# بررسی شرایط تولید رامنولیپید به منظور مصرف در صنعت غذا با استفاده از سویه‌های مختلف باسیلوس و تاثیر عوامل مختلف بر تولید آن

حمید راشدی[۱*]، علی ایزدی[۲]

۱- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، پردیس دانشکده‌های فنی دانشگاه تهران.
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، پردیس دانشکده‌های فنی دانشگاه تهران.
**(تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/٤/۱۹)**

## چکیده

بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات دوگانه دوستی هستند که توسط باکتری‌و قارچ‌تولید می‌شوند و قادرند کشش سطحی را کاهش دهند. این ترکیبات به دلیل سمیت کمتر و تجزیه‌پذیری بهتر نسبت به سورفکتانت‌های شیمیایی ارجحیت دارند و کاربرد بسیاری در صنایع نفتی، غذایی و داروسازی دارند.
هدف از این تحقیق، بررسی شرایط تولید بیوسورفکتانت‌های حاصل از سویه‌های باسیلوس شناسایی شده در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده مهندسی شیمی دانشگاه تهران بود که به ترتیبHR1 ،HR2 و HR3 نامگذاری شده‌اند.پس از انجام عمل تلقیح، محیط کشت در شیکرانکوباتور با دما، زمان و دورهای مختلف قرار داده شد و سپس بیوسورفکتانت‌های حاصل توسط حلال استخراج و اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج بدست آمده دما، زمان گرمخانه‌گذاری و دور همزن از عوامل موثر بر تولید بیوسورفکتانت هستند. بیشترین مقدار بیوسورفکتانت توسط سویه HR1 در دمای C°33و دور همزن rpm150 پس از ۵ روز گرمخانه‌گذاری بدست آمد. برای تولید بیوسورفکتانت جهت استفاده در صنایع گوناگون به ویژه صنعت غذا، سویه باسیلوس HR1 مناسب است.

**کلید واژگان:** رامنولیپید، بیوسورفکتانت، باسیلوس، صنعت غذا.

*مسئول مکاتبات: hrashedi@ut.ac.ir

## ۱- مقدمه

بیوسورفکتانت‌ها ترکیباتی هستند که توسط برخی باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند و مزایای بسیاردارند که برای مثال می‌توان از زیست تخریب‌پذیری، سمیت کمتر و ساختار متنوع نسبت به سورفکتانت‌های سنتزی شیمیایی، فعالیت ثابت در شرایط سخت محیطی مانند دما، اسیدیته‌و غلظت‌های مختلف نمک نام برد [۱،۲]. بیوسورفکتانت‌ها توانایی تغییر ساختار و فعالیت آنزیم‌ها را داشته و می‌توانند بر روی برخی میکروارگانیسم‌ها اثر کشنده داشته و از خود فعالیت آنتی بیوتیکی نشان دهند و در ایجاد بیماری توسط برخی عوامل بیماری‌زا نقش داشته باشند [٤،۳]. بر اساس تحقیقات انجام شده، باکتری‌ها معمولا از منابع کربنی برای تولید بیوسورفکتانت استفاده می‌کنند، اما در مورد گستره باکتری‌های تولید کننده بیوسورفکتانت اطلاعات جامعی در دست نمی‌باشد و این میکروارگانیسم‌های تولید کننده در محیط‌های آبی و خاکی وجود دارند اما بر اساس تحقیقات، گونه‌های مختلف باسیلوس توانایی تولید بیوسورفکتانت را دارند که از میان آن‌ها باسیلوس سابتیلیس مهمترین گونه برای تولید می‌باشد [۷-۵].

