Archive of SID

تولید امولسیون کننده امولسان با استفاده از باکتری *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 ATCC-31012

سید سامان موسویان[1*]، یوسف رحیمی کشکولی[2]

1- عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گچساران

2- مدرس دانشگاه آزاد اسلامی واحد گچساران

(تاریخ دریافت: 88/11/26 تاریخ پذیرش:89/5/24)

چکیده

امولسان امولسیون کننده ای است که توسط باکتری *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 ATCC-31012 تولید می شود و در حال حاضر کاربردهای زیادی درصنایع غذایی (تهیه پنیرهای نرم وانواع بستنی) دارد. در این تحقیق توانایی تولید این امولسیون کننده با باکتری ذکر شده در دمای $30\ ^{o}C$ با استفاده از طرح رویه پاسخ مورد ارزیابی قرار گرفته است. نفت خام و سولفات آمونیوم به عنوان منبع کربن و منبع نیتروژن در مقادیر مختلف مورد استفاده قرار گرفتند. بهینه محیط کشت برای تولید امولسان برابر با 4%(v/v) منبع کربن، 3 g/l منبع نیتروژن و 7% (v/v) میزان درصد تلقیح بدست آمده است که در این شرایط بیشترین تولید توده سلولی و بیشترین کاهش کشش سطحی بترتیب 2/9 g/l و 30 mN/m می باشد. ضریب همبستگی مدل محاسباتی یا R^2 (adj) برای مقدار توده سلولی تولیدی و میزان کاهش کشش سطحی بترتیب برابر97/13% و 95/52% بدست آمده است.

کلید واژگان: امولسیون کننده، امولسان، کشش سطحی، توده سلولی.

1 - مقدمه

امولسیون کننده ها ترکیباتی آمفی فیلیک شامل دو بخش هیدروفوبیک (غیر قطبی) و هیدروفیلیک (قطبی) هستند که بین فازهای سیال مثلاً (روغن/ آب) یا (هوا/ آب) تجمع یافته، باعث کاهش کشش سطحی و بین سطحی و تشکیل امولسیون می شوند. خصوصیات فعال سطحی باعث می شود که امولسیون کننده ها یکی ازمهمترین و اساسی ترین محصولات صنعتی شود و دارای کاربردهای وسیع در صنایع غذایی، کشاورزی، دارویی و صنعت نفت می باشد. امولسان که نوعی امولسیون کننده پلیمری است توسط باکتری *A. calcoaceticus*RAG-1 تولید می شود به دلیل استفاده در صنایع غذایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است. اساساً امولسیون کننده ها به عنوان عامل انحلال هیدروکربنها جلب توجه می کند، اما نکته مهم این است که این ملکول ها در پنج دهه گذشته به عنوان جانشین سورفکتانت های شیمیایی (کربوکسیلیک ها، سولفونیتها و سولفات اسید استرها) مخصوصاً در صنایع غذایی، داروسازی و ازدیاد برداشت نفت، افزایش نسبتاً زیادی داشته است. امولسیون کننده ها به‌دلیل دارا بودن ویژگی‌هایی مانند امولسیون‌سازی و امولسیون زدایی، تشکیل کف، قابلیت پیوند با آب، خواص مرطوب ساختن، اثر بر ویسکوزیته و پایداری محصول مورد استفاده قرار می‌گیرند. این ترکیبات به علت داشتن

* مسئول مکاتبات : s.mousavian@iaug.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

تجزیه پذیری زیستی آسان ، فعالیت ویژه در حرارت های بالا و pH های مختلف، قابلیت تولید از مواد ارزان، داشتن سمیت کمتر و سازگاری مناسب محیطی و ساختار منحصر به فرد خواص جدیدی را ایجاد می کند که نسبت به سورفکتانت های شیمیایی ارجحیت دارند[1و2]. امولسیون کننده ها، در صنایع غذایی نقش مهمی را در ایجاد سازگاری و قوام مطلوب غذا ایجاد می‌کنند و در تهیه انواع سس ها، ادویه مخصوص سالاد، پنیرهای نرم و بستنی کاربرد دارند. در محصولات لبنیاتی مثل پنیر نرم و بستنی افزودن امولسیون کننده ها میزان خامه ای بودن را بهبود می بخشند که این ویژگی برای محصولات کم چرب از ارزش خاصی برخوردار است[3]. لیپوپپتید بدست آمده از باکتری *Bacillus subtilis* قادر به ایجاد امولسیون های پایدار با روغن سویا و روغن نارگیل می باشد که باعث شده به عنوان یک عامل امولسیون کننده قوی در غذا استفاده شود[4]. امولسیون کننده بدست آمده از *Candida utilis* بیوامولسانی با وزن مولکولی زیاد است که در چاشنی سالاد به‌کاربرده می‌شود[4]. در صنایع گوشت و نانوایی این ترکیبات در ایجاد طعم و امولسیفیکاسیون بافت‌های چربی که‌بصورت جزیی شکسته شده‌اند، نقش مهمی را ایفا می‌کنند[4].

