

افزایش تولید سورفکتین در باکتری *Bacillus subtilis* UTB96 با استفاده از بهینه‌سازی فرایند فرمانتاسیون

سحر کشاورزی<sup>۱</sup>، مسعود احمدزاده<sup>۲\*</sup>، سعید میرزایی<sup>۳</sup>، کیوان بهبودی<sup>۱</sup>، مژگان بنده‌پور<sup>۳</sup>

۱- گروه گیاه پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲- گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، کرمان، ایران

۳- دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

\* مسئول مکاتبات: مسعود احمدزاده، پست الکترونیک: ahmadz@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۲۱

۵(۲) ۱۳-۲۶

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۷/۰۴

## چکیده

در میان باکتری‌های زیست مهارگر، باکتری *Bacillus subtilis* در تولید طیف وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی مطرح می‌باشد که از این میان، بیوسورفکتانت‌ها از جمله سورفکتین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. سورفکتانت‌هایی که به وسیله میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند به دلیل سمیت پایین و خواص منحصر به فرد، کاربردهای متعددی دارند اما به دلیل هزینه بالای تولید و خالص‌سازی، تولید در بازده بالا هنوز میسر نشده است. در این تحقیق به منظور ارزیابی تولید سورفکتین در جدایه مذکور، شناسایی ژن تولید کننده آن (*srf*) و تعیین مقدار سورفکتین تولید شده به ترتیب از روش‌های متلاشی شدن قطره (Drop collapse)، روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) و آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. بررسی مولکولی با آغازگر اختصاصی نشان داد که این جدایه دارای ژن *srf* می‌باشد. برای بهینه‌سازی شرایط عملیاتی، اثر شرایط فیزیکی و شیمیایی و القا کننده‌های مختلف بر میزان زیست توده و سورفکتین خام تولیدی بررسی شد. شرایط بهینه فیزیکی و شیمیایی به دست آمده شامل: مدت زمان نگهداری کشت ۹۶ ساعت، دمای ۳۰ درجه سلسیوس، اسیدیته ۷ و دور شیکر ۲۵۰ rpm می‌باشد. از میان القا کننده‌ها که شامل منابع کربن، منابع نیتروژن و اسیدهای آمینه، بیشترین مقدار تولید سورفکتین پس از تیمار محیط کشت با گلوکز به مقدار ۱/۲۴۳ گرم بر لیتر محیط کشت می‌باشد. پس از آن تأثیر عناصر القا کننده‌ای که بیشترین تأثیر را در افزایش تولید سورفکتین داشته‌اند، به صورت توأم بررسی شد. نتایج نشان داد بیشترین مقدار تولید سورفکتین ۵/۰۵۵ mg/l در حضور یون‌های آهن، منیزیم و منگنز به صورت توأم می‌باشد. همچنین مقدار و نوع منابع غذایی تأثیر به‌سزایی در بازده تولید سورفکتین دارد. بنابراین این تغییر در مقدار و ترکیب القا کننده‌ها روشی اقتصادی برای تولید تجاری این ماده محسوب می‌شود.

**واژه‌های کلیدی:** سورفکتانت، فرمانتاسیون، ژن *srf*، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

## مقدمه

سورفکتین یک لیپوپپتید حلقوی است که توسط باکتری‌های مولد این ترکیب شامل *Bacillus subtilis*، *B. coagulans* و *B. licheniformis*، *B. amyloliquifaciens* تولید می‌شود. ناگای و همکاران مسیر سنتز این ترکیب را مورد مطالعه قرار دادند (Nagai et al., 1996). خانواده سورفکتین دارای یک بخش پپتیدی حاوی ۷ تا ۱۱ اسید آمینه به صورت خطی، حلقوی یا ترکیبی و اسیدهای چرب بتا-هیدروکسی ۱۴-۱۶ کربنی که بخش لیپیدی متصل به ستون پپتید را تشکیل می‌دهند، می‌باشد. طول زنجیره کربنی

سورفکتانت‌های میکروبی مولکول‌های فعال سطحی با ساختارهای شیمیایی گوناگون هستند، که به وسیله سوبه‌هایی از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند که به دلیل خصوصیات منحصر به فردشان از قبیل قابلیت زیست تخریب پذیری بالا، سمیت پایین، خواص کف‌کنندگی و پایداری فعالیت آن‌ها در اسیدیته، شوری و دمای بالا، جایگزینی مناسب برای سورفکتانت‌های شیمیایی محسوب می‌شوند (Mukherjee et al., 2006, Muthusamy et al., 2008).

مایکوپلاسمایی (Vollenbroich *et al.*, 1997)، ضد ویروسی (Kracht *et al.*, 1999)، ضد قارچی (Mohammadipour *et al.*, 2009)، ضد فیتوپلاسمایی (Askari *et al.*, 2011)، حشره کشی (Assie *et al.*, 2002) و فعالیت همولایتیک سورفکتین اشاره کرد. به علاوه سورفکتین مقاومت سیستمیک در گیاه را تحریک می کند (Ongena *et al.*, 2007). حضور دو باقیمانده آمینو اسیدی، آسپارژین و گلوتامین به عنوان جایگاهی برای اتصال کاتیون های یک یا دو ظرفیتی عمل کرده و نقش سیدروفور را ایفا می کند. همچنین مطالعات امروزه نقش سورفکتین را در تشکیل غشاهای نازک در سطح مشترک آب هوا در استرین های باسیلوس، در حرکت دسته جمعی یا swarming (Debois *et al.*, 2008) و تشکیل بیوفیلم (Bais *et al.*, 2004) نشان داده است. لیوپیتیدهایی همچون سورفکتین به دلیل فعالیت آنتی بیوتیک، نقش کلیدی در میان کنش گیاه-باکتری و تحریک مکانیسم های دفاعی میزبان (Ongena *et al.*, 2005, Ongena *et al.*, 2007)، انتشار سلول های باکتریایی و در نتیجه کلونیزاسیون ریزوسفر (Ongena & Jacques, 2008) و تجزیه آلاینده های زیستی (Bioremediation) به عنوان سلاح هایی چند بعدی در کنترل بیماری های گیاهی به شمار می آیند. بنابراین تولید گروه های مختلف لیوپیتیدی باعث برتری سویه های تولید کننده آن ها در جایگاه های اکولوژیکی می شوند. خواص منحصر به فرد سورفکتانت ها از قبیل کاهش کشش سطحی و بین سطحی، سمیت کم، تولید با استفاده از مواد اولیه ارزان، امولسیون کنندگی، قابلیت تولید کف، تجزیه پذیری زیاد و سازگاری با محیط زیست اجازه می دهد این مواد جانشین خوبی برای سورفکتانت های شیمیایی باشند (Rashedi *et al.*, 2006).

