فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۸، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۱۴۰- ۱۲۹
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۱۴ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۱۰

انتخاب شرایط بهینه تولید بیوپلیمر میکروبی ضدخوردگی از گونه *فلاووباکتریوم* به‌روش سطح پاسخ (RSM)

مجتبی خانی: دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران، mj_khani67@yahoo.com
علی بهرامی *: استادیار مهندسی شیمی- بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران، a_bahrami@mut.ac.ir
محمد داود غفاری: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران، m.davoudghafari@gmail.com

چکیده

مقدمه: روش‌های گوناگونی برای مقابله با پدیده خوردگی پیشنهاد شده است. یکی از این روش‌ها استفاده از رنگ‌ها و پوشش‌ها است. در فرمول‌بندی رنگ‌ها و پوشش‌ها ترکیبات ضدخوردگی مختلفی به کار برده می‌شود که روند خوردگی را کند می‌کنند. در یک روش جدید استفاده از بیوپلیمر میکروبی می‌تواند با هزینه کمتر، به‌علت اینکه تولید بیوپلیمر نیاز زیادی به کارخانه و صنعت پیشرفته ندارد، مشکل خوردگی را به‌خصوص در صنایع تا حدود زیادی رفع کند. با توجه به گزارش‌های مربوط به تأثیرات ضدخوردگی بیوپلیمر تولیدی از گونه *فلاووباکتریوم*، در این مطالعه برای بهینه سازی تولید این بیوپلیمر اثر پارامترهای دما، pH و دور شیکر بر مقدار تولید بیوپلیمر با استفاده از نرم‌افزار طراحی آزمایش به‌روش RSM ، بررسی شد.

مواد و روش‌ها: برای تولید بیوپلیمر از محیط کاری ارلن به‌حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر استفاده شد. پس از تهیه محیط کشت تولید بیوپلیمر، محیط پیش کشت (۶درصد حجمی) به ارلن‌ها تلقیح شد. بعد از تلقیح، ارلن‌ها در دماها،pH و دورهای مختلف که با نرم‌افزار طراحی آزمایش به‌روش RSM طراحی شد، به‌مدت ۹۶ ساعت در شیکر انکوباتور قرار داده شد. بعد از این زمان برای جداسازی سلول‌ها، محیط‌ها در دور ۹۰۰۰rpm و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس مایع رویی با سه برابر حجمش الکل سرد برای رسوب بیوپلیمر تولیدی مخلوط شد. درنهایت، محلول‌های نمونه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت به‌منظور افزایش رسوب بیوپلیمر نگهداری شد.

نتایج: تحلیل نتایج حاصل از طراحی آزمایش‌ها به‌روش RSM نشان می‌دهد که دما، pH و دور شیکر به‌ترتیب اثر درخورتوجهی بر تولید بیوپلیمر ضدخوردگی داشته‌اند. تولید بیوپلیمر ابتدا تا رسیدن به pH=۸ افزایش می‌یابد و سپس کاهش می‌یابد. همچنین دمای مناسب رشد باکتری ۳۳ درجه سانتی‌گراد بوده و بیشترین میزان بیوپلیمر تولیدشده در دور شیکر در ۲۱۰ rpm بوده است. درنهایت بیشترین مقدار بیوپلیمر تولیدی(۱۴/۳ گرم بر لیتر) در دمای۳۳ درجه سانتی‌گراد و pH=۸ و دور شیکر ۲۱۰ rpm به دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری: تولید بیوپلیمر ضدخوردگی از گونه *فلاووباکتریوم* به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر پارامترهای فیزیکی است. نتایج حاصل از تولید بیوپلیمر با بررسی شرایط دما، pH و دور شیکر، پس از بهینه سازی، نشان از اهمیت این پارامترها برای تولید اقتصادی بیوپلیمر است.

واژه‌های کلیدی: بیوپلیمر ضدخوردگی، دما ،pH و دور شیکر

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

خوردگی درواقع انهدام و فساد یا تغییر و دگرگونی در خواص و مشخصات مواد به‌علت واکنش آن‌ها با محیط اطراف است. خوردگی یک فرآیند خودبه خودی است و به زبان ترمودینامیکی در جهتی پیش می رود که واکنش به حالت پایدار نزدیک شود (انرژی گیبس منفی شود). خوردگی می‌تواند به حالت‌های مختلف ظاهر شود (۱). لوله‌ها و تجهیزات استفاده‌شده در آب دریا اغلب از آلیاژهای گران‌قیمت کروم‌دار تهیه می شوند. این آلیاژها مقاومت خوبی در برابر خوردگی دارند. اما به‌دلیل گران‌بودن آن‌ها امروزه از فولاد کربنی و پوشش های محافظ پلیمری به جای این آلیاژهای گران‌قیمت استفاده می‌شود. امروزه فولاد به‌عنوان یکی از مهم‌ترین موادی است که در ساختن سازه‌های صنعتی به کار می‌رود. از جمله این سازه‌ها می‌توان به تانکرهای ذخیره، لوله‌های نفت و گاز، وسایل نقلیه و کشتی‌ها اشاره کرد (۲). خوردگی درواقع یکی از مشکلات اساسی در صنایع مختلف است که همواره خسارات فراوان اقتصادی و زیست‌محیطی به بار می آورد. تخمین هزینه‌های خوردگی در ایالات متحده بین ۸ تا ۱۲۶ میلیارد دلار برآورد شده است. طبق آمار وال استریت ژورنال هزینه‌های خوردگی در صنعت نفت و گاز حدود ۲ میلیارد دلار برآورد شده است (۳). این اعداد سال‌به‌سال در حال افزایش است؛ زیرا چاه‌ها عمیق‌تر و محیط‌ها خورنده‌تر می‌شوند. ارزیابی دقیق اقتصادی درباره خوردگی به‌علت وسعت و دامنه مسائل، میزان خسارت‌های واردشده، مخارج لازم جهت اعمال روش‌های حفاظتی و عوامل مؤثر دیگر، کار بسیار پیچیده و مشکلی است. از جمله زیان‌های مالی حاصل از خوردگی می‌توان به هزینه‌های تعویض قطعات و دستگاه‌ها، ماشین آلات، تأسیسات و واحدهای عملیاتی و حتی هزینه های مربوط به نیروهای انسانی لازم اشاره کرد. همچنین از جمله هزینه‌های اعمال روش‌های حفاظتی می‌توان به هزینه‌های رنگ‌آمیزی، سرمایه‌ای و نصب سیستم های حفاظت کاتدی اشاره کرد. با وجود این، روش‌ها و استراتژی‌های مختلفی برای کنترل خوردگی بررسی شده است که از این جمله می‌توان به پوشش‌های شیمیایی و یا روش‌های حفاظت کاتدی اشاره کرد. ولی اکثر این روش‌ها گران‌قیمت است و خسارات زیست‌محیطی فراوانی را نیز به‌همراه دارند. بنابراین استفاده از یک روش کنترلی جدید که هم از لحاظ اقتصادی مناسب باشد و هم خسارات زیست‌محیطی نداشته باشد، ضروری است. یکی از جدیدترین روش‌ها در بحث کنترل خوردگی استفاده از بیوپلیمرهای ضدخوردگی است.

