیجه‌های به دست آمده از این پژوهش، بسیار بهتر از نتیجه‌های دیگر پژوهشگران است. در پایان آزمایش در حدود ۵۰ میلی لیتر کف در ارلن متصل به راکتور زیستی جمع شد. در تجزیه انجام شده روی کف مشخص شد که غلظت رامنولیبید در آن ۳۲g/L است. بنابراین خارج کردن کف از راکتور زیستی، افزون بر اینکه از افزودن آنتی فوم جلوگیری می‌کند به نظر می‌رسد روش مناسبی برای رسیدن به بیشترین غلظت رامنولیبید نیز باشد. بنابراین می‌توان این روش را برای جداسازی بیوسورفکتانت‌ها پیشنهاد داد.

جداسازی رامنولیبید ۳ و ۱ از یکدیگر با دستگاه MPLC

از آنجایی که رامنولیبید نوع ۱ و رامنولیبید نوع ۳ برای کالیبره کردن دستگاه HPLC ضروری است بنابراین جداسازی این دو ماده از همدیگر با دستگاه MPLC صورت گرفت. ۵ mL از رامنولیبید



شکل ۷- اثبات جداسازی رامنولیپید ۱ و ۳ از نمونه‌های جمع شده در ظروف شیشه‌ای با استفاده از TLC.

باید به نکته توجه نمود که برای اندازه‌گیری غلظت رامنولیبید ابتدا باید دستگاه HPLC را کالیبره نمود. برای این منظور رامنولیبید ۱ و ۳ به دست آمده از قسمت اول با غلظت‌های ۰ و ۰/۲۵ و ۰/۵ و ۰/۷۵ و ۱ گرم بر لیتر به دستگاه تزریق شد و به ثبت مساحت‌های زیر نمودار پرداخته شد. شکل ۹ منحنی کالیبراسیون به دست آمده را نشان می‌دهد. شکل‌های ۱۰ و ۱۱ نمونه‌ای از نتیجه‌ها در مورد تزریق رامنولیبید ۱ و ۳ به طور جداگانه در دستگاه HPLC و شکل ۱۲ نمونه‌ای از تزریق رامنولیبید تولید شده توسط باکتری *Pseudomonas aeruginosa* NP2 استفاده شده در این پژوهش پس از استخراج می‌باشد. بنابراین استفاده از دستگاه HPLC این برتری را دارد که با توجه به زمان خروجی پیک‌ها و مقایسه آنها، هم وجود رامنولیبید ۱ و ۳ اثبات می‌شود و هم غلظت اندازه‌گیری شود.

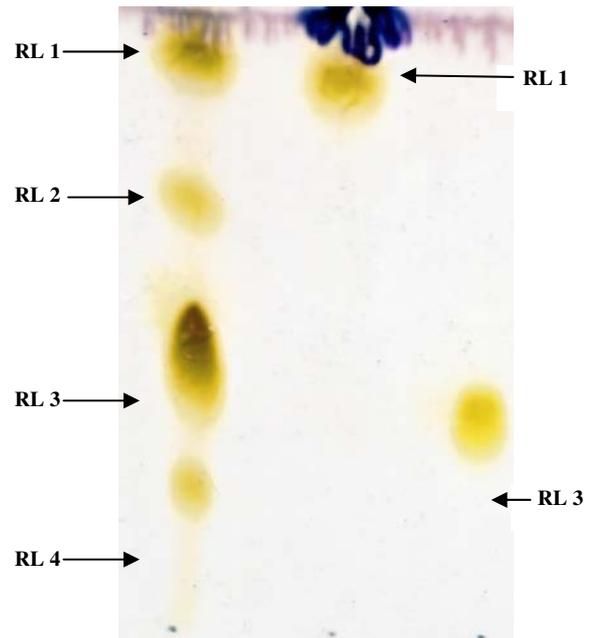
بررسی کشش سطحی رامنولیبید تولید شده

تأثیر غلظت رامنولیبید تولید شده روی کشش سطحی و بین سطحی^(۱) در شکل ۱۳ نشان داده شده است. نتیجه‌ها نشان می‌دهد برای بیوسورفکتنت به دست آمده در این پژوهش، کمترین مقدار غلظت بیوسورفکتنت که بعد از آن دیگر کشش سطحی و بین سطحی تغییر نمی‌شود، برابر 120 mg/L می‌باشد یا به عبارت دیگر کشش سطحی از 68 mN/m به 26 mN/m و بین سطحی از 38 mN/m به 2 mN/m در غلظت CMC می‌رسد.

