

## بررسی سینتیکی جداسازی زیستی مس از محلول سولفات مس به شکل نانوذرات سولفید مس

سیدمحمدرفوف حسینی<sup>۱\*</sup>، مهین شفیعی<sup>۲</sup>

۱. بخش مهندسی معدن، دانشگاه شهید باهنر، کرمان (raoofsmh@yahoo.com)

۲. بخش مهندسی شیمی، دانشگاه شهید باهنر، کرمان (m.schaffie@uk.ac.ir)

### چکیده

اخیرا ثابت شده است که قارچ *Fusarium oxysporum* توانایی دارد تا نانوذرات فلزی را از طریق ترشح پروتئین‌های خاص به داخل محیط رشد خود، تولید کند. بنابراین، به منظور درک بیشتر چگونگی رشد و تولید پروتئین و همچنین فرایند بیوسنتز نانوذرات توسط این میکروارگانیسم، کشت آن انجام و سینتیک رشد سلول، مصرف پیش ماده و تولید پروتئین، به ترتیب با استفاده از معادلات لگاریتمی و Luedeking-Piret مدل‌سازی شد. همچنین، انطباق این مدل‌ها بر داده‌های آزمایشگاهی بررسی و نتایج آماری آن ارائه گردید. درنهایت، داده‌های حاصل از بیوسنتز نانوذرات سولفید مس ارائه شده و مکانیسم و سینتیک تولید آنها بررسی شد.

### مشخصات مقاله

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۲۰ اردیبهشت ۹۱

دریافت پس از اصلاح: ۳۰ دی ۹۱

پذیرش نهایی: ۴ بهمن ۹۱

کلمات کلیدی:

فوساریوم اوکسیس پروم

سینتیک

رشد

پروتئین

نانوذرات

سولفید مس

حقوق ناشر محفوظ است.

\* عهده دار مکاتبات

## ۱- مقدمه

می‌گیرد و ۲) مدل‌های غیر ساختاری که در آنها، سامانه‌های زیستی تنها با توجه به زیست توده بیان می‌شوند [۱۵] و ساده‌ترین روش برای مدل‌سازی سینتیکی، استفاده از مدل‌های سینتیکی غیرساختاری می‌باشد.

بنابراین، از آنجاکه پیش از این، در مقاله‌ای بطور جداگانه به خواص نانوذرات تولید شده پرداخته شد [۸]، در این مقاله برای اولین بار، مدل سینتیکی تولید زیستی نانوذرات فلزی با بهره‌گیری از سینتیک واکنش‌های آنزیمی ارایه می‌شود. همچنین، تولید زیست توده مصرف گلوکز و تولید پروتئین توسط *F. oxysporum* اندازه‌گیری و مدل‌سازی شده است.

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱- میکروارگانیزم و شرایط رشد

قارچ مورد استفاده در این آزمایش‌ها، *Fusarium oxysporium* بود که از موسسه فدرال علوم زمین و منابع طبیعی آلمان (BGR) تهیه شد. این قارچ بر روی اسلنت PDA در دمای ۳۰°C رشد داده شد و برای شروع دوره فرمنتاسیون، اسپورها از یک اسلنت ۴ روزه در ارلن‌های ۳۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت MGYB با غلظت  $4 \times 10^6$  اسپور در میلی‌لیتر تلقیح شدند. سپس، فلاسک‌ها درون شیکر انکوباتور در دمای ۳۰°C و دور ۲۰۰ rpm به مدت ۱۲۰ ساعت قرار گرفتند. این آزمایش‌ها با دو بار تکرار انجام شدند.

## ۲-۲- بیوسنتز نانوذرات سولفید مس

پس از اتمام دوره فرمنتاسیون به مدت ۷۲ ساعت، سلول‌ها با استفاده از یک سانتریفیوژ (سیگما 3-16PK) با سرعت ۵۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه جدا و در شرایط استریل شسته شدند. سپس، سلول‌ها به ۱۰۰ ml محلول  $10^{-3}M$  سولفات مس انتقال یافته و فلاسک‌ها به مدت ۱۲ ساعت در شیکر-انکوباتور با دمای ۳۰°C و دور ۲۰۰ rpm قرار داده شدند.

## ۲-۳- روش‌های اندازه‌گیری

به منظور اندازه‌گیری تولید زیست توده، پروتئین و مصرف قند، نمونه‌هایی با فواصل ۱۲ ساعت با استفاده از میکروتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری برداشت شد. سپس، سلول‌های قارچ با استفاده از سانتریفیوژ جدا شده و وزن آنها پس از قرار گرفتن در دمای ۷۰°C به مدت ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد. همچنین، محلول باقی‌مانده برای اندازه‌گیری‌های بعدی در

فوساریوم اوکسیسپروم یکی از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهان است که در خاک‌های سراسر دنیا رشد می‌کند. بعلاوه، برخی از سویه‌های آن، ممکن است به عنوان عوامل کنترل زیستی در کشاورزی مورد استفاده قرار گیرند [۱]. لیکن، اخیراً کاربرد تازه‌ای از این قارچ در علوم و مهندسی ارایه شده است. تاکنون، مقالات متعددی [۲،۳،۴] منتشر شده‌اند که اثبات می‌کنند این میکروارگانیزم قادر است نانوذرات فلزی را در ترکیبات و اشکال گوناگون تولید نماید.

