

Optimization of antifungal metabolite surfactin production by *Bacillus velezensis* UTB96

Maedeh Ahmadzadeh¹, Maliheh Vahidi Nasab², Masoud Ahmadzadeh³

1- Undergraduate student, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran, maral.ahmadzadeh@ut.ac.ir

2- Ph.D candidate, Institute of Food Science and Biotechnology. University of Hohenheim, Germany malihe.vahidinasab@uni-hohenheim.de

3- Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran

(Corresponding author: ahmadz@ut.ac.ir/ORCID iD: 4131-2009-0003-0000)

Abstract

Surfactin is one of the most effective bacterial cyclic lipopeptides mainly produced by different species of *Bacillus* that has antifungal activity. This compound are considered for using in various industries, medical and pharmaceutical and agricultural as an effective antibiotic for pest and disease management. Mostly the production of secondary metabolites in microorganisms is strongly influenced by physical and chemical conditions. In the current study, effect of some factors on surfatin production of *B. velezensis* UTB96 were evaluated. This strain is able to reduce the surface tension of the water from 72 mN/m to 30 mN/m. In this research we evaluated the production of surfactin by *B. velezensis* UTB96 as a potent producer. The strain was cultured in two different media. The effect of different incubation time including 24, 48 and 72 hours, different temperature including 25 and 37° C, and also, different sources of nitrogen and finally different concentration of microelements surfactin production has been evaluated using HPLC analysis. HPLC analysis indicated that surfactin considerably produced at the optimum temperature of 37°C for a 48h-incubation period. Regarding media components, it was found that the optimum nitrogen source was NH₄NO₃ (50 mM) and also, the optimum mineral slats were MnSO₄ (0.01 mM), FeSO₄ (4 uM). These results tend to suggest that *B. velezensis* UTB96 might be an appropriate strain to produce surfactin in bioreactor fermentation for large-scale production in order to apply for controlling *A. flavus* and to reduce its dangerous mycotoxin, aflatoxin as well. It was also revealed that the extracted cyclic lipopeptides could inhibit the growth of the fungus *Aspergillus flavus* at the concentration of 1mg/ml.

Key word: Cyclic lipopeptids, Surfactin, Biosurfactants, Antimicrobials, *Aspergillus*

بهینه‌سازی تولید ترکیب ضد قارچی سورفکتین در *Bacillus velezensis* UTB96

مائده احمدزاده^۱، ملیحه وحیدی نسب^۲ و مسعود احمدزاده^۳

۱- دانشجوی کارشناسی گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲- دانشجوی دکترای انستیتو علوم غذایی و بیوتکتولوژی، دانشگاه هونهایم، آلمان

۳- استاد گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(Corresponding author: ahmadz@ut.ac.ir / ORCID iD: 4131-2009-0003-0000)

چکیده

سورفکتین قدرتمندترین و یکی از مهم‌ترین لیپوپپتیدهای حلقوی است که توسط *Bacillus velezensis* و برخی گونه‌های *Bacillus* دیگر تولید می‌شود و کاربرد وسیعی در صنعت، پزشکی، داروسازی و کنترل زیستی آفات و بیماری‌های گیاهی در کشاورزی دارد. به منظور افزایش تولید لیپوپپتیدهای حلقوی، انتخاب محیط کشت مناسب و اقتصادی و مهیا کردن بهترین شرایط محیطی تولید، اهمیت زیادی دارد. سویه *B. velezensis* UTB96 با تولید لیپوپپتیدهای حلقوی موجب کشتش سطحی آب را از ۷۲ mN/m به ۳۰ mN/m شد. در این پژوهش، دو محیط کشت متفاوت تهیه شد و میزان تولید سورفکتین با استفاده از HPLC در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ پس از مایه‌زنی، در دو دمای ۲۵ و ۳۷ درجه سلسیوس و دو محیط متفاوت از نظر منابع نیتروژن و برخی فلزات مؤثر محاسبه شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان تولید سورفکتین مربوط به دمای ۳۷ درجه سلسیوس، طول دوره رشد ۴۸ ساعته و با منبع نیتروژن نیترات آمونیوم و غلظت ۰/۰۱ میلی مول سولفات منگنز و چهار میکرومول سولفات آهن است. به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که سویه *B. velezensis* UTB96 توان بالقوه‌ای در تولید لیپوپپتید حلقوی سورفکتین دارد و بهینه‌سازی محیط کشت و عوامل محیطی تاثیر معنی داری بر افزایش میزان تولید سورفکتین دارد؛ لذا این سویه را می‌توان برای کاربردهای صنعتی و تولید تجاری سورفکتین پیشنهاد کرد. همچنین، لیپوپپتیدهای حلقوی خالص سازی شده از این سویه در غلظت یک میلی گرم بر میلی مول توانستند از رشد قارچ *Aspergillus flavus* جلوگیری کنند.

کلمات کلیدی: لیپوپپتیدهای حلقوی، بیوسورفکتانت‌ها، سورفکتین، خواص ضد میکروبی، آسپرژیلوس

مقدمه

لیوپیتیدهای حلقوی متابولیت‌هایی هستند که طی واکنش‌های مرحله به مرحله و پیچیده از فعالیت پتید سنتتازهای غیرریبوزومی حاصل می‌شوند. به علت سمیت کمتر برای جانوران، زیست تخریب‌پذیری و پتانسیل کاهش قابل توجه کشش سطحی، جایگزین مناسبی برای سورفکتانت‌های صنعتی محسوب می‌شوند (Ahmadzadeh and Sharifi Tehrani, 2021). سویه‌هایی از دو گونه *Bacillus subtilis* و *Bacillus amyloliquifaciens* بزرگترین خانواده‌های لیوپیتیدهای حلقوی یعنی سورفکتین، ایتورین، فنجاسین و همچنین خانواده تازه شناسایی شده‌ای با نام لوسیلومایسین را تولید می‌کنند (Luo et al., 2015; Raaijmakers et al., 2010). لیوپیتیدهای خانواده سورفکتین از یک حلقه هپتاپتیدی تشکیل شده‌اند که به یک زنجیره اسیدچرب بتا‌هیدروکسی^۱ ۱۴-۱۷ کربنه متصل است. در واقع بخش انتهایی زنجیره اسید چرب در تشکیل حلقه هپتاپتیدی مشارکت می‌کند و یک حلقه ماکرولاکتونی^۲ را می‌سازد (Ongena and Jacques, 2008). اعضای مهم خانواده سورفکتین شامل سورفکتین، لیچنایسین، پومیل‌اسیدین و اسپرین هستند. تفاوت آنها در توالی اسیدهای آمینه و طول زنجیره کربنی آنهاست. سورفکتین‌ها به دلیل طبیعت آمفی‌فیلیک خود می‌توانند به آسانی و محکم به لایه لیپیدی غشاهای سلولی متصل شوند. این لیوپیتیدهای حلقوی قدرتمندترین و یکی از مهم‌ترین لیوپیتیدحلقوی تولیدشده به وسیله باکتری *B. subtilis* هستند و کاربرد وسیعی در صنعت، پزشکی و داروسازی و کنترل زیستی آفات و بیماری‌ها در کشاورزی دارند. تولید لیوپیتیدهای حلقوی نقش مهمی در خاصیت بازدارندگی رشد بیمارگرهای گیاهی در گونه *B. subtilis* به عنوان یک عامل کنترل زیستی را دارد (Ahmadzadeh and Sharifi Tehrani, 2021). لیوپیتیدهای حلقوی دارای خاصیت ضد ویروس، باکتری، قارچ، مخمر، مایکوپلاسمای قوی هستند و در حوزه کشاورزی و کنترل بیولوژیک از آنها استفاده زیادی می‌شود. فعالیت ضد قارچی لیوپیتیدهای حلقوی مختلف، علیه قارچ‌های متعددی و برخی مخمرهای بیماریزای انسانی و گیاهی از جمله *Aspergillus spp.* بررسی شده است. طول زنجیره اسیدچرب و توالی اسید آمینه ای سیکلوپتید لیوپیتیدها در نحوه عمل و نقش آنها مؤثر است (Raaijmakers et al., 2010). علاوه بر مشارکت در آنتاگونیسم، لیوپیتیدهای تولیدشده توسط جنس *Bacillus* و به خصوص سورفکتین در القای مقاومت سیستمیک گیاهان (Jourdan et al., 2009; Ongena et al., 2005)، در افزایش تحرک باکتری و توانایی ارتباط و استقرار موفق روی ریشه گیاه، به عبارت بهتر، کلنیزاسیون (Bais et al., 2004; Kearns et al., 2004) و همچنین، در تشکیل بیوفیلم (Hofemeister et al., 2004)، نقش دارند.

