

بهینه‌سازی استخراج آنتی‌بیوتیک فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید توسط سودوموناس آئروجینوزا MUT.3

حمید مثمري^۱، علی بهرامی^{۱*}، محمد داود غفاری^۲، خالد جزایری^۳

۱. گروه مهندسی شیمی و بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. گروه مهندسی پلیمر، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

چکیده

امروزه به دلیل سمیت بالای رنگ‌های ضد خزه‌ی مرسوم، توجه بسیاری از دانشمندان به سوی پوشش‌هایی سازگار با محیط زیست است. فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید (PCA) از جمله آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر با قابلیت استفاده در پوشش‌های دریایی بوده که می‌تواند به عنوان عامل ضدخزه از اتصال گونه‌های زنده ناخواسته دریایی به بدنه شناورها جلوگیری کند. در این پژوهش فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید (PCA) تولیدی توسط سویه سودوموناس آئروجینوزا MUT.3 به عنوان ماده ضدباکتریایی مورد بررسی قرار گرفته است. با بهینه‌سازی فرآیند استخراج PCA با استفاده از روش پاسخ سطحی (RSM)، نتایج نشان داد که شرایط بهینه در استخراج PCA عبارتند از: بهره‌گیری از حلال اتیل استات در زمان ۳۰ دقیقه و درصد اختلاط ۱۵۰. در پژوهش حاضر، بهینه‌سازی فرآیند استخراج به عنوان یک روش مؤثر در افزایش تولید محصول در فرآیندهای زیستی پیشنهاد شد که طی آن میزان استخراج ماده ضدباکتریایی یاد شده، به میزان ۳۴٪ نسبت به مطالعات قبلی افزایش یافت.

مشخصات مقاله

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۲۱ دی ۹۳

دریافت پس از اصلاح: ۷ خرداد ۹۴

پذیرش نهایی: ۱۸ شهریور ۹۴

کلمات کلیدی:

فرآیند استخراج

طراحی آزمایش

روش پاسخ سطحی (RSM)

پوشش دریایی

خزه‌بستن

ضدخزه

* عهده‌دار مکاتبات

a_bahrami@mut.ac.ir

حقوق ناشر محفوظ است.

۱- مقدمه

پدیده خزه‌بستن یا رسوب زیستی^۱ به چسبیدن، رشد و تجمع گونه‌های زنده مختلف بر سطوح غوطه‌ور در آب گفته می‌شود. پدیده خزه‌بستن از نگرانی‌های اصلی در صنایع مرتبط با آب به ویژه صنایع دریایی است، زیرا بروز چنین مشکلی بر بدنه شناورها می‌تواند بر سرعت، بازدهی هیدرودینامیکی، مصرف سوخت و وزن تأثیر منفی بگذارد. در اثر خزه‌بستن، بیوفیلم یا لایه زیستی^۲ بر سطح تشکیل می‌شود که می‌تواند موجب افزایش ۱۴ درصدی مصرف سوخت و نیز کاهش ۵۰ درصدی سرعت در کشتی‌ها شود [۱]. روش متداول برای مقابله با این پدیده، استفاده از پوشش‌های حاوی ترکیبات سمی همچون قلع تری‌بوتیل‌قلع^۳ (TBT) بوده است که با از بین بردن موجودات در اطراف پوشش، مانع از چسبیدن آن‌ها به سطح می‌شدند. به دلیل مسائل زیست‌محیطی، کاربرد ترکیبات سمی در پوشش‌های دریایی ممنوع و پژوهش‌ها بر استفاده از ترکیبات زیستی تمرکز یافته است. در روش‌های زیستی، جهت مهار خزه‌بستن می‌توان از مواد ضدباکتریایی استخراج شده از موجودات دریایی همچون اسفنج‌ها [۳، ۴، ۵]، جلبک دریایی [۶، ۷، ۸]، ریزسازواره‌ها [۹، ۱۰، ۱۱] و یا سایر مواد همچون آنزیم‌ها [۱۲، ۱۳] و غیره [۱۴] استفاده کرد.

از جمله راهکارهای مؤثر در رسیدن به جایگزینی مناسب برای پوشش‌های مرسوم، استفاده از ترکیبات تولید شده توسط ریزسازواره‌ها است. بالغ بر ۶۵۰ ترکیب مختلف با خاصیت ضدباکتریایی تا به حال شناسایی شده است [۱۵]. در میان این ترکیبات، فن‌ازین ۱- کربوکسیلیک اسید (PCA) یکی از مؤثرترین ترکیبات ضدباکتریایی بوده که به عنوان ترکیب ضدخزه در پوشش دریایی قابلیت استفاده دارد [۱۶]. جنس سودوموناس یکی از باکتری‌های مولد این ترکیب می‌باشد [۱۷]. در تعدادی از پژوهش‌های موجود به بهینه‌سازی ترکیبات و بررسی اثر عوامل و شرایط مختلف محیط کشت در تولید PCA پرداخته شده است. طی گزارشی که در سال ۲۰۰۸ توسط یوان^۴ و همکاران ارائه شد، میزان تولید PCA از سویه سودوموناس M-18Q از ۰/۷۵ به ۱/۲۴ g/l افزایش یافت [۱۸].

همچنین در سال ۲۰۱۰ سو^۵ و همکاران با انجام دو

موتاسیون بر سویه مذکور قادر به تولید ۴/۰۳ گرم بر لیتر فن‌ازین ۱- کربوکسیلیک اسید شدند [۱۹]. طی پژوهشی که در سال ۱۳۹۰ در دانشگاه صنعتی مالک اشتر صورت گرفت، سویه سودوموناس آئروجینوزا^۶ MUT.3 با هدف تولید PCA جهت کاربرد در پوشش دریایی به عنوان ماده ضدباکتریایی جداسازی شد. در ادامه‌ی این پژوهش، ترکیبات و شرایط محیط کشت سویه مذکور مورد بررسی و بهینه‌سازی قرار گرفت که طی آن میزان تولید PCA از ۰/۶ به ۱g/l افزایش پیدا کرد [۲۰، ۲۱]. هر چند پژوهش‌هایی در زمینه تولید PCA صورت گرفته، ولیکن به شرایط فرآیندی در استخراج و استحصال محصول توجه کمتری شده است. در مطالعه‌ی اخیر فرآیند استخراج حلالی PCA از سویه سودوموناس آئروجینوزا MUT.3 با استفاده از روش پاسخ سطحی بهینه‌سازی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- باکتری، محیط کشت و روش کشت

برای تولید PCA در این پژوهش از باکتری سودوموناس آئروجینوزا MUT.3 استفاده شد. باکتری مذکور از شهر اراک در ایران جدا شده و در کلکسیون دانشگاه صنعتی مالک اشتر نگهداری می‌شود. این سویه در محیط کشت حاوی ۳g عصاره مخمر^۷، ۳g پپتون کارئین^۸، ۵g عصاره گوشت^۹، ۳g گلوکز، ۱/۵g K₂HOP₄، ۱/۵g KH₂PO₄، ۵g NaCl کشت شد. پس از سترون‌سازی محیط کشت به وسیله اتوکلاو^{۱۰}، پیش کشت میکروبی به میزان ۵٪ به محیط تزریق و در دمای ۳۰°C، pH برابر ۷ و دور ۱۴۰rpm به مدت ۴ روز تحت هم‌خوردن قرار گرفت [۲۲].