هدف از تحقیق حاضر بهینه سازی محیط کشت تولید امولسان با استفاده از باکتری *A .calcoaceticus* RAG-1 ATCC-31012 در دمای 30 ^{o}C است. از روش CCD[1] که از روش های طرح رویه پاسخ است جهت طراحی آزمایشات استفاده می شود.

2 - مواد و روش‌ها

2-1 ارگانیسم: میکروارگانیسم استفاده شده باکتری *A .calcoaceticus* RAG-1 ATCC-31012 می باشد که از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید.

2-2 شرایط محیط کشت: آبگوشت غذایی (Nutrient broth) برای آماده کردن مایه تلقیح استفاده شده است. ریزسازواره ها در 34 ^{o}C به مدت 40-35 ساعت تا رسیدن به دانسیته نوری 1/22-1 در طول موج 600 nm رشد کردند و در مقادیر مختلف3% ، 5% و7(v/v)% استفاده شدند.

برای تولید امولسان محیط کشت با ترکیب نشان داده شده در جدول (1) بکار برده شده است. منبع کربنی انتخابی، نفت خام تهیه شده از پالایشگاه آبادان بوده است که در مقادیر2% ، 3% و 4(v/v)% اضافه می شود. لازم به ذکر است که نفت خام را به مدت 72 ساعت در دمای 50 ^{o}C در ظرف در باز در آون قرار داده شد تا ترکیبات فرار آن خارج شود، سپس در اتوکلاو استریل کردیم. سولفات آمونیوم نیز به عنوان منبع نیتروژن با مقادیر مختلف 1، 2 و 3 g/l به محیط کشت اضافه گردید. مطالعه رشد میکروارگانیسم و تولید امولسان در فلاسک های 500 ml محتوی 150ml محیط کشت در 30 ^{o}C درون شیکر انکوباتور با دور 180rpm انجام شده است. pH نهایی محیط کشت روی 7 تنظیم شد. نمونه ها را پس از 96 ساعت برداشته و توده سلولی و کشش سطحی سنجیده می شود. آزمایشات تکرار و نتایج از متوسط دو آزمایش مستقل گزارش شده است.

جدول 1 ترکیب محیط کشت مورد استفاده در تولید امولسان

ترکیب محیط کشت	مقدار مورد نیاز(g/l)
K_2HPO_4	5.60
KH_2PO_4	2.43
$MgSO_4.7H_2O$	0.50
Trace elements [a]	4.00*

[a] محلول Trace elements (ml) محتوی مواد زیر است:

$ZnSO_4.7H_2O$, 0.422; $MnSO_4.H_2O$, 0.594; $CuSO_4.5H_2O$, 0.624; $CaCl_2.2H_2O$, 0.367; $Na_2MoO_4.2H_2O$, 0.696; $CoCl_2.6H_2O$, 0.788; EDTA, 0.680; $FeSO_4.7H_2O$,0.604

2-3 سنجش توده سلولی: برای اندازه گیری توده سلولی 50 ml از نمونه را برداشته و با دور 10000 g× در دمای 10 ^{o}C برای مدت 20 دقیقه سانتریفوژ می کنیم، رسوب ته نشین شده (توده سلولی) را با قرار دادن در آون در دمای 105 ^{o}C برای یک شب خشک کرده و سپس وزن می کنیم[5].

2-4 اندازه گیری کشش سطحی: کشش سطحی با استفاده از دستگاه تنسیومتر (model K10 ST Kruss, Germany) اندازه گیری شد. همه اندازه گیریها روی مایع بدون سلول انجام می گیرد.

1. Central composite design

www.SID.ir

Archive of SID

5-2 طراحی آزمایشات: در این تحقیق از روش CCDجهت طراحی آزمایشات استفاده شده است. هدف این تحقیق بهینه سازی شرایط محیط کشت جهت تولید امولسان می باشد. طبق بررسی های انجام شده، سه پارامتر منبع کربن، منبع نیتروژن و درصد تلقیح بیشترین تاثیر را نسبت به سایر پارامتر ها در تولید این امولسیون کننده دارند. لذا جهت بهینه سازی تولید این امولسیون کننده سه پارامتر مذکور را با توجه به روش استفاده شده برای طراحی آزمایشات به عنوان متغیر های مورد نظر و با سه سطح در مقادیر کد شده (1+ و0و 1-) و مقادیر واقعی، مطابق جدول 2 در نظر گرفته شد.