امروزه، مطالعه سولفیدهای فلزی نیمه‌هادی به سرعت در حال رشد است. در این میان، سولفید مس به عنوان ترکیبی با استوکیومتری متغیر، توجه زیادی را به سمت خود جلب نموده است [۵]. این تغییر پذیری، باعث شده است که سولفید مس، از خود ویژگی‌های غیرمعمول الکتریکی و نوری را بروز دهد که از این قابلیت‌ها می‌توان در ساخت سلول‌های خورشیدی، کاتالیست‌ها، کاتدهای ظرفیت بالا در باتری‌های لیتیومی، حسگرهای شیمیایی و مواد خنک کننده ترمو الکتریکی بهره برد [۶،۷].

نانوذرات سولفید مس، با روش‌های متنوعی تولید شده است. لیکن، با در نظر گرفتن علاقه روزافزون به توسعه روش‌های دوستدار محیط زیست در سنتز نانوذرات فلزی، برآن شدیم تا این ذرات را برای اولین بار در جهان با استفاده از قارچ فوساریوم اکسیسپروم تولید نماییم [۸].

سینتیک کند تولید نانوذرات توسط این قارچ همواره در کارهای انجام شده، یک عامل محدود کننده بوده است و در گزارش‌های مختلفی به آن اشاره گردیده است [۹،۱۰]. از آنجایی که فرایند سنتز تاحد بالایی وابسته به آنزیمها و پپتیدهای ترشح شده توسط میکروارگانیزم به محیط است [۱۱،۱۲]، انجام یک پژوهش پایه‌ای بر روی سینتیک رشد، تولید پروتئین و سنتز نانوذرات جهت بدست آوردن دانش کافی در مورد فرایند و بهبود آن در آینده ضروری است.

به طور کلی، مدل‌های سینتیکی، روابط ریاضی هستند که به صورت تجربی بدست می‌آیند و به خوبی می‌توانند بر داده‌های آزمایشگاهی منطبق شوند [۱۳]. بسیاری از سامانه‌های زیستی، از مدل‌های بیوسینتیکی برای نرخ مصرف پیش‌ماده، تولید زیست توده و محصول استفاده می‌کنند تا فهم پایه‌ای از مکانیسم فرایندها بدست آید [۱۴]. دو نوع مدل فرمنتاسیون وجود دارد. ۱) مدل‌های ساختاری که برخی جنبه‌های پایه‌ای ساختار سلول، عملکرد و ترکیب آنرا در نظر

$$X = \frac{X_0 e^{\mu m t}}{1 - (X_0/X_m)(1 - e^{\mu m t})} \quad (2)$$

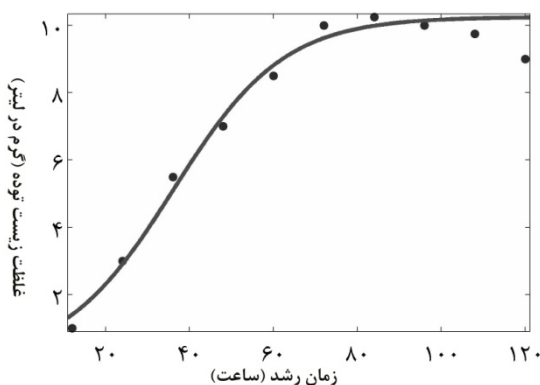
اشکال رابطه ۲ این است که فاز مرگ را پیش‌بینی نمی‌کند. به منظور پیش‌بینی فاز مرگ میکروارگانسیم علاوه بر فاز رشد، باید از رابطه ۳ استفاده کنیم [۱۹].

$$X = \frac{X_0 e^{\mu m t}}{1 - (X_0/X_m)^2 \left(\frac{\mu m}{k + \mu m}\right) (1 - e^{(k + \mu m)t})} \quad (3)$$

در این رابطه،  $k$  مقدار ثابتی است که با ازدیاد یا کاهش سلول‌ها در ارتباط است. در واقع، مقدار مثبت آن نشان‌دهنده کاهش و مقدار منفی آن، نشان‌دهنده افزایش در جمعیت سلول‌هاست.