در تولید تجاری یک محصول بیوکنترل، انتخاب یک بسترکشت مناسب و به صرفه اهمیت زیادی دارد. به منظور جایگزین کردن بیوسورفکتانت‌ها به جای سورفکتانت‌های سنتتیک، باید از منابع ارزان قیمت استفاده کرد (Ghribi et al., 2011). به طوری که باکتری بتواند بیشترین مقدار این متابولیت‌های ثانویه را تولید کند. بدین منظور، محققان سعی کرده‌اند تا از ضایعات کشاورزی و بسترهای کشت ارزان استفاده نمایند. تولید لیوپیتیدهای حلقوی در هر دو محیط کشت مایع^۳ و جامد^۴ امکان‌پذیر است (Zhu et al., 2013). منبع کربن برای کلیه فعالیت‌های بیوسنتزی که منجر به تولید مثل، تولید متابولیت‌ها و بقای سلول می‌شود، مورد نیاز است. مناسب‌ترین منبع کربن برای تولید سورفکتین، قند گلوکز (۳۴ گرم بر لیتر) می‌باشد (Joshi et al., 2008). درحالی‌که عده‌ای از محققین نشان دادند که علاوه بر قند گلوکز، ملاس چغندر قند (۱۶۰ میلی لیتر بر لیتر)، منبع کربن مناسبی برای بهینه‌سازی سورفکتین می‌باشد. منبع کربن اصلی موجود در این ترکیب، قند سوکروز است. سوکروز پس از قند کلوکز، یک منبع کربن مناسب جهت بهینه‌سازی تولید لیوپیتیدهای حلقوی معرفی شده است (Abdel-Mawgoud et al., 2008). تصفیه ملاس و رقیق‌سازی آن قبل از استفاده نیز، بر کیفیت محصول بیوکنترل تولیدشده

¹ β -hydroxy fatty acids

² Macrolactone ring

³ Submerged State Fermentation

⁴ Solid State Fermentation

تاثیر دارد (Banat et al., 2014). هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی شرایط رشد باکتری و فراهم کردن مناسب‌ترین شرایط محیطی به منظور دستیابی به افزایش تولید لیپوپپتیدهای حلقوی به ویژه سورفکتین و افزایش کارایی بیوکنترل است. در تحقیق حاضر، با در نظر گرفتن جنبه اقتصادی، یک محیط کشت مناسب به منظور بهینه‌سازی لیپوپپتیدهای حلقوی انتخاب شد.

مواد و روش

تهیه و نگهداری سویه *Bacillus velezensis* UTB96

سویه *Bacillus velezensis* UTB96 (Accession number: CP036527.1) از کلکسیون آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشگاه تهران تهیه شد. البته به غیر از آزمون‌های بیوشیمیایی و بررسی ناحیه 16s rRNA که قبلاً انجام گرفته بود (Bagher et al. 2018)، آزمون‌های ملکولی تکمیلی برای شناسایی دقیق گونه، انجام گرفته است. این سویه که ژنوم آن نیز تعیین ترادف شده است، در حال حاضر، یک سویه پروبیوتیک برتر محسوب می‌شود و به عنوان تولیدکننده سورفکتین مطرح است (Keshavarzi et al., 2018; Vahidinasb et al., 2019). به منظور نگهداری کوتاه‌مدت باکتری از محلول یک‌دهم مولار $MgSO_4$ و برای نگهداری بلندمدت نیز از محیط LB به نسبت حجمی مساوی با گلیسرین (۸۷ درصد) سترون، درون ویال‌های اپندورف سترون مخلوط و در فریزر $-80^{\circ}C$ استفاده شد.

محیط کشت اولیه رشد باکتری *B. velezensis* UTB96

تولید انواع لیپوپپتیدها در سویه *B. velezensis* UTB96 از بین ده‌ها جدایه باکتری، به عنوان یک باکتری برتر پروبیوتیک گیاهی به اثبات رسیده است (Afsharmanesh et al., 2014). در همه آزمایش‌ها، باکتری ابتدا بر روی محیط کشت آگار مغذی (NA) کشت شد. پس از ۲۴ ساعت یک لوب از باکتری رشد یافته در این محیط کشت به دویست میلی لیتر درون ارلن‌های پانصد میلی لیتری محیط کشت مایع در محیط کشت Luria-Bertani (LB) کشت داده شد. پس از ۱۸-۱۴ ساعت رشد باکتری در دمای $37^{\circ}C$ و ۱۸۰ دور در دقیقه از آن به عنوان زادمایه اولیه استفاده شد. در این پژوهش، از ملاس چغندر قند به عنوان منبع کربن باکتری استفاده شد. شربت خیس‌انده ذرت به عنوان منبع نیتروژن آلی و نترات آمونیوم (NH_4NO_3) به عنوان منبع نیتروژن معدنی انتخاب شدند. از آنجایی که اضافه کردن غلظت مناسبی از برخی فلزات، تغییرات معنی‌داری در تولید لیپوپپتیدهای حلقوی ایجاد می‌کند، در این پژوهش نیز، با توجه به نتایج کارهای پیشین توسط سایر محققان، سه فلز منگنز، منیزیم و آهن به شکل نمک‌های سولفات استفاده شدند (Mizumoto and Shoda, 2007; Gancel et al., 2009). همچنین، از نمک‌های منوپتاسیم فسفات ($KHPO_4$)، دی‌پتاسیم فسفات (K_2HPO_4)، کلرید کلسیم ($CaCl_2$) و کلرید پتاسیم (KCl) جهت ثابت ماندن pH و ایجاد محیط بافری استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱- محیط کشت پایه و اصلاح شده