با وجود ویژگی های قابل توجه تجاری سورفکتین و فواید آشکار آن در مقایسه با سورفکتانت های سنتتیک، تولید سورفکتانت های میکروبی در مقیاس تجاری به دلیل بازده بسیار پایین تولید توسط میکروارگانیسم ها و همچنین هزینه بالای تولید و خالص سازی این مواد به سختی میسر شده است. از این رو تحقیقات زیادی در سال های

اسیدهای چرب و آرایش آمینو اسیدی لیوپیتیدها بسته به منابع غذایی مورد تغذیه باکتری ممکن است متفاوت بوده و خصوصیات لیوپیتید را تحت تأثیر قرار دهد. این خانواده متشکل از حدود ۲۰ لیوپیتید مختلف است که به استثنای اسپرین (Thomas & Ito, 1969) در رفتارهای ساختاری (هپتاپیتیدی با توالی کایرال LLDLLDL) مشترک اند. وجود چنین طیف وسیعی می تواند مربوط به تغییر در شرایط کشت، خصوصاً تغذیه با برخی آمینو اسیدهای ویژه باشد (Peypoux *et al.*, 1999).

کشف سنتز غیر ریوزومی پتیدها توسط گورز و همکاران با پی بردن به این حقیقت که سنتز در حضور RNase یا بازدارنده ماشین ریوزومی امکان پذیر است، صورت پذیرفت (Gevers *et al.*, 1968). اپرون *srfA* و آنزیم های دخیل در سنتز سورفکتین اولین موردی بود که در ارتباط با لیوپیتید *Bacillus subtilis* شرح داده شد. اپرون دخیل در سنتز سورفکتین شامل ۴ چهارچوب خوانش باز (ORF) بزرگ کد کننده سورفکتین سنتاز، *srfA-A*، *srfA-B*، *srfA-C* و *srfA-D* می باشد (Konz *et al.*, 1997)، دومین COM واسطه گز ارتباطی NRPS و دومین SFP فعال کننده آنزیم های سنتتاز است. آنزیم تیواستراز/ آسیل ترانسفراز (*srfA-D*) شروع فرایند سنتز را تحریک می کند. زنجیره اسید چرب به اسید آمینه فعال شده در اولین بخش (*srfA-A*) اضافه می شود. فعال شدن آنزیم های *srf* سنتتازها بستگی به آنزیم ۴- فسفو پنتین ترانسفراز (SFP ترانسفراز) دارد که به وسیله ژن *sfp* کد می شود. آنزیم ۴- فسفو پنتین ترانسفراز قادر است بخش فسفو پنتین از کو آنزیم A را به پروتئین های حامل زنجیره پتیدی (پتیدیل) تشکیل شده از پتید سنتتازهای غیر ریوزومی منتقل کند. ژن های مولد سورفکتین سنتتاز در ژنوم *B. subtilis* 168 حفاظت شده می باشد (Mootz *et al.*, 2001). کاسبی و همکاران نشان دادند که بیان سورفکتین سنتتاز وابسته به اسیدیته محیط کشت است (Cosby *et al.*, 1998).

لیوپیتیدها در باکتری های مولد نقش های متنوعی دارند. از آن جمله می توان به فعالیت ضد باکتریایی، ضد

پلی پتون برای فرمنتاسیون استفاده کردند و عملکرد تولید سورفکتین، ۰/۲۵ گرم بر لیتر گزارش شد (Ohno et al., 1992).

تحقیقات مختلف دیگر نیز به طور واضح نیاز و اثر تحریکی آهن و منگنز را نشان داده است (Wei et al., 2004). در سیستم های پیوسته، نسبت مولار بحرانی نیتروژن/آهن/منگنز به صورت ۱:۷/۷:۹۲۰ تعیین شده که دست کم برای ۳۶ نسل تولید سورفکتین را ثابت نگه می دارد (Sheppard & Cooper, 1991). اکسیژن و دما نیز از فاکتورهای اصلی در تولید سورفکتین به شمار می روند. دماهای بالا (۳۷ درجه سلسیوس) برای سنتز سورفکتین در *B. subtilis* ATCC6633 و *B. subtilis* RB14 مطلوب است اما این شرایط برای *B. subtilis* S499 مطلوب نمی باشد (Jacques et al., 1999). جایگزینی منبع نیتروژن کوپر (Cooper) و محدودیت اکسیژن که جریان انرژی را به سمت سنتز محصول پیش می برد، منجر به بالاترین بازدهی ذکر شده برای تولید سورفکتین (7g/l) توسط *B. subtilis* C9 شده است (Kim et al., 1997). به نظر می رسد چنین فرایندی برای *B. subtilis* S499 که بازده سورفکتین بالاتری در شرایط هوادهی بهتر دارد، سازگار نباشد (Jacques et al., 1999).

مطالعات نشان داده است که شرایط محیطی می تواند به شدت نسبت بین سورفکتین و لیچنایسین تولید شده توسط نژاد *B. subtilis* ATCC21332 را تغییر دهد. حضور حاملین پروپیلن در محیط کشت بسته (Gancel et al., 2009) یا استفاده از غشای پروپیلن (Coutte et al., 2010) برای هوادهی در بیوراکتور (بدون حباب)، بیوسنتز را افزایش می دهد. پس از مراحل فرمنتاسیون باکتری و تولید آنتی بیوتیک، مرحله بعد جداسازی و سنجش میزان تولید سورفکتین است. استفاده از روش رسوب دهی با اسید و بعد از آن کریستاله کردن و تبلور مجدد برای جداسازی سورفکتین و استفاده از HPLC برای سنجش میزان تولید پیشنهاد شده است (Arima et al., 1968; Sandrin et al., 1990; Ohno et al., 1995; Hsieh et al., 2004; Wei et al., 2007).

اخیر به منظور حل این مشکلات انجام شده است (Mukherjee et al., 2006; Muthusamy et al., 2008).

از آن جایی که بیوسورفکتانت ها به عنوان جایگزین سبز یا سازگار با محیط زیست (Ritter, 2004) سورفکتانت های مصنوعی تلقی می شوند، با وجود محدودیت های موجود در تولید تجاری آن ها، رغبت زیادی به بهینه سازی و تولید این مواد وجود دارد. راه حل های گوناگونی برای کاهش هزینه تولید سورفکتانت پیشنهاد شده است. از آن جمله می توان بهینه سازی محیط کشت و شرایط محیطی، بهینه سازی شرایط عملیاتی راکتور زیستی و اصلاح ژنتیکی را نام برد.

آریما و همکاران ترکیبی برون سلولی را از مایع رویی محیط کشت *B. subtilis* جدا نمودند که فعالیت بیوسورفکتانتی استثنایی داشت، این ترکیب سورفکتین نامیده شد. از این فرمنتاسیون مقدار ۰/۱ گرم بر لیتر سورفکتین به دست آمد که میزان نسبتاً کمی بود. مطالعات بسیاری بر تأثیر فاکتورهای محیطی بر تولید سورفکتین متمرکز شده اند (Peypoux et al., 1999, Akpa et al., 2001). تأثیر فاکتورهای محیطی مختلف بر تولید سورفکتین، می تواند به سویه باکتری بستگی داشته باشد. از میان فاکتورهای محیطی منابع غذایی و از میان منابع غذایی منبع کربن از اهمیت ویژه ای برخوردار است. گلوکز سوبسترای بود که به عنوان منبع کربن در مطالعات پیشین بسیار مورد استفاده قرار گرفته است. ساکارز و فروکتوز نیز به عنوان منابع کربن کارآمد در برابر گلیسرول و هگزادکان ذکر شده اند اما استفاده از فروکتوز مقرون به صرفه نیست. در مورد منابع نیتروژن دو محیط کشت عمده برای تولید سورفکتین استفاده شده است، محیط کشت کوپر (Cooper et al., 1981) که حاوی منابع معدنی نیتروژن (نترات آمونیوم) و محیط کشت لندی (Landy et al., 1948) که از گلوتامیک اسید به عنوان منبع نیتروژن بهره برده است. عملکرد این محیط های کشت غذایی به ترتیب ۰/۸ و ۰/۷۶ گرم بر لیتر بود. اهنو و همکاران از محیطی حاوی گلوکز و

جدول ۲- زمان بندی دوره‌های حرارتی PCR.