با انطباق نتایج حاصل از فرمنتاسیون بر رابطه ۲، نشان داده شد که رشد قارچ، تقریباً یک روند کلاسیک را دنبال کرده و بیشترین زیست‌توده، پس از ۸۴ ساعت به میزان  $X_m = 10.25 \text{ g l}^{-1}$  حاصل شد. با انطباق داده‌های آزمایشگاهی بر معادله ۲، مقادیر پارامترهای غلظت بیومس اولیه و نرخ پیشینه رشد بترتیب به صورت  $X_0 = 0.613 \text{ g l}^{-1}$  و  $\mu_m = 0.076 \text{ h}^{-1}$  تعیین شدند. شکل ۱ نشان‌دهنده یک دیاگرام مقایسه‌ای بین مقادیر حاصل از آزمایش و مدل است. مقدار R-square و Adjusted R-square که هر دو ۰/۹۷ بدست آمدند گویای انطباق عالی مدل بر داده‌های آزمایشگاهی حاصل از رشد این قارچ است [۲۰].

همانطور که در شکل ۱ قابل مشاهده است، داده‌هایی که مقادیر زیست توده را در ساعات پایانی آزمایش نشان می‌دهند، اختلاف قابل توجهی با مدل آرایه شده دارند. علت این پدیده، ناتوانی مدل بدست آمده از معادله ۲ برای پیش‌بینی فاز مرگ است. بنابراین، مدل جدیدی را بر مبنای معادله ۳، آزمایش می‌کنیم.



شکل (۱) مقایسه داده‌های آزمایشگاهی (●) رشد سلول و مدل لگاریتمی (—)

فریزر نگهداری شد. غلظت گلوکز با استفاده از روش رنگ سنجی نلسون و سوموگای [۱۶، ۱۷] و پروتئین با استفاده از روش بردفورد [۱۸] و توسط یک دستگاه اسپکتروفوتومتر (Varian-Carry) تعیین شدند. بعلاوه، به منظور تعیین سینتیک تولید نانوذرات، نمونه‌هایی در فواصل معین از فلاسک‌های حاوی سولفات مس برداشته شده و سلول‌ها توسط سانتریفیوژ جدا شدند. سپس، به منظور توقف فعالیت آنزیم‌ها، نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در آب جوش قرار داده شد و تا لحظه آنالیز در فریزر نگهداری شدند. غلظت مس نمونه‌ها، با استفاده از یک دستگاه ICP (Varian 715-ES) ثبت گردید. همچنین، pH فلاسک‌ها با استفاده از یک دستگاه pH متر Jenway ثبت شد. تصویر نانوذرات تولید شده، با استفاده از دستگاه TEM مدل Philips CM20 تهیه شد.

### ۳- آرایه نتایج و تحلیل یافته‌ها

#### ۳-۱- رشد میکروبی

رشد میکروبی بلافاصله پس از تلقیح سلول‌ها به محیط کشت تازه آغاز شده و وزن سلول‌ها به تدریج افزایش می‌یابد. وزن خشک سلول نشان‌دهنده غلظت سلول‌هاست که نشانگر نسبتاً مناسبی از رشد میکروارگانسیم‌ها در محیط کشت است و می‌توان آنرا با استفاده از مدل غیرساختاری تشریح نمود. در این مدل، نرخ رشد متناسب است با غلظت اولیه سلول در محیط. از آنجاکه سیستم بسته است، عمر میکروارگانسیم محدود به مقدار پیش‌ماده موجود در محیط کشت است. بنابراین، چرخه رشد به تدریج از فازی وارد فاز دیگر می‌شود. معادله لگاریتمی، یک روند رشد کلاسیک را نشان می‌دهد که در آن، پس از یک فاز تاخیر، سلول‌ها وارد فاز نمایی شده و سپس به فاز ثابت می‌رسند که در آن، نرخ تولد و مرگ یکسان است. در نهایت، با تمام شدن منبع کربن و غلبه نرخ مرگ بر تولد، جمعیت سلولی کاهش یافته و فاز مرگ آغاز می‌گردد [۱۹].

معادله لگاریتمی مستقل از میزان پیش‌ماده است و می‌توان آنرا به صورت زیر بیان نمود:

$$dX/dt = \mu_m X (1 - X/X_m) \quad (1)$$

که در آن،  $\mu_m$  ( $\text{h}^{-1}$ ) نرخ ماکزیمم رشد و  $X_m$  ( $\text{g l}^{-1}$ ) غلظت پیشینه زیست توده است. با انتگرال گیری از معادله ۱، مقدار زیست توده بعنوان تابعی از زمان حاصل می‌شود (معادله ۲).