Table 1- Original and modified culture media

Modified medium	Original medium	
Molasses 10g/l	Molasses 10g/l	Carbon source Nitrogen source
NH_4NO_3 50mM	Corn steep liquor 5g/l	
$MgSO_4$ 0.5g/l	$MgSO_4$ 0.5g/l	Buffers
$KHPO_4$ 0.5g/l	$KHPO_4$ 0.5g/l	
K_2HPO_4 1g/l	K_2HPO_4 1g/l	
$CaCl_2$ 0.5g/l	$CaCl_2$ 0.5g/l	
KCl 0.5g/l	KCl 0.5g/l	Cations
$FeSO_4$ 0.008g/l	$FeSO_4$ 0.008g/l	
$MnSO_4$ 0.01mM	$MnSO_4$ 0.1g/l	

Luria-Bertani (LB) ¹

نمودار رشد باکتری طی هفده ساعت در سه محیط کشت LB، پایه و اصلاح شده

برای مقایسه منحنی رشد، سویه *B. velezensis* UTB96 در محیط‌های کشت LB، پایه و اصلاح‌شده، در دمای 37°C و تکان ۱۸۰ دور در دقیقه رشد داده شدند. میزان رشد این دو باکتری، در محیط‌های مختلف، با اندازه‌گیری جذب نوری آنها در ششصد نانومتر، هر یک ساعت یکبار در طی ۱۷ ساعت اندازه‌گیری شد.

بررسی اثر دما و طول دوره کشت بر میزان تولید لیپوپپتیدهای حلقوی دو محیط کشت پایه و اصلاح‌شده

ابتدا محیط‌های کشت پایه و اصلاح‌شده تهیه شد. سپس این محیط‌ها به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شدند. پس از تنظیم pH آنها بر روی ۶/۸ و استریل نمودن، زادمایه قارچ با نسبت هفت درصد از کشت تازه ۱۸-۱۴ ساعته باکتری‌ها در محیط مایع LB، به آنها تلقیح شد. محیط‌های مایه‌زنی‌شده در دور ثابت ۱۸۰ دور در دقیقه در دو دمای مختلف 25°C و 37°C قرار گرفتند. ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از رشد، باکتری‌ها برداشت شدند. برای هر کدام از تیمارها، سه تکرار در نظر گرفته شد. مایع رویی (سوپرناتانت) باکتری با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ (۸۰۰۰g به مدت بیست دقیقه) برای انجام آزمایش‌های بعدی به‌دست آمد.

استخراج لیپوپپتیدهای حلقوی

سلول‌های باکتری به‌وسیله سانتریفیوژ (هشت هزار دور در دقیقه به مدت پانزده دقیقه) از مایع رویی جدا شدند. بلافاصله پس از آن، pH سوپرناتانت به‌وسیله اسید کلریدریک شش نرمال به دو واحد رسانده شد و به مدت ۸-۶ ساعت در دمای چهار درجه سلسیوس قرار داده شدند (Hsieh et al., 2004). سپس با سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰g به مدت بیست دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس، رسوب حاصل، جمع‌آوری و بخش پپتیدی آن با استفاده از متانول استخراج شد. در مرحله بعدی حلال متانول به کمک فشار در روش خشک‌انجمادی در دمای -60°C درجه سلسیوس حذف شده، رسوب حاصل در فریزر با دمای منفی چهار درجه سلسیوس نگهداری شد.

ردیابی تولید سورفکتین با استفاده از HPLC

برای تعیین غلظت سورفکتین از دستگاه HPLC ساخت شرکت KNAUER کشور آلمان مدل PLATIN blue و رابط نرم‌افزاری EZChrom Elite استفاده شد. قبل از تزریق نمونه‌ها، استاندارد سورفکتین خریداری‌شده از سیگما، از فیلتر استات سلولزی ۰/۲ میلی‌متری عبور داده شد و به مقدار ده میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق گردید. محلول حاوی لیپوپپتیدها، روی ستون سلولزی ODS-2 C18 با طول ۲۵۰ میلی‌متر و قطر داخلی چهار میلی‌متر با کمک بافر شوینده (فاز متحرک^۱) شامل استونیتریل همراه با تری فلورواستیک اسید ۳/۸ میلی‌مولار به نسبت ۸۰:۲۰ درصد به صورت ایزوگرادیانت به تعادل درآمد. سرعت جریان^۲ یک میلی‌لیتر در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و حجم تزریق ده میکرولیتر بود. در نهایت جذب آن به‌وسیله آشکارگر فتو دیود آبی (PDA)^۳ در طول موج ۲۱۰ نانومتر ثبت شد.

بررسی میزان توده زیستی باکتری در دو محیط کشت پایه و اصلاح‌شده در دمای 37°C

میزان تولید توده زیستی (بیومس) باکتری با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ و توزین توده سلولی مورد سنجش قرار گرفت (Zhu et al., 2013). سلول‌های باکتری به‌وسیله سانتریفیوژ (ده هزار دور در دقیقه، به مدت ۲۰ دقیقه و دمای چهار درجه سلسیوس) از مایع رویی جدا شدند. توده باکتری دو بار با آب مقطر استریل شستشو و سپس در داخل ظروف آلومینیومی ریخته شدند. توده سلولی باقی‌مانده در روی این ظروف پس از خشک شدن در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس به مدت یک شب، با در دست داشتن وزن اولیه آنها، توزین شدند.

آزمون‌های بیوشیمیایی برای ارزیابی میزان تولید لیپوپپتیدهای حلقوی

¹ Mobile phase

² Flow

³ Photo Diode Array

مقدار کلی تولید مواد بیوسورفکتانت در دو محیط پایه و اصلاح شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به وسیله آزمون‌های بیوشیمیایی لیپاز، جابه‌جایی با نفت و میزان کاهش کشش سطحی به شرح زیر اندازه‌گیری شد.

آزمون تولید لیپاز -طبق روشی متداول (Samad et al., 1998) درچاهک ایجادشده در مرکز محیط کشت تولید لیپاز (دو درصد توئین ۸۰، ۱/۰ درصد متیل رد و ۲/۵ درصد آگار)، دویست میکرولیتر سوپرناتانت باکتری، اضافه‌شد. پس از ۲۴ ساعت قرارگرفتن در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، هاله ایجادشده در اطراف چاهک‌ها که نشان‌دهنده میزان تولید لیپاز است، بررسی شد.