۲-۲- استخراج آنتی‌بیوتیک

پس از ۹۶ ساعت انکوبه شدن، سلول‌ها از محیط کشت در ۷۵۰۰g توسط دستگاه سانتریفیوژ اپندورف^{۱۱} مدل ۵۸۱۰R جداسازی شدند. سپس سوپرناتانت حاصل، جهت استخراج حلالی به نسبت ۱:۱ به حلال افزوده و در دکانتور مخلوط شد. پس از جدا نمودن فاز آلی حاوی PCA، حلال تقطیر شده و باقیمانده تقطیر توسط دستگاه تغلیظ کننده تغلیظ شد.

⁶ *Pseudomonas Aeruginosa*

⁷ Yeast extract

⁸ Peptone from casein

⁹ Meat extract

¹⁰ Autoclave

¹¹ Eppendorf

¹ Biofouling

² Biofilm

³ Tributyltin

⁴ Yuan

⁵ Su

۲-۳- آزمایش نفوذ دیسکی

آزمون نفوذ دیسکی از جمله روش‌های تعیین میزان قدرت بازدارندگی آنتی بیوتیک به شمار می‌آید. برای انجام این آزمایش از محیط نوترینت آگار^۱ استفاده شد. محلول PBS با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند^۲ از سویه *E. Coli* DH5α رقیق‌سازی شد و سپس به وسیله سوآپ^۳ بر روی پلیت حاوی نوترینت آگار آگار کشت چمنی داده شد [۲۳]. سپس آنتی بیوتیک به دست آمده در متانل حل و به حجم ۱ml رسانده شد و از محلول حاصل ۲۰μl روی دیسک ریخته شد. پس از خشک شدن، دیسک به کمک پنس سترون در مرکز پلیت قرار داده شد. پلیت جهت رشد باکتری‌ها به داخل انکوباتور ۳۰°C منتقل و پس از ۱۲ ساعت انکوبه شدن، قطر هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسک اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که بررسی قطر هاله شفاف هر یک از آزمایش‌های طراحی شده، با سه بار تکرار صورت گرفت.

۲-۴- طراحی آزمایش

استخراج از جمله بخش‌های مؤثر در فرآیندهای زیستی بوده که بر کیفیت و همچنین بر قیمت محصول تأثیرگذار است. با توجه به مقالات ارائه شده در این زمینه، عوامل مؤثر بر فرآیند استخراج حلالی عبارتند از: نوع حلال، درصد حلال مورد استفاده، زمان و دمای اختلاط [۲۴، ۲۵]. در میان عوامل مطرح شده با بررسی‌های صورت گرفته در آزمایشگاه، مشخص شد که دما بر استخراج ماده ضدباکتریایی PCA مؤثر نیست. به همین دلیل سه عامل دیگر به عنوان عوامل مؤثر بر فرآیند انتخاب و مورد بهینه‌سازی قرار گرفتند. جهت بهینه‌سازی و طراحی آزمایش، از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت^۴ ۷ استفاده شد. در مقالات به حلال‌های مختلفی اشاره شده است که قابلیت انحلال PCA را دارند. از جمله این حلال‌ها می‌توان به اتیل استات [۲۶]، نرمال هگزان [۲۷]، کلروفرم [۲۸]، متیلن‌دی‌کلراید [۲۹]، استن [۳۰] و بنزن [۳۱] اشاره نمود. پس از بررسی‌ها، چهار حلال کلروفرم، اتیل استات، متیلن‌دی‌کلراید و n- هگزان، برای انجام مراحل بهینه‌سازی انتخاب شدند که کلروفرم به دلیل میزان بالای ناخالصی محصول از جریان بهینه‌سازی کنار گذاشته شد.

جهت اطمینان از انتخاب حلال‌ها، از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا استفاده شد. برای انجام کروماتوگرافی از

ستون C₁₈ با طول ۱۵۰mm و قطر داخلی ۴/۵mm استفاده شد. این ستون با اکتا دسیل سیلیکا به قطر متوسط ۵μm پر شده بود. آنالیز HPLC در سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه و با شیب خطی به مدت ۳۰ دقیقه از صد درصد آب به صد درصد استونیتریل اعمال شد. طیف خروجی در طول موج ۲۵۰nm ثبت شد.

در فرآیند استخراج، نوع حلال، درصد حلال و مدت زمان اختلاط از عوامل مؤثر بر میزان تولید آنتی بیوتیک انتخاب شدند. سه عامل مذکور در سه سطح مورد بررسی قرار گرفت که این سطوح و عوامل در جدول ۱ ارائه شده است. با معرفی عوامل مؤثر بر تولید PCA به نرم‌افزار، آزمایش‌هایی طراحی شد که با انجام آن، مقادیر بهینه هر عامل و تأثیر متقابل آن‌ها بر تولید به دست آمد. برای انجام هر آزمایش توسط نرم‌افزار، ۵۰ml سوپرناتانت با حجم مشخصی از حلال که توسط نرم‌افزار ارائه شده است، در دکانتور مخلوط شد و تحت استخراج و آزمایش نفوذ دیسکی قرار گرفت. لازم به ذکر است که تمامی آزمایش‌ها در شرایط یکسان انجام شدند.