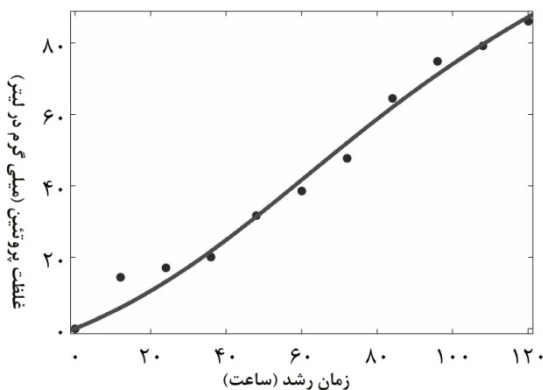
می‌شود و بیان می‌کند که تشکیل محصول توسط قارچ، متناسب است با نرخ رشد. عبارت مستقل از رشد  $(\beta X)$ ، نشان می‌دهد که تمام میکروارگانیسم‌ها محصول را به صورت کسری از غلظت سلول و بدون در نظر گرفتن فاز رشد تولید می‌کنند. معادله ۴ را به صورت زیر نیز می‌توان نوشت:

$$dP = \alpha dX + \beta X dt \quad (5)$$

اگر معادله ۲ را بجای  $X$  در معادله ۵ قرار دهیم و از آن انتگرال بگیریم، نرخ تولید محصول  $(P)$  را می‌توان به شکل زیر بدست آورد:

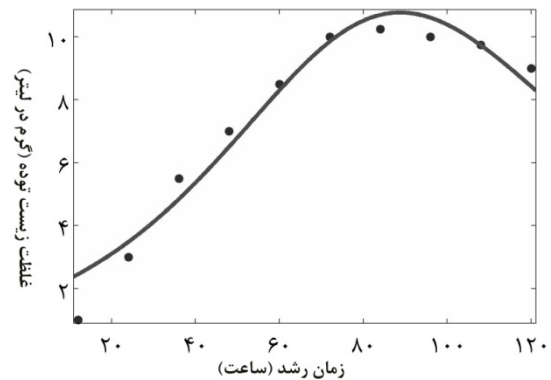
$$P = \alpha X_0 \left( \frac{e^{\mu m t}}{1 - (X_0/X_m)(1 - e^{\mu m t})} - 1 \right) + \beta \frac{X_m}{\mu m} \ln \left( 1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{\mu m t}) \right) \quad (6)$$

در اینجا، محصول همان آنزیم‌هایی است که قارچ به محیط کشت خود ترشح می‌کند. شکل ۳ رابطه بین تولید پروتئین و زمان را که از داده‌های آزمایشگاهی و انطباق معادله ۶ بر آنها بدست آمده، نمایش می‌دهد. مقادیر ضریب مدل برای  $\alpha$  و  $\beta$  به ترتیب عبارتند از  $8/229$  و  $0/039$ . همچنین، R-square و Adjusted R-square هر دو برای این مدل،  $0/98$  محاسبه شدند که بیانگر انطباق عالی مدل ارائه شده بر نتایج آزمایشگاهی است [۲۰]. ناهماهنگی کمی که بین غلظت پروتئین در ساعات اولیه رشد و مدل در شکل ۳ دیده می‌شود، احتمالاً به علت خطا در اندازه‌گیری غلظت‌های بسیار کم پروتئین ایجاد شده است.



شکل (۳) مقایسه داده‌های آزمایشگاهی (●) تولید پروتئین و مدل Luedeking-Piret (—)

در مدل جدید که در شکل ۲ آورده شده است، دیده می‌شود که با رسیدن به انتهای زمان رشد، مقدار زیست توده کاهش می‌یابد. مقادیر پارامترهای غلظت بیومس اولیه و نرخ پیشینه رشد در این مدل، بترتیب  $X_0 = 1/713 \text{ g l}^{-1}$  و  $\mu_m = 0/31 \text{ h}^{-1}$  نشان‌دهنده یک دیاگرام مقایسه‌ای بین مقادیر حاصل از آزمایش و مدل است. مقدار R-square و Adjusted R-square که به ترتیب،  $0/96$  و  $0/95$  بدست آمدند گویای انطباق عالی مدل بر داده‌های آزمایشگاهی حاصل از رشد این قارچ است. اگرچه این مدل، تمامی مراحل رشد را به خوبی نمایش می‌دهد، لیکن مقداری که این مدل برای غلظت زیست توده در زمان صفر پیش‌بینی می‌نماید، از مقدار واقعی که باید کمتر از  $1 \text{ g l}^{-1}$  باشد، انحراف دارد.



شکل (۲) مقایسه داده‌های آزمایشگاهی (●) رشد سلول و مدل لگاریتمی با در نظر گرفتن مرگ سلول‌ها (—)

### ۳-۲- تشکیل پروتئین

همانطور که پیش از این اشاره شد، فرایند زیستی تولید نانوذرات، یک فرایند وابسته به آنزیم‌هاست. بنابراین، اندازه‌گیری مقدار پروتئین‌های ترشح شده به محیط توسط میکروارگانیسم اهمیت می‌یابد. رابطه بین زیست توده و تشکیل محصول را می‌توان با استفاده از معادله تشکیل Luedeking-Piret شبیه‌سازی کرد، که برای اولین بار به منظور تشریح تولید لاکتیک اسید توسط *Lactobacillus* از ایه شده است [۲۱]. طبق این رابطه (معادله ۴)، تولید محصول وابسته به غلظت زیست توده و نرخ رشد است:

$$dP/dt = \alpha dX/dt + \beta X \quad (4)$$

در این معادله،  $\alpha$  و  $\beta$  ثابت‌های تشکیل محصول می‌باشند که با توجه با شرایط فرمنتاسیون تغییر می‌کنند. اولین عبارت در معادله ۴، بعنوان نرخ وابسته به رشد شناخته