آزمون جابه‌جایی با نفت خام - طبق روشی استاندارد چهل میلی‌لیتر آب مقطر به تشتک پتری پانزده سانتی‌متری، ریخته‌شد و سپس، بیست میکرولیتر نفت خام به مرکز آب اضافه شد و در نهایت، ده میکرولیتر از مایع رویی باکتری، به مرکز نفت خام پخش شده در سطح آب اضافه شد (Morikawa et al., 1993). بعد از سی ثانیه، قطر هاله ایجادشده اطراف باکتری که نشان‌دهنده تولید بیوسورفکتانت است، اندازه‌گیری شد. این آزمایش با پنج تکرار انجام شد.

آزمون بررسی میزان کاهش کشش سطحی - میزان کاهش کشش سطحی سوپرناتانت‌ها، با استفاده از دستگاه تنسیومتر موجود در دانشکده شیمی دانشگاه تهران مدل Kruss K6, Germany اندازه‌گیری شد و با آب مقطر به عنوان شاهد، مقایسه شد (Gudina et al., 2002).

بررسی خاصیت ضد قارچی لیپوپپتیدهای حلقوی استخراج شده

سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت ۱۰^۵ اسپور در میلی‌لیتر تهیه و به محیط کشت PDA استریل شده اضافه شد. پس از سردشدن محیط، چاهکی به قطر هشت میلی‌متر در وسط تشتک پتری ایجاد شد. لیپوپپتیدهای حلقوی از محیط پایه و اصلاح شده، پس از ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، خالص شدند و با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر در حلال آلی متانول مخلوط شده، در نهایت، به چاهک ایجادشده در وسط تشتک پتری ریخته شدند. پس از پنج روز، میزان هاله بازدارندگی اطراف چاهک اندازه‌گیری شد.

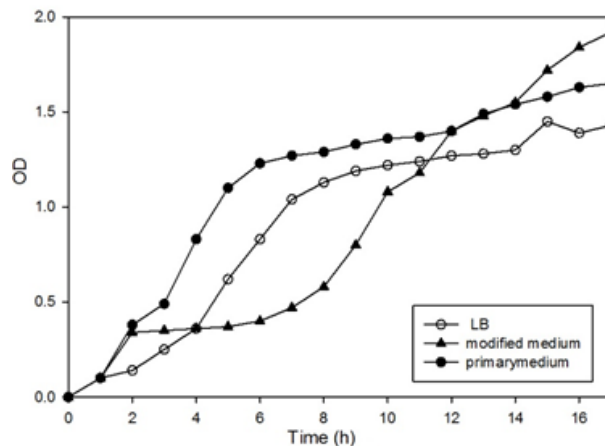
آنالیز آماری و تجزیه و تحلیل

به منظور تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه 27.0.1 استفاده شد و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک یا پنج درصد مقایسه شدند. به منظور رسم نمودار نیز، از نرم‌افزار SigmaPlot استفاده شد.

نتایج

نمودار رشد باکتری طی ۱۷ ساعت در سه محیط کشت LB، پایه و اصلاح شده

مقایسه نمودار رشد باکتری *B. velezensis* UTB96 در سه محیط پایه، اصلاح شده و LB نشان داد که الگوی رشد این جدایه مشابه با سایر باکتری‌ها دارای یک فاز تاخیر، فاز لگاریتمی و سکون است، اما این الگوی رشد، در محیط‌های مختلف، متفاوت است. رشد باکتری در محیط پایه و LB، بیشتر به هم شبیه بوده، با این تفاوت که زمان رسیدن باکتری به فاز لگاریتمی در محیط پایه سریعتر از محیط LB است. در محیط پایه سرعت رشد باکتری در شش ساعت اول رشد، بیشتر از محیط اصلاح شده است و پس از آن کم شده تا این که به فاز سکون می‌رسد و ثابت می‌شود، اما در محیط اصلاح شده برعکس است و در ساعات اولیه، سرعت رشد پایین است و به تدریج زیاد می‌شود. در نهایت، حداکثر میزان رشد باکتری در محیط اصلاح شده مشاهده شد (شکل ۱).

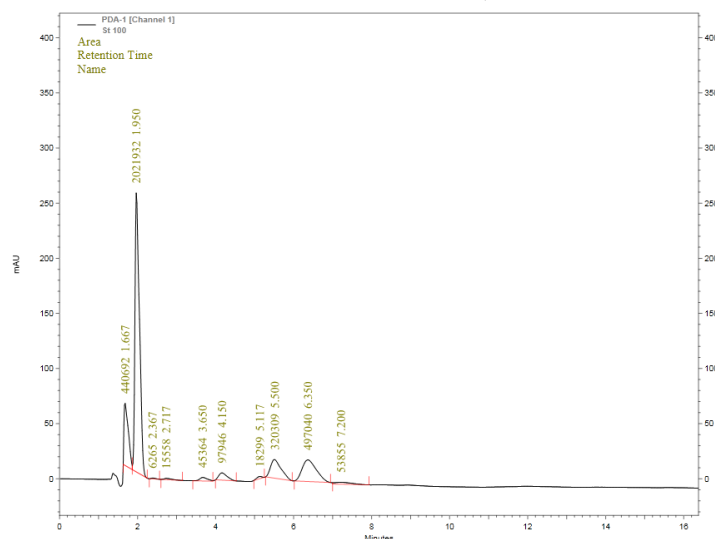


شکل ۱- منحنی رشد باکتری طی هفده ساعت در سه محیط کشت LB، پایه و اصلاح شده

Fig 1- Bacterial growth kinetic during 17 h in three media: original medium, LB and modified

اندازه گیری میزان تولید سورفکتین

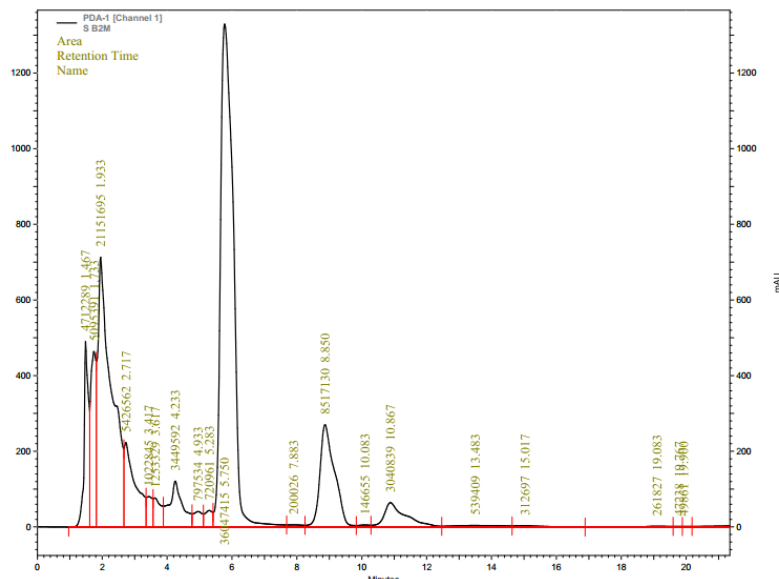
سورفکتین دارای ۹ ایزومر مختلف است که در کروماتوگرام حاصل از نمونه سورفکتین استاندارد، این ۹ پیک مشاهده شدند (شکل ۲).