روش‌های مختلف باید ابداع و گسترده شود تا رشد میکروبی و تولید سورفکتانت‌ها، دارای هزینه‌ی تولید کمتر، بازده بیشتر و دارای فرایندهایی با صرفه اقتصادی باشند [۸]. شرایط محیط کشت مانند دما، دور همزن، میزان اکسیژن محلول و نوع سوبسترای مصرفی بخاطر موثر بودن بر رشد و فعالیت سلولی، بر روی تولید بیوسورفکتانت اثر می‌گذارند [۹]. برای تولید بیوسورفکتانت‌ها توسط سویه‌های مختلف مطالعات متعددی صورت گرفته است. راشدی و همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی تولید رامنولیپید از *Pseudomonas aeruginosa* با استفاده از نسبت‌های مختلف ملاس پرداختند و مشخص گردید که میزان تولید وابسته به رشد باکتری می‌باشد [۱۰]. *Abushady* و همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی تولید رامنولیپید حاصل از گونه‌های مختلف *Bacillus Subtilis* با استفاده از منابع مختلف نیتروژن و شرایط محیطی پرداختند که بهترین نتیجه استفاده از نیترات آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن بود [۱۱]. Sifour و همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی تولید بیوسورفکتانت از دو گونه باسیلوس پرداختند. بیشترین میزان بیوسورفکتانت تولیدی وقتی حاصل گشت که از گلوکز به عنوان منبع کربن و از گلوتامیک اسید به عنوان منبع نیتروژن استفاده شد و میزان غلظت یون منیزیم بر میزان فعالیت امولسیفیکاسیون در هر دو گونه موثر بود [۱۲]. Kyung و همکاران در سال ۲۰۰٤ با استفاده از سودوموناس به بررسی تولید رامنولیپید در کشت ناپیوسته و نیمه‌پیوسته پرداختند. نتایج نشان داد کشت نیمه‌پیوسته بهتر از کشت ناپیوسته بود و نوع منبع کربن و نیتروژن، دور همزن، اسیدیته، زمان، میزان هوادهی و دما پارامترهای تاثیرگذار در تولید رامنولیپید بودند [۱۳].

با توجه به مزایای ذکر شده، هدف از این مطالعه، بررسی عوامل مختلف از جمله دما، زمان گرمخانه‌گذاری و دور همزن بر میزان تولید رامنولیپید حاصل از سویه‌های باسیلوس *HR1*، *HR2* و *HR3* بود.

## ۲- مواد و روش‌ها

### میکروارگانیسم و شرایط کشت

در این تحقیق از سه سویه باسیلوس شناسایی و جداسازی شده در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده مهندسی شیمی دانشگاه تهران با نام‌های *HR1*، *HR2* و *HR3* برای بررسی تولید رامنولیپید استفاده شد. این سویه‌ها برای فعال‌سازی اولیه، از فریزر$-۷۰^{\circ}C$ خارج شدند و در محیط کشت شفاف Luria Bertani (LB) حاوی۱٪ پپتون ،۱٪ سدیم کلراید و ۳٪ عصاره مخمر در $pH=۸$ در $۳۵^{\circ}C$ به مدت ۲٤ ساعت کشت داده شدند و برای استفاده‌های بعد در اسلنت‌های LB و در دمای $٤^{\circ}C$ نگه‌داری گشتند. مایع تلقیح با استفاده از محیط‌کشت Luria Bertani در دمای $۳۵^{\circ}C$ و ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری و دور همزن ۱۵۰rpm آماده‌شد. در ترکیب محیط کشت از منبع کربنی شربت ذرت خیسانده (بصورت جامد خشک) به میزان (٤ g/l) برای تولید محصول استفاده شد. سایر ترکیبات به صورت زیر می‌باشند:

الف- ترکیبات پر مقدار (g/l)

$KH_2PO_4$, 0.5; $K_2HPO_4$, 1; KCl, 0.1; $MgSO_4$, 0.5; $FeSO_4$, 8; $CaCl_2$, 50; Urea, 6.

ب- ترکیبات کم مقدار (mg/l)

$ZnSO_4$, 4.4; $MnSO_4$, 3.3; $CuSO_4$, 0.1.

برای بررسی شرایط تولید بیوسورفکتانت به عنوان محصول این کشت سلولی، از ۵٪ مایع تلقیح و گرمخانه‌گذاری با زمان‌های ٤٨ ساعت، ۱۲۰ ساعت و ١٦٨ ساعت در دماهای ۲۵°C، ۳۵°C و ٤٠°C و دور همزن‌های ۱۰۰rpm، ۱۵۰rpm و ۲۰۰rpm استفاده شد.

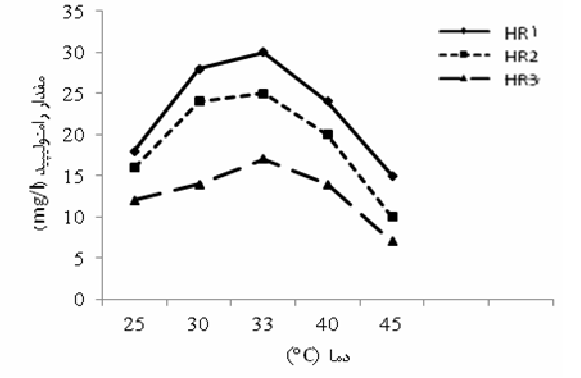
## شناسایی و خالص‌سازی رامنولیپید در محیط کشت