### ۳-۳- مصرف گلوکز

گلوکز به عنوان پیش ماده (منبع کربن)، برای تولید محصول متابولیکی و تولید سلول بکار می‌رود. مصرف پیش ماده را می‌توان با معادله ۷ شبیه‌سازی کرد، که یک معادله Luedeking-Piret است و در آن، مقدار پیش ماده مورد استفاده برای تولید محصول، قابل چشم پوشی در نظر گرفته می‌شود.

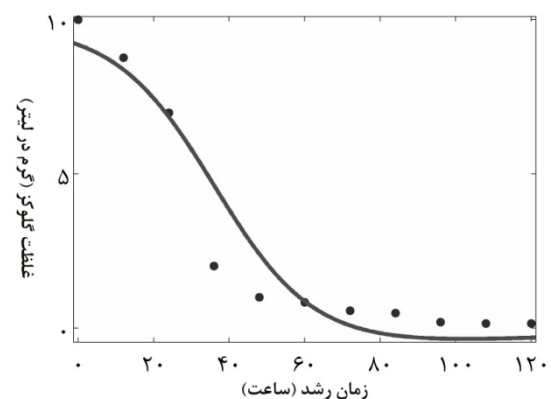
$$-dS/dt = (1/Y_{X/S}) dX/dt + m_s X \quad (7)$$

مقدار زیست توده حاصل بر اساس پیش ماده مصرفی از معادله ۸ محاسبه می‌شود:

$$Y_{X/S} = -\Delta X/\Delta S = -\frac{X-X_0}{S-S_0} \quad (8)$$

که  $X_0$  غلظت تلقیح و  $S_0$  غلظت اولیه گلوکز ( $g\ l^{-1}$ ) می‌باشد. با جایگزینی معادله ۷ با معادله ۲ و انتگرال گیری داریم:

$$S = S_0 - \frac{X_0 e^{\mu m t}}{Y_{X/S} [1 - (X_0/X_m)(1 - e^{\mu m t})]} + \frac{X_0}{Y_{X/S}} - \frac{X_m m_s}{\mu m} \ln \left( 1 - \frac{X_0}{X_m} (1 - e^{\mu m t}) \right) \quad (9)$$



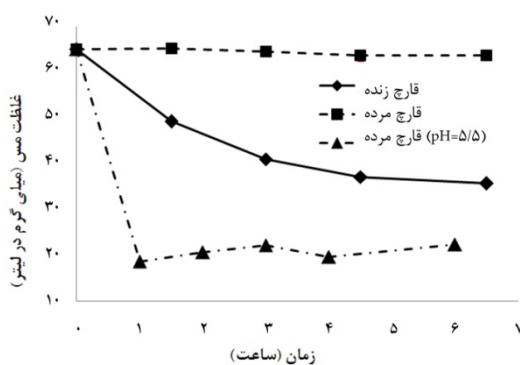
شکل (۴) مقایسه داده‌های آزمایشگاهی (●) مصرف گلوکز و مدل Luedeking-Piret (—)

شکل ۴ نشان دهنده مصرف گلوکز در طول زمان به مدت ۱۲۰ ساعت است. در این مدت، ابتدا با شروع فاز نمایی، مصرف گلوکز به طور ناگهانی افزایش یافته و بعد از ۴۸ ساعت، غلظت آن به  $1\ g\ l^{-1}$  می‌رسد. سپس، با ورود به فاز ثابت رشد، مصرف پیش ماده نیز کاهش یافته و تا پایان آزمایش، با سرعت بسیار کمی کاهش می‌یابد. با تطبیق داده های آزمایش به معادله ۹، مقادیر پارامترهای مدل به صورت:  $Y_{X/S} = 0.197\ g\ g^{-1}$

همچنین، با در نظر گرفتن R-square و adjusted R-square که هر دو ۰/۹۲ هستند، می‌توان گفت که مدل و داده‌های آزمایشگاهی، انطباق مناسبی باهم دارند [۲۰]. با مراجعه به شکل ۴، واضح است که مدل بدست آمده، روند مشاهده شده در داده‌های بدست آمده از آزمایش را به خوبی توصیف می‌نماید.