۲-۵- اندازه‌گیری بازدهی استخراج آنتی بیوتیک

برای اندازه‌گیری میزان بازدهی استخراج آنتی بیوتیک به روش استخراج حلالی، از روش HPLC استفاده شد. به همین جهت، دو نمونه به صورت مجزا تهیه شد: نمونه اول: نمونه آنتی بیوتیک خشک با متانل به حجم ۱ml رسانده شد، سپس از این محلول ۲۰۰μl برداشته و در لوله آزمایش به حجم ۲ml رسانده شد. نمونه دوم: پس از کشت و جداسازی سلول‌ها، سوپرناتانت در ۷۵۰۰g سانتریفیوژ و از فیلتر ۰/۲۲μm عبور داده شد و ۲ml از آن برای انجام آزمایش جدا شد. با مقایسه سطح زیر پیک در هر یک از نمونه‌ها، میزان بازدهی استخراج PCA از محیط کشت سویه سودوموناس آئروجینوزا MUT.3 مشخص شد.

جدول (۱) عوامل و سطوح طراحی شده جهت بهینه‌سازی

استخراج حلالی آنتی بیوتیک

ردیف	عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
۱	نوع حلال	اتیل استات	متیلن‌دی‌کلراید	n- هگزان
۲	درصد حلال	۵۰	۱۰۰	۱۵۰
۳	زمان اختلاط	۳۰	۷۵	۱۲۰

¹ Autoclave

² Mc Farland

³ swap

⁴ design expert

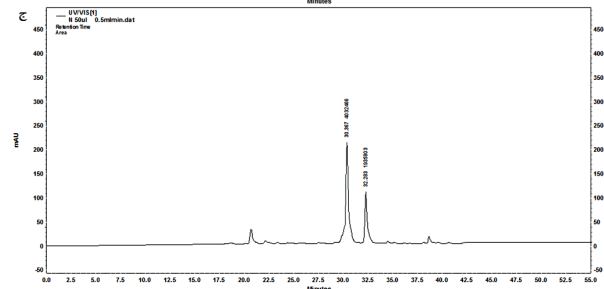
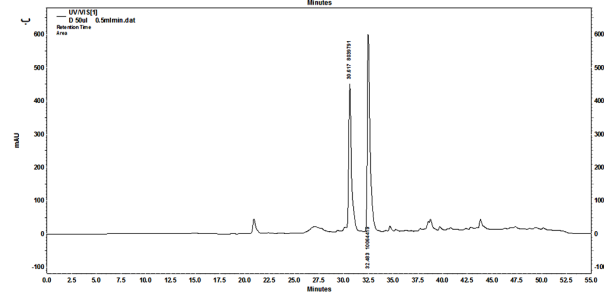
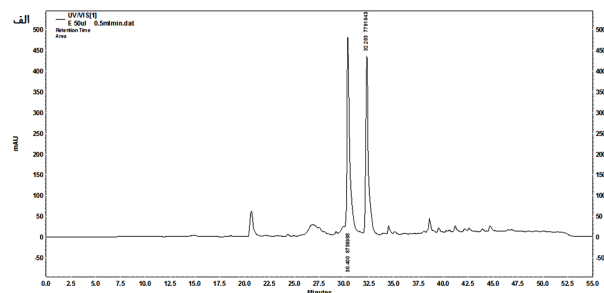
۳- ارائه نتایج و تحلیل یافته‌ها

همان‌طور که پیش‌تر بیان شد، جهت اطمینان از صحت انتخاب سه حلال مورد بررسی، آزمون HPLC برای هر یک از حلال‌ها به منظور مقایسه میزان قابلیت استخراج انجام شد.

نتیجه این بررسی در شکل ۱ نشان داده شده است. مطابق شکل ۱، قله یا پیک‌های^۱ حاصل در نتایج HPLC در زمان ۳۰ و ۳۲ دقیقه نشان‌دهنده محصول موردنظر است. پیک‌های حاصل مربوط به فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید (پیک اول) و هیدروکسی فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید هستند که در پژوهش‌های پیشین شناسایی شده بودند [۲۰].

همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است، اتیل استات و متیلن دی کلراید قابلیت استخراج PCA مناسب داشته و n-هگزان قابلیت استخراج کمتری دارد. لذا قیمت نسبتاً پائین این حلال موجب شد تا در آزمایش بهینه‌سازی توانایی آن را نیز بررسی نماییم. با ارائه عوامل و سطوح به نرم‌افزار، ۳۶ آزمایش طراحی شد که در جدول ۲ ارائه شده است.

ردیف	نوع حلال	درصد حلال (%)	زمان اختلاط (min)
۱	n-هگزان	۱۰۰	۷۵
۲	متیلن دی کلراید	۲۹/۲۹	۷۵
۳	متیلن دی کلراید	۱۰۰	۷۵
۴	اتیل استات	۱۰۰	۷۵
۵	n-هگزان	۱۰۰	۷۵
۶	متیلن دی کلراید	۱۵۰	۳۰
۷	اتیل استات	۲۹/۲۹	۷۵
۸	n-هگزان	۱۰۰	۱۳۸/۶۴
۹	متیلن دی کلراید	۱۰۰	۱۳۸/۶۴
۱۰	اتیل استات	۱۰۰	۱۱/۳۶
۱۱	متیلن دی کلراید	۱۰۰	۱۱/۳۶
۱۲	متیلن دی کلراید	۱۷۰/۷۱	۷۵
۱۳	n-هگزان	۵۰	۱۲۰
۱۴	n-هگزان	۱۰۰	۷۵
۱۵	n-هگزان	۱۷۰/۷۱	۷۵
۱۶	n-هگزان	۲۹/۲۹	۷۵
۱۷	متیلن دی کلراید	۵۰	۱۲۰
۱۸	اتیل استات	۱۰۰	۷۵
۱۹	اتیل استات	۱۰۰	۱۳۸/۶۴
۲۰	متیلن دی کلراید	۱۰۰	۷۵
۲۱	n-هگزان	۱۵۰	۱۲۰
۲۲	اتیل استات	۱۰۰	۷۵
۲۳	n-هگزان	۵۰	۳۰
۲۴	متیلن دی کلراید	۱۵۰	۱۲۰
۲۵	اتیل استات	۵۰	۱۱/۳۶
۲۶	اتیل استات	۱۰۰	۷۵
۲۷	n-هگزان	۱۰۰	۷۵
۲۸	اتیل استات	۱۲۰	۱۵۰
۲۹	اتیل استات	۵۰	۱۲۰
۳۰	متیلن دی کلراید	۵۰	۳۰
۳۱	اتیل استات	۱۷۰/۷۱	۷۵
۳۲	اتیل استات	۱۵۰	۳۰
۳۳	متیلن دی کلراید	۱۰۰	۷۵
۳۴	n-هگزان	۱۵۰	۳۰
۳۵	اتیل استات	۵۰	۳۰
۳۶	متیلن دی کلراید	۱۰۰	۷۵



شکل (۱) نتایج کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)

حاصل از نمونه‌های اولیه در غربالگری حلال‌ها.