در دهه اخیر، پژوهش هایی درخصوص استفاده از بیوپلیمرها جهت استفاده در فرایند کاهش سرعت خوردگی و یا ممانعت از خوردگی انجام شده است؛ این پژوهش‌ها همچنین دربرگیرنده تأثیر بیوپلیمر دراین خصوص بوده است. در سال ۲۰۱۱ فاینکنستادت[1] و همکارانش اثر مهارکنندگی خوردگی اگزوپلی ساکارید استخراج شده از گونه *لئوکونستوک مسنتریود*[2] را بر استیل کم کربن[3] مطالعه کردند (۴).

بیوپلیمرها درواقع ماکرومولکول های زیستی هستند که از تعداد زیادی زیرواحد کوچک و شبیه به هم تشکیل شده‌اند که با اتصال کووالانسی به هم متصل می‌شوند و یک زنجیره طولانی را ایجاد می کنند. در روند طبیعی بیوپلیمرها و یا همان ماکرومولکول‌ها، ترکیبات داخل سلولی هستند که قابلیت زنده ماندن به ارگانیسم را در شرایط سخت محیطی می‌دهند. مواد

بیوپلیمری در شکل‌های گوناگون توسعه یافته‌اند؛ بنابراین ظرفیت استفاده در صنایع گوناگون را دارند. بیوپلیمرها از منابع مختلف مانند میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و حیوانات تولید می‌شوند. با توجه به اینکه این مواد را انواع موجودات زنده سنتز می‌کنند، بخش مهمی از اعمال اکوسیستمی را برعهده دارند. این پلیمرها را به دلیل قابلیت تجزیه زیستی، مجدداً خود موجودات مصرف می‌کنند (۵).

کارایی عوامل جلوگیری‌کننده از خوردگی که بر پایه فلزات سنگین مانند کروم تولید شده و به‌عنوان افزودنی در فرمولاسیون پوشش‌های آلی به کار برده می‌شوند، مدت‌ها است که اثبات شده است؛ ولیکن آثار مخرب زیست‌محیطی و بیماری‌زایی (سرطان) این فلزات باعث شده که امروزه کاربرد آن‌ها محدود شود و از افزودنی‌های زیست‌تخریب‌پذیر در فرمولاسیون پوشش‌های آلی استفاده شود. مولکول‌هایی که میکروارگانیسم‌ها تولید کرده‌اند از جمله بیوپلیمرها، خواص ضدخوردگی مناسبی دارند. در سال‌های اخیر پژوهش‌هایی در برخی از کشورها از جمله هلند درخصوص خاصیت ضدخوردگی بیوپلیمرها و ارتباط آن با سایر خواص فیزیکی و شیمیایی آن انجام شده است. از اهداف نهایی این پژوهش‌ها بهینه‌کردن کارایی حفاظتی این مواد و کاربرد آن‌ها در فرمولاسیون پوشش‌های آلی بیان شده است (۶- ۹).

همان‌طور که اشاره شد از روش‌های مدنظر در حفاظت در برابر خوردگی، تولید پوشش‌های آلی است که دوام و چسبندگی بهتری را داشته باشند، بیوپلیمرهای باکتریایی می‌توانند از طریق بهینه‌سازی این پوشش‌ها از نظر چسبندگی و تشکیل فیلم مناسب نقش مهمی را در ممانعت از خوردگی ایجاد کند. همچنین این ترکیبات با حضور در محیط خورنده می‌توانند تا حدود زیادی سرعت خوردگی را کاهش دهند. سازوکار عملکرد بیوپلیمرها را می‌توان ناشی از موارد زیر دانست:

۱. قدرت نفوذ آن‌ها در سطح فلز (درنتیجه کمترکردن سطح تماس فلز با محیط خورنده)؛

۲. بلوک‌کردن اکسیژن محلول در محیط خورنده به‌عنوان یک اکسیدکننده قوی و لازم برای فرآیند معمول خوردگی؛

۳. کمپلکس‌کردن محصولات اولیه خوردگی (در مواردی مثل خوردگی فولاد که با دو مرحله تبدیل آهن فلزی به یون فرو و در ادامه تبدیل این یون به یون فریک مواجه هستیم) و تثبیت آن‌ها روی سطح فلز و درنتیجه جلوگیری از خوردگی (۱۰).

در این پژوهش به‌منظور افزایش بازده تولید و همچنین کمک به فرآیند صنعتی‌شدن تولید بیوپلیمر ضدخوردگی از گونه *فلاووباکتریوم*، به بررسی پارامترهای دما، pH و دور شیکر در سیستم آزمایشگاهی پرداخته شد. پس از تحلیل نتایج حاصل از طراحی آزمایش‌ها به‌روش RSM ، بهینه‌ترین شرایط برای تولید محصول به دست آمد.

مواد و روش‌ها

تهیه سویه میکروبی: سویه باکتری استفاده‌شده در این پژوهش یک باکتری هوازی، غیراسپورزا و گرم منفی و از خانواده *فلاووباکتریوم‌ها*[۴] است. این سویه در پژوهش‌های گذشت پژوهشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر جداسازی شده است و با نام *کرایزئوباکتریوم* ایندلوجنیس ام یو تی ۲[۵] در NCBI (JN831444) ثبت شده است.

تهیه پیش‌کشت میکروبی: از محیط عمومی ال.بی.براث[۶] برای تهیه مایه تلقیح استفاده شده است. بدین منظور یک میلی‌لیتر از بانک میکروبی ۸۰- درجه سانتی‌گراد در داخل ۱۵۰ میلی‌لیتر ال.بی.براث سترون اضافه شد و به مدت ۱۲ ساعت در شیکر انکوباتور در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور ۱۷۰ rpm انکوبه شد.