جدول2 مقادیر کدشده و واقعی متغیرهای مستقل در سطوح مختلف

متغیرهای مستقل	علائم	مقادیر کدشده و واقعی		
		-1	0	+1
میزان هیدروکربن (نفت خام) (%v/v)	A	2	3	4
سولفات آمونیوم (g/l)	B	1	2	3
میزان درصد تلقیح (%v/v)	C	3	5	7

با استفاده از روش CCD و با کمک بسته نرم افزاری Design Expert (Version 7.0., USA) و سطوح غلظت در نظر گرفته شده برای هر یک از متغیرها آزمایشات را طراحی کرده و چیدمان آنها و نتایج بدست آمده را برای میزان توده سلولی تولیدی و کاهش کشش سطحی مطابق جدول 3 مشخص نمودیم. جدول 3 آرایش روش CCD را با 6 تکرار در نقطه مرکزی نشان می دهد. مدل اولیه پیشنهادی و پیش فرض را به صورت Full quadratic با در نظر گرفتن تمامی ترمها به صورت معادله (1) در نظر می گیریم. داده های آزمایشگاهی بدست آمده با این معادله مطابقت داده می شود:

معادله(1)

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j + e$$

که در آن y وε بترتیب پاسخ بدست آمده و خطای تصادفی است. x ها بیان کننده متغیرهای مستقل انتخاب شده در مقادیر کد شده می باشد. β ها ضرایب معادله می‌باشند وجهت برازش و محاسبه ضرایب معادله لازم است که داده‌های تجربی بدست آمده با استفاده از رگرسیون و آنالیز واریانس (ANOVA)[2] تحلیل شود. بدین منظور رگرسیون و تحلیل واریانس با استفاده از بسته نرم افزاری Design Expert 7.0 انجام گرفت.

جدول 3 چیدمان روش CCD برای سه متغیر مستقل استفاده شده در این تحقیق و نتایج توده سلولی تولیدی (Y_1) و میزان کاهش کشش سطحی (Y_2)

شماره آزمایش	متغیر های مستقل (مقادیر کدشده)			مقادیر نتایج بدست آمده	
	A	B	C	Y_1 (g/l)	Y_2 (mN/m)
1	-1	-1	-1	0.865	58.00
2	+1	-1	-1	1.800	56.40
3	-1	+1	-1	1.400	57.00
4	+1	+1	-1	1.900	50.00
5	-1	-1	+1	0.875	58.00
6	+1	-1	+1	1.750	54.20
7	-1	+1	+1	2.100	40.00
8	+1	+1	+1	2.900	30.00
9	-1	0	0	1.522	51.08
10	+1	0	0	2.200	40.40
11	0	-1	0	1.616	49.37
12	0	+1	0	2.227	34.85
13	0	0	-1	1.700	53.80
14	0	0	+1	2.210	39.00
15	0	0	0	2.050	40.00
16	0	0	0	2.100	42.00
17	0	0	0	2.212	41.00
18	0	0	0	2.000	43.00
19	0	0	0	1.990	44.00
20	0	0	0	1.950	43.00

3- نتایج و بحث

در فرایند تولید امولسان پارامترهای مهمی نقش دارد. در میان پارامترهایی که بر روی تولید امولسیون کنندها موثر است، نوع منبع کربن و منبع نیتروژن احتمالاً محدودیت های غذائی و پارامترهای فیزیکی و شیمیایی مانند حرارت و pH از همه مهمترند[6]. امولسیون کننده ها توسط انواع مختلفی از میکرو ارگانسیم ها یا به صورت خارج سلولی و یامتصل به

2. Analysis of variance

www.SID.ir

Archive of SID

قسمت هایی از سلول، اغلب طی رشد بر روی سوبستراهای نامحلول در آب تولید می شوند و با کاهش کشش بین دو سطح امکان در دسترس قرار گرفتن سوبسترا برای مصرف و متابولیسم میکروارگانسیم فراهم می سازد [7]. حل نمودن هیدروکربن توسط امولسیون کنندهها مرحله مهمی از جذب مواد غذایی و استفاده از آن برای میکروارگانیسم ها می باشد. ثابت شده است که امولسیون کنندهها نقش مهمی در چسبندگی سلول ایفا می کنند که سبب پایداری بیشتر سلول تحت شرایط نامساعد محیطی می گردد. به هنگام رشد باکتری مورد استفاده بر روی نفت خام، حضور امولسان با میزان رشد لگاریتمی سلولهای متصل به هیدروکربن نشان داده شده است. امولسان در طول فاز لگاریتمی کپسول کوچکی را در سطح سلول باکتری ایجاد می نماید. در واقع امولسان یک فیلم یا لایه ای به ضخامت 20nm روی سطح الکان ذرات نفتی ایجاد می کند و این امر باعث پایداری و تثبیت ذرات نفت می شود. این باکتری از طریق فیمبریه نازک به ذرات نفت متصل می گردد. در هنگام عبور از فاز لگاریتمی رشد به فاز مرگ، امولسان متصل شده به سلول در داخل محیط کشت آزاد می شود [7و8و9].