شکل ۲- کروماتوگرام نمونه استاندارد سورفکتین شامل نه ایزومر مختلف

Fig 2- Chromatogram of standard sample of surfactin showing nine isomers

شکل ۳ کروماتوگرام مربوط به تولید سورفکتین در محیط اصلاح شده پس از ۴۸ ساعت در دو دمای ۳۷ و ۲۵ درجه سلسیوس را نشان می دهند. بر طبق این نتایج، میزان تولید سورفکتین در دمای ۳۷ درجه بیشتر بود و اختلاف معنی داری با مقدار سورفکتین در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نشان داد. بیشترین میزان تولید سورفکتین تولید شده مربوط به دمای ۳۷ درجه و ۴۸ ساعت پس از کشت باکتری است (جدول ۲)؛ بنابراین، برای انجام سایر آزمایش ها از این دمای و طول دوره کشت ۴۸ ساعته به منظور رشد باکتری استفاده شد.



شکل ۳- کروماتوگرام تولید سورفکتین (شامل ایزومرهای مختلف) در محیط اصلاح شده، پس از ۴۸ ساعت و دمای ۳۷°C
 Fig 3- Chromatogram of standard sample of surfactin showing several isomers following incubation in modified medium for 48 h at 37°C

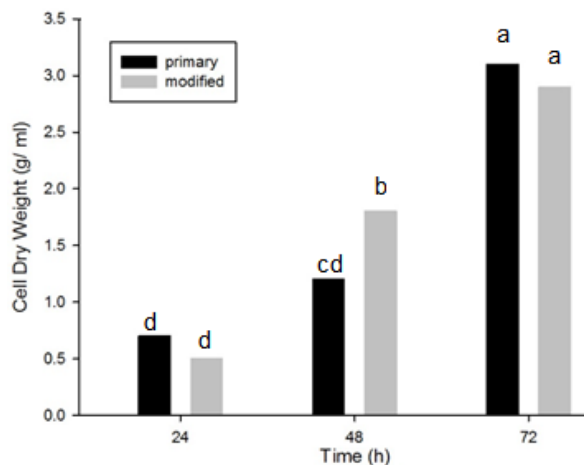
جدول ۲- میزان تولید سورفکتین در تیمارهای مختلف در آزمون HPLC

Table 2- Measurement of surfactin resulted from HPLC assay

Surfactin production (mg/ml)	Treatment	Surfactin production (mg/ml)	Treatment
2.083c	24-h growth in original medium, 25°C	3.575 bc	48-h growth in modified medium, 25°C
2.219 c	24-h growth in original medium, 37°C	6.529 a	48-h growth in modified medium, 37°C
1.326 d	24-h growth in modified medium, 25°C	2.221 c	72-h growth in modified medium, 25°C
4.61 bc	24-h growth in modified medium, 37°C	4.084 bc	72-h growth in modified medium, 37°C

میزان توده زیستی باکتری در دو محیط کشت پایه و اصلاح شده در دمای ۳۷°C

در ابتدا تفاوت چندانی بین میزان توده زیستی باکتری مشاهده نشد و پس از ۴۸ ساعت روند رشد باکتری در محیط اصلاح شده افزایش یافت. در نهایت، بیشترین میزان توده زیستی باکتری مربوط به محیط پایه و پس از ۷۲ ساعت اندازه گیری شد. نتایج در شکل ۴ قابل مشاهده است.

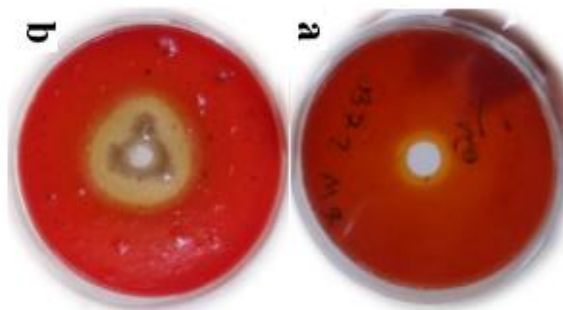


شکل ۴- مقایسه میزان توده زیستی باکتری در دو محیط پایه و اصلاح شده در دمای ۳۷°C

Fig 4- Comparison of bacterial biomass cultured on two medium at 37°C

آزمون‌های بیوشیمیایی برای ارزیابی میزان تولید لیپوپپتیدهای حلقوی

آزمون لیپاز- در آزمون لیپاز، هاله روشن ایجاد شده در اطراف چاهک حاوی مایع رویی باکتری (سوپرناتانت)، نشان دهنده میزان تولید مواد بیوسورفکتانت است. نتایج این آزمون نشان داد که میران هاله ایجاد شده از سوپرناتانت باکتری رشد یافته در محیط LB کمتر از محیط پایه و اصلاح شده بود. در واقع میزان تولید لیپوپپتیدهای حلقوی در دو محیط پایه و اصلاح شده بیشتر از محیط LB است (شکل ۵).



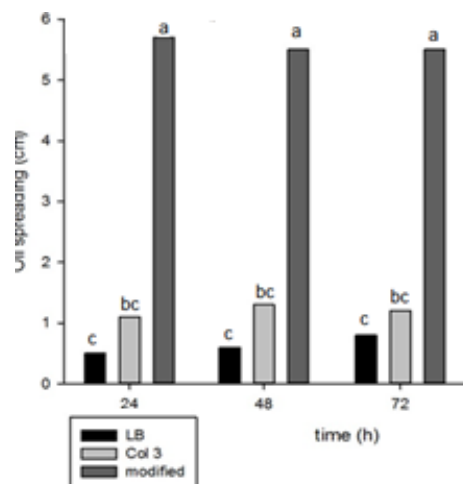
شکل ۵- آزمون تولید لیپاز. a: سوپرناتانت *B. velezensis* UTB96 رشد یافته در محیط LB به مدت ۴۸ ساعت؛ b: سوپرناتانت *B.*

velezensis UTB96 رشد یافته در محیط اصلاح شده به مدت ۴۸ ساعت

Fig. 5- Lipase production test. a) supernatant of *B. velezensis* UTB96 grown in LB for 48h and b) grown in the modified medium for 48 hours

آزمون جابه‌جایی با نفت خام

بر طبق نتایج این آزمون، قسمت رویی سوسپانسیون باکتری حاصل از سانتریفیوژ محیط اصلاح شده، پخش شدگی بیشتری در نفت خام داشت و اختلاف آنها با محیط پایه در سطح یک درصد کاملاً معنی دار بود. قسمت رویی سوسپانسیون (سوپرناتانت) حاصل از سانتریفیوژ باکتری ۴۸ ساعت رشد یافته در محیط LB کمترین قطر پخش شدگی را نشان داد. نتایج این آزمون در شکل‌های ۶ و ۷ قابل مشاهده است.