الف) اتیل استات، ب) متیلن دی کلراید و ج) n-هگزان

اثر درصد حلال

درصد حلال نشان داد که در اتیل استات با افزایش نسبت حلال به سوپرناتانت، میزان قطر هاله شفاف افزایش یافت. این در حالی است که در n- هگزان نتیجه کاملاً متفاوت بود و با افزایش درصد حلال به بیشتر از ۱۰٪، میزان قطر هاله کاهش یافت. برای حلال متیلن دی کلراید این امر مشابه اتیل استات بود، یعنی با افزایش نسبت حلال، قطر هاله

با انجام آزمایش‌های طراحی شده، میانگین قطر هاله شفاف حاصل از هر یک از نمونه‌ها در آزمایش نفوذ دیسکی اندازه‌گیری شد که در جدول ۳ ارائه شده است.

۳-۱- تحلیل آماری نتایج

تحلیل داده‌های حاصل شده به روش واریانس صورت گرفت. در این روش، عامل P-value نمادی جهت میزان اطمینان به تأثیرگذاری یک عامل در نظر گرفته می‌شود. در آنالیز نهایی واریانس عواملی که دارای P-value کمتر از ۰/۰۵ باشند به عنوان عوامل مشخص در مدل نهایی گزینش می‌شوند. در ادامه عواملی که P-value بیشتر از ۰/۰۵ داشتند حذف شده و در نهایت عوامل ارائه شده در جدول ۴ به دست آمد.

ضرایب رگرسیون چندگانه از طریق روش حداقل مربعات جهت پیش‌بینی مدل چندجمله‌ای درجه دوم برای متغیر پاسخ ایجاد شد و با توجه به معنی‌داری ضرایب جدول ۴ مدل پیشنهادی جدول ۵ ارائه شد.

۳-۱-۱- بررسی اثر عوامل

برای تعیین چگونگی اثر هر متغیر بر متغیر پاسخ، از روش تحلیل نموداری استفاده شد. با توجه به جدول ۵ اثر عوامل مؤثر بر فرآیند استخراج کاملاً مشخص شد که در ادامه به بررسی آن‌ها پرداخته شده است.

جدول (۳) نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر هاله شفاف

شماره آزمایش	قطر هاله شفاف (cm)	شماره آزمایش	قطر هاله شفاف (cm)	شماره آزمایش	قطر هاله شفاف (cm)
۱	۰/۷	۱۳	۰/۶	۲۵	۰/۷
۲	۰/۶	۱۴	۰/۷	۲۶	۰/۹
۳	۰/۸	۱۵	۰/۶	۲۷	۰/۷
۴	۰/۹	۱۶	۰/۷۵	۲۸	۰/۹۵
۵	۰/۷	۱۷	۰/۶	۲۹	۰/۷
۶	۰/۹	۱۸	۰/۹	۳۰	۰/۷۵
۷	۰/۶	۱۹	۰/۹	۳۱	۰/۹۵
۸	۰/۷	۲۰	۰/۸	۳۲	۰/۹۵
۹	۰/۶	۲۱	۰/۶	۳۳	۰/۸
۱۰	۰/۹۵	۲۲	۰/۹	۳۴	۰/۶
۱۱	۰/۹	۲۳	۰/۶	۳۵	۰/۷۵
۱۲	۰/۸	۲۴	۰/۷۵	۳۶	۰/۸

جدول (۴) عوامل تحلیلی آنالیز واریانس اصلاح شده

عوامل	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F-value	P-value	توضیحات
مدل	۰/۵۱	۱۹	۰/۰۵۷	۴۰/۵۳	<۰/۰۰۰۱	Significant
% حلال (A)	۰/۰۷۲	۱	۰/۰۷۲	۵۱/۶۶	۰/۰۰۰۱	
زمان (B)	۰/۰۳۰	۱	۰/۰۳۰	۲۱/۳۱	۰/۰۰۰۳	
نوع حلال (C)	۰/۲۴	۲	۰/۱۲	۸۶/۰۰	<۰/۰۰۰۱	
AC	۰/۰۸۸	۲	۰/۰۴۴	۳۱/۳۷	۰/۰۰۰۱	
BC	۰/۰۳۸	۲	۰/۰۱۹	۱۳/۴۸	۰/۰۰۰۴	
A ²	۰/۰۴۲	۱	۰/۰۴۲	۳۰/۰۹	۰/۰۰۰۱	

جدول (۵) مدل پیشنهادی طرح برای حلال‌های مختلف

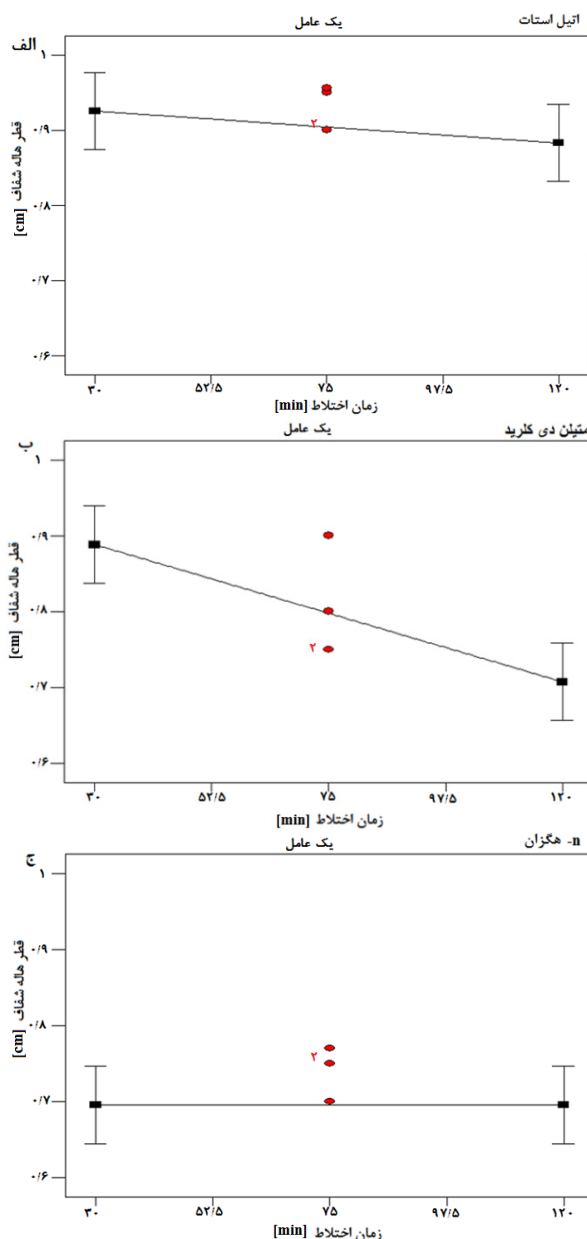
نوع حلال	فرمول محاسبه قطر هاله شفاف
اتیل استات	$0/49863 + \% \text{ حلال} \times 10^{-3} \times 6/02910 + \text{زمان} \times 10^{-4} \times 3/35307 - (\% \text{ حلال})^2 \times 10^{-5} \times 1/83333 -$
n- هگزان	$(\% \text{ حلال})^2 \times 10^{-5} \times 1/83333 - \text{زمان} \times 10^{-18} \times 1/19262 - \% \text{ حلال} \times 10^{-3} \times 3/13634 + 0/56276 +$
متیلن دی کلراید	$(\% \text{ حلال})^2 \times 10^{-5} \times 1/83333 - \text{زمان} \times 10^{-3} \times 2/01184 - \% \text{ حلال} \times 10^{-3} \times 5/12377 + 0/61073 +$