تهیه محیط کشت پایه تولید بیوپلیمر: محیط کشت بهینه‌شده (گرم بر لیتر) شامل ساکاروز : ۲۱ ، گلوتامیک اسید: ۲، H_2O. NaH_2Po_4: ۹، K_2HPO_4: ۶، NH_4Cl : ۰/۷، $7H_2O$. $MgSo_4$: ۱ در غلظت ذکرشده در آب مقطر حل شد (برای حجم ۳۰۰ میلی‌لیتر تهیه شد). ترکیب محیط کشت استفاده‌شده در پژوهش قبلی خانی[۷] و همکاران بهینه شده است (۱۱). با توجه با اینکه اتوکلاوکردن ساکاروز همراه با دیگر ترکیبات محیط کشت باعث تغییر رنگ محیط کشت و ازدست رفتن کیفیت مواد مغذی آن می شود (واکنش قهوه‌ای شدن از نوع میلارد[۸]) در چنین شرایطی برای حل مشکل، محلول ساکاروز غلیظ ۲۵۰ گرم بر لیتر تهیه می شود و به‌صورت جداگانه اتوکلاو و به اجزای محیط کشت اضافه می شود (۱۲).

تلقیح محلول ساکاروز و مایه تلقیح به محیط کشت: با توجه به اینکه در هر ارلن نیم‌لیتری به‌میزان ۳۰۰ میلی‌لیتر محیط پایه تولید تهیه شده، پس از اتوکلاوکردن محیط‌های مربوط، در هر ارلن به‌میزان ۲۵/۲ میلی لیتر از محلول غلیظ ساکاروز (۲۵۰گرم بر لیتر) سترون شد و در شرایط استریل و زیر هود میکروبی اضافه شد. در پایان میزان (v/v) ۶درصد پیش کشت میکروبی به ارلن‌ها اضافه شد (۱۳).

پارامترهای لازم جهت بهینه سازی آزمون: با توجه به شرایط رشد باکتری مربوط و بررسی در مطالعات انجام‌شده (۱۴- ۲۰)، سه پارامتر دما، pH و دور شیکر به‌منظور بهینه‌سازی شرایط کشت میکروبی و تولید بیوپلیمر در این مطالعه بررسی شدند. جدول ۱ پارامترهای مربوط را به‌همراه سطوح آن‌ها نشان می‌دهد.

جدول ۱- پارامترها و سطوح موردنظر

پارامتر	کمینه (۱-)	بیشینه (۱+)
دما (سانتی گراد)	۲۵	۴۰
pH	۵	۹
دور همزن(rpm)	۷۰	۲۱۰

استخراج محصول: پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون ارلن‌ها از انکوباتور خارج شدند و سلول‌ها به‌وسیله سانتریفیوژ (شرکت سیگما[۹] مدل 6-16K با شماره روتور Nr.12256) جداسازی شدند. سپس به هرکدام از مایع‌های رویی جداشده به‌اندازه سه برابر حجمی الکل مطلق ۹۶درصد اضافه شد و در یخچال ۴+ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از حدود ۱۲ ساعت محصول بیوپلیمر در کف ظروف استخراج رسوب کرده بود. ظروف استخراج از یخچال بیرون آورده شد و تا حد امکان از مایع بالایی ظروف خارج شد و مابقی ته هر ظرف سانتریفیوژ شد تا بیوپلیمر به‌طور کامل از الکل جدا شود. محصول به‌دست‌آمده در محیط آزمایشگاه گذاشته شدند تا کاملاً خشک شوند.

بهینه سازی نهایی شرایط دما، pH و دور شیکر تولید بیوپلیمر به‌کمک نرم‌افزار طراحی آزمایش ۷[۱۰]: طراحی آزمایش، مطالعه و بررسی توامان چندین متغیر فرآیند است. با ترکیب چندین متغیر، در یک مطالعه به جای انجام مطالعات مجزا برای هریک از متغیرها، تعداد آزمایش‌های مورد نیاز به‌میزان قابل‌توجهی کاهش می‌یابد و درنتیجه درک بهتری در مورد فرایند به دست

می آید. برای طراحی شرایط دما، pH و دور شیکر بهینه در این پژوهش از نرم‌افزار طراحی آزمایش ۷ استفاده شد.

طراحی آزمایش ها به کمک روش سطح پاسخ[11] (RSM): هدف نخست روش RSM، یافتن پاسخ بهینه است. هنگامی که بیش از یک پاسخ وجود دارد، یافتن بهینه توافقی که فقط یک پاسخ را بهینه نکند، اهمیت دارد. هنگامی که قیدهایی روی داده‌های طراحی وجود دارند، طراحی آزمایش باید الزامات این قیود را تأمین کند. هدف دوم شناخت چگونگی تغییرات پاسخ در یک جهت داده شده با تنظیم متغیرهای طراحی است. در کل، سطح پاسخ به‌طور گرافیکی قابل‌مشاهده است.

همان گونه که در جدول ۱ نشان داده شد، ۳ پارامتر برای بهینه‌سازی انتخاب شد که پس از ورود اطلاعات مربوط در نرم‌افزار یادشده، ۱۸ آزمون مطابق جدول ۲ برگزیده شده است.

تست خوردگی به‌روش نقطه‌ای: محلول NaCl در غلظت استاندارد ۳/۵درصد به‌عنوان محلول خورنده ساخته شد. یک محفظه مرطوب و بی‌هوازی به‌عنوان محیط مناسب جهت خوردگی ساخته شد. روی قطعه کوچک فولادی که سطح آن‌ها با سمباده ۴۰۰ کاملاً صاف و صیقل‌داده شده است، دو قطره مایع (۳۰میکرولیتر) قرار داده می شود، سپس در محفظه مذکور به‌مدت یک ساعت قرار داده می‌شود. قطره اول شامل محلول خورنده ۳/۵درصد سدیم کلرید و قطره بعدی شامل مخلوطی مساوی از محلول ۳/۵درصد سدیم‌کلرید و محلول ۱درصد از بیوپلیمر تولیدی از باکتری *فلاووباکتریوم* بود. پس از یک ساعت قطعه از محفظه بیرون آورده شد و در هوای آزاد خشک شدند. سپس بررسی سطح به‌لحاظ خوردگی انجام شده است (۴ و ۲۱).