### ۳-۴- تولید نانوذرات سولفید مس

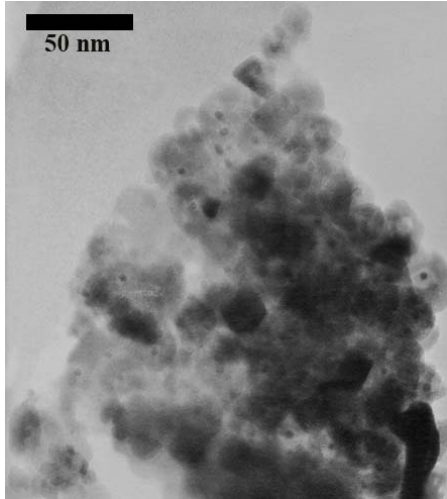
همانطور که پیش از این گفته شد، واکنش تولید ذرات نانو توسط میکروارگانیسم‌ها یک فرایند آنزیمی است. در این واکنش، که در واقع یک سیستم دفاعی در برابر اثرات سمی یون‌های فلزات در محیط می‌باشد، آنزیم‌های احیا کننده (ریداکتاز) با انتقال الکترون به یون فلزی حاضر در محیط، آنرا احیا نموده و به شکل ذرات با اندازه نانو رسوب می‌دهند [۲۲]. بنابراین، برای مدل کردن این فرایند، می‌توان از مدل‌های واکنش‌های آنزیمی استفاده نمود. روشی که معمولاً در بررسی سینتیک واکنش‌های آنزیمی-کاتالیزوری استفاده می‌شود، اندازه‌گیری مقدار واکنش دهنده باقی مانده یا محصول تولید شده در طول زمان است. بنابراین، غلظت مس باقی مانده در محلول اندازه‌گیری شد که در شکل ۵ مشاهده می‌کنید.



شکل (۵) تغییرات غلظت مس در حضور سلول‌های قارچ [۲۳]

تغییرات غلظت مس در حضور سلول‌های مرده و زنده، در شکل ۵ به تصویر کشیده شده است. این نمودار نشان می‌دهد که در کشت زنده قارچ *F. oxysporum*، غلظت مس به تدریج کاهش یافته تا به نصف غلظت اولیه خود رسیده است. در مقابل، هنگامی که سلول‌ها قبل از اضافه شدن به پیش ماده، اتوکلاو شدند، هیچ تغییری در غلظت یونهای مس دیده نشد. اگرچه ممکن است در نگاه اول، از این مشاهده نتیجه گیری شود که فعالیت سلول‌های زنده و احیای یونهای

شکل ۷، تصویر نانوذرات سنتز شده را که دارای اندازه حدود ۲ تا ۵ نانومتر است، در پوششی از پتید نشان می‌دهد. این پوشش بلافاصله پس از ایجاد هسته اولیه ذره، حول آن شکل گرفته و از رشد بیشتر اندازه آنها جلوگیری می‌کند.



شکل (۷) تصویر TEM نانوذرات سولفید مس تولید شده توسط قارچ *F. oxysporum*. ذرات به صورت نقطه‌های تیره به اندازه ۲ تا ۳ نانومتر در پوششی از پروتئین قابل مشاهده هستند.

#### ۴- نتیجه‌گیری

باتوجه به نتایج فرمنتاسیون *F. oxysporum* از مدل‌های غیرساختاری برای تشریح مصرف سوبسترا، تولید زیست توده و تولید پروتئین، طی فرایند بهره برداری شد و معادلات لگاریتمی و Luedeking-Piret توانستند به خوبی سینتیک رشد قارچ، مصرف گلوکز و تولید پروتئین را تشریح کنند. همچنین، نشان داده شد که در بیوسنتز نانوذرات سولفید مس که از سینتیک مرتبه اول پیروی می‌نماید، یونهای مس ابتدا بر روی سطح سلولهای قارچ جذب شده و سپس به صورت ذرات سولفید مس احیا می‌شوند.

#### تشکر و قدردانی

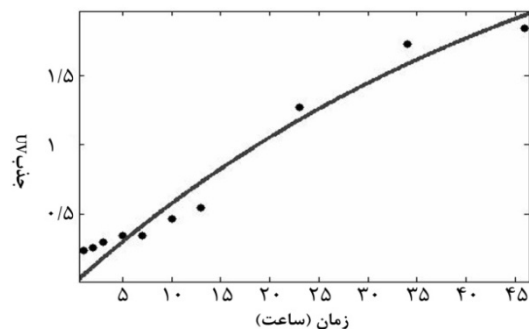
نویسندگان مقاله از رهنمودها و حمایت‌های ارزنده آقای دکتر محمد پازوکی، دانشیار پژوهشگاه مواد و انرژی و آقای دکتر محمد رنجبر همقاوندی استاد دانشگاه شهید باهنر کرمان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

#### علائم اختصاری و نمادها

$m_s$	ثابت ماندگاری ( $g \text{ substrate}/(g \text{ cells } h)$ )
$P$	غلظت محصول ( $mg \text{ l}^{-1}$ )
$S$	غلظت پیش ماده ( $g \text{ l}^{-1}$ )
$S_0$	غلظت اولیه پیش ماده ( $g \text{ l}^{-1}$ )