حلال‌ها در فرآیند نشان نداد. در اتیل استات، با افزایش زمان اختلاط، میزان عملکرد آنتی‌بیوتیک به مقدار جزئی کاهش داشت، این در حالی است که در n -هگزان با مقدار بسیار جزئی افزایش و در متیلن‌دی‌کلراید، میزان قطر هاله شفاف به شدت با گذر زمان کاهش یافت. این امر می‌تواند به جهت ماهیت متیلن‌دی‌کلراید باشد که با افزایش زمان اختلاط، جداسازی دو فاز مشکل‌تر می‌شود؛ بنابراین حداقل زمان، یعنی ۳۰ دقیقه بهترین زمان اختلاط انتخاب شد. تأثیر زمان در تولید آنتی‌بیوتیک در شکل ۳ نشان داده شده است.

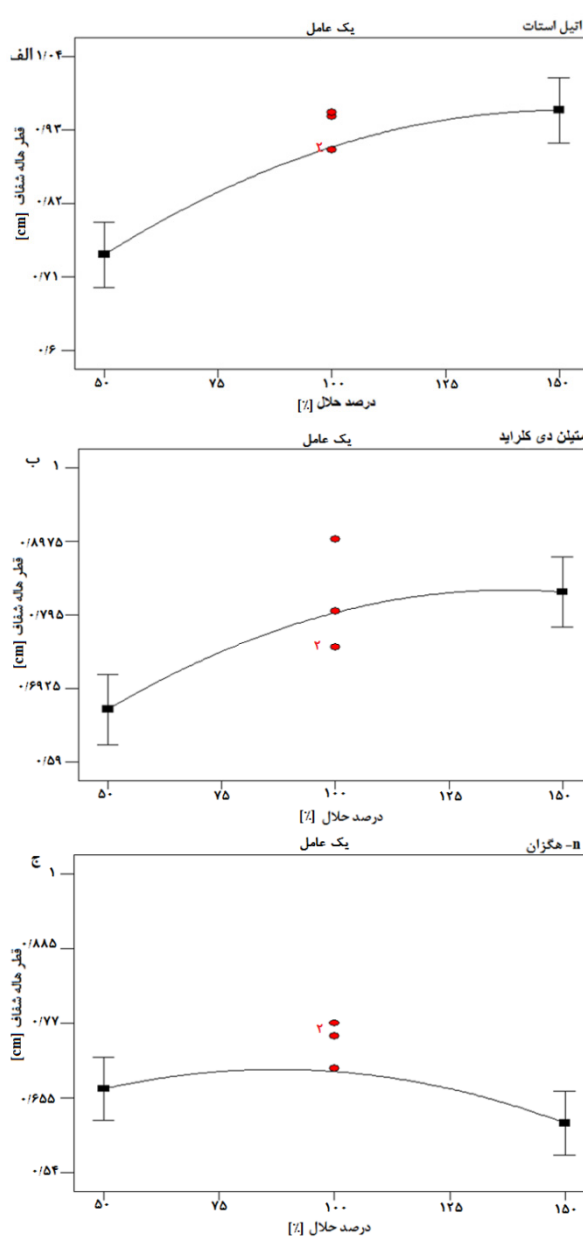
افزایش یافت. در هر دو حلال اتیل استات و متیلن‌دی‌کلراید، شیب افزایش میزان قطر هاله از ۱۰۰٪ به بعد کاهش یافت. بنابراین همان‌طور که از شکل ۲ مشخص است، ۱۵۰٪ حلال برای متیلن‌دی‌کلراید و اتیل استات و ۱۰۰٪ برای n -هگزان به عنوان درصد اختلاط بهینه انتخاب شدند.

اثر زمان اختلاط

زمان اختلاط یکی از سه عاملی بود که مورد بررسی قرار گرفت، ولیکن تأثیر چندانی بر قابلیت استخراج هر یک از



شکل (۳) اثر زمان اختلاط بر میزان قطر هاله شفاف. الف) اتیل استات، ب) متیلن‌دی‌کلراید و ج) n -هگزان



شکل (۴) اثر درصد حلال بر میزان قطر هاله شفاف. الف) اتیل استات، ب) متیلن‌دی‌کلراید و ج) n -هگزان

جدول (۶) مقایسه نتایج حاصل از قطر هاله شفاف

تئوری و اندازه گیری شده

نوع حلال	درصد حلال (%)	زمان اختلاط (min)	قطر هاله شفاف تئوری (cm)	قطر هاله شفاف (cm)
اتیل استات	۱۳۷/۵	۴۸	۰/۹۶۹۷۸	۰/۹۶
متیلن دی کلراید	۱۳۸/۷	۳۰	۰/۹۰۸۴۸۵	۰/۹
n- هگزان	۸۶/۰۹	۱۰۳/۲۰	۰/۶۹۷۹۸۵	۰/۷