کاهش کشش سطحی محیط رشد، مهم‌ترین و اصلی‌ترین معیار برای اثبات تولید بیوسورفکتنت به حساب می‌آید. سویه‌های مولد بیوسورفکتنت که توسط پژوهشگران دیگر جداسازی شده‌اند توانسته بودند کشش سطحی محیط رشد را از 69 mN/m تا 27 mN/m کاهش دهد [۷، ۸، ۱۳]. در حالی که بیوسورفکتنت تولید شده توسط سویه‌های مورد بررسی در این پژوهش کشش سطحی آب را از 68 mN/m به حدود 26 mN/m رساند که نتیجه‌های به دست آمده قابل مقایسه با نتیجه‌های پژوهش‌های قبلی می‌باشد.

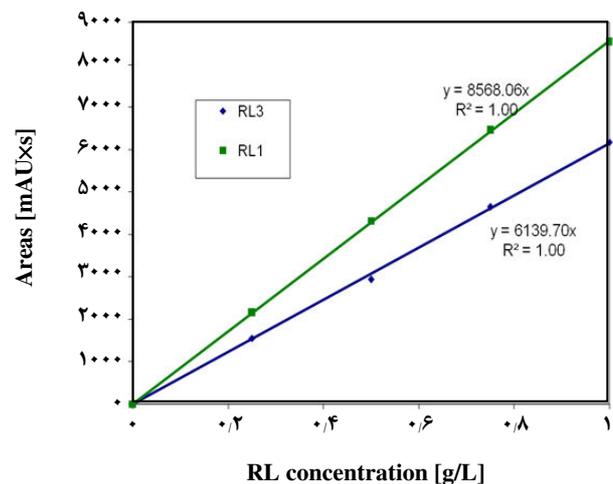
نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر امکان‌پذیری تولید رامنولیبید از *Pseudomonas aeruginosa* NP2 با تخمیر در یک راکتور زیستی اثبات کرد. بررسی رشد *Pseudomonas aeruginosa* NP2 در راکتور زیستی با اندازه‌گیری غلظت رامنولیبید توسط HPLC و TLC نشان داد که رامنولیبید در انتهای فاز لگاریتمی و ابتدای فاز سکون رشد



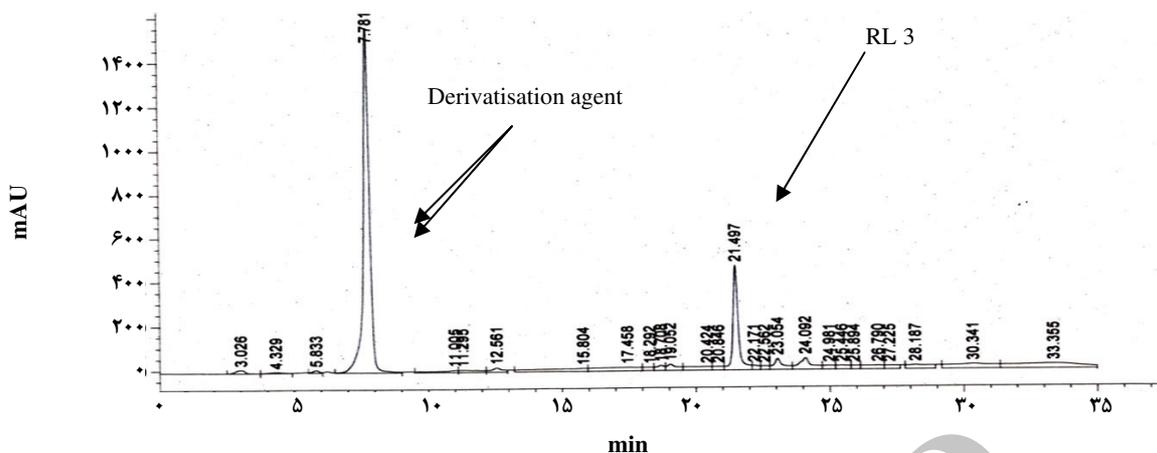
۱	۲	۳
استاندارد جنیل	مخلوط ۳۷ تا ۴۷	مخلوط ۵۹ تا ۱۰۰