Table 2. Timing of the temperature cycles of PCR.

Step	PCR data	Cycle	Time	Temperature (°C)
1	Initial denaturation	1	2 min	95
	Denaturation		30 sec	95
2	Annealing	28	50 sec	53
	Elongation		50 sec	72
2	Extension	1	2 min	72

از آنجایی که حضور ژن *surf* به دلایل متعدد خاموشی ژن نمی‌تواند نشان دهنده تولید سورفکتین باشد، برای ردیابی تولید سورفکتین از روش متلاشی شدن قطره نفت استفاده شد. پس از رشد ۴ روزه باکتری در محیط کشت اصلی با استفاده از سانتریفیوژ (۶۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه) و سپس میکروفیلتر، سلول‌های باکتریایی از محیط جدا شدند. ابتدا مقدار ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون پلیت‌های ۱۵ سانتی‌متری ریخته شد. سپس ۲۰ میکرولیتر نفت خام به مرکز پلیت اضافه شد. پس از به تعادل رسیدن نفت در سطح آب، ۲۰ میکرولیتر از سوپانسیون حاصل روی سطحی پوشیده از نفت خام قرار داده شد. قطره حاوی سورفکتین، سطح نفت را متلاشی می‌کند. با همین روش از ۲۰ میکرولیتر آب مقطر به جای سورفکتین به عنوان شاهد استفاده شد. نکته قابل توجه این که این روش غلظت‌های بالای سورفکتین را مشخص می‌سازد (Tugrul & Cansunar, 2005).

### اندازه گیری زیست توده و تعیین مقدار سورفکتین

به منظور اندازه‌گیری زیست توده و جداسازی سورفکتین از سلول‌های باکتریایی مراحل زیر انجام شد: باکتری در محیط کشت LB به مدت ۷۲ ساعت در ۳۰ درجه سلسیوس و ۲۵۰ rpm کشت شد. سپس سلول‌های باکتریایی از محیط کشت مایع به وسیله سانتریفیوژ (۸۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه) جداسازی، خشک و برای به دست آوردن زیست توده وزن شدند. مایع رویی از میکروفیلتر عبور داده شده و با اضافه کردن اسید کلریدریک ۶ مولار pH آن به ۲ رسانده شد. سپس به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شد تا سورفکتین خام رسوب کند. با سانتریفیوژ مجدد، محلول رویی حذف و

با توجه به اهمیت موضوع می‌توان موارد زیر را از اهداف این پژوهش ذکر کرد:

- ۱- اثبات توانایی سویه‌های بومی کشور در تولید سورفکتین،
- ۲- تغییر و بهینه‌سازی شرایط محیطی به منظور افزایش توان تولید سورفکتین در جدایه *Bacillus subtilis* UTB96،
- ۳- بررسی تأثیر متقابل فاکتورهای محیطی در تولید سورفکتین.

## مواد و روش‌ها

### تهیه و آماده‌سازی باکتری

جدایه *B. subtilis* UTB96 مورد استفاده در این بررسی از کلکسیون دانشگاه تهران تهیه شد و برای تهیه پیش کشت از محیط نوترینت برات (NB) استفاده شد. به این منظور محلول نوترینت برات با غلظت ۸ g/l تهیه و سترون شد. سپس به کمک یک لوپ سترون، باکتری از روی پلیت درون ارلن حاوی نوترینت برات قرار داده شد و درون شیکراکتوباتور در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۵۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت تا محلول آماده تلقیح به محیط کشت اصلی شد. محیط کشت LB به عنوان محیط کشت اصلی مورد استفاده قرار گرفت.

### ردیابی ژن مولد سورفکتین

برای ارزیابی وجود یا عدم وجود ژن تولید کننده سورفکتین (*surf*) از دستگاه Gradient PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن مذکور (جدول ۱) استفاده شد.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه *surfA* (کد کننده سورفکتین).

Table 1. The sequence of primers used to reproduce *surfA* fragment (surfactin encoder).

Primer name	Primer sequence
Forward	5'- CCCAAGCTTTTCGGCTGTTAGTTCATA-3'
Revers	5'- CGGATCCGTTGGTGGCGAAGTGTCT-3'

DNA باکتریایی با استفاده از کیت استخراج DNA برای باکتری‌های گرم مثبت از شرکت سیناکلون استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر اساس جدول ۲ انجام شد.

شد. پس از کاربرد تیمارهای متعدد میزان زیست توده و سورفکتین با روش‌های فوق‌الذکر مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. در نهایت تأثیر ترکیب القاکننده‌هایی که بیشترین تأثیر را در افزایش سورفکتین داشتند در غلظت‌های بهینه مورد ارزیابی قرار گرفت. تیمارهای مورد مطالعه به ترتیب ترکیب گلوکز و آهن و همچنین ترکیب سه عنصر آهن، منگنز و منیزیم به صورت توأم و مقایسه آن‌ها با استفاده از این تیمارها به تنهایی بود. تمامی آزمون‌های فوق با سه بار تکرار انجام شد.

### نتایج

بررسی جدایه با روش PCR (تکثیر قطعه ۹۰۰ جفت بازی) برای ردیابی ژن *stf* نشان داد که جدایه مذکور حامل ژن مذکور است (شکل ۱). با توجه به این که حضور ژن تولید کننده سورفکتین حتماً به معنای تولید سورفکتین نمی‌باشد از روش پخش شدن قطره که یک روش مشخص کننده تولید مقادیر بالای سورفکتین می‌باشد استفاده گردید. بررسی این روش نشان داد که جدایه مورد مطالعه تولید سورفکتین می‌کند.

در بررسی زمان نگهداری محیط کشت حاوی باکتری در شیکر انکوباتور، ۹۶ ساعت زمان بهینه برای تولید بیشترین مقدار سورفکتین (۱/۳۳ g/l) و زیست توده (۱/۶۶ g/l) به دست آمد. به طوری که با افزایش زمان نگهداری تا ۹۶ ساعت میزان سورفکتین و زیست توده به صورت خطی افزایش می‌یابد. اما اندازه گیری مقدار سورفکتین در زمان ۱۲۰ ساعت تفاوت معنی داری با زمان ۹۶ ساعت ندارد در حالی که میزان زیست توده به مقدار ناچیزی کاهش می‌یابد که این مقدار معنی دار نیست.