اثر نوع حلال

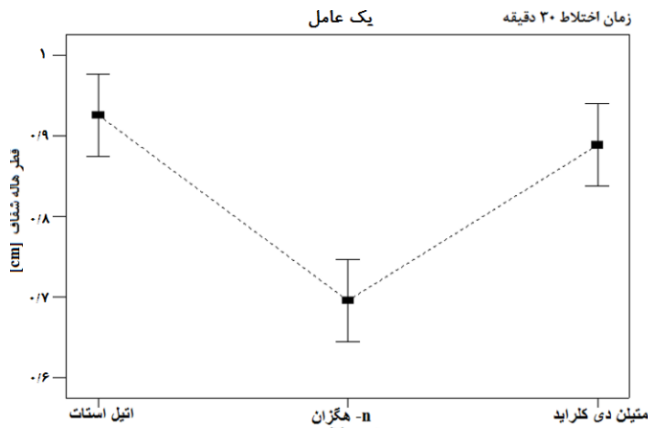
نوع حلال مهم ترین و تأثیر گذارترین عامل در بهینه سازی است. با توجه به انتخاب ۳۰ دقیقه به عنوان زمان اختلاط مناسب فرآیند استخراج، تأثیر نوع حلال در زمان ۳۰ دقیقه و درصد اختلاط ۱۵۰ در شکل ۴ به خوبی مشخص است. مطابق نتایج، اتیل استات حلال مناسبی برای استخراج آنتی بیوتیک است، متیلن دی کلراید نیز بازده نسبتاً خوبی در بررسی قطر هاله شفاف نشان داد. با توجه به شکل ۴، حلال اتیل استات در مقایسه با دو حلال دیگر می تواند به عنوان حلال بهینه در فرآیند استخراج فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید از سویه سودوموناس آئروجینوزا MTU.3 انتخاب شود.

در شکل ۵ برهمکنش هر دو عامل زمان و نسبت اختلاط بر هر یک از سه حلال انتخاب شده نشان داده شده است. در تصویر نیز مشخص است، برتری اتیل استات و تفاوت اندک آن با متیلن دی کلراید و در زمان کمتر و نسبت بیشتر اختلاط است.

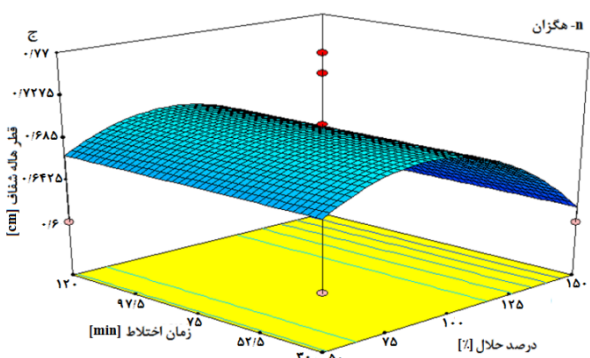
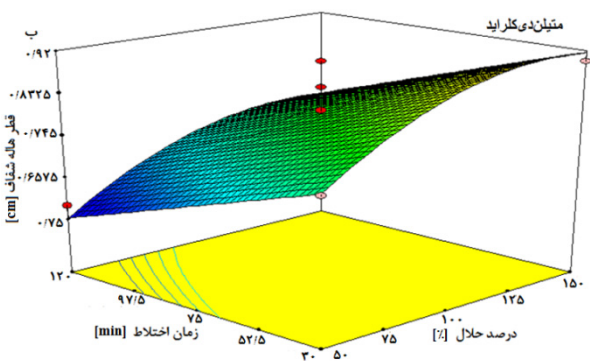
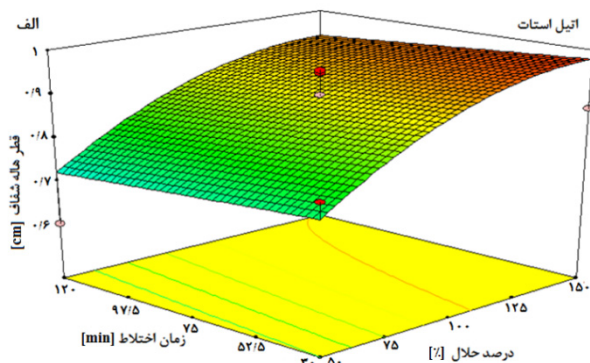
جهت اطمینان از صحت و دقت مدل طراحی شده، با توجه به نتایج به دست آمده، میزان قطر هاله شفاف تئوری و حاصل شده از آزمایش برای هر یک از سه حلال، بررسی شد که نتایج آن در جدول ۶ نشان داده شده است. با توجه به مقایسه صورت گرفته در جدول ۶، تفاوت حداقلی موجود نشان دهنده دقت قطر هاله شفاف اندازه گیری شده در آزمایش و با قطر پیش بینی شده، نشان دهنده دقت بالای مدل است. همچنین با وجود R^2 برابر با ۹۳/۳۵٪ و Adj R-squared برابر با ۹۱/۰۴٪ می توان بر اطلاعات مدل اطمینان کرد.

۲-۳ اندازه گیری بازدهی استخراج آنتی بیوتیک

برای تعیین میزان بازدهی از مقایسه سطح زیر پیکر حجم تزریق شده در دو نمونه استفاده شد. با توجه به یکسان بودن حجم تزریق هر دو نمونه، مقایسه سطح زیر قله ها، پاسخ را مشخص نمود. نتایج این آزمایش در شکل ۶ ارائه شده است.



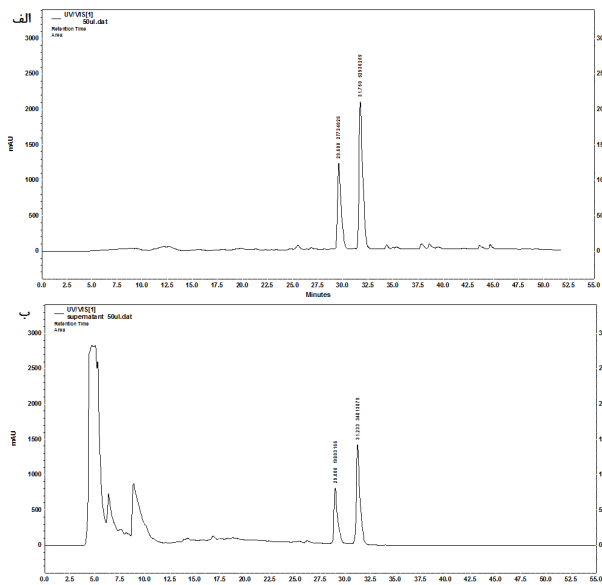
شکل (۴) تأثیر نوع حلال بر قطر هاله شفاف در زمان های مختلف