جدول ۲- طراحی آزمایش برای بهینه‌سازی شرایط تولید بیوپلیمر (میزان مقادیر سطوح بر حسب کد)

آزمایش	فاکتور ۱ دما:A (درجه سانتی‌گراد)	فاکتور ۲ :B pH	فاکتور ۳ دور شیکر:C (rpm)
۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
۳	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۱/۶۸۲
۴	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	-۱/۶۸۲
۵	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	-۱/۰۰۰
۶	۰/۰۰۰	-۱/۶۸۲	۰/۰۰۰
۷	-۱/۶۸۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
۸	-۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	-۱/۰۰۰
۹	۱/۰۰۰	-۱/۰۰۰	-۱/۰۰۰
۱۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
۱۱	-۱/۰۰۰	-۱/۰۰۰	۱/۰۰۰
۱۲	۱/۶۸۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
۱۳	-۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰
۱۴	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
۱۵	-۱/۰۰۰	-۱/۰۰۰	-۱/۰۰۰
۱۶	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰	۱/۰۰۰
۱۷	۰/۰۰۰	۱/۶۸۲	۰/۰۰۰
۱۸	۱/۰۰۰	-۱/۰۰۰	۱/۰۰۰

نتایج

پارامترهای درنظرگرفته‌شده در این آزمون جهت بهینه سازی، دما، pH و دور همزن هستند که تأثیر هریک از این عوامل در سطوح مربوط بر میزان وزن خشک محصول نهایی (بیوپلیمر) بررسی شده است. پس از انجام آزمایش ها به همان شکلی که گفته شد، عملیات استخراج انجام و پس از خشک شدن کامل محصولات، با ترازوی دیجیتال توزین شدند؛ نتایج حاصل از توزین محصول خشک هر ارلن در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- میزان بیوپلیمر تولیدی از هر آزمایش

آزمایش	میزان تولید(g/l)	آزمایش	میزان تولید(g/l)
۱	۱۴/۱	۱۰	۱۴/۰۷
۲	۱۴/۱۷	۱۱	۱/۴
۳	۱۴/۰۳	۱۲	۳/۵۵
۴	۷/۷	۱۳	۱۴/۳
۵	۷/۹۶	۱۴	۱۳/۰۷
۶	۰/۸۳	۱۵	۱/۴
۷	۴/۲۵	۱۶	۰
۸	۰	۱۷	۱۲
۹	۲/۴۵	۱۸	۲/۲۵

همان‌گونه که مشاهده می‌شود بیشترین میزان تولید محصول مربوط به آزمایش ۲ با ۱۴/۱۷ گرم بر لیتر و پس از آن مربوط به آزمایش‌های ۱۳، ۱، ۱۰ و ۳ به‌ترتیب با میزان محصولات ۱۴/۳، ۱۴/۱، ۱۴/۰۷ و ۱۴/۰۳ گرم بر لیتر بیشترین میزان تولید محصول را به خود اختصاص داده‌اند.

نتایج آنالیز آنوا[۱۲]: تحلیل واریانس یا ANOVA یک ابزار مقایسه سطوح (تیمارهای) یک عامل است. در تحلیل واریانس دو پارامتر مهم مطرح می‌شود که با عبارات P-value و F-value نشان می‌دهند. درواقع F-value پارامتری جهت بررسی تأثیر هر عامل بر تولید محصول است که هرچقدر وزن این عامل بیشتر باشد نشان دهنده اثربخشی و اهمیت آن عامل در مدل سازی نهایی است. همچنین پارامتر P-value نمادی جهت میزان اطمینان به تأثیرگذاری یک عامل در نظر گرفته می شود که در آنالیز نهایی واریانس عواملی که دارای P-value کمتر از ۰/۰۵ باشند به‌عنوان عامل مشخص در مدل نهایی گزینش می‌شوند.

منابعی را که میزان P-value آن‌ها بیشتر از ۰/۰۵ است، به‌دلیل اثرگذاری کم آن‌ها در مدل نهایی می توان حذف کرد. براین‌اساس منابع A، C، AB، BC، C^2، ABC، A^2C، A^2B و AB^2 برای ساده‌سازی رابطه نهایی حذف شدند. F-value مدل با مقدار ۷/۵۹ نشان‌دهنده معنی‌داربودن[۱۳] مدل است (جدول ۴). با احتساب این مقدار F-value تنها ۰/۲۲درصد احتمال وجود دارد که F-value مدل به این بزرگی بر اثر نویز ایجاد شده باشد. همچنین تمامی مقادیر P-value کمتر از ۰/۰۵ نشان‌دهنده همه‌گیربودن آن منبع است.

جدول ۴- آنالیز آنوا نهایی

فاکتور	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F-value	P-value	توضیحات
مدل	۴۰۵/۵۱	۴	۱۰۱/۳۸	۷/۵۹	<۰/۰۰۲۲	Significant
pH (B)	۸۲/۴۰	۱	۸۲/۴۰	۶/۱۷	۰/۰۲۷۴	–
AC	۶۳/۰۶	۱	۶۳/۰۶	۴/۷۲	۰/۰۴۸۹	–
A^2	۱۹۰/۹۰	۱	۱۹۰/۹۰	۱۴/۲۹	۰/۰۰۲۳	–
B^2	۱۱۱/۹۹	۱	۱۱۱/۹۹	۸/۳۸	۰/۰۱۲۵	–
باقی‌مانده[۱۴]	۱۷۳/۶۵	۱۳	۱۳/۳۶	–	–	–
بی‌تناسبی[۱۵]	۱۷۲/۸۳	۱۰	۱۷/۲۸	۶۳/۱۰	۰/۰۰۲۹	Significant