در ارزیابی pH بهینه برای تولید سورفکتین، pH برابر با ۶ برای تولید زیست توده (۰/۷۲ g/l) مناسب به نظر می‌رسد اما در مورد سورفکتین، تفاوت معنی داری بین pH: ۶ و ۷ (۰/۲۲ g/l) مشاهده نشد. در تحقیق حاضر از بین دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای تولید سورفکتین (۰/۵۴ g/l) و دمای ۲۵ درجه سلسیوس برای تولید زیست توده (۰/۸۷ g/l) مناسب می‌باشد. از

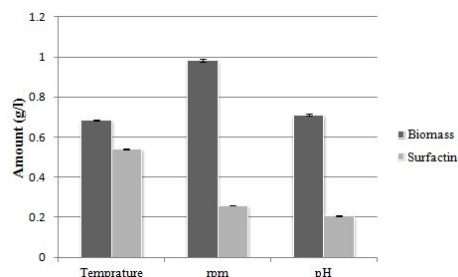
رسوب به دست آمده در دسیکاتور خشک شد. پس از افزودن ۵۰ میلی لیتر کلرید متیلن به رسوب خشک به مدت یک شب به طور مداوم هم زده شد و پس از دو بار فیلتر شدن، در دمای محیط تغلیظ شد. رسوب سفید رنگ مایل به نخودی به دست آمد که همان سورفکتین می‌باشد (Abdel-mawgod *et al.*, 2008).

برای اندازه گیری میزان تولید سورفکتین از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. جداسازی و اندازه گیری کمی و کیفی نمونه‌ها با استفاده از ستون C<sub>18</sub> فاز معکوس و فاز متحرک استونیتریل و تری فلورو استیک اسید با سرعت جریان یک میلی متر در دقیقه و آشکارساز UV، ۲۱۰ نانومتر انجام شد (Hsieh *et al.*, 2004).

### بهینه سازی تولید سورفکتین

به منظور بهینه سازی شرایط تولید سورفکتین از محیط کشت غذایی مایع (Nutrient Broth) در این تحقیق استفاده شد. سپس در مرحله اول تأثیر فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی (مدت زمان کشت یا زمان انکوباسیون، دما، دور شیکر و pH) مورد ارزیابی قرار گرفت. مدت زمان انکوباسیون، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت؛ دور شیکر، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ rpm؛ دما، ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس و pH، ۶، ۷ و ۸ در نظر گرفته شد. به منظور ارزیابی زمان بهینه انکوباسیون به صورت پیش فرض از دمای ۳۰ درجه سلسیوس دور شیکر ۳۰۰ rpm با pH استاندارد محیط کشت (pH: ۷) استفاده شد. سپس زمان بهینه به دست آمده برای برداشت سورفکتین به همراه فاکتورهای پیش فرض در آزمایش‌های بعدی اعمال شد. پس از تعیین فاکتورهای بهینه فیزیکی و شیمیایی در افزایش تولید سورفکتین و اعمال این فاکتورهای بهینه برای بررسی‌های بعدی، تأثیر فاکتورهای القاکننده (آهن، منگنز، منیزیم، آمینو اسیدها، منابع قندی و منابع نیتروژنی) با غلظت‌های متفاوت مورد ارزیابی قرار گرفت. از میان منابع قندی گلوکز و ساکارز که در بررسی‌های پیشین، بیشترین تأثیر را در افزایش تولید سورفکتین داشتند و از میان منابع نیتروژنی نیترات آمونیوم، تریپتون، پپتون و اسیدهای آمینه‌ی گلابسین، متیونین و لوسین انتخاب شد و برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته

افزایش تولید سورفکتین داشتند (دما ۳۰ درجه سلسیوس، pH: ۷، دور همزن ۲۵۰ rpm و طول دوره انکوباسیون یا مدت زمان کشت ۹۶ ساعت) به عنوان شرایط فیزیکی و شیمیایی پایه برای بررسی القا کننده‌ها انتخاب شدند.

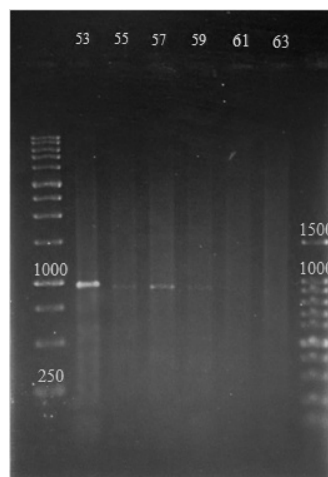


شکل ۲- اثر فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی بهینه (دما: ۳۰ درجه سلسیوس، دور شیکر: ۲۵۰ rpm، اسیدیته: ۷) به دست آمده در تولید زیست توده و سورفکتین بر حسب گرم بر لیتر محیط کشت.

Fig. 2. The effect of optimum physicochemical factors (30°C, 250rpm, pH:7) obtained in the production of biomass and surfactin in gram per liter (g/l) of culture medium.

در مورد اثر القا کننده‌هایی همچون آهن، منگنز و منیزیم در تولید سورفکتین تحقیقات زیادی انجام شده است. غلظت‌های مورد ارزیابی در این تحقیق در جدول ۳ بر حسب میلی مولار نشان داده شده است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد غلظت بهینه آهن، منگنز و منیزیم برای تولید سورفکتین به ترتیب ۳ mM (۰/۷۵ g/l)، ۰/۲ (۰/۴۳ g/l) و ۰/۸ (۰/۳۹ g/l) و برای تولید زیست توده به ترتیب ۲، ۰/۲ و صفر میلی مولار می‌باشد. در پژوهش‌های قبلی، از منابع کربن قندی همچون گلوکز، ساکارز و فروکتوز و از اسیدهای چربی همچون گلیسرول و هگزادکان به منظور افزایش تولید سورفکتین استفاده شده است. از آنجایی که در این بررسی‌ها گلوکز و ساکارز بیشترین تأثیر را در افزایش تولید سورفکتین داشتند به عنوان دو منبع کارآمد در غلظت‌های متفاوت در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. این بررسی نشان داد تولید سورفکتین و زیست توده در حضور گلوکز و ساکارز به ترتیب (۱/۲۳ و ۰/۹۶۴) و (۱/۰۹ و ۰/۶۱ g/l) بوده و بنابراین

فاکتورهای اصلی در تولید سورفکتین جابجایی زیست توده و اکسیژن محلول در محیط به شمار می‌روند که با تغییر در دور همزن قابل کنترل است. در این تحقیق از بین دورهای ۱۵۰، ۲۲۰، ۲۵۰ rpm، مناسب‌ترین دور برای همزن ۲۵۰ rpm ارزیابی شد. با توجه به حجم داده‌های این بخش، امکان ذکر همه آن‌ها در قالب نمودار میسر نیست بنابراین میزان تولید زیست توده و سورفکتین با اعمال فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی بهینه در کنار هم در شکل ۲ نشان داده شده است. به دلیل متفاوت بودن شرایط در هر تیمار، گروه‌بندی آماری در این نمودار انجام نشده است. زیرا هدف از این بخش آزمایش به دست آوردن فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی و یافتن شرایط بهینه پایه برای مقایسه اثر القا کننده‌ها می‌باشد.