شکل (۵) نمودارهای سه بعدی مربوط به تأثیر درصد حلال و زمان اختلاط بر قطر هاله شفاف حاصل از آنتی بیوتیک استخراج شده از کشت سویه سودوموناس آئروجینوزا MUT.3. الف) اتیل استات، ب) متیلن دی کلراید و ج) n- هگزان

جدول (۷) سطح زیر پیک و بازدهی فرآیند استخراج آنتی بیوتیک

بازدهی استخراج آنتی بیوتیک		سطوح هم‌ارز شده		سطح زیر پیک دوم (area/50 μ l)	سطح زیر پیک اول (area/50 μ l)	نمونه استخراجی
		سطح زیر پیک دوم (area/50 μ l)	سطح زیر پیک اول (area/50 μ l)			
پیک اول	پیک دوم	۵۲۹۳۰۲۵۹/۹	۲۷۷۲۴۰۲/۶	۵۲۹۳۰۲۵۹	۲۷۷۲۴۰۲۶	
%۱۵/۲	%۱۴	۳۴۸۱۳۸۷۹	۱۹۸۰۳۱۶۶	۳۴۸۱۳۸۷۹	۱۹۸۰۳۱۶۶	سوپرناتانت



شکل (۶) آزمایش HPLC برای بررسی بازدهی استخراج آنتی بیوتیک از سوپرناتانت به روش استخراج حلالی. (الف) نمونه استخراج حلالی شده و (ب) سوپرناتانت

تشکر و قدردانی

بر خود لازم می‌دانیم تا تشکر خود را از دانشگاه صنعتی مالک اشتر که در تمام مراحل تحقیق حامی ما بوده و کمال همکاری را داشتند، ابراز نماییم.

مراجع

- [1] M. P. Schultz (2004) "Frictional resistance of antifouling coating systems", *Journal of Fluids Engineering*, 126, 1039–1047.
- [2] A. S. Clare (1996) "Marine natural product antifoulants: status and potential", *Biofouling*, 9, 211–229.
- [3] V.P. Limna Mol, T.V. Raveendran, K.R. Abhilash, et al. (2010) "Inhibitory effect of Indian sponge extracts on bacterial strains and larval settlement of the barnacle, *Balanus Amphitrite*", *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64, 506–510.
- [4] Y. Xu, N. Li, W. Jiao, et al. (2012) "Antifouling and cytotoxic constituents from the South China Sea sponge *Acanthella cavernosa*", *Tetrahedron*, 68, 2876–2883.
- [5] D. Feng, Y. Qiu, W. Wang, et al. (2013) "Antifouling activities of *hymenialdisine* and *debromohymenialdisine*

با توجه به وجود دو قله در آزمایش HPLC، هر پیک به صورت جداگانه بررسی شد. تنها نکته‌ای که باید بر آن دقت شود، این است که نمونه حاصل از استخراج به نسبت ۱۰ برابر تغلیظ شده بود و باید در محاسبات لحاظ شود. با توجه به جدول ۷ مشخص است که بازدهی این فرآیند در حدود ۱۵٪ اول است. این بازدهی برای حالت بدون بهینه‌سازی فرآیند استخراج است. پس از بهینه‌سازی، میزان استخراج آنتی بیوتیک از ۱ گرم بر لیتر به ۱/۳۴ گرم بر لیتر افزایش یافت که افزایش بازدهی ۳۴ درصدی نسبت به حالت اولیه را نشان می‌دهد. به همین ترتیب میزان بازدهی کلی استخراج از ۱۵٪ به ۲۰٪ افزایش یافت.

۴- جمع بندی

در این پژوهش، عوامل مؤثر بر فرآیند استخراج PCA بررسی و بهینه‌سازی شد. آنالیز استاندارد واریانس بر روی قطره‌های هاله شفاف حاصل شده، مشخص نمود که جهت دستیابی به حالت بهینه‌ی استخراج فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید از سویه *سودوموناس آئروجینوزا* MUT.3، استفاده از اتیل استات، به نسبت اختلاط ۱۵۰٪ حلال به سوپرناتانت و اختلاط به مدت ۳۰ دقیقه شرایط بهینه است. پس از بهینه‌سازی، ۳۴٪ میزان استخراج آنتی بیوتیک نسبت به حالت اولیه افزایش نشان داد. بازدهی کلی فرآیند استخراج پس از بهینه‌سازی به ۲۰٪ رسید. اگرچه اتیل استات بهترین حلال انتخاب شد، اما با توجه به شکل ۴، استفاده از متیلن‌دی‌کلراید نیز به قطر هاله شفاف مناسبی منجر می‌شود که با توجه به قیمت پائین‌تر متیلن‌دی‌کلراید، این حلال در افزایش مقیاس و برآوردهای اقتصادی بیشتر مورد توجه خواهد بود. با توجه به بررسی‌هایی که در این تحقیق صورت گرفت، نشان داده شد که فرآیند استخراج از مراحل بسیار مهم و تأثیرگذار در فرآیند تولید محصولات زیستی است که می‌توان با انجام بهینه‌سازی، فرآیند را به سوی اقتصادی شدن هرچه بیشتر پیش برد.