3-1 تحلیل آزمایشات و مدلسازی پارامترهای مؤثر بر فرایند تولید امولسان

مطابق آنچه در قسمت مواد و روشها، همچنین قسمت طراحی آزمایشات گفته شد آزمایشات را طبق جدول طراحی شده روش CCD، با در نظر گرفتن سه متغیر منبع کربن، درصد تلقیح و منبع نیتروژنی برابر با 20 آزمایش همراه با 6 بار تکرار در نقطه مرکزی ، برای کاهش خطا انجام می دهیم. جدول آزمایشات طراحی شده با توجه به متغیرهای فرض شده به صورت کد شده ونتایج بدست آمده برای میزان توده سلولی تولیدی و کاهش کشش سطحی مطابق جدول (3) آورده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده به دنبال ارائه مدلی مناسب بر اساس مدل اولیه (معادله 1) برای تولید امولسان با توجه به سه متغیر فرض شده منبع کربن، منبع نیتروژن و درصد تلقیح می باشیم. همانطور که گفته شد مدل اولیه به صورت Full quadratic در نظر گرفته شد، به عبارت دیگر فرض اولیه و پیشنهادی، مؤکد بر موثر بودن تمامی ترمها (متغیرها با توان اول و دوم و اثر متقابل متغیرها) و در نظر گرفتن آنها در مدل بود. ولی در عمل برخی از ترم های در نظر گرفته شده در مدل اضافی بوده و باید حذف شوند، لذا احتیاج به یک تحلیل آماری جهت مشخص نمودن ترم های موثر از غیرموثر داریم. این تحلیل با استفاده از آزمون فرض و پارامتر P-value انجام می شود. محاسبات مربوطه توسط نرم افزار Design Expert 7.0 انجام داده شد و پس از حذف ترم های غیر موثر به جدول تحلیل آماری (جدول 4) می رسیم. معادله (2) و (3) بترتیب مدل محاسباتی برای مقدار توده سلولی تولیدی وکاهش کشش سطحی را با توجه به ضرایب محاسبه شده نشان می دهد.

$$Y_1 = 2.022 + 0.378\,A + 0.362\,B + 0.217\,C - 0.188\,A^2 - 0.127\,B^2 - 0.063\,AB + 0.217\,BC$$ معادله (2)

$$Y_2 = 42.106 - 3.308\,A - 6.412\,B - 5.400\,C + 3.818\,A^2 + 4.478\,C^2 - 1.450\,AB - 4.350\,BC$$ معادله (3)

جدول 4 نتایج آنالیز واریانس برای توده سلولی تولیدی (Y_1) و کاهش کشش سطحی (Y_2)

ource	Y_1				Y_2			
	SS	df	F-value	P-value	SS	df	F-value	P-value
lodel	4.030	7	92.760	0.0001	1256.2	7	58.850	0.0001
A	1.430	1	231.09	0.0001	109.43	1	35.890	0.0001
B	1.310	1	211.17	0.0001	411014	1	134.84	0.0001
C	0.470	1	75.840	0.0001	291.60	1	95.630	0.0001
AB	0.033	1	5.2400	0.0411	16.820	1	5.5200	0.0368
AC	-------	---	-------	-------	-------	---	-------	-------
BC	0.380	1	60.950	0.0001	151.38	1	49.650	0.0001
A^2	0.110	1	18.290	0.0011	46.670	1	15.300	0.0021
B^2	0.052	1	8.4300	0.0133	-------	---	-------	-------
C^2	-------	---	-------	-------	64.190	1	21.050	0.0006
esidua	0.075	12	-------	-------	36.590	12	-------	-------
l	0.052	7	1.6900	0.2918	25.760	7	1.7000	0.2896
ack of	0.022	5	-------	-------	10.830	5	-------	-------
fit	4.110	19	-------	-------	1292.8	19	-------	-------
Pure error								
Total								

در جدول (4)، DF[3] : بـه معنـای درجـه آزادی ،SS[4] : بـه معنای مجموع مربعات، MS[5] : کمیتی مشابه واریـانس اسـت به معنای میانگین مربعـات و P-Value ، F-Value مقـادیر عددی تعیین کننده در پذیرش و یا رد فرض آماری مورد نظر می‌باشند. مهم ترین قسمت در جدول تحلیل آماری در بخـش