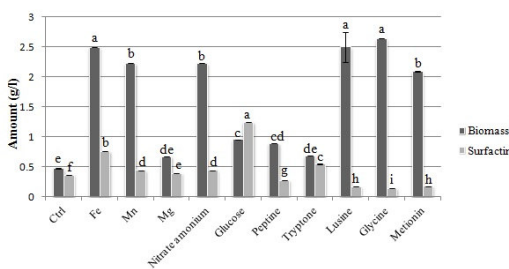
شکل ۱- تکثیر قطعه ۹۰۰ جفت بازی از توالی ژن srf با آغازگر اختصاصی در *Bacillus subtilis* UTB96 با استفاده از PCR گرادیانت با دمای ۵۳، ۵۵، ۵۷، ۵۹، ۶۱ و ۶۳ درجه سلسیوس (مارکر 1Kb در سمت چپ و مارکر ۱۰۰۰ bp در سمت راست تصویر قرار دارد).

Fig. 1. The amplification of 900 base pairs (bp) fragment of the srf gene with a specific primer in *Bacillus subtilis* UTB96 using gradient PCR at 53, 55, 57, 59, 61 and 63°C (1Kb marker on the left and 1000bp marker on the right side).

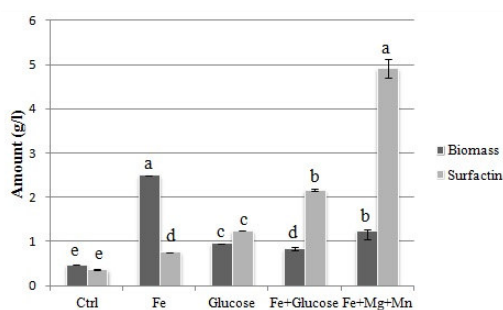
پس از تعیین فاکتورهای بهینه فیزیکی و شیمیایی در افزایش تولید سورفکتین، تیمارهایی که بیشترین تأثیر را در



نتایج حاصل از تأثیر ترکیب القاکننده‌هایی که بیشترین تأثیر را در افزایش سورفکتین داشتند نشان می‌دهد که ترکیب گلوکز و آهن به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش تولید سورفکتین نسبت به استفاده از آهن به‌تنهایی و گلوکز به‌تنهایی شد. استفاده هم‌زمان سه عنصر آهن، منگنز و منیزیم به‌صورت توأم نیز به‌میزان قابل ملاحظه‌ای بازده تولید را افزایش داد به گونه‌ای که میزان سورفکتین تولید شده در محیط از تیمار در اثر تمامی القاکننده‌ها به‌تنهایی و تیمار ترکیب گلوکز و آهن نیز بیشتر شد (شکل ۴).



شکل ۳- مقایسه اثر القاکننده‌ها در تولید زیست توده و سورفکتین بر حسب گرم بر لیتر محیط کشت (حروف انگلیسی در بالای هر ستون نشان دهنده گروه‌بندی آماری آن ستون می‌باشد).  
Fig. 3. Comparison of the effect of the inducers on the production of biomass and surfactin in gram per liter (g/l) of the culture medium (English letters above each column represent the statistical grouping of that column).



شکل ۴- مقایسه اثر ترکیبی القاکننده‌ها در تولید زیست توده و سورفکتین بر حسب گرم بر لیتر محیط کشت (حروف انگلیسی در بالای هر ستون نشان دهنده گروه‌بندی آماری آن ستون می‌باشد).  
Fig. 4. Comparison of the combined effect of inducers on the production of biomass and surfactin in gram per liter (g/l) of the culture medium (English letters above each column represent the statistical grouping of that column).

گلوکز در افزایش تولید، کارایی بیشتری داشته و تفاوت معنی‌داری با ساکارز و هر دو با شاهد داشتند. در این پژوهش با افزایش غلظت گلوکز (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰) تا ۵۰ g/l میزان سورفکتین و زیست توده افزایش داشته اما در غلظت ۶۰ g/l مقدار آن‌ها کاهش می‌یابد.

بررسی‌ها نشان می‌دهد از میان منابع نیتروژنی، نیتروژن معدنی (نترات آمونیوم) نسبت به نیتروژن آلی کارایی بیشتری در افزایش تولید سورفکتین دارد. در این پژوهش نیز اضافه کردن نترات آمونیوم به محیط کشت منجر به افزایش معنی‌دار زیست توده و سورفکتین شد. در جدول ۳ به غلظت‌های مورد استفاده از نترات آمونیوم اشاره شده است. از دیگر منابع نیتروژنی مورد استفاده در تولید سورفکتین می‌توان منابع پروتئینی و اسیدهای آمینه را نام برد که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. از منابع پروتئینی تریپتون و پپتون، در افزایش زیست توده (۰/۸۸ g/l) و در افزایش سورفکتین تریپتون (۰/۵۴ g/l) بهتر عمل کرد. از دیگر منابع پروتئینی اسیدهای آمینه متیونین، گلايسين و ال-لوسين استفاده شد که هر سه مورد، منجر به کاهش معنی‌دار در میزان سورفکتین نسبت به شاهد و افزایش قابل ملاحظه و معنی‌دار در افزایش زیست توده نسبت به شاهد شدند. بیشترین کاهش سورفکتین در حضور گلايسين (۰/۲۵ g/l) و بیشترین افزایش زیست توده در حضور گلايسين و ال-لوسين (بدون تفاوت معنی‌دار) (۴/۵ g/l و ۴/۴) افتاد (شکل ۳).

جدول ۳- غلظت‌های مورد استفاده به‌منظور افزایش تولید سورفکتین برای فاکتورهای القاکننده (غلظت‌های بهینه با علامت \* نشان داده شده است).

Table 3. Inducer factors concentrations used to increase surfactin production (optimal concentrations are shown with \*).

Treatment	Concentration		
Iron (mM)	1	2	3*
Manganese (mM)	0.2*	0.5	1
Magnesium (mM)	0.6	0.8*	1
Ammonium nitrate (mM)	0.3	0.6*	0.8
Glucose (g/l)	20	30	40 50* 60

ارزیابی میزان زیست توده در آزمایش‌های فوق نشان داد تیمار آهن به‌تنهایی بیشترین تأثیر و استفاده هم‌زمان آن با گلوکز نیز در افزایش معنی‌دار میزان زیست توده نسبت به شاهد مؤثر بوده است.

**بحث**

بررسی جدایه با دستگاه PCR برای ردیابی ژن *stf* نشان داد که جدایه مذکور حامل ژن *stf* است. در این بررسی از میان دماهای مورد ارزیابی برای اتصال آغازگر در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز دمای بهینه ۵۳ درجه سلسیوس به دست آمد که با نتایج سان و همکاران هم‌خوانی دارد (Sun et al., 2009).

زمان نگهداری، فاکتوری است که به‌طور مستقیم بر فاز تأخیری (Lag)، میزان رشد، زیست توده، اسپورزایی و به‌ویژه میزان سورفکتین مؤثر است. همان‌گونه که ذکر شد با افزایش زمان نگهداری تا ۹۶ ساعت میزان سورفکتین و زیست توده به‌صورت خطی افزایش می‌یابد. اما اندازه‌گیری مقدار سورفکتین در زمان ۱۲۰ ساعت تفاوت معنی‌داری با زمان ۹۶ ساعت ندارد در حالی که میزان زیست توده به مقدار ناچیزی کاهش می‌یابد که این مقدار معنی‌دار نیست. کاهش ناچیز میزان زیست توده می‌تواند به دلیل کاهش مواد غذایی، ورود سلول‌ها به فاز مرگ و در نهایت تجزیه آن‌ها توسط متابولیت‌های تجزیه‌کننده باشد.