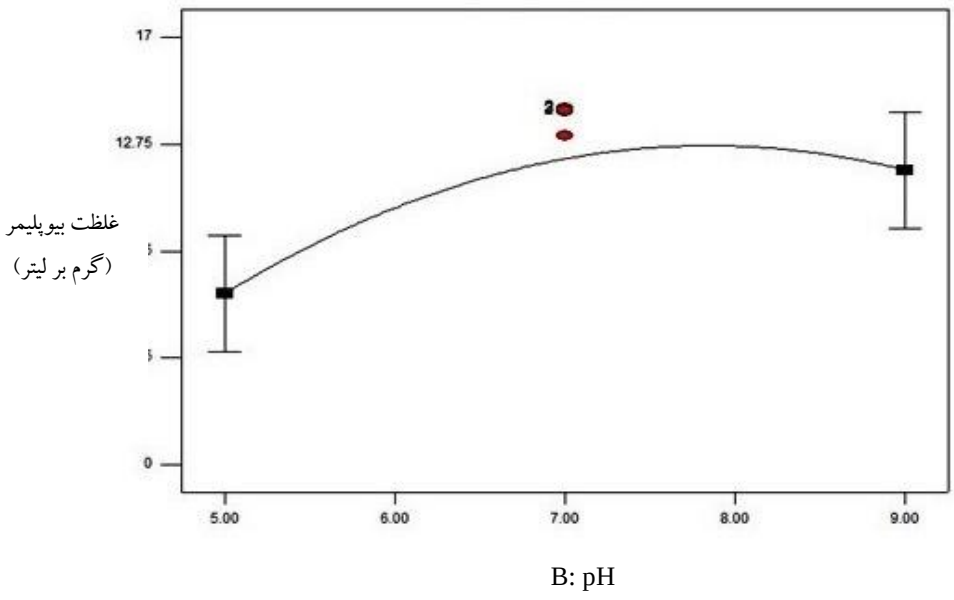
با توجه به مطالب عنوان‌شده و آنالیز انجام شده با نرم‌افزار، براساس اطلاعات آزمایشگاهی کسب‌شده میزان تولید بیوپلیمر ضدخوردگی براساس گرم بر لیتر و برپایه عوامل کدگذاری‌شده با رابطه ۱ قابل‌محاسبه است. رابطه ۱:

$$Polymer = +12.17 + 2.46 \times B - 2.81 \times A \times C - 3.80 \times A^2 - 2.91 \times B^2$$

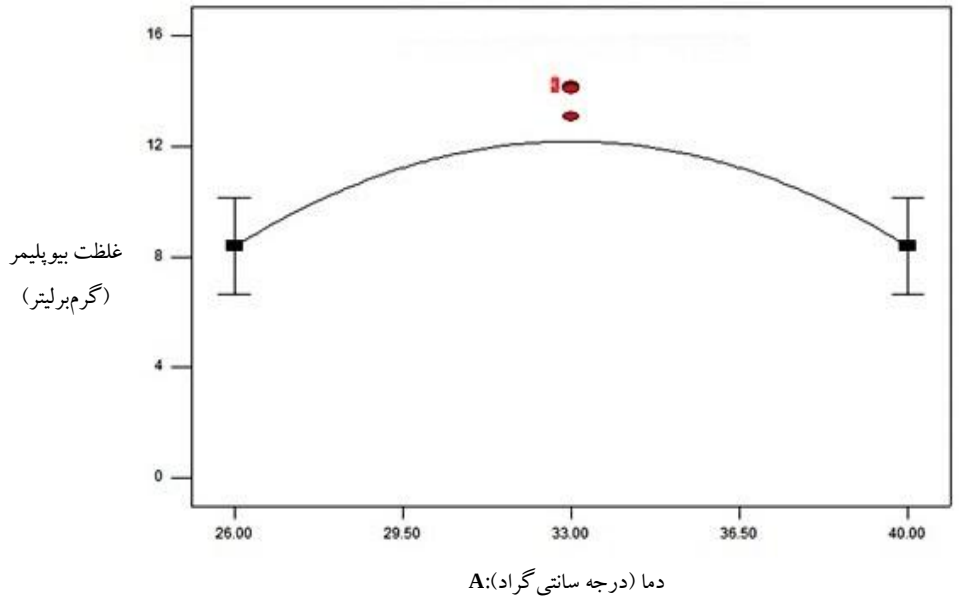
با انتقال داده‌های حاصل به نرم‌افزار و بررسی تأثیر هریک از عوامل، نمودارهای میزان برهم‌کنش و تأثیر متقابل هرجزء بر دیگری ترسیم شد. در ادامه با توجه به اجزای ۳گانه بررسی‌شده در این پژوهش، منحنی‌ها تحلیل شده است.

اثر عامل pH: همان‌گونه که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، در این بررسی با فرض ثبات دما در ۳۳ درجه سانتی‌گراد و دور شیکر در ۱۴۰rpm، با افزایش pH تا ۸، تولید محصول بیوپلیمر افزایش می یابد، و در صورت افزایش pH بیشتر از این میزان، تولید محصول کاهش خواهد یافت. بنابراین با درنظرگرفتن تأثیر عامل pH به‌تنهایی در میزان اثرگذاری‌اش بر تولید محصول مربوط، pH بهینه در این شرایط حدود ۸ است.

اثر عامل دما: همان‌گونه که در شکل ۲ ملاحظه می‌شود، در این بررسی با فرض ثابت‌بودن pH در ۸ و دور شیکر در ۲۱۰rpm، با افزایش دما تا ۳۳ درجه سانتی‌گراد، تولید محصول بیوپلیمر افزایش می‌یابد، و در صورت افزایش دما بیشتر از این میزان، تولید محصول کاهش خواهد یافت. بنابراین با درنظرگرفتن تأثیر عامل دما به‌تنهایی در میزان اثرگذاری‌اش بر تولید محصول مربوط، دمای بهینه در این شرایط حدود ۳۳ درجه سانتی‌گراد است.



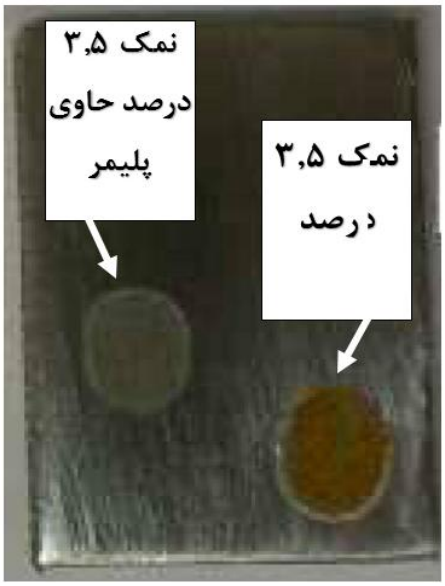
شکل ۱- اثر پارامتر pH (افقی) بر تولید بیوپلیمر (عمودی)