تشخیص رامنولیپید با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) انجام شد. قسمتی از بیوسورفکتانت بر روی سیلیکاژل توسط (کلرفرم: متانول: آب: v/v ۷۰: ۱۰: ۰/۵) به عنوان حلال و فاز متحرک، جدا گشت. معرف Ninhydrin (۰/۵ g Ninhydrin در ۱۰۰ml Anhydrous Acetone) برای تشخیص رامنولیپید استفاده شد [١٤]. برای خالص‌سازی رامنولیپید تولید شده از سانتریفوژ با سرعت ۸۰۰۰rpm به مدت ۱۲ دقیقه استفاده شد که سبب جداگشتن میکروارگانیسم‌ها گشت. سپس از اسید برای رسوب‌دادن استفاده شد. با استفاده از اسید هیدروکلریک، اسیدیته به مقدار ۲ واحد کاهش یافت و با استفاده از حلال‌های آلی استخراج انجام شد و رامنولیپید بدست آمد [۱۵].

## ۳- یافته‌ها

## اثر دماهای مختلف گرمخانه‌گذاری بر تولید رامنولیپید

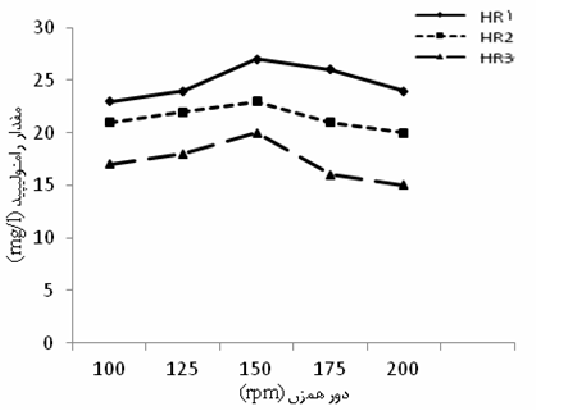
تولید رامنولیپید برای سویه‌های باسیلوس *HR1*، *HR2* و *HR3* با دور همزن ۱۵۰rpm به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری بررسی شد (شکل ۱). بیشترین میزان تولید رامنولیپید در دمای ۳۳°C توسط سویه *HR1* بود و با افزایش و کاهش این دما، میزان تولید رامنولیپید کاهش یافت. با توجه به شکل کاملا مشخص است که هر سه سویه در یک دمای بهینه بیشترین میزان تولید رامنولیپید را دارند و *HR3* نسبت به دو سویه دیگر کمترین مقدار تولید رامنولیپید را دارد.




**شکل ۱** مقدار رامنولیپید تولید شده توسط سه گونه باسیلوس در دماهای مختلف گرمخانه‌گذاری و با دور همزن ۱۵۰rpm به مدت ۷ روز گرمخانه‌گذاری

## اثر دورهای مختلف شیکر انکوباتور بر تولید رامنولیپید

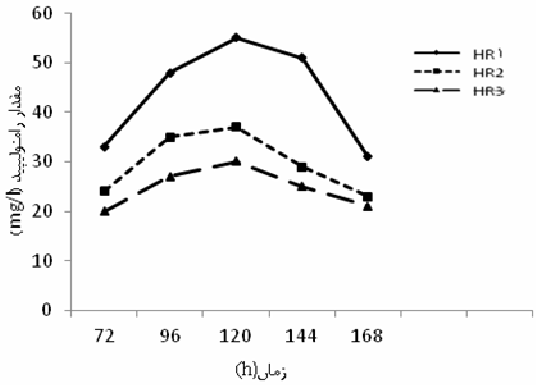
با توجه به (شکل ۲) اثر دورهای مختلف شیکر انکوباتور بر تولید رامنولیپید توسط سه گونه باسیلوس در مدت ۷ روز و دمای۳۳°C بررسی شد. بیشترین میزان تولید رامنولیپید برای هر سه سویه در ۱۵۰rpm بدست آمد. با کاهش یا افزایش میزان دور همزن، میزان تولید رامنولیپید کاهش می‌یابد اما شیب این کاهش زیاد نمی‌باشد. در این شرایط نیز سویه *HR1* دارای بیشترین میزان تولید و *HR3* کمترین میزان تولید رامنولیپید را داشت.