3. DF: Degrees of Freedom
4 . SS: Sum of Square
5. MS: Mean Square

www.SID.ir

Archive of SID

آنالیز واریانسها ، پارامتری به نام Lack of fit می باشد. این پارامتر نشان دهنده مناسب بودن یا نامناسب بودن مدل می باشد. مقادیر کوچک P و بزرگ F بیانگر نامناسب بودن مدل محاسباتی است و چنانچه مقدار P کوچکتر از 0/05 باشد به صورت کلی مدل را باید کنار گذاشت. با توجه به جدول (4) مقدار P و F پارامتر Lack of fit مدل برای مقدار توده سلولی تولیدی برابراست با P = 0.2918 و F = 1.6900 و برای میزان کاهش کشش سطحی برابراست با P =0.2896 و F = 1.7000 بدست آمده است که با توجه به توضیحات داده شده، بیانگر مناسب بودن مدل های محاسباتی می باشد. ضریب همبستگی مدل محاسباتی یا R^2 (adj) همانطور که در جدول (5) مشخص است برای مقدار توده سلولی تولیدی و میزان کاهش کشش سطحی بترتیب برابر97/13% و 95/52% بدست آمده است. به طور معمول R های بالای 60% بیانگر ضریب همبستگی نسبتاً خوبی هستند و نشان دهنده انطباق داده ها و خط محاسباتی حاصل از رگراسیون می باشند. که نتایج بدست آمده برای ضرایب همبستگی مدل، بیانگر تطابق بسیار خوب و عالی مدل های محاسباتی با نقاط آزمایش شده و دقت بالای مدل ها می باشد. مطلبی که باید به آن توجه کرد تفاوت بین R^2 و R^2 (adj) است. مقدار R^2 با افزایش تعداد آزمایشات و در نتیجه افزایش درجه آزادی زیاد می شود که این افزایش غیرواقعی و کاذب می باشد لذا آماردانان به طور معمول R^2 (adj) را که بیانگر مقدار حقیقی همبستگی است مورد استناد قرار داده و گزارش می دهند.

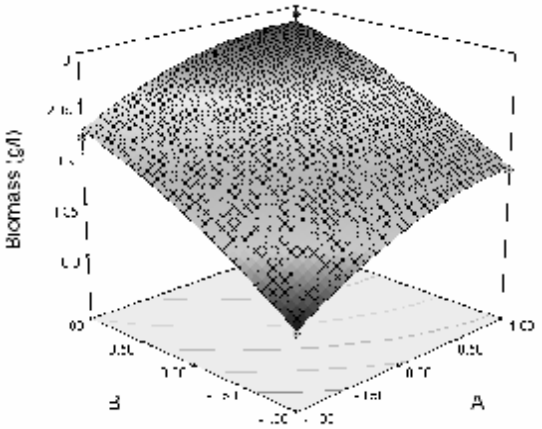
جدول 5 پارامترهای آماری بدست آمده برای مقدار توده سلولی تولیدی(Y_1) و میزان کاهش کشش سطحی (Y_2)

پارامترهای آماری	Y_1	Y_2
R^2	0.9819	0.9717
R^2 adjusted	0.9713	0.9552
Std.Dev	0.0790	1.7500
Mean	1.8600	46.250
Coefficient of variance	4.2300	3.7800
PRESS	0.3200	131.01
Predicted R^2	0.9222	0.8987
Adequate precision	38.462	27.382

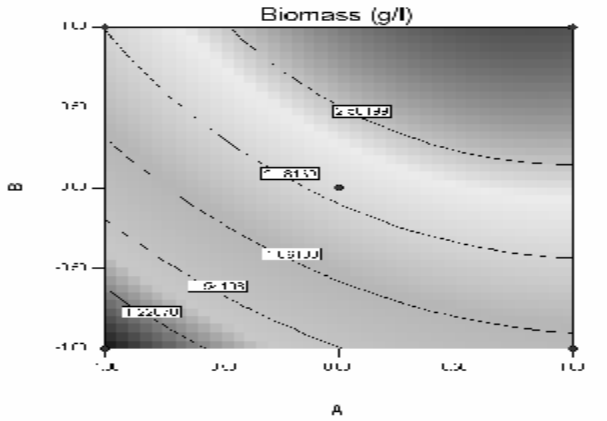
2-3 نمودارهای سطح سه بعدی (Surface plots) و مسطح (Contour)

این نمودارها میزان و غلظت محصول تولیدی را در برابر متغیرها به صورت سه بعدی و مسطح نشان می دهد. این اشکال فضایی با استفاده از نقاط آزمایش شده و همچنین درونیابی سایر نقاط با استفاده از مدل محاسباتی صورت می گیرد. شکل (1) و شکل (2) بترتیب نمودار سطح سه بعدی و مسطح رشد سلولی (توده سلولی تولیدی) و میزان کاهش کشش سطحی را برای اثر متقابل دو فاکتور منبع کربنی (A) و منبع نیتروژنی (B) نشان می دهد.