شکل ۶- مقایسه قطر پخش شدگی در نفت خام مربوط به مایع رویی (سوپرناتانت)

باکتری *B. velezensis* UTB96 در سه محیط پایه، اصلاح شده و LB

Fig. 6- Oil displacement test (dispersing diameter) of *B. velezensis* UTB96 in supernatant of three different media (control, LB and modified)

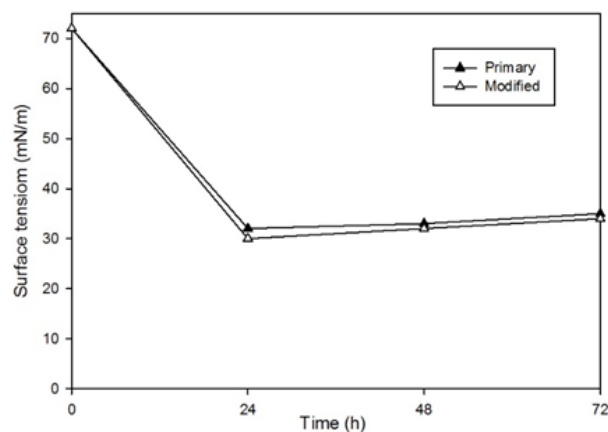


شکل ۷- آزمون پخش شدگی مایع رویی (سوپرناتانت) باکتری *B. velezensis* UTB96 رشد یافته در محیط اصلاح شده در نفت خام

Fig. 7- Oil displacement test for *B. velezensis* UTB96 supernatant grown in modified medium

آزمون بررسی میزان کاهش کشش سطحی

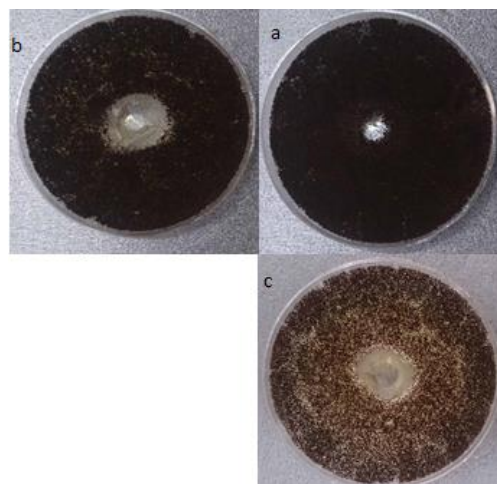
سوپرناتانت باکتری حاصل از دو محیط پایه و اصلاح شده توانستند کشش سطحی را به خوبی کاهش دهند. در این آزمون کشش سطحی آب مقطر ۷۲ mN/m محاسبه شد و مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ باکتری در تیمارهای زمانی مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توانستند به طور متوسط کشش سطحی آب را تا ۳۰ mN/m کاهش دهند (شکل ۸).



شکل ۸- میزان کاهش کشش سطحی باکتری *B. velezensis* UTB96 در دو محیط پایه و اصلاح شده
 Fig. 8- Reducing ability of tension surface of *B. velezensis* UTB96 in both basic and modified culture media

بررسی خاصیت ضد قارچی لیپوپپتیدهای حلقوی استخراج شده

هاله بازدارندگی از رشد قارچ در اطراف چاهک حاوی لیپوپپتیدهای خالص شده از محیط‌های پایه و اصلاح شده نشان داد که لیپوپپتیدهای خالص سازی شده می‌توانند از رشد *A. flavus* جلوگیری کند (شکل ۹). فعالیت ضد قارچی لیپوپپتیدهای حلقوی تولید شده توسط باکتری‌های جنس *Bacillus* به ایتورین و فنجاسین نسبت داده می‌شود و سورفکتین با فعالیت تشدید کنندگی (سینرژیستی) خود این خاصیت را افزایش می‌دهد. تولید این ترکیبات در آزمایش‌های قبلی در این سویه به اثبات رسیده بود (Afsharmanesh et al. 2014).



شکل ۹- آزمون بررسی خاصیت ضد قارچی لیپوپپتیدهای حلقوی استخراج شده

a: شاهد، b: لیپوپپتیدهای استخراج شده از محیط پایه و c: لیپوپپتیدهای استخراج شده از محیط اصلاح شده (اجزای هر دو محیط در

جدول ۱ توضیح داده شده‌اند)

Fig. 9- Antifungal activity of lipopeptides in a) Control, b) basic medium and c) modified medium (The components of both media was described in Table 1)

بحث

لیپوپپتیدهای حلقوی یا بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات آمفی‌فیلیک تولید شده از سطح سلول زنده هستند که دارای بخش آب‌دوست و آب‌گریز می‌باشند و کشش سطحی را کاهش می‌دهند و جایگزین مناسبی برای سورفکتانت‌های سنتتیک شیمیایی محسوب می‌شوند

(Ines and Dhouha, 2015). خواص بیوکنترلی این ترکیبات موجب توان رقابت بیشتر باکتری‌های تولیدکننده آن برای بقا در شرایط نامساعد شده است. این ترکیب علاوه بر کاربرد در صنایع مختلف، در رشد و تکثیر باکتری موثر بوده، علاوه بر خواص ضد میکروبی، نقش مهمی در کنترل حشرات دارد. از این رو، بهینه‌سازی تولید آن می‌تواند در فرایند صنعتی شدن، مورد استفاده شرکت‌های خصوصی قرار بگیرد. محققان نشان دادند که عوامل محیطی مختلف مثل دما، pH، میزان هوادهی، دور شیکر و طول دوره کشت، بر میزان تولید بیوسورفکتانت‌ها موثر است (Joshi et al., 2008).

اسیدیته مناسب برای تولید سورفکتین نیز، حدود ۶/۵ تا ۶/۸ می‌باشد (Abdel-Mawgoud et al., 2008). در حالیکه اسیدیته مناسب برای تولید ایتورین متفاوت است و محققان، مقادیر مختلفی از اسیدیته را در تحقیق خود برای تولید ایتورین پیشنهاد داده‌اند. طبق گزارش Mizumoto and Shoda (2007) بیشترین میزان ایتورین توسط باکتری *B. subtilis* RB14-CS در اسیدیته ۵/۹ تا ۶/۳ تولید شده است. به منظور بهینه‌سازی تولید سورفکتین در این تحقیق اسیدیته تمام محیط‌های کشت، ۶/۸ در نظر گرفته شد. علاوه بر این فاکتورها، طول دوره رشد باکتری بر تولید بیوسورفکتانت‌ها مؤثر است. بیشترین میزان رشد سویه *B. subtilis* KO تقریباً ۰/۶۰۸ تا ۰/۷۸۰ گرم در یکصد میلی‌لیتر محیط LB broth و ملاس ده درصد، دمای ۴۵ درجه و ۲۴ ساعت طول دوره رشد بوده است (Younis et al., 2010). زمان عامل مهمی در مقدار تولید سورفکتین است. تولید این ترکیب تحت تنظیم سیستم حد نصاب احساس بوده، بیان آن در مراحل پایانی فاز سکون افزایش می‌یابد. البته، این ترکیب در سنتز برخی متابولیت‌های باکتری موثر بوده، از این رو، مقدار آن در شرایط خاصی می‌تواند رو به کاهش بگذارد (Ines and Dhouha, 2015; Guez et al., 2021).