سن و سامیناتان، pH مناسب برای تولید سورفکتین را ۶/۷۵ به دست آوردند. در این مطالعه نیز pH مناسب برای تولید سورفکتین ۶ و ۷ و برای تولید زیست توده ۶ به دست آمد. به‌نظر می‌رسد pH قلیایی منجر به کاهش تولید سورفکتین و اسیدیته کمتر از ۶ نیز به تدریج منجر به رسوب سورفکتین در محیط و کاهش تولید آن خواهد شد (Sen & Swaminathan, 1997).

زمان نگهداری، فاکتوری است که به‌طور مستقیم بر فاز تأخیری (Lag)، میزان رشد، زیست توده، اسپورزایی و به‌ویژه میزان سورفکتین مؤثر است. همان‌گونه که ذکر شد با افزایش زمان نگهداری تا ۹۶ ساعت میزان سورفکتین و زیست توده به‌صورت خطی افزایش می‌یابد. اما اندازه‌گیری مقدار سورفکتین در زمان ۱۲۰ ساعت تفاوت معنی‌داری با زمان ۹۶ ساعت ندارد در حالی که میزان زیست توده به مقدار ناچیزی کاهش می‌یابد که این مقدار معنی‌دار نیست. کاهش ناچیز میزان زیست توده می‌تواند به دلیل کاهش مواد غذایی، ورود سلول‌ها به فاز مرگ و در نهایت تجزیه آن‌ها توسط متابولیت‌های تجزیه‌کننده باشد.

سن و سامیناتان، pH مناسب برای تولید سورفکتین را ۶/۷۵ به دست آوردند. در این مطالعه نیز pH مناسب برای تولید سورفکتین ۶ و ۷ و برای تولید زیست توده ۶ به دست آمد. به‌نظر می‌رسد pH قلیایی منجر به کاهش تولید سورفکتین و اسیدیته کمتر از ۶ نیز به تدریج منجر به رسوب سورفکتین در محیط و کاهش تولید آن خواهد شد (Sen & Swaminathan, 1997).

مناسب برای تولید سورفکتین در حضور منابع قندی را ۶/۷-۶/۳ اعلام کردند (Shaligram & Singhal, 2010).

دما نیز از فاکتورهای اصلی در تولید سورفکتین به شمار می‌رود. دماهای بالا (۳۷ درجه سلسیوس) برای سنتز سورفکتین در *B. subtilis* RB14 جدا شده از کمپوست و

ارزیابی میزان زیست توده در آزمایش‌های فوق نشان داد تیمار آهن به‌تنهایی بیشترین تأثیر و استفاده هم‌زمان آن با گلوکز نیز در افزایش معنی‌دار میزان زیست توده نسبت به شاهد مؤثر بوده است.

بررسی جدایه با دستگاه PCR برای ردیابی ژن *stf* نشان داد که جدایه مذکور حامل ژن *stf* است. در این بررسی از میان دماهای مورد ارزیابی برای اتصال آغازگر در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز دمای بهینه ۵۳ درجه سلسیوس به دست آمد که با نتایج سان و همکاران هم‌خوانی دارد (Sun et al., 2009).

زمان نگهداری، فاکتوری است که به‌طور مستقیم بر فاز تأخیری (Lag)، میزان رشد، زیست توده، اسپورزایی و به‌ویژه میزان سورفکتین مؤثر است. همان‌گونه که ذکر شد با افزایش زمان نگهداری تا ۹۶ ساعت میزان سورفکتین و زیست توده به‌صورت خطی افزایش می‌یابد. اما اندازه‌گیری مقدار سورفکتین در زمان ۱۲۰ ساعت تفاوت معنی‌داری با زمان ۹۶ ساعت ندارد در حالی که میزان زیست توده به مقدار ناچیزی کاهش می‌یابد که این مقدار معنی‌دار نیست. کاهش ناچیز میزان زیست توده می‌تواند به دلیل کاهش مواد غذایی، ورود سلول‌ها به فاز مرگ و در نهایت تجزیه آن‌ها توسط متابولیت‌های تجزیه‌کننده باشد.

سن و سامیناتان، pH مناسب برای تولید سورفکتین را ۶/۷۵ به دست آوردند. در این مطالعه نیز pH مناسب برای تولید سورفکتین ۶ و ۷ و برای تولید زیست توده ۶ به دست آمد. به‌نظر می‌رسد pH قلیایی منجر به کاهش تولید سورفکتین و اسیدیته کمتر از ۶ نیز به تدریج منجر به رسوب سورفکتین در محیط و کاهش تولید آن خواهد شد (Sen & Swaminathan, 1997).

مناسب برای تولید سورفکتین در حضور منابع قندی را ۶/۷-۶/۳ اعلام کردند (Shaligram & Singhal, 2010).

دما نیز از فاکتورهای اصلی در تولید سورفکتین به شمار می‌رود. دماهای بالا (۳۷ درجه سلسیوس) برای سنتز سورفکتین در *B. subtilis* RB14 جدا شده از کمپوست و



(batch) باید در زمان مناسب به منظور جلوگیری از مصرف سورفکتین متوقف شود و غلظت قند حالت بحرانی در این سیستم دارد (Shaligram & Singhal, 2010). در این تحقیق با افزایش غلظت گلوکز (تا ۵۰ g/l) میزان سورفکتین و زیست توده افزایش می یابد اما در غلظت ۶۰ g/l میزان هر دوی آنها کاهش می یابد. تحقیقات پیشین نیز نشان می دهد غلظت های بالای گلوکز (۶۰-۵۰ g/l) منجر به کاهش pH و در نتیجه کاهش تولید سورفکتین خواهد شد (Shaligram & Singhal, 2010).

بررسی ها نشان می دهد از میان منابع نیتروژنی، نیتروژن معدنی (نترات آمونیوم) نسبت به نیتروژن آلی کارایی بیشتری در افزایش تولید سورفکتین دارد. استفاده از نترات در دو حالت اتفاق می افتد، در شرایط رشد بی هوازی و یا زمانی که آمونیوم در محیط به اتمام رسیده باشد. بازده پایین تولید سورفکتین در محیط های بدون استفاده از نترات و در نتیجه فاقد محتوای کربن کافی و یا تنها دارای آمونیوم (بدون نترات) اتفاق می افتد. بنابراین نترات به عنوان یک گیرنده الکترون نهایی در شرایط بی هوازی عمل می کند. در شرایط هوازی مصرف آمونیوم به نترات ارجح است. این مطالعه آشکار می سازد که با انجام سیستم نیمه پیوسته (fed batch) و فراهم آوردن آمونیوم در فاز رشد و نترات به عنوان منبع غذایی، مصرف نترات می تواند ادامه یافته و تولید سورفکتین نیز افزایش یابد (Shaligram & Singhal, 2010). از میان منابع نیتروژنی نوع پروتئین و نوع اسیدهای آمینه کمتر مورد بررسی قرار گرفته اند. از آنجایی که نوع پروتئین و اسید آمینه می تواند تأثیر متفاوت و حتی معکوسی در تولید سورفکتین و زیست توده داشته باشد، بنابراین دقت در منابع غذایی و القاکننده های پروتئینی در فرایند تولید سورفکتین امری ضروری به نظر می رسد.