مس و تولید نانوذرات باعث کاهش غلظت مس شده است، دقت در مقدار pH آزمایش‌ها، دلیل دیگری را برای این پدیده پیشنهاد می‌کند. وقتی که سلول‌های قارچ به محلول حاوی پیش ماده افزوده شدند، pH اولیه برابر با ۴/۳ بود و این مقدار با گذشت زمان، به ۵/۵ رسید. لیکن، در مورد سلول‌های مرده، pH اولیه تا پایان آزمایش بدون تغییر باقی ماند. در آزمایشی دیگر، pH اولیه فلاسک حاوی سلول‌های مرده روی ۵/۵ تنظیم شد و مشاهده شد که غلظت مس در محلول، حدود ۷۰ درصد کاهش یافت، لیکن تغییری در رنگ محلول و جذب UV دیده نشد. همچنین، در مورد سلول‌های زنده، ملاحظه شد که با وجود اینکه، پس از ساعت ششم، غلظت مس باقیمانده در محلول بدون تغییر باقی ماند، افزایش دانسیته جذب UV محلول، حتی با گذشت ۴۸ ساعت، متوقف نشد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که کاهش غلظت مس به دلیل جذب یونها بر روی سطح سلول‌های قارچ می‌باشد. در واقع، می‌توان فرض کرد که در فرایند بیوسنتز، یونهای فلزی ابتدا بر روی سطح سلول‌ها جذب شده و سپس به شکل ذرات نانو احیا می‌گردند. همچنین، سیاه شدن رنگ زیست توده جمع آوری شده در پایان آزمایش، این ادعا را تایید می‌کند.

بنابراین، تصمیم گرفته شد که برای تعیین مقدار نانوذرات تولیدی، از میزان جذب UV محلول حاوی نانوذرات استفاده شود. از آنجاکه، پس از تولید نانوذرات سولفید مس، جذب UV محلول، زیر طول موج ۴۰۰ nm بشدت افزایش پیدا می‌کند، با ثبت دانسیته جذب پیک منحنی که در ۲۹۵ nm قرار دارد، می‌توان به معیاری برای تعیین سینتیک محصول دست یافت. نمودار حاصل، در شکل ۶ نشان داده شده است. ملاحظه می‌شود که تولید نانوذرات، تقریباً از سینتیک مرتبه اول پیروی می‌کند. ضرایب مدل به صورت  $C_0=3/286$  و  $k=0/01927$  همراه R-square و adjusted R-square برابر ۰/۹۵ بدست آمدند.



شکل (۶) مقایسه داده‌های آزمایشگاهی (●) بیوسنتز نانوذرات سولفید مس و مدل سینتیک مرتبه یک (—)