**شکل ۲** مقدار رامنولیپید تولید شده توسط سه گونه باسیلوس در دور همزن‌های گوناگون در مدت ۷ روز و دمای۳۳°C

### اثر مدت زمان گرمخانه‌گذاری بر تولید رامنولیپید

زمان مناسب برای هر سه سویه باسیلوس در دمای ۳۳°C و دور همزن ۱۵۰rpm به مدت ۵ روز گرمخانه گذاری بدست آمد. با توجه به (شکل ۳) پس از این مدت با افزایش یا کاهش زمان، میزان رامنولیپید تولیدی کاهش یافت و کاملا واضح است که میزان اثر زمان گرمخانه‌گذاری بر تولید رامنولیپید زیاد بوده و تاثیر آن بر مقدار تولید رامنولیپید بیشتر از دو پارامتر دما و دور همزن می‌باشد.




**شکل ۳** مقدار رامنولیپید تولید شده توسط سه گونه باسیلوس با گذشت زمان در دمای ۳۳°C و دور همزن ۱۵۰rpm

## ٤- بحث

با توجه به مزایای زیاد مذکور برای بیوسورفکتانت، در این پژوهش اثر فاکتورهای دما، دور همزن و زمان بر میزان تولید رامنولیپید در سه سویه باسیلوس *HR1*، *HR2* و *HR3* مطالعه شد. دمای بهینه‌ی تولید رامنولیپید برای هر سه گونه ۳۳°C بود. با توجه به اینکه میزان رامنولیپید تولیدی به میزات رشد و مصرف سوبسترا مرتبط است [١٦] در دماهای کمتر و بیشتر از این مقدار، کاهش میزان تولید رامنولیپید مشاهده شد. علت این امر می‌تواند کاهش فعالیت و رشد سلولی در دماهای کمتر از ۳۳°C و مصرف شدن مواد غذایی یا کاهش فعالیت آنزیم‌های موثر در تولید رامنولیپید در دمای بیشتر از این مقدار و کاهش عملکرد میکروارگانیسم‌ها باشد.

بیشترین مقدار تولید رامنولیپید در دور همزن ۱۵۰rpm مشاهده گشت. کاهش میزان رامنولیپید تولیدی در دور کمتر، می‌تواند به دلیل عدم اختلاط مناسب محیط کشت و عدم دسترسی میکروارگانیسم به منابع غذایی مورد نیاز باشد و کاهش تولید در دور بالاتر می‌تواند ناشی از کاهش عملکرد میکروارگانیسم‌ها در اثر افزایش تنش برشی یا زمان بسیار کوتاه جهت دستیابی میکروارگانیسم به منبع غذایی باشد.

با گذشت زمان نیز در میزان رامنولیپید تولیدی تغییر قابل ملاحظه‌ای مشاهده شد. بیشترین میزان تولید پس از ۵ روز گرمخانه‌گذاری مشاهده شد. پس از این زمان به دلیل کاهش و اتمام منبع کربنی که منبع انرژی سلول است، فعالیت سلول کاهش یافته و به مرور زمان سلول برای ادامه فعالیت متابولیکی، از رامنولیپید تولیدی به عنوان منبع انرژی استفاده می‌کند و در نتیجه غلظت رامنولیپید کاهش می‌یابد. نتایج بدست آمده با نتایج حاصل از تحقیق امینی و همکاران که از سویه‌های مختلف سودوموناس برای تولید رامنولیپید استفاده نمودند، قابل مقایسه بوده و روند تغییرات غلظت رامنولیپید نسبت به شرایط محیطی مشابه است [١٧].

نتایج نشان دادند که نوع سویه باکتریایی، دما، دور همزن و زمان گرمخانه‌گذاری از عوامل مهم در تولید رامنولیپید هستند. بیشترین غلظت رامنولیپید تولیدی توسط سویه *HR1* در دمای ۳۳°C و دور همزن ۱۵۰rpm پس از ۵ روز گرمخانه‌گذاری به دست آمد.

## ٥- نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد سویه *HR1* برای تولید رامنولیپید مناسب می‌باشد و از رامنولیپید تولیدی می‌توان در صنایع مختلفی مانند صنایع غذایی استفاده کرد.

## ٦- تشکر و قدردانی

از کلیه دوستان که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند، نهایت سپاس و قدردانی را داشته و بر آن‌ها درود میفرستیم.

## ٧- منابع

[1] Ishigami Y. Biosurfactants Face Increasing Interest. Inform. 1993;4:1156-65.
[2] Nitschke M, Pastore GM. Production and properties of a surfactant obtained from Bacillus subtilis grown on cassava wastewater. Bioresour Technol 2006; 97(2): 336-41.
[3] Heyd M, Kohnert A, Tan TH, Nusser M, Kirschhofer F, Brenner-Weiss G, Et Al. Development and Trends of Biosurfactant

Analysis and Purification Using Rhamnolipids as An Example. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2008 Jul;391(5):1579-90. Pubmed PMID: 18320178.