لازم به ذکر است که میزان زیاد رشد باکتری لزوماً به معنای افزایش تولید لیپوپپتید نیست. در تحقیق حاضر نیز، بیشترین میزان زیست توده باکتری به مقدار $2/96 \text{ g l}^{-1}$ اندازه‌گیری شد. دمای بهینه برای تولید بیوسورفکتانت‌ها با هم متفاوت است؛ به طوری که بهینه دما برای تولید سورفکتین ۳۷ درجه سلسیوس و برای ایتورین ۲۵ درجه می‌باشد (Ohno et al., 1995). این مقدار مربوط به محیط پایه پس از ۷۲ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بود. این در حالی است که نتایج HPLC نشان داد که بیشترین میزان تولید سورفکتین مربوط به دمای ۳۷ درجه و بعد از ۴۸ ساعت دوره رشد است. علاوه بر فاکتورهای محیطی، مشخص شده است که غلظت مناسب از برخی فلزات، تغییرات معنی‌داری در تولید لیپوپپتیدهای حلقوی ایجاد می‌کند. اضافه کردن غلظت مناسب از سولفات آهن در مراحل مختلف رشد باکتری موجب افزایش معنی‌داری در تولید سورفکتین می‌شود؛ به طوری که مقدار سورفکتین از $4 \mu\text{m}$ به بیش از 3500 mg l^{-1} می‌رسد (Wei and Chu, 1998). فلزات تأثیرگذار دیگر در تولید سورفکتین، منگنز و منیزیم می‌باشند. غلظت مناسب از یون Mn^{2+} تأثیر بسیار مهمی در افزایش تولید سورفکتین توسط باکتری *B. subtilis* دارد. اضافه کردن ۰/۰۱ میلی‌مول منگنز موجب افزایش تولید سورفکتین از $0/33 \text{ g l}^{-1}$ به $2/6 \text{ g l}^{-1}$ می‌شود (Wei and Chu, 2002). لی^۱، در سال ۲۰۱۱ نیز از فلزات روی، آهن، منگنز و منیزیم جهت بهینه‌سازی تولید بیوسورفکتانت‌ها استفاده کرده است. بر طبق نتایج وی، سولفات منگنز و سولفات منیزیم با غلظت‌های به ترتیب، $0/1 \text{ g l}^{-1}$ و $0/5 \text{ g l}^{-1}$ بیشترین تأثیر را در میزان تولید بیوسورفکتانت‌ها داشته‌اند (رفرنس). در تحقیق حاضر میزان تولید سورفکتین در دو محیط پایه و اصلاح‌شده در زمان‌های متفاوت کشت بررسی شد. این دو محیط از نظر منابع نیتروژن و غلظت عناصر مؤثر منگنز و آهن با هم تفاوت داشتند. از آنجایی که منابع نیتروژن معدنی نسبت به آلی در تولید سورفکتین مؤثرتر هستند، یکی از علل موفق‌تر بودن محیط اصلاح‌شده در تولید سورفکتین را می‌توان به جایگزین شدن آمونیوم نترات با شربت خیسانه ذرت نسبت داد. علاوه بر این، فلزات آهن و منگنز نیز در تولید لیپوپپتیدهای حلقوی به خصوص سورفکتین بسیار مؤثر هستند که در ترکیب محیط اصلاح‌شده با توجه به نتایج سایر محققین از غلظت‌های کمتر نسبت به محیط پایه استفاده شد. به طور کلی کاهش یا افزایش تولید لیپوپپتیدهای حلقوی

^۱ Li

را نمی‌توان به اضافه کردن هر یک از این ترکیبات به تنهایی نسبت داد؛ چرا که تغییر غلظت هریک از این ترکیبات می‌تواند بر تأثیری که دیگری دارد، اثر بگذارد؛ بنابراین همواره باید بر ایند اثر ترکیبات موجود در محیط کشت باکتری در شرایط محیطی متفاوت مورد توجه قرار گیرد. نتایج آزمون‌های لیپاز و کاهش کشش سطحی آب از ۷۲ mN/m به ۳۰ mN/m نشان داد که این باکتری در تولید لیپوپتیدها توانمندی قابل توجهی دارد. آزمون جابه‌جایی با نفت خام و کنارزدن آن از سطح آب نشان داد که این جدایه از کارایی نسبتاً خوبی برخوردار است و اثر این بیوسورفکتانت می‌تواند در حذف باقی‌مانده‌های نفتی مورد بررسی قرار گیرد. در این تحقیق، خاصیت ضدقارچی لیپوپتیدهای حلقوی خالص‌سازی شده از *B. velezensis* UTB96 بر *Aspergillus flavus* به اثبات رسید.

شاکری و همکاران در تحقیقات خود ۹ گونه قارچ را انارهای آلوده داخل باغ و انبار جداسازی کردند و بر اساس گزارش آنها گونه *A. flavus* از توانایی بالایی در نفوذ و رشد و تکثیر برخوردار بود و در همه نمونه‌های آلوده بدون استثنا وجود داشته است (نقل از Afsharmanesh et al., 2014). در حال حاضر پوسیدگی میوه انار در انبار یا در مراحل بازاریابی، مهمترین مشکل انبارداری و مانع عمده صادرات میوه انار محسوب می‌شود؛ لذا با توجه به نتایج مؤثر این جدایه باکتری بر روی قارچ مذکور در شرایط آزمایشگاه، آزمایش‌ها و تحقیقات تکمیلی بیشتر می‌تواند در باغ جهت کاهش عوامل پوسیدگی انار انجام شود. اثبات شده است که تولید آنزیم لیپاز در باکتری‌ها همزمان با تولید بیوسورفکتانت می‌باشد (Colla et al., 2010). بنابراین آزمون تولید لیپاز راهی برای ارزیابی تولید بیوسورفکتانت‌ها محسوب می‌شود.

به‌طور کلی بهینه‌سازی تولید نوع خاصی از لیپوپتیدها به دلیل اشتراک در برخی مسیرهای بیوشیمیایی، کار آسانی نیست (Abdel-mawgoud et al. 2008). هر یک از اعضای این خانواده لیپوپتیدهای حلقوی خواص ضد میکروبی یا حشره‌کشی متفاوتی دارند؛ از این رو یافتن شرایط و منابع غذایی (کربن، ازت، نسبت آنها و مواد معدنی) مستلزم تحقیقات گسترده‌تری است که در حال انجام و تکمیل - شدن می‌باشد. ایتورین اگرچه به دلیل خواص ضدقارچی مشهور است اما کارهای تحقیقاتی بعدی نشان داد که خاصیت حشره‌کشی مناسبی دارد (Guinda et al., 2012).