شکل ۸ - اثبات جداسازی جداسازی رامنولیبید ۱ و ۳ از دو نمونه مخلوط شده (شماره ۳۷ تا ۴۷ و شماره ۱۰۰ تا ۵۹) در ظروف شیشه‌ای با استفاده از TLC.

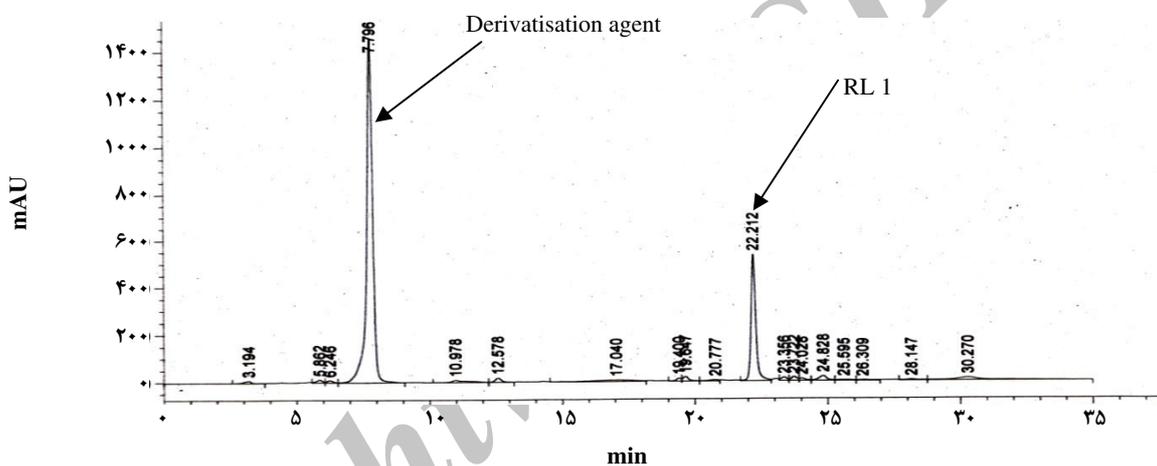


شکل ۹ - منحنی کالیبراسیون به دست آمده از رامنولیبید ۱ و ۳ با غلظت‌های ۰ و ۰/۲۵ و ۰/۵ و ۰/۷۵ و ۱ گرم بر لیتر به دستگاه HPLC.