نتایج حاصل از تأثیر ترکیب القاکننده هایی که بیشترین تأثیر را در افزایش سورفکتین داشتند نشان می دهد ترکیب گلوکز و آهن و همچنین ترکیب آهن، منگنز و منیزیم به طور معنی داری منجر به افزایش تولید سورفکتین می شود. لذا این نتیجه آشکار می سازد که این عناصر در تولید سورفکتین اثر هم افزایی دارند. Wei و همکاران روشی

که منگنز (۰/۰۱ mM) بر مصرف نیتروژن و احساس یون پتاسیم مؤثر بوده و تولید سورفکتین را از ۰/۳۳ g/l به ۲/۶ افزایش داد (Wei & Chu, 2002). فقر سیستم انتقال آهن می تواند یکی از دلایل نیاز شدید به آهن در پروسه تولید باشد (Cooper et al., 1981).

وی و همکاران نشان دادند که غلظت های بهینه عناصر منیزیم (۰/۰۸ mM)، پتاسیم (۱۰ mM)، منگنز (۲/۴ mM) و آهن (۷ mM) بر خلاف کلسیم بیشترین تأثیر را در بازده رشد سلول و تولید سورفکتین داشتند که با نتایج این تحقیق سازگاری دارد (Wei et al., 2007). پژوهش های قبلی نشان داد که سایت فعال پروتئین SFP که دومین PCP را در سورفکتین سنتتاز فعال می کند، به یون منیزیم به عنوان کوفاکتور نیاز دارد و یون پتاسیم در تحریک ترشح سورفکتین به خارج از سلول نقش دارد (Kinsinger et al., 2003, Kinsinger et al., 2005). تحقیق حاضر نیز نشان داد اضافه کردن یون منیزیم به مقدار ناچیز بنا به دلایلی که در بالا به آن اشاره شد، منجر به افزایش تولید سورفکتین می شود. کوپر و همکاران نشان دادند که سولفات های مس، نیکل، کبالت و روی تولید سورفکتین را در باسیلوس سوبتیلیس متوقف می کند. منگنز عنصری شناخته شده در افزایش تولید متابولیت های ثانویه بدون تأثیر معنی دار بر رشد سلولی می باشد (Cooper et al., 1981). در حالی که در جدایه این تحقیق این عنصر علاوه بر تولید سورفکتین در تولید زیست توده در غلظت ۰/۲ mM نیز تأثیر مثبت داشته است.

در خصوص منابع کربن، گلوکز سوبسترای بود که در منابع بسیار مورد استفاده قرار گرفته است (Yeh et al., 2005). ساکارز و فروکتوز نیز به عنوان منابع کربن کارآمد در برابر گلیسرول و هگزادکان ذکر شده اند. در حالی که الأجلانی و همکاران ساکارز را منبع قندی مناسب تری برای تولید سورفکتین ارزیابی کردند (Al-Ajlani et al., 2007). کاهش تدریجی غلظت سورفکتین به دنبال تقلیل میزان گلوکز می تواند به دلیل استفاده سلول ها از سورفکتین به عنوان منبع کربن برای رشد باشد. این پدیده نشان می دهد سیستم فرمانتاسیون ناپیوسته

می‌رسد. آهن و گلوکز در افزایش سورفکتین بیشترین تأثیر را دارند. ترکیب القاکننده‌ها به‌ویژه استفاده ترکیبی از آهن، منگنز و منیزیم بیشترین تأثیر را در افزایش سورفکتین دارد.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از دانشگاه تحصیلات تکمیلی و فناوری پیشرفته کرمان و واحد تحقیق و توسعه، شرکت فناوری زیستی طبیعت گرا (بایوران) که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، صمیمانه تقدیر و تشکر می‌شود.

طراحی کردند که در آن ترکیب بهینه‌ای از عناصر باعث افزایش سورفکتین می‌شود، که باعث بالا رفتن سورفکتین از ۱/۷۴ به ۳/۳۴ گرم بر لیتر می‌شوند (Wei *et al.*, 2007). عبدال موهگود و همکاران نیز با استفاده از محیط (molasses MSM) و بهینه سازی ترکیب عناصر محیط کشت مقدار ۱/۱۲ g/l سورفکتین تولید کردند (Tugrul & Cansunar, 2005).

غلظت‌های بهینه به‌منظور افزایش سورفکتین برای فاکتورهای القاکننده در جدول ۳ آمده است. به‌منظور افزایش زیست توده اسیدهای آمینه مناسب‌ترین گزینه به‌نظر

### References

- Abdel-Mawgod, A., Aboulwafa, M. & Hassouna, N. 2008. Characterizations of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 150: 289–303.
- Akpa, E., Jacques P., Wathélet, B., Paquot, M., Fuchs, R., Budzikiewicz, H. & Thonart, P. 2001. Influence of culture conditions on lipopeptide production by *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 93: 551–561.
- Al-Ajlani, M.M., Sheikh, M.A., Ahmad, Z. & Hasnain, S. 2007. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. *Microbial Cell Factories*, 6: 17.
- Arima, K., Kakinuma, A. & Tamura, G. 1968. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31: 488–494.
- Askari, N., Salehi Jouzani, Gh., Mousivand, M., Foroutan, A., Hagh Nazari, A., Abbasalizadeh, S., Soheilvand, S. & Mardi, M. 2011. Evaluation of Anti-Phytoplasma Properties of Surfactin and Tetracycline Towards Lime Witches' Broom Disease Using Real-Time PCR. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 81–88.
- Assie, L.K., Deleu, M., Arnaud, L., Paquot, M., Thonart, P., Gaspar, Ch. & Haubruge, E. 2002. Insecticide activity of surfactins and iturins from a biopesticide *Bacillus subtilis* Cohn (S499 strain). *Meded. Rijksuniv. Gent. Fak. Landbouwk. Toegep. Biol. Wet.*, 67: 647–655.
- Bais, H.P., Fall, R. & Vivanco, J.M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin. *Plant Physiology*, 134: 307–319.
- Cooper, D.G., Macdonald, C.R., Duff, S.J. & Kosaric, N. 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and Environmental Microbiology*, 42: 408–412.
- Cosby, W.M., Vollenbroich, D., Lee, O.H. & Zuber, P. 1998. Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0K oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control. *Journal of Bacteriology*, 180: 1438–1445.