الف)



ب)

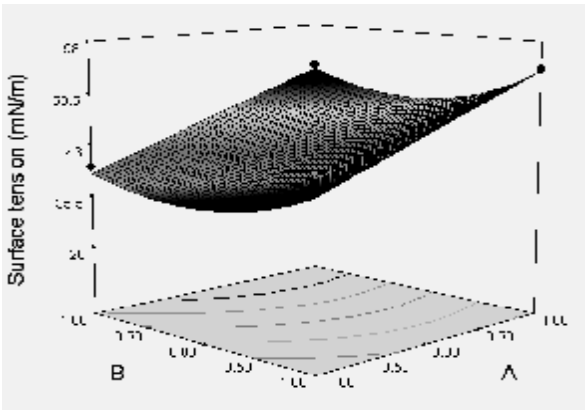


شکل 1 میزان رشد سلولی (توده سلولی تولیدی) باکتری A calcoaceticus RAG-1 ATCC-31012. در دمای $30\ ^{\circ}C$، نمودار سطح سه بعدی (الف) و نمودار مسطح (ب)، منبع کربنی(A) و منبع نیتروژنی(B) فاکتورهای متغیر و درصد تلقیح (C) در سطح 1+ ثابت نگه داشته شده است.

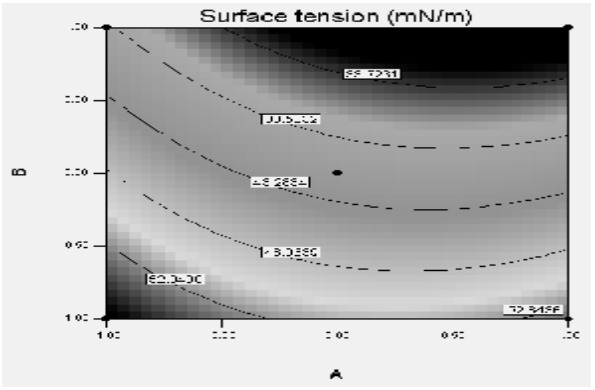
www.SID.ir

Archive of SID

الف)



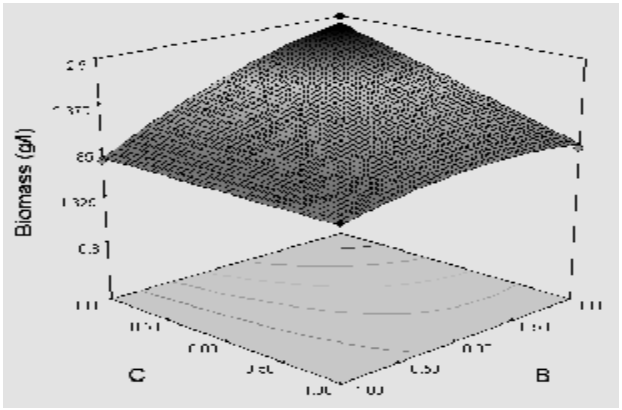
ب)



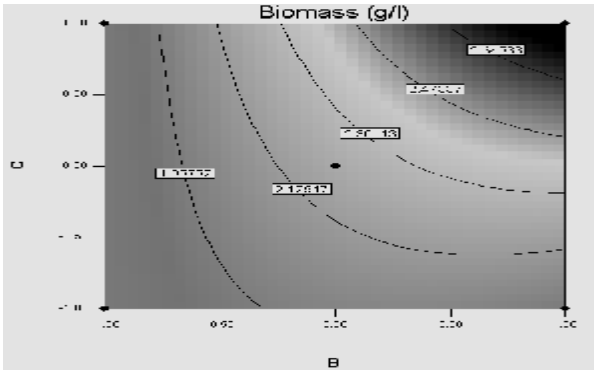
شکل 2 میزان کاهش کشش سطحی امولسان تولید شده از باکتری A .calcoaceticus RAG-1 ATCC-31012 در دمای $30\ ^{\circ}C$، نمودار سطح سه بعدی (الف) و نمودار مسطح (ب) ، منبع کربنی(A) و منبع نیتروژنی(B) فاکتورهای متغیر و درصد تلقیح (C) در سطح 1+ ثابت نگه داشته شده است.