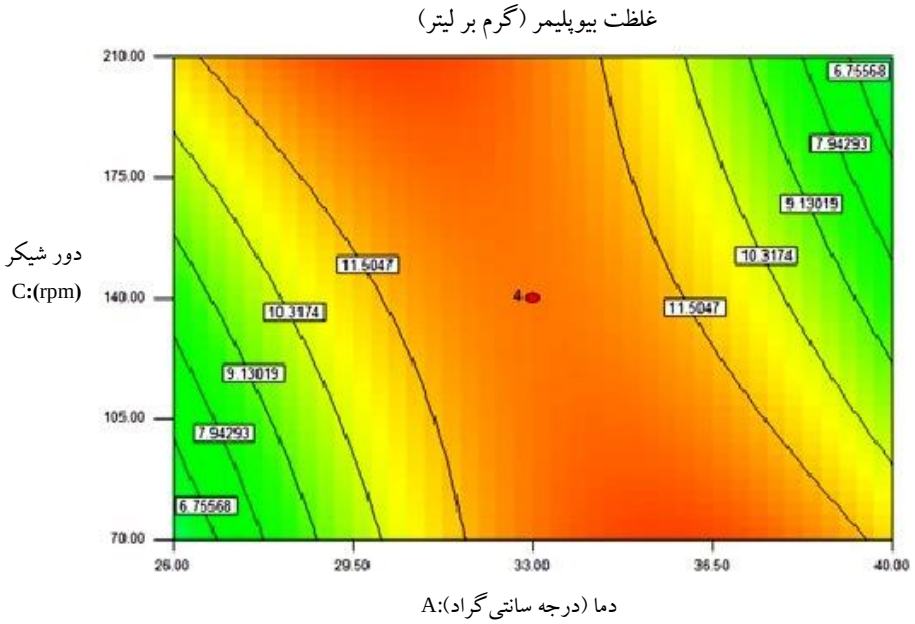
شکل ۲- اثر پارامتر دما (افقی) بر تولید بیوپلیمر(عمودی)

برهم‌کنش دما و دور شیکر: دما در مقابل دور شیکر دارای برهم‌کنش‌های قابل توجهی است. همان‌طور که در شکل ۳ به‌صورت منحنی‌های کانتر و سه‌بعدی، تأثیر دما و دور همزن بر تولید بیوپلیمر تولیدی قابل‌مشاهده است، درpH برابر ۷، هم‌زمان با افزایش و کاهش دور همزن از ۱۴۰ و حفظ دما در محدوده ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد، تولید بیوپلیمر افزایش می‌یابد تا به مقدار حداکثری آن در این برهم‌کنش برسد و پس از این مقادیر، تولید دوباره سیر نزولی می‌گیرد.

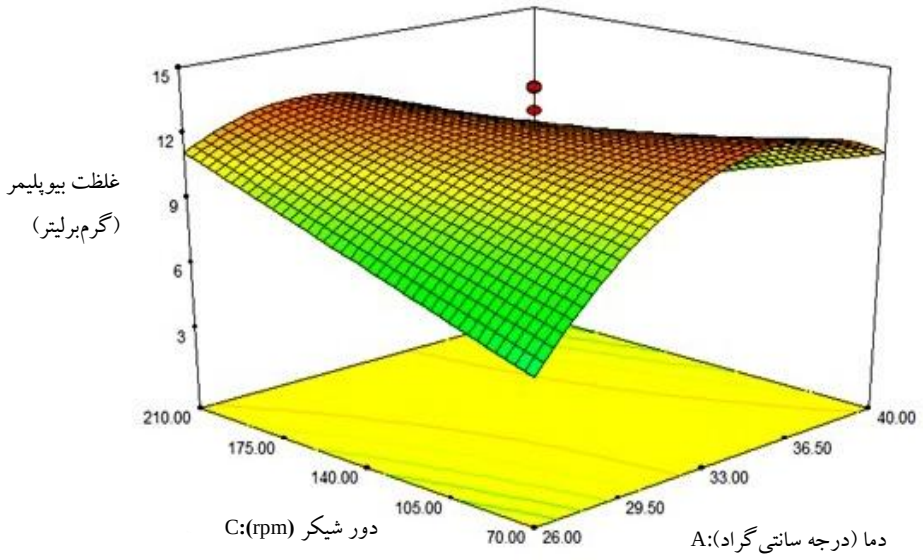
نتایج آزمون خوردگی نقطه‌ای: درپایان برای اثبات خاصیت مهار خوردگی بیوپلیمر بهینه‌شده، تست خوردگی نقطه‌ای انجام شد. صحت این تست با توجه به آنالیزهای الکتروشیمیایی (EIS) و آزمایش‌های تحلیلی سطح (FT-IR) را غفاری[۱۶] و همکاران بررسی کردند (۲۱). در اینجا برای نشان‌دادن خاصیت مهارکنندگی خوردگی محصول تولیدی، خوردگی نقطه‌ای آن را بررسی کردیم. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، محلول خورنده ۳/۵درصد NaCl روی قطعات فولادی خوردگی ایجاد کرده است؛ حال آنکه وقتی از مخلوطی مساوی از محلول ۳/۵درصد NaCl و بیوپلیمر ضدخوردگی تولیدی استفاده شود، هیچ‌گونه خوردگی مشاهده نمی‌شود.



شکل ۴- نتایج آزمون خوردگی نقطه‌ای پس از خشک‌شدن.



(الف)



(ب)

شکل ۳- برهم‌کنش دما و دور شیکر بر غلظت بیوپلیمر الف) نمودار کانتر، ب) نمودار سطح سه‌بعدی