- |   |   |           |
|---|---|-----------|
|   | زمان فرمنتاسیون ( $h$ )                                       | $t$       |
| [10] A. Ahmad, S. Senapati, M. Islam Khan, R. Kumar and M. Sastry (2003) "Extracellular biosynthesis of monodispersed gold nanoparticles by anovel extremophilic Actinomycete", <i>Langmuir</i> , 19, 3550-3553.  | غلظت سلول ( $g\ l^{-1}$ )                                     | $X$       |
|   | غلظت بیشینه سلول ( $g\ l^{-1}$ )                              | $X_m$     |
|   | غلظت اولیه سلول ( $g\ l^{-1}$ )                               | $X_0$     |
| [11] A. Ahmad, P. Mukherjee, S. Senapati, D. Mandal, M. Islam Khan, R. Kumar and M. Sastry (2003) "Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus <i>Fusarium oxysporum</i> ", <i>Colloid Surface B-Biointerfases</i> , 28, 313-318. | سلول بدست آمده به ازای پیش ماده ( $g\ cells/(g\ substrate)$ ) | $Y_{X/S}$ |
|   | ضریب تشکیل محصول وابسته به رشد ( $g\ g^{-1}$ )                | $\alpha$  |
|   | ضریب تشکیل محصول مستقل از رشد ( $g\ g^{-1}\ h^{-1}$ )         | $\beta$   |
|   | نرخ رشد ماکزیمم ( $h^{-1}$ )                                  | $\mu_m$   |
| [12] V. Bansal, D. Rautaray, A. Ahmad and M. Sastry (2004) "Biosynthesis of zirconia nanoparticles using the fungus <i>Fusarium oxysporum</i> ", <i>Journal of Materials Engineering</i> , 14, 3303-3305.   | ثابت سینتیک مرتبه یک  | $k$       |
|   | دانسیتة جذب UV نهایی  | $C_0$     |
- مراجع**
- [1] D. R. Fravel, B. C. Moravec, R. W. Jones and S. Costanzo (2008) "Characterization of two ABC transporters from biocontrol and phytopathogeni *Fusarium oxysporum*", *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 73, 2-8.
- [2] P. Mukherjee, S. Senapati, D. Mandal, A. Ahmad, M. Islam Khan, R. Kumar and M. Sastry (2002) "Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*", *ChemBioChem*, 5.
- [3] A. Ahmad, P. Mukherjee, D. Mandal, S. Senapati, M. Islam Khan, R. Kumar and M. Sastry (2002) "Enzyme mediated extracellular synthesis of CdS nanoparticles by the fungus, *Fusarium oxysporum*", *Journal of the American Chemical Society*, 124, 12108-12109.
- [4] T. L. Riddin, M. Gericke and C. G. Whiteley (2006) "Analysis of the inter- and extracellular formation of platinum nanoparticles by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* Using Response Surface Methodology", *Nanotechnology*, 17, 3482-3489.
- [5] P. Roy and S. K. Srivastava (2007) "Low-temperature synthesis of CuS nanorods by simple wet chemical method", *Materials Letters*, 61, 1693-1697.
- [6] F. Li, J. Wu, Q. Qin, Z. Li and X. Huang (2010) "Controllable synthesis, optical and photocatalytic properties of CuS nanomaterials with hierarchical structures", *Powder Technology*, 198, 267-274.
- [7] K. Iwahori, R. Takagi, N. Kishimoto and I. Yamashita (2011) "A size controlled synthesis of CuS nano-Particles in the protein cage, apoferritin", *Materials Letters*, 65, 3245-3247.
- [8] M. R. Hosseini, M. Schaffie, M. Pazouki, E. Darezereshki and M. Ranjbar (2012) "Biologically synthesized copper sulfide nanoparticles: Production and characterization", *Materials Science in Semiconductor Processing*, 15, 222-225.
- [9] A. R. Shahverdi, S. Minaeian, H. R. Shahverdi, H. Jamalifar and A. Nohi (2007) "Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of *Enterobacteria*: A novel biological approach", *Process Biochemistry*, 42, 919-923.
- [13] K. Kiviharju, K. Salonen, M. Leisola and T. Eerikainen (2007) "Kinetics of *Bifidobacterium longum* ATCC15707 growth", *Process Biochemistry*, 42, 1140-1145.
- [14] H. Ahn, S. Lee and S. Hwang (2005) "Growth kinetic parameter estimation of *Klebsiella sp.* utilizing thiocyanate", *Process Biochemistry*, 40, 1363-1366.
- [15] H. Zand, M. Blažej, V. Bálaš and J. Markoš (2004) "A kinetic model for gluconic acid production by *Aspergillus niger*", *Chemical Papers*, 58, 23-28.
- [16] N. Nelson (1944) "A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose", *Journal of Biological Chemistry*, 153, 375-380.
- [17] Somogyi (1952) "Notes on sugar determination", *Journal of Biological Chemistry*, 195, 19-23.
- [18] M. Bradford (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding", *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- [19] G. D. Najafpour (2007) *Biochemical Engineering and Biotechnology*, Elsevier Science, Amsterdam.
- [20] M. R. Hosseini, M. Schaffie, M. Pazouki, and M. Ranjbar (2013) "Direct electric current stimulation of protein production by *Fusarium oxysporum*", *Chemical Engineering Communications*, accepted.
- [21] R. Luedeking and E. L. Piret (1959) "A kinetic study of the lactic acid fermentation: Batch process at controlled pH", *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 1, 636-644.
- [22] S. He, Z. Guo, Y. Zhang, S. Zhang, J. Wang and N. Gu (2007) "Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria *Rhodospseudomonas capsulate*", *Materials Letters*, 61, 3984-3987.
- [23] M. R. Hosseini, M. Schaffie, M. Pazouki, A. Schippers, and M. Ranjbar (2013) "A novel electrically enhanced biosynthesis of copper sulfide nanoparticles", *Materials Science in Semiconductor Processing*, In press.

## Kinetic Study of the Biological Copper Removal from a Copper Sulfate Solution in the Form of Copper Sulfide Nanoparticles

M. R. Hosseini<sup>1,\*</sup>, M. Schaffie<sup>2</sup>

1. Department of Mining Engineering, Shahid Bahonar University, Kerman.
2. Department of Chemical Engineering, Shahid Bahonar University, Kerman.

---

### ABSTRACT

Recently, it is proved that *Fusarium oxysporum* is capable of synthesizing metallic nano particles by secreting special enzymes and peptides into its environment. Therefore, in order to improve the knowledge of the cell growth, protein production, and nano particle synthesis, batch cultivation of *Fusarium oxysporum* was studied, and the kinetics of the cell growth, substrate utilization, protein generation, and CuS nano particle biosynthesis were modeled using a logistic, Luedeking-Piret, and first order kinetic equations, respectively. Also, the fitness of the models on the experimental data was examined, and their statistical specifications were presented. Finally, it was proved that the presented models were perfectly match the data and could well explain all the culture parameters.

---

### ARTICLE INFO

Article history:

Received: 9 May 2012

Received in revised form: 19 Jan 2013

Accepted: 23 Jan 2013

---

Key words:

*Fusarium oxysporum*

Kinetic

Growth

Protein

Nano particles

Copper

---

All right reserved.

---

\* Corresponding author