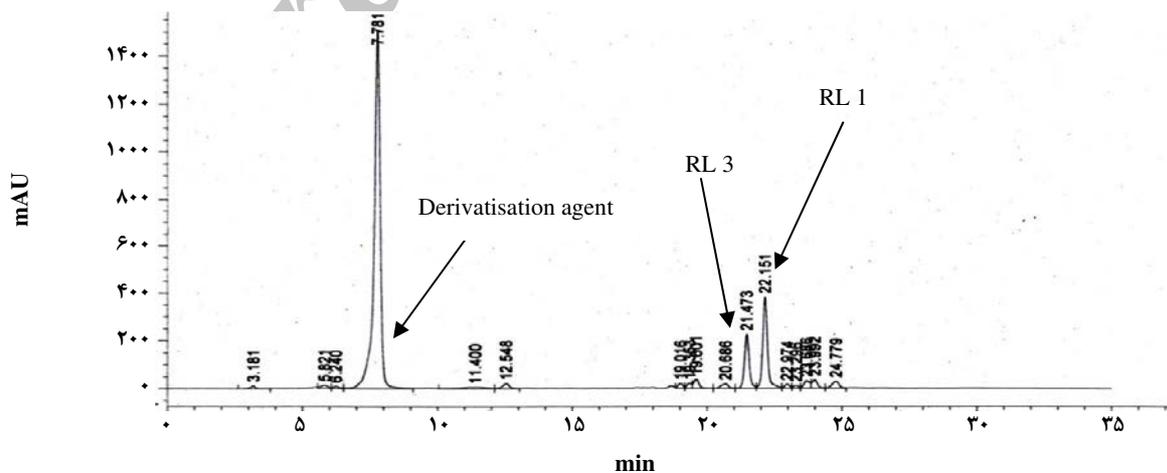
(۱) Interfacial tension



شکل ۱۰- نمونه‌ای از نتیجه‌های دستگاه HPLC در مورد تزریق رامنولیبید ۳ به تنهایی.



شکل ۱۱- نمونه‌ای از نتیجه‌های دستگاه HPLC در مورد تزریق رامنولیبید ۱ به تنهایی.



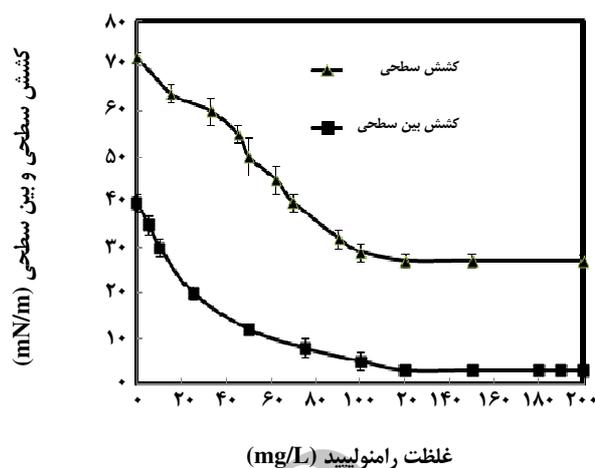
شکل ۱۲- نمونه‌ای از نتیجه‌های دستگاه HPLC در مورد تزریق رامنولیبید تولید شده در این پژوهش.

برای کالیبره کردن دستگاه HPLC لازم بود، جداسازی این دو ماده از همدیگر با دستگاه MPLC صورت گرفت. نتیجه‌های TLC نشان داد رامنولیپید ۳ و ۱ به طور کامل از هم جدا شده است که از این موضوع می‌توان در صنایع دارویی استفاده نمود. بیوسورفکتنت تولید شده توسط سویه مورد بررسی در این پژوهش کشش سطحی آب را از ۶۸ mN/m به حدود ۲۶ mN/m رساند. این نتیجه با نتیجه‌های ذکر شده به وسیله دیگر پژوهشگران دیگر سازگار است. باکتری‌های مولد بیوسورفکتنت جداسازی شده توسط پژوهشگران دیگر جداسازی شده‌اند توانسته بودند کشش سطحی محیط رشد را از ۶۹ mN/m تا ۲۷ mN/m کاهش دهد [۷، ۸ و ۱۳]. با توجه به نتیجه‌های مثبت به دست آمده از این پژوهش، می‌توان باکتری بومی *Pseudomonas aeruginosa* NP2 و ماده تولیدی آن را برای کاربردهای صنعتی پیشنهاد داد.

قدردانی

نویسنده این مقاله از شرکت مهندسی و توسعه نفت به خاطر تأمین هزینه‌ها و حمایت‌های مادی این پروژه (قرارداد شماره ۵۵۳-م ت ن) تشکر و قدردانی می‌نماید. همچنین از جناب آقای پرفسور کریستوف سیلداک، جناب آقای دکتر رادولف هازمن و جناب آقای مهندس مارکوس مولر از دانشگاه صنعتی کارل‌سروهه آلمان به خاطر در اختیار قرار دادن کلیه امکانات آزمایشگاهی آن دانشگاه و راهنمایی‌های ارزنده خود تشکر و قدردانی ویژه خود را می‌نمایم.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۲/۱۶



شکل ۱۳- نمودار تغییرات کشش سطحی و بین سطحی بر حسب غلظت رامنولیپید تولید شده.

