مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره پنجم، شماره نوزدهم - تابستان ۱۳۹۴

Research Article
مقاله تحقیقی

تولید بیوسورفکتانت توسط لاکتوباسیلوس جهت استفاده در صنایع غذایی به عنوان جایگزینی برای امولسیفایرهای سنتزی

پریوش کیانی[۱] ، محمد مهدی محمودی*[۲]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

چکیده:

سابقه و هدف: بیوسورفکتانت‌ها یا بیوامولسیفایرها ترکیبات کاهش دهنده کشش سطحی بوده که توسط بسیاری از باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌شوند. اهمیت این ترکیبات را در مقایسه با سورفکتانت های سنتزی می توان در عدم سمیت، سازگاری با محیط زیست، فعالیت در دما، pHو شوری بالا برشمرد. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس های تولیدکننده بیوسورفکتانت و ارزیابی میزان کارآیی بیوسورفکتانت تولید شده بود.

مواد و روش ها: در این پژوهش، نمونه گیری از محصولات لبنی و کشت در محیط MRS انجام شد. سویه های جداسازی شده با قابلیت تولید بیوسورفکتانت بر اساس تست های بیوشیمیایی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند. شرایط بهینه تولید بیوسورفکتانت بررسی گردید و فعالیت امولسیفایری آن در یک سیستم مدل غذایی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته ها: در مجموع ۹ سویه لاکتوباسیلوس از محصولات لبنی جدا شد که در بین آنها ۲ سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس پنتوزوس بیشترین قابلیت تولید بیوسورفکتانت را دارا بودند. بیوسورفکتانت های استخراج شده از هر ۲ باکتری نشان دادند که از قابلیت مناسبی در فرایند امولسیون کنندگی برخوردار هستند.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که می توان سویه هایی از لاکتوباسیلوس با قابلیت مناسب تولید بیوسورفکتانت جداسازی نمود و در صورتی که بتوان هزینه های تولید را کاهش داد، امکان بکارگیری چنین سویه هایی جهت تولید بیوسورفکتانت در مقیاس صنعتی به منظور جایگزینی برای امولسیفایرهای سنتزی در صنایع غذایی وجود دارد.

کلمات کلیدی: لاکتوباسیلوس، بیوسورفکتانت، عوامل فعال سطحی

مقدمه:

لاکتوباسیلوس ها گروه مهمی از باکتری های تولید کننده اسید لاکتیک می باشند. گونه های موجود در این جنس از نظر خصوصیات فنوتیپی، بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و حتی میزان بازهای گوانین و سیتوزین (GC) بسیار ناهمگون هستند. اینها باکتری هایی گرم مثبت، بدون اسپور، کاتالاز منفی، میکروآئروفیل و به شکل میله های بلند، باریک و گاهی خمیده و کوتاه به شکل کوکوباسیل دیده می‌شوند. این باکتری‌ها از اجزای اصلی فلور میکروبی محصولات لبنی بوده و به عنوان کشت آغازگر محصولات لبنی تخمیری و دیگر انواع غذا های تخمیری مانند سوسیس، کالباس، ترشیجات و ... بکار گرفته می‌شوند.

لاکتوباسیلوس ها در طعم فراورده‌های غذایی دخالت داشته و به شکل پروبیوتیک های غذایی استفاده می شوند(۱۷). این باکتری ها انرژی خود را از طریق تخمیر کربوهیدرات ها و تولید اسیدلاکتیک به دست می آورند و می توان گفت که این باکتری ها تخمیرکننده های اجباری می باشند(۱). اثر حفاظتی لاکتوباسیلوس در نگه داری غذاهای تخمیری به طور عمده به

نویسنده مسئول : گروه میکروبیولوژی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
پست الکترونیک: mmmahmoodi636@yahoo.com
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۰۵/۰۸
تاریخ پذیرش : ۱۳۹۳/۱۲/۱۱

دلیل شرایط اسیدی است که توسط این باکتری ها در غذا ایجاد می شود. تبدیل کربوهیدرات ها به اسیدهای آلی (اسید لاکتیک و اسید استیک) به