- Production by *Pseudomonas* sp. M-18Q”, *Bioscience and Bioengineering*, 105, 232– 237.
- [19] J. Su, Q. Zhou, H. Zhang, et al. (2010) “Medium optimization for phenazine-1-carboxylic acid production by a *gacA qscR* double mutant of *Pseudomonas* sp. M18 using response surface methodology”, *Bioresource Technology*, 101, 4089– 4095.
- [20], S.Y. Salehi (2013) “Investigation effect of medium composition on antibacterial production from *Pseudomonas* sp”, *M.Sc. thesis*, Institute of Biotechnology, Malek Ashtar University.
- [21], A. Nikzad (2013) “Investigation effect of culture condition on antibacterial production from *Pseudomonas* sp.”, *M.Sc. thesis*, Institute of Biotechnology, Malek Ashtar University.
- [22], M.D. Ghafari (2011) “Isolation of biofilm producer bacteria to reduction of metal corrosion”, *M.Sc. thesis*, Department of Microbiology, Shahed University.
- [23] M. Mirghani, N. A. Kabbashi, F. A. Elfaki, et al. (2012) “Investigation of the spider web for antibacterial activity”, *Malaysian International Conference on Trends in Bioprocess Engineering (MICOTriBE 2012)*, Langkawi, Kedah, Malaysia, BT- 201– 1.
- [24] V.K Chandaliya, P. K. Banerjee, and P. Biswas (2012) “Optimization of solvent extraction process parameters of Indian coal”, *Mineral Processing & Extractive Metall. Rev.*, 33, 246– 259.
- [25] P. M Jeganathan, S. Venkatachalam, T. Karichappan, et al. (2014) “Model development and process optimization for solvent extraction of polyphenols from red grapes using box– Behenken design”, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 44, 56– 67.
- [26] A. Nansathit, S. Apipattarakul, Ch. Phaosiri, P. Pongdontri, et al. (2009) “Synthesis, isolation of phenazine derivatives and their antimicrobial activities”, *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 6(1), 79– 91.
- [27] M. A. M. Wael, F. M. Bruce, W. Marcell, et al. (2010) “Dermacozines, a new phenazine family from deep-sea dermacocci isolated from a Mariana Trench sediment”, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 8, 2352– 2362.
- [28] H. M. Liu, X. H. Zhang, X. Q. Huang, et al. (2008) “Rapid quantitative analysis of phenazine-1-carboxylic acid and 2-hydroxyphenazine from fermentation culture of *Pseudomonas chlororaphis* GP72 by capillary zone electrophoresis”, *Talanta*, 76, 276– 281.
- [29] P. J. Slininger, M. A. Shea-Wilbur (1995) “Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 794– 800.
- [30] M. E. Levitchb, E. R. Stadtman (1964) “A study of the biosynthesis of phenazine-1-carboxylic acid”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 106, 194–199.
- [31] A. M. Rosales, L. Thomashow, R. J. Cook, T. W. Mew (1995) “Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice associated antagonistic *Pseudomonas* spp.” *The American Psychopathological Society*, 85, 1028–1032.
- from the sponge *Axinella* sp.”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 359– 364.
- [6] A. Silkina, A. Bazes, J. Mouget, et al. (2012) “Comparative efficiency of acroalgal extracts and booster biocides as antifouling agents to control growth of three diatom species”, *Marine Pollution Bulletin*, 64, 2039– 2046 .
- [7] L.D. Chambers, C. Hedio, K.R. Stokes, et al. (2011) “Investigation of *Chondrus crispus* as a potential source of new antifouling agents”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, 939– 946.
- [8] S. Prabhakaran, R. Rajaram, V. Balasubramanian, et al. (2012) “Antifouling potentials of extracts from seaweeds, seagrasses and mangroves against primary biofilm forming bacteria”, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2, 316– 322.
- [9] U. Kharchenko, I. Beleneva (2013) “Evaluation of coatings corrosion resistance with biocomponents as antifouling additives”, *Corrosion Science*, 72, 47– 53.
- [10] U. Kharchenko, I. Beleneva, E. Dmitrieva (2012) “Antifouling potential of a marine strain, *Pseudomonas aeruginosa* 1242, isolated from brass microfouling in Vietnam”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 75, 68– 74.
- [11] K. Saosoong, W. Wongphananukul, Ch. Poasiri (2009) “Isolation and Analysis of Antibacterial Substance Produced from *P. aeruginosa* TISTR 781”, *KKU Science*, 37, 163– 172.
- [12] S. M. Olsen, L. T. Pedersen, K. Dam-Johansen, et al. (2010) “Replacement of traditional seawater-soluble pigments by starch and hydrolytic enzymes in polishing antifouling coatings”, *Coatings Technology and Research*, 7, 355– 363.
- [13] S.M. Olsen, J.B. Kristensen, B.S. Laursen, et al. (2010) “Antifouling effect of hydrogen peroxide release from enzymatic marine coatings: Exposure testing under equatorial and Mediterranean conditions”, *Progress in Organic Coatings*, 68, 248– 257.
- [14] J. Guezennec, J. Marie Herry, A. Kouzayha, et al. (2012) “Exopolysaccharides from unusual marine environments inhibit early stages of biofouling”, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 66, 1– 7.
- [15] J. Burgess, K. Boyd, et al. (2003) “The Development of a Marine Natural Product-based Antifouling Paint”, *Biofouling*, 19, 197– 205.
- [16] P. Stead, B. A. M. Rudd, H. Bradshaw, et al. (1996) “Induction of phenazine biosynthesis in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* by L-N-(3-oxohexanoyl) homoserine lactone”, *FEMS Microbiology Letters*, 140, 15– 22.
- [17] L. Pierson, E. A. Pierson (2010) “Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1659– 1670.
- [18] L. Yuan, Y. Li, Y. Wang, et al. (2008) “Optimization of Critical Medium Components Using Response Surface Methodology for Phenazine-1-Carboxylic Acid

Optimization of phenazine 1- carboxylic acid extraction by *Pseudomonas Aeruginosa* MUT.3

Mosmeri Hamid ¹, Bahrami. Ali ^{1,*}, Ghafari. Mohammad Davoud ², Khaled Jazayeri ³

1. Chemical Engineering-Biotechnology Group, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

2. Microbiology Group, Shahed University, Tehran, Iran

3. Polymer Engineering Group, Amir Kabir University of Technology

ABSTRACT

Replacing toxic antifouling paints with coatings that have no effect on the marine environment is an important issue. Phenazine 1-carboxylic acid (PCA) is one of the effective antibiotics, which can be used as antifouling agent in marine coatings to prevent attachment of marine species on ship hulls. In this study, Phenazine 1-carboxylic acid (PCA) as an antibacterial agent which produced by *Pseudomonas Aeruginosa* MUT.3 was investigated. PCA extraction process was optimized using Response Surface Methodology (RSM). Results showed that at 30 min mixing time, 150% of solvent and using ethyl acetate as solvent are considered the optimum levels and factors in phenazine 1-carboxylic acid production which produced by *P. aeruginosa* MUT.3. In the present paper, the optimization of extraction process suggested as an effective way to increase the production in biological processes in which the extraction of PCA increased by 34% compared to previous reports.

ARTICLE INFO

Article history:

Received in: Jan. 11, 2015

Revised from: May 25, 2015

Accepted: Sep. 9, 2015

Key words:

Extraction process

Experiment design

Response surface methodology (RSM)

Marine coating

Biofouling

Antifouling

All right reserved.

* Corresponding author

a_bahrami@mut.ac.ir