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به مزوفیل‌بودن باکتری *کرایزئوباکتریوم ایندلوجنیس ام‌یوتی ۲* رشد و زندگی باکتری در دماهای ۵۰ -۲۰ درجه سانتی‌گراد امکان‌پذیر است؛ لیکن تغییر دمای رشد باکتری به‌طور مستقیم بر میزان تولید بیوپلیمر تأثیرگذار است. نتایج نشان داد که باکتری *کرایزئوباکتریوم ایندلوجنیس* در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد کمتر و درنتیجه تولید بیوپلیمر کمتری داشت؛ اما با افزایش دما به ۳۳ درجه سانتی‌گراد، رشد بیشتر و تولید بیشتری دیده شد به‌طوری‌که حداکثر میزان تولید بیوپلیمردر دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد به‌میزان ۱۴/۳ گرم در لیتر انجام شد. در ادامه با افزایش دما به ۴۰ درجه سانتی‌گراد میزان تولید نسبت به تولید در دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت. تصور می‌شود علت این پدیده‌ها از یک سو حساسیت آنزیم‌های درگیر در تولید بیوپلیمر به حرارت بالا و کاهش فعالیت آن‌ها است و از سوی دیگر مصرف مقداری از انرژی برای نگهداری سلول‌ها در دمای بالا است که به‌این‌ترتیب، میزان تولید کاهش می‌یابد. نظر به اینکه سیستم تخمیری این پژوهش، سیستم غیرمداوم به صورت ارلن لرزان است، با تغییر دور شیکر تأثیر مقادیر متفاوت هوادهی بر تولید بیوپلیمر بررسی شد که با توجه به هوازی‌بودن باکتری موردمطالعه، در شرایط دور هم‌زدن پایین رشد باکتری مختل و منجر به تولید بیوپلیمر به‌صورت جزئی شد؛ درحالی‌که حداکثر تولید در ۲۱۰ rpm به‌میزان ۱۴/۳ گرم در لیتر انجام شد. معمولاً باکتری‌ها در محیط‌های با دامنه pH=۵-۸ قادر به رشد و زندگی هستند. در پژوهش حاضر تأثیر pH بر رشد باکتری و به تبع آن تولید بیوپلیمر به‌گونه‌ای است که حداکثر تولید در pH=۸ به میزان ۱۴/۳ گرم در لیتر حاصل شد. در این راستا، طبق مطالعات لاوسون[۱۷] و سوزرلند[۱۸] در سال ۱۹۸۷بهینه‌ترین میزان pH برای رشد سلول و تولید بیوپلیمر در اکثر گونه‌های تولیدکننده بیوپلیمر ۶ تا ۸ است (۲۲). شای و همکاران[۱۹] در سال ۲۰۰۵ و قالی و همکاران[۲۰] در سال ۲۰۰۷ بهینه pH جهت تولید بیوپلیمر لوان را به‌ترتیب ۶ و ۹-۵/۴ اعلام کردند (۲۳ و ۲۴). همچنین در سال ۲۰۰۸ بهینه‌ترین شرایط برای رشد سلول و تولید بیوپلیمر توسط گونه *ای‌کلوکا WD7* در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ گزارش شده است (۲۵). باجاج و همکاران[۲۱] در سال ۲۰۰۶، کالوگاینیس و همکاران[۲۲] در سال ۲۰۰۳ و کاناری و همکاران[۲۳] در سال ۲۰۰۲ بهینه شرایط تولید بیوپلیمر ژلان و زانتان را در pH=۶/۵-۸ و دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند (۲۶- ۲۸).

در این مطالعه پس از بررسی نتایج و آنالیزهای حاصل از آزمایش‌ها مشخص شد که بهترین نتایج جهت تولید بیوپلیمر ضدخوردگی از گونه *فلاووباکتریوم* شامل: دما ۳۳ درجه سانتی گراد، pH=۸ و دور شیکر ۲۱۰ rpm است که منجر به تولید ۱۴/۳ گرم بر لیتر محصول خواهد شد و بیش از دو برابر افزایش در میزان تولید بیوپلیمر را قبل از بهینه‌سازی این پارامترها نشان می‌دهد. نتایج ارائه شده در این مطالعه اولین گزارش از تولید بیوپلیمر ضدخوردگی توسط سویه *کرایزئوباکتریوم ایندلوجنیس ام‌یوتی ۲* است. همچنین از محصول بهینه به‌دست‌آمده تست خوردگی نقطه‌ای انجام گرفت که خاصیت ضدخوردگی محصول تولیدشده نیز ثابت شد.

References

(1) Nimmo B., Hinds G. *Beginners Guide to Corrosion*. 2nd ed. The United Kingdom: NPL's Corrosion Group; 2003.

(2) Kenneth A. *Marine and Offshore Corrosion*. 3rd ed. United Kingdom: British Library Cataloguing in Publication Data: Elsevier; 2005.

(3) Fontana M. G., Corrosion Engineering, 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 1986

(4) Finkenstadt V., Cote G., Willett J. Corrosion protection of low-carbon steel using exopolysaccharide coatings from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnology Letters* 2011; 33: 1093- 100.

(5) Vandamme E.J., De Baets S., Steinbüchel E. Biopolymers Polysaccharides I: Polysaccharides from prokaryotes, Germany: Wiley-VCH; 2002.

(6) Meinema H.A., Rentrop C.H.A., Breur H.J.A., Ferrari G.M. Development and Screening of organic-inorganic hybrid coatings with anti-fouling properties for application on optical underwater instruments. 1 st international Conference on Coatings on Glass-ICCG, Saarbrucken, Germany, 2000.

(7) Sangeetha Y., Meenakshi S., Sairam Sundaram C. Electrochemical behaviour of acetyl G as corrosion inhibitor for mild steel in acid medium. *Pigment & Resin Technology* 2015; 44 (6): 371- 8.

(8) Ferrari G.M., Breur H.J.A.; Biopolymers for the corrosion protection of steel, *16th International Conference on Coatings* 2004; Beijing, pp.19- 24.

(9) Breur. H.J.A.Fouling and Bioprotection of Metals [Dissertation]. Varanasi: Banaras Hindu Univ; India, 2002.

(10) Rajabi E. Evaluation of Bacterial Exopolysaccharid effect for corrosion protection of carbon stee l [Dissertation]. Tehran: Malek Ashtar Univ; 2012.

(11) Khani M., Bahrami A., Chegeni A., Ghafari MD., Mansouran zadeh Ali. Optimization of Carbon and Nitrogen Sources for Extracellular Polymeric Substances Production by Chryseobacterium indologenes MUT. 2. *Iranian Journal of Biotechnology* 2016, 14 (2): 13- 18.

(12) Kim W.J., Lee W.G., Theodore K., Chang H. N. Optimization of Culture Conditions and Continuous Production of Chitosan by the Fungi, Absidia coerulea Biotechnol. *Bioprocess Engineering* 2001, 6 (1): 6- 10.

(13) Kim S. W., Hwang H. J., Xu C. P., Choi J. W., Yun J. W. Effect of aeration and agitation on the production of mycelial biomass and exopolysaccharides in an enthomopathogenic fungus Paecilomyces sinclairii *Letters in Applied Microbiology* 2003, 36, 321- 6.