[4] Bodour AA, Drees KP, Maier RM. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. Appl Environ Microbiol 2003; 69(6): 3280-7.

[5] Haddad NI, Wang J, Mu B. Identification of a Biosurfactant Producing Strain: Bacillus subtilis HOB2. Protein Pept Lett 2009; 16(1): 7-13.

[6] Lin SC, Minton MA, Sharma MM, Georgiou G. Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by Bacillus licheniformis JF-2. Appl Environ Microbiol 1994; 60(1): 31-8.

[7] Nakano MM, Zuber P. Cloning and Characterization of Srfb, A Regulatory Gene Involved In Surfactin Production And Competence In Bacillus Subtilis. Journal of Bacteriology. 1989;171:5347-53.

[8]Makkar RS, Cameotra SS. Biosurfactant Production by Microorganisms on Unconventional Carbon Sources. Journal of Surfactants and Detergents. 1999;2:237-41.

[9] Cameotra S, Makkar RS . Synthesis of Biosurfactants in Extreme Conditions. Appl Microbial Biotechnol. 1998;50:520-9.

[10] Rashedi H, Assadi M M, Bonakdarpour B, Jamshidi E. Environmental Importance of Rhamnolipid Production From Molasses as a Carbon Source. Int J Environ Sci Tech. 2005;2:59-62.

[11] Abushady HM, Bashandy AS, Aziz NH, and. Ibrahim HMM. Molecular Characterization Of Bacillus Subtilis Surfactin Producing Strain And The Factors Affecting Its Production. Int J Agri Biol. 2005;7:337-44.

[12] Sifour M, Ouled-Haddar H, Aziz GM. Production of Biosurfactants from Two Bacillus Species. Egyptian Journal of Aquatic Research. 2005;31:142-8.

[13] Lee KM, Hwang SH, Duck HaS, Jang J, Lim DJ, Kong J-Y. Rhamnolipid Production in Batch and Fed-Batch Fermentation Using pseudomonas Aeruginosa BYK-2 KCTC 18012P. 2004;9:267-73.

[14] Yin H, Qiang J, Jia Y, Ye J, Peng H, Qin H, Et Al. Characteristics Of Biosurfactant Produced By Pseudomonas Aeruginosa S6 Isolated From Oil-Containing Wastewater. Kidlingtonc, ROYAUME-UNI: Elsevier; 2009. 7 P.

[15] L Sim, Ward OP, Li Z-Y. Production And Characterisation Of A Biosurfactant Isolated From Pseudomonas Aeruginosa UW-1. J Ind Microbiol Biotechnol. 1997;19:232-38

[16] Soberon-Chavez G, Lepine F, Deziel E. Production of rhamnolipid by Pseudomonas aeruginosa. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 68: 718-725.

[17] Amini F, Samadi N, Harandeh M, Sharifian A. Optimization of the production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa strains, Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 2008; 4: 33-38 (in persion).

# Evaluation of Rhamnolipid production by various strains of bacillus for consumption in the food industry and the influence of different parameters on the production

**Rashedi, H. [1]*[*], Izadi A[2]**

1. Ph.D of Chemical Engineering, School of Chemical Engineering, College of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran
2. M.Sc of Chemical Engineering, School of Chemical Engineering, College of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran

**(Received: 92/2/18 Accepted: 92/4/19)**

Biosurfactants are amphiphilic compounds that are produced by bacteria and fungi and they are able to reduce surface tension. These compounds are preferred due to less toxicity and better degradation than chemical surfactants and they have many applications in the petroleum, food and pharmaceutical industries. The purpose of this study was the investigation of production conditions of biosurfactant from Bacillus strains identified in Biotechnology Laboratory, Chemical Engineering Department, Tehran university, that been named HR1, HR2, and HR3. Materials and Methods: After performing the inoculation, the culture medium incubated at different temperatures and times and rotation rates and then obtained biosurfactant extracted and measured by solvent. According to the results, temperature, incubation time and rotation rate are affecting factors on biosurfactant production. The maximum amount of biosurfactant was obtained by HR1 in 33 °C and 150 rpm after 5 days incubation. acillus HR1 is appropriate for biosurfactant production for use in various industries, especially in the food industry.

**Key words:** Rhamnolipid, Biosurfactant, *Bacillus*, Food Industry.

* Corresponding Author E-Mail Address: hrashedi@ut.ac.ir