- Coutte, F., Leclère, V., Bechet, M., Guez, J.S., Lecouturier, D., Chollet Imbert, M., Dhulster, P. & Jacques, P. 2010. Effect of pps disruption and constitutive expression of *surfA* on surfactin productivity, spreading and antagonistic properties of *Bacillus subtilis* 168 derivatives. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 480–491.
- Debois, D., Hamze, K., Gue´rigneau, V., Le Cae´r, J.P., Holland, I.B., Lopes, P., Ouazzani, J., Se´ror, S.J., Brunelle, A. & Lapre´vote, O. 2008. In situ localisation and quantification of surfactins in a *Bacillus subtilis* swarming community by imaging mass spectrometry. *Proteomics*, 8: 3682–3691.
- Gancel, F., Montastruc, L., Liu, T., Zhao, L. & Nikov, I. 2009. Lipopeptide overproduction by cell immobilization on iron enriched light polymer particles. *Process Biochemistry*, 44: 975–978.
- Gevers, W., Kleinkauf, H. & Lipmann, F. 1968. The activation of amino acids for biosynthesis of gramicidin S. *National Academy Sciences*, 60: 269–276.
- Hsieh, F.C., Li, M.C., Lin, T.C. & Kao, S.S. 2004. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Current Microbiology*, 49: 186–191.
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E. & Thonart, P. 1999. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett Burman design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77: 223–233.
- Kim, H.S., Yoon, B.D., Lee, C.H., Suh, H.H., Oh, H.M., Katsuragi T. & Tani Y. 1997. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of Fermentation Technology*, 84: 41–46.
- Kinsinger, R.F., Shirk, M.C. & Fall, R. 2003. Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *Journal of Bacteriology*, 185: 5627–5631.
- Kinsinger, R.F., Kearns, DB., Hale, M. & Fall, R. 2005. Genetic requirements for potassium ion-dependent colony spreading in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 187: 8462–8469.
- Konz, D., Klens, A., Schorgendorfer, K. & Marahiel, M.A. 1997. The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chemical Biology*, 4: 927–937.
- Kracht, M., Rokos, H., Ozel, M., Kowall, M., Pauli, G. & Vater, J. 1999. Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. *Journal of Antibiotics*, 52: 613–619.
- Landy, M., Warren, G.H., Rosenman, S.B. & Colio, L.G. 1948. Bacillomycin an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 67: 530–541.
- Mohammadipour, M., Mousivand, M., Salehi Jouzani, Gh. & Abbasalizadeh, S. 2009. Molecular and biochemical characterization of Iranian surfactin-producing *Bacillus subtilis* isolates and evaluation of their biocontrol potential against *Aspergillus flavus* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Canadian Journal of Microbiology*, 55: 395–404.
- Mootz, H.D., Kessler, N., Linne, U., Eppelmann, K., Schwarzer, D. & Marahiel, M.A. 2002. Decreasing the ring size of a cyclic no ribosomal peptide antibiotic by in frame module deletion in the biosynthetic genes. *Journal of the American Chemical Society*, 124: 10980–10981.
- Mukherjee, S., Das, P. & Sen, R. 2006. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*, 24: 509–515.

- Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T.K. & Sivachidambaram, P. 2008. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current Science*, 94: 736–747.
- Nagai, S., Okimura, K., Kaizawa, N., Ohki, K. & Kanatomo, S. 1996. Study on surfactin, a cyclic depsipeptide. II. Synthesis of surfactin B2 produced by *Bacillus natto* KMD 2311. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 44: 5–10.
- Ohno, A., Ano, T. & Shoda, M. 1992. Production of a lipopeptide antibiotic surfactin with recombinant *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters*, 14: 1165–1168.
- Ohno, A., Ano, T. & Shoda, M. 1995. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 47: 209–214.
- Ongena, M., Jacques, P., Toure, Y., Destain, J., Jabrane, A. & Thonart, P. 2005. Involvement of fengycin type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69: 29–38.
- Ongena, M. & Jacques, P. 2008. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16: 115–125.
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L. & Thonart, P. 2007. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9: 1084–1090.
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M. & Wallach, J. 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 553–563.
- Rashedi, H.R., Mazaheri Assadi, M., Jamshidi, E. & Bonakdarpour, B. 2006. Optimization of the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* HR isolated from an Iranian Southern Oil well. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 25: 25–30.
- Ritter, S.K. 2004. Green innovations. *Chemical & Engineering News*, 82: 25–30.
- Sandrin, C., Peypoux, F. & Michel, G. 1990. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 12: 370–375.
- Sen, R. & Swaminathan, T. 1997. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47: 358–363.
- Shaligram, N.S. & Singhal, R.S. 2010. Surfactin: A review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. *Food Technology and Biotechnology*, 48: 119–134.
- Sheppard, J.D. & Cooper, D.G. 1991. The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous phased growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35: 72–76.
- Sun, H., Bie, X., Lu, F., Lu, Y., Wu, Y. & Lu, Z. 2009. Enhancement of surfactin production of *Bacillus subtilis* fmbR by replacement of the native promoter with the Pspac promoter. *Canadian Journal of Microbiology*, 5: 1003–1006.
- Thomas, D.W. & Ito, T. 1969. The revised structure of the peptide antibiotic esperin, established by mass spectrometry. *Tetrahedron*, 25: 1985–1990.
- Tugrul, T. & Cansunar, E. 2005. Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 851–853.

- Vollenbroich, D., Pauli, G., Ozel, M. & Vater, J. 1997. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology, 63: 44–49.
- Wei, Y.H. & Chu, I.M. 2002. Mn<sup>2+</sup> improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. Biotechnology Letters, 24: 479–482.
- Wei, Y.H., Lai, C.C. & Chang, J.S. 2007. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Process Biochemistry, 42: 40–45.
- Wei, Y.H., Wang, L.F. & Chang, J.S. 2004. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. Biotechnology Progress, 20: 979–983.
- Yeh, M.S., Wei, Y.H. & Chang, J.S. 2005. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. Biotechnology Progress, 21: 1329–1334.

---

**Enhancing surfactant production in *Bacillus subtilis* UTB96 by fermentation optimization****Sahar Keshavarzi<sup>1</sup>, Masoud Ahmad zadeh\*<sup>1</sup>, Saeid Mirzaei<sup>2</sup>, Keivan Behboudi<sup>1</sup>, Mojgan bandeh pour<sup>3</sup>**

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2. Department of Biotechnology, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

3. Biotechnology Department, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti, University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\*Corresponding author: Masoud Ahmad zadeh, ahmadz@ut.ac.ir

Received: Sep., 6, 2017

5(2) 13-26

Accepted: Jun., 11, 2018

---

**Abstract**

A biocontrol bacterium, *Bacillus subtilis* is well known for producing wide spectrum of antimicrobial compounds. Among these products, biosurfactant compounds such as surfactin have high importance. Biosurfactants that are produced by the microorganisms are applied in the various aspects of industry, medicine and agriculture because of their low toxicity and individual properties. However, these compounds are not produced in high quantity due to their low production yield and high purification cost. In the current study for investigating the production of surfactin in the isolate (UTB96), recognition of *srf* gene and determination of the amount of surfactin production, we used Drop collapse, PCR and HPLC methods. Molecular analysis with specific primer indicated that the isolate had *srf* gene. To optimize the fermentation process, influence of various inducers and physiochemical factors were studied on the biomass and surfactin production. The results indicated that maximum surfactin production occurred after amending the culture medium with glucose (1.243 g/l) solution. After that influence of the combined inducer elements were studied in increasing the amount of surfactin production. Results revealed that maximum production (5.055 g/l) was done in the presence of Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> mixture in the culture medium. The results also showed that the amount and the type of the food sources had remarkable impact on the surfactin production efficiency. The changes in the amount and composition of the food sources therefore, could be economically considered for the commercial production of this compound.

**Keywords:** biosurfactant, fermentation, *srf* gene, HPLC

---