در این شکل ها منبع کربنی و منبع نیتروژنی فاکتورهای متغیر هستند و میزان درصد تلقیح فاکتور ثابت و بطور انتخابی در بالاترین سطح یعنی (%v/v) 7 ثابت نگه داشته شده است. همانطور که مشاهده می کنید در نمودارهای شکل (1) هر چه بر میزان منبع کربن (نفت خام) و منبع نیتروژن (سولفات آمونیوم) افزوده می شود تولید توده سلولی افزایش می یابد و در غلظت های بالای نفت خام و سولفات آمونیوم که بترتیب (%v/v) 4 و(g/l) 3 می باشد بیشترین تولید توده سلولی در حدود 2/9 g/l بدست آمده است که نشان دهنده این است که منبع کربن و نیتروژن در رشد باکتری موثربوده و محدود کننده رشد باکتری نمی باشند. در نمودارهای شکل (2) نیز بیشترین کاهش کشش سطحی زمانی است که بر میزان منبع کربن (نفت خام) و منبع نیتروژن (سولفات آمونیوم) افزوده می شود و این میزان در غلظت های بالای نفت خام و سولفات آمونیوم در حدود 30 mN/m بدست آمده است. شکل (3) و (4) نیز نمودارهای سطح سه بعدی و مسطح رشد سلولی (توده سلولی تولیدی) و میزان کاهش کشش سطحی را برای اثر متقابل دو فاکتور منبع نیتروژنی (B) و میزان درصد تلقیح (C) نشان می دهد. همانطور که در این نمودارها مشاهده می کنید منبع کربنی (A) فاکتور ثابت و بطور انتخابی در بالاترین سطح یعنی (%v/v) 4 ثابت نگه داشته شده است. در این نمودارها با توجه به شکل مشاهده می کنیم که کشش سطحی در (%v/v) 7 تلقیح کمترین مقدار را دارد. چون تولید امولسان وابسته به رشد باکتری است از این رو هر چه میزان باکتری بیشتر باشد مقدار تولید امولسان نیز بیشتر خواهد بود و در نتیجه از میزان کشش سطحی کاسته می گردد. با توجه به نتایج بدست آمده از اثر جداگانه و متقابل هر یک از پارامترها بر مقدار توده سلولی تولیدی و میزان کاهش کشش سطحی برای هر یک از متغیرها سطوح بهینه عوامل در نظر گرفته شده به صورت الف: درصد بهینه منبع کربن (%v/v) 4 ب : غلظت بهینه منبع نیتروژنی (g/l) 3 ج : درصد بهینه تلقیح (%v/v) 7 بدست آمده است.

الف)



ب)

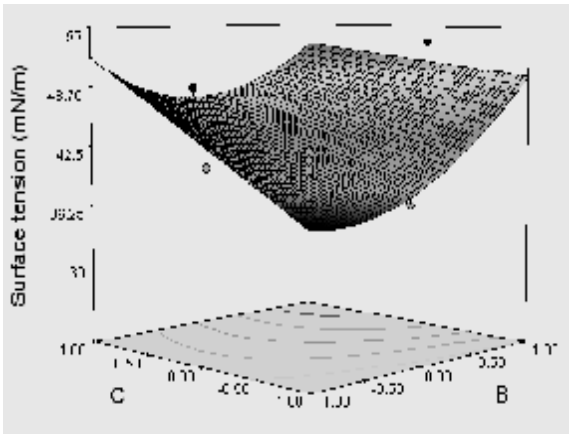


شکل3 میزان رشد سلولی (توده سلولی تولیدی) باکتری A calcoaceticus RAG-1 ATCC-31012. در دمای $30\ ^{\circ}C$ ، نمودار سطح سه بعدی (الف) و نمودار مسطح (ب) ، منبع نیتروژنی(B) و درصد تلقیح (C) فاکتورهای متغیر و منبع کربنی(A) در سطح 1+ ثابت نگه داشته شده است.

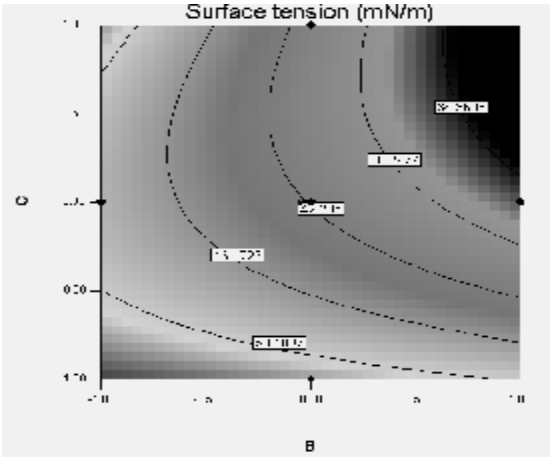
www.SID.ir

Archive of SID

الف)



ب)



شکل 4 میزان کاهش کشش سطحی امولسان تولید شده از باکتری A .calcoaceticus RAG-1 ATCC-31012 در دمای $30\ ^{\circ}C$ ، نمودار سطح سه بعدی (الف) و نمودار مسطح (ب) ، منبع نیتروژنی(B) و درصد تلقیح (C) فاکتورهای متغیر و منبع کربنی(A) در سطح 1+ ثابت نگه داشته شده است.

4- نتیجه گیری

همانطور که اشاره شد امولسیون کننده های میکروبی مزایای قابل توجهی نسبت به امولسیون کننده های شیمیایی دارند وانتظار می‌رود در آینده نزدیک در بسیاری از موارد جایگزین امولسیون کننده های شیمیایی شوند. لازمه این امر تولید انبوه بیوامولسیون کننده ها است. به همین دلیل بر خلاف کارهای اولیه بر روی این ترکیبات که عمدتاً بر روی ساختمان شیمیایی و خواص فیزیکوشیمیایی و بیوسنتز آنها متمرکز بوده‌است و حاصل آن در مقالات متعددی مرور شده است، در سالهای اخیر مطالعات بر روی تولید به روش تخمیر، ژنتیک و کاربردهای تجاری آنها صورت گرفته است.Fiechter و همکارانش تحقیقات وسیعی را روی انواع امولسیون کننده های میکروبی انجام دادند[4].