(14) Kang X., Wang Y., Harvey L.M., Mcneil B. Effect of air flow rate on scleroglucan synthesis by Sclerotium glucanicum in an airlift bioreactor with an internal loop. *Bioprocess Engineering* 2000; 23 (1): 69- 74.

(15) Prasertsan P., Wichienchot S., Doelle JohnH., Kennedy F. Optimization for biopolymer production by Enterobacter cloacae WD7. *Carbohydrate Polymers* 2008; 71 (3): 468- 75.

(16) Selbmann L., Crognale S. and Petruccioli M. Beta-glucan production by Botryosphaeria rhodina in different bench-top bioreactors. *Journal of Applied Microbiology* 2004; 96(2): 1074- 81.

(17) Gaidhani H.K., Mcneil B. and Ni X. Fermentation of pullulan using an oscillatory baffled fermenter. *Chemical Engineering Research and Design* 2005; 83 (6): 640- 45.

(18) Jae Cho E., Young Oh J., You Chang H., Won Yun J. Production of exopolysaccharides by submerged mycelial culture of a mushroom Tremella fuciformis. *Journal of Biotechnology* 2006; 127 (2): 129- 40.

(19) Pil Park J., Mi Kim Y., Woo Kim S., Jin Hwang H.Effect of aeration rate on the mycelial morphology and exo-biopolymer production in Cordyceps militaris. *Process Biochemistry* 2002; 37 (1): 1257- 62.

(20) Lopez E., Ramos I., Sanroman M. A.Extracellular polysaccharides production by *Arthrobacter* viscosus. *Journal of Food Engineering* 2003; 60 (2): 463- 67.

(21) Ghafari M.D., Bahrami A., Rasool I., Arabian, D., Ghafari F., Bacterial exopolymeric inhibition of carbon steel corrosion. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2013; 80 (7): 29- 33.

(22) Davidson I. W., Sutherland I. W., Lawson C. J. Localization of O-acetyl groups of bacterial alginate. *Microbiology* 1977; 98 (2): 603- 06.

(23) Shih IL, Yuy T, Shieh CJ, Hsieh CY. Selective Production and Characterization of Levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *Jornal of Agriculture and Chemistry* 2005; 23 (1):151- 5.

(24) Ghaly A.E., Arab F., Mahmoud N.S., Higgins J. Production of Levan by *Bacillus licheniformis* for Use as a Soil Sealant in Earthen Manure Storage Structures. *American Journal of Biotechnology and Biochemistry* 2007; 3 (2): 47- 54.

(25) Prasertsan P., Wichienchot S., Doelle H., Kennedy J.F., Optimization for biopolymer production by *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydrate Polymer* 2008; 71, 468- 75.

(26) Bajaj I.B., Saudagar P.S., Singhal R.S., Pandey A. Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from Sphingomonas paucimobilis ATCC 31461. *Journal of Bioscience Bioengineering* 2006; 102: 150- 6.

(27) Kalogiannis S., Iakovidou G., Liakopoulou-Kyriakides M., Kyriakidis D.A., Skaracis G.N. Optimization of xanthan gum production by Xanthomonas campestris grown in molasses. *Process Biochemistry* 2003; 39: 249- 56.

(28) Kanari B., Banik R.R., Upadhyay S.N. Effect of environmental factors and carbohydrate on gellan gum production *Appled Biochemistry Biotechnology* 2002; 129- 40.

---

[1]- Finkenstadt
[2]- Leuconostoc mesenteroides
[3]- low-carbon steel
[4]- Flavobacterium
[5]- Chryseobacterium indologenes MUT. 2
[6]- LB Broth
[7]- Khani
[8]- Maillard
[9]- SIGMA
[10]- Design Expert 7
[11]- Respose surface method
[12]- ANOVA
[13]- Significant
[14]- Residual
[15]- Lack of Fit
[16]- Ghafari
[17]- Lawson
[18]- Sutherland
[19]- Shih et al.
[20]- Ghaly et al.
[21]- Bajaj et al.
[22]- Kalogiannis et al.
[23]- Kanari et al.

Selection of optimal conditions for anti-corrosive microbial biopolymer production by the *Flavobacterium* strain using response surface methodology (RSM)

Mojtaba Khani
MSc. of Chemical Engineering-biotechnology, Institute of Science Biotechnology Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.
mj_khani67@yahoo.com
Ali Bahrami *
PhD of Chemical Engineering-biotechnology, Institute of Science Biotechnology Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran,
a_bahrami@mut.ac.ir
Mohammad davod Ghafari
MSc. of Microbiology, Shahed University, Tehran, Iran, m.davoudghafari@gmail.com

Abstract

Introduction: Various methods have been proposed to deal with corrosion. One of these methods is using of paints and coatings. In formulation of paints and coatings several anti-corrosion compounds are applied that slow down the corrosion process. In this respect, using microbial biopolymers can improve this problem in the industry with lower costs because of biopolymer production not required to factory and advanced industry. in this study, the effects of temperature, pH and agitation on the biopolymer production using response surface methodology (RSM) were evaluated.

Materials and methods: To produce biopolymer, the culture medium (300 ml) were added in the 500 ml erlenmeyer flasks. Then, the bacterial preculture medium (6% V/V) were inoculated in the flasks and incubated for 96hr in different conditions (agitation speed, tempreture and pH). Afterwards, the medium was centrifuged at 9000 rpm for 10 min and the supernatant was mixed with triple volume of chilled absolute ethanol and stored at 4°C for 24hr to precipitate.

Results: Analysis of the results of design experiments indicate that the biopolymer production was strongly governed by the temperature, pH and agitation. The biopolymer production increased steadily up to pH 8 and decreased in the higher pH values. Also, for cell growth suitable temperature was 33°C and maximum concentration of the biopolymer production was agitation of 210 rpm. Finally, maximum concentration of the biopolymer production (14.3g/l) was determined to be in pH of 8, temperature of 33°C and agitation of 210rpm.

Discussion and conclusion: Anti-corrosive biopolymer production by *Flavobacterium sp.* affected significantly by physical parameters. The results of the biopolymer production by investigating the conditions of temperature, pH and agitation after optimization, indicates the importance of this parameter for economic production of biopolymer.

Key words: Anti-corrosive biopolymer, Temperature, pH, Agitation

* Corresponding author
Received: August 5, 2014 / **Accepted:** May 31, 2015