بنابر نتایج این پژوهش، سویه *Bacillus velezensis* UTB96 توان بالقوه‌ای در تولید لیپوپتیدهای حلقوی و به‌ویژه سورفکتین دارد و بهینه‌سازی محیط کشت و عوامل محیطی تأثیر قابل معنی‌داری بر افزایش میزان تولید سورفکتین دارد. لذا این جدایه را می‌توان برای کاربردهای صنعتی و تولید تجاری بیوسورفکتانت‌ها پیشنهاد کرد و در حوزه‌های مختلف کشاورزی و کنترل بیولوژیک، در پزشکی و داروسازی، صنایع غذایی و در بخش‌های مختلف صنعت نفت از آنها بهره برد. این سویه در حال حاضر به صورت تجاری توسط شرکت بایوران تولید و استفاده می‌شود.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تهران و امکانات آزمایشگاهی شرکت فناوری زیستی طبیعت گرا (بایوران) انجام گرفته است. از آقای دکتر همایون مرادی مدیر عامل شرکت صمیمانه تشکر می‌شود. بررسی‌های مربوط به اندازه‌گیری سورفکتین و تفسیر نتایج مربوطه با همکاری انستیتو علوم غذایی و بیوتکنولوژی دانشگاه هوهنهایم آلمان انجام گرفته است.

References

- ABDEL-MAWGOUD, A. M., ABOLWAFI, M. M., & HASSOUNA, N. A.-H. 2008. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. Applied Biochemistry and Biotechnology, 150(3): 305- 325. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8155-x>

- AFSHARMANESH, H., AHMADZADEH, M., JAVAN-NIKKHAH, M., & BEHBOUDI, K. 2014. Improvement in biocontrol activity of *Bacillus subtilis* UTB1 against *Aspergillus flavus* using gamma-irradiation. Crop. Protection, 60: 83-92. (In Farsi with English summary). <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.02.013>
- 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 production. Plant Physiology, 134(1): 307-319. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028712>
- BANAT, I. M., SATPUTE, S. K., CAMEOTRA, S. S., PATIL, R., & NYAYANIT, N. V. 2014. Cost-effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. Frontiers in Microbiology, 5: 697-715. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00697>
- COLLA, L. M., RIZZARDI, J., PINTO, M. H., REINEHR, C. O., BERTOLIN, T. E., & COSTA, J. A. V. 2010. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. Bioresource Technology, 101(21): 8308-8314. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.086>
- GANCEL, F., MONTASTRUC, L., LIU, T., ZHAO, L. and NIKOV, I. 2009. Lipopeptide overproduction by cell immobilization on iron enriched light polymer particles. Process Biochemistry, 44: 975–978. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.023>
- GHRIBI, D., MNIF, I., BOUKEDI, H., KAMMOUN, R., & ELLOUZE-CHAABOUNI, S. 2011. Statistical optimization of low-cost medium for economical production of *Bacillus subtilis* biosurfactant, a biocontrol agent for the olive moth *Prays oleae*. African Journal of Microbiology Research, 5(27): 4927-4936. <https://doi.org/10.5897/ajmr11.1125>
- GUDINA, E. J., PEREIRA, J. F., RODRIGUES, L. R., COUTINHO, J. A., & TEIXEIRA, J. A. 2012. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in microbial-enhanced oil recovery. International Biodeterioration & Biodegradation, 68: 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.01.001>
- GUEZ, JS, VASSAUX, A, LARROCHE, C, JACQUES, P, COUTTE, F. 2021. New continuous process for the production of lipopeptide biosurfactants in foam overflowing bioreactor. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 28;9:678469. <https://doi: 10.3389/fbioe.2021.678469>
- HSIEH, F.C., Li, M.C., LIN, T.C. and 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. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4314-7>

- HOFEMEISTER, J., CONRAD, B., ADLER, B., HOFEMEISTER, B., FEESCHE, J., KUCHERYAVA, N., ZWINTSCHER, A. 2004. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide-and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(4): 363-378. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1056-y>
- INÈS M, DHOUBA G. 2015. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. *Peptides*, 71:100-12. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.006>
- JOSHI, S., YADAV, S., & DESAI, A. J. 2008. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by *Bacillus licheniformis* R2. *Biochemical Engineering Journal*, 41(2): 122-127. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.04.005>
- JOURDAN, E., HENRY, G., DUBY, F., DOMMES, J., BARTHELEMY, J.-P., THONART, P., & ONGENA, M. 2009. Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(4): 456-468. <https://doi.org/10.1094/mpmi-22-4-0456>
- KEARNS, D. B., CHU, F., RUDNER, R., & LOSICK, R. 2004. Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility. *Molecular Microbiology*, 52(2): 357-369. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.03996.x>
- KESHAVARZI, S., AHMAD ZADEH, M., MIRZAEI, S., BEHBOUDI, K., and BANDEH POUR, M. 2018. Enhancing surfactant production in *Bacillus subtilis* UTB96 by fermentation optimization. *Biocontrol in Plant Protection*. 5(2), 13-26. <https://doi.org/10.22092/bcpp.2018.117885>
- KLICH, M.A. 2002. Identification of Common Aspergillus species. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures. LUO, C., LIU, X., ZHOU, X., GUO, J., TRUONG, J., WANG, X., and CHEN, Z. 2015. Unusual biosynthesis and structure of locillomycins from *Bacillus subtilis* 916. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(19): 6601-6609. <https://doi.org/10.1128/AEM.01639-15>
- MIZUMOTO, S., & SHODA, M. 2007. Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(1): 101-108. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0994-9>
- MORIKAWA, M., DAIDO, H., TAKAO, T., MURATA, S., SHIMONISHI, Y., & IMANAKA, T., 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *Journal of Bacteriology*, 175(20): 6459-6466. <https://doi.org/10.1128/jb.175.20.6459-6466.1993>

- ONGENA, M., DUBY, F., JOURDAN, E., BEAUDRY, T., JADIN, V., DOMMES, J., & THONART, P. 2005. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5): 692-698. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1741-0>
- ONGENA, M., & JACQUES, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3): 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- RAAIJMAKERS, J. M., DE BRUIJN, I., NYBROE, O., & ONGENA, M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6): 1037-1062. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x>
- SAMAD, M. Y. A., RAZAK, C. N. A., SALLEH, B., YUNUS, W. Z. W., AMPON, K. & BASRI, M. 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of Microbiological Methods*, 9(1): 51-56. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(89\)90030-4](https://doi.org/10.1016/0167-7012(89)90030-4)
- ZHU, Z., ZHANG, J., WU, Y. , RAN, W., & SHEN, Q. 2013. Comparative study on the properties of lipopeptide products and expression of biosynthetic genes from *Bacillus amyloliquefaciens* XZ 173 in liquid fermentation and solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(11): 2105-2114. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1375-4>