تولید می‌شود. این نتیجه با نتیجه‌های ذکر شده به وسیله دیگر پژوهشگران مانند مولر و همکاران [۸]، هورمان و همکاران [۷] و سیلداک و همکاران [۱۲] سازگار است. این یافته‌ها نشان دهنده معتبر بودن نتیجه‌های این پژوهش می‌باشد. بیشترین میزان رامنولیپید تولید شده در محیط روغن آفتاب‌گردان برابر با ۱۳/۵ g/L در راکتور زیستی به دست آمد. البته برای افزایش تولید می‌توان از راکتورهای زیستی بزرگتر استفاده نمود. برای اثبات تولید رامنولیپید، آزمایش کروماتوگرافی لایه نازک همراه با شاهد و استاندارد انجام شد. همچنین برای اثبات و بررسی بیشتر تولید این ماده در دستگاه HPLC با توجه به زمان خروجی پیک‌ها و مقایسه پیک‌ها با پیک‌های استاندارد جنیل، تولید رامنولیپید ۳ و ۱ اثبات شد. از آنجایی که رامنولیپید نوع ۱ و رامنولیپید نوع ۳

مراجع

- [1] Sen R., Biotechnology in Petroleum Recovery: The microbial EOR, *Progress in Energy and Combustion Science*, **34**, p. 714 (2008).
- [2] Nasr S., Soudi M.R., Mehrnia M.R., Sarrafzadeh M.H., Characterization of Novel Biosurfactant Producing Sstrains of *Bacillus spp.* Isolated from Petroleum Contaminated Soil, *Iranian Journal of Microbiology*, **1**, p. 54 (2009).
- [۳] راشدی ح.، جمشیدی ا.، مظاهری اسدی م.، بنکدار پور ب.، بررسی تولید رامنولیپید توسط میکروارگانیسم *سودوموناس آرجینوزا* جدا شده از مخازن نفتی، *نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران*، (۱) ۲۵، ص. ۲۵ (۱۳۸۵)

- [۴] امینی ف.، صمدی ن.، هرانده م.، نقدی م.، شریفان ان.، بررسی شرایط تولید رامنولیپید حاصل از سویه‌های مختلف سودوموناس آرجینوزا، نشریه علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۱، ص. ۳۳ (۱۳۸۸).
- [5] Fiechter A., Integrated System for Biosurfactant Synthesis, *Biotechnology*, **2**, p.1739 (1992).
- [6] Nereus W., Daniel K.Y., Processes for the Production of Rhamnolipids, *USP 7,202,063 B1*. (2007).
- [7] Hörmann B., Müller M.M., Syldatk C., Hausmann R., Rhamnolipid Production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **112**, p. 674 (2010).
- [8] Müller M.M., Hörmann B., Syldatk C., Hausmann R., *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a Model for Rhamnolipid Production in Bbioreactor Systems, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, p. 167 (2010).
- [9] Davis D.A., Lyncha H.C., Varley J., The Application of Foaming Recovery of Surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 Cultures, *Enzyme Microbiol. Technol.*, **28**, p. 346 (2001).
- [10] Chen C.Y., Baker S.C., Darton R.C., Batch Production of Biosurfactant with Foam Fractionation, *Chem. Technol. Biotechnol.*, **81**, p. 1923 (2006).
- [۱۱] امانی ح.، بررسی فرایند ازدیاد برداشت میکروبی نفت با بیوسورفکتنت‌ها، پایان نامه دکتری، دانشکده فنی، دانشگاه تهران، (۱۳۸۹).
- [12] Syldatk C., Lang S., Wagner F., Wray V., Witte L., Chemical and Physical Characterization of Four Interfacial-Active Rhamnolipids from *Pseudomonas* Spec. DSM 2874 Grown on n-Alkanes, *Z Naturforsch*, **40**, p.51 (1985).
- [13] Benincasa M., Contiero J., Manresa M.A., Moraes I.O., Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* Lbi, *Journal of Food Engineering*, **54**, p.283 (2002).