با توجه به اینکه کاهش کشش سطحی محیط رشد، مهم‌ترین و اصلی‌ترین معیار برای اثبات تولید بیوامولسیون کننده ها محسوب می‌شود. قویترین بیوامولسیون کننده ای که تا به امروز گزارش شده سورفاکتین است که یک آنتی بیوتیک پپتیدولیپیدی با فعالیت سطحی قابل توجه می‌باشد و بوسیله *Bacillus subtilis* و با استفاده از منابع کربن محلول در آب تولید می‌شود. این بیوامولسیون کننده قادر است کشش سطحی محیط رشد را از70 تا مقادیر کمتر از 26 mN/m کاهش دهد[10].

نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر نشان می دهد که تولید امولسان که بیوامولسیون کننده ای پلیمری است وابسته به رشد باکتری (تولید توده سلولی) است و هر چه توده سلولی بیشتری تولید شود امولسان بیشتری تولید و کاهش کشش سطحی بیشتر می شود. حداقل مقدار کشش سطحی برای امولسان تولید شده 30 mN/m بدست آمده است که در حد قابل قبولی قرار دارد. و با توجه به اینکه روز به روز بر میزان مقبولیت امولسیون کننده های میکروبی بخاطر تجزیه پذیری و غیر سمی بودن آنها افزوده می شود این ترکیبات جایگزین مناسبی برای امولسیون کننده های شیمیایی به حساب می آیند.

5- منابع

[1] Gautam, K.K. and Tyagi,V.K. (2006), "Microbial surfactants:A Review". J.Oleo Sci. Vol.55, No.4: 155-166.

[2] Edwards, K. R., Lepo, J. E., & Lewis, M. A. (2003)," Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species". Marine Pollution Bulletin. 46(10): 1309-1316.

[3]Nitschke, M., Costa, S. G. V. A. O. (2007), " Biosurfactants in food industry". Trends in Food Science & Technology. 18: 252-259.

[4] Fiechter.A.(1992),"Biosurfactants: moving toward industrial application". TIBTECH. 10:208-216.

[5] Randhir.S.M,Swaranjit.S.C. (1997),"Utilization of molasses for biosurfactant production by two Bacillus Strains at thermophilic conditions". JAOCS, Vol.74, No.7: 887-889.

www.SID.ir

Archive of SID

[6] Ligia.R, Jose.T, Rosario.O, Henny.C, Van.D.M. (2006),"Surfase Surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria". Process Biochemistry 41: 1-10.

[7] Desai Jitendra D. & Ibrahmi M. Banat. (1997),"Microbial production of surfactants & theircommerical potential". Microbial. Mol. Biol. 61(1): 47-64.

[8]Bach.H., Gutnick.D.(2003)," An Exocellular Protein from the Oil-Degrading Microbe Acinetobacter venetianus RAG-1 Enhances the Emulsifying Activity of the Polymeric Bioemulsifier Emulsan". Applied and Environmental Microbiology 69(5): 2608-2615.

[9]Rosenberg, E., Gutnick.D. L. (1979) "Emulsifier of Arthrobacter RAG-1: Isolation and Emulsifying Properties". Applied and Environmental Microbiology 37(3): 402-408.

[10]Makkar, R.S. and Cameotra. S.S. (1997) "Biosurfactant production by a thermophilic Bacillus subtilis strain". Jornal of industrial Microbiology & Biotechnology 18: 37-42.

www.SID.ir

Archive of SID

Emulsan production by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 ATCC-31012

Mousavian, S. S.*, Rahimi, K. Y.

Islamic Azad University, Gachsaran Branch, Gachsaran, Iran.

(Received: 88/11/26 Accepted: 89/5/24)

Emulsan compound produced by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 ATCC-31012. At present, this bioemulsifier show potential applications many sectors of food industry (soft cheese and ice creams). The ability of a bacterial to grow and produce emulsan by response surface methodology under shaking incubator conditions at 30°C was studied. Crude oil and ammonium sulfate at different levels use as a carbon and nitrogen source respectively. The medium culture optimum for emulsan production was occurred 4% (v/v) carbon source, 3gr/lit ammonium sulfate and 7% (v/v) inoculum's size. At optimum levels of these parameters, 2.9 gr/lit biomass at end of fermentation was obtained. Production of emulsan by this bacterial culture resulted in surface tension reduction to 30 mN/m. Coefficients of determination, R^2, of fitted regression models for biomass production and surface tension are equal to 97.13% and 95.52%, respectively.

Keywords: bioemulsifier, emulsan, surface tension, biomass.

*Corresponding author, E-mail address: s.mousavian@iaug.ac.ir

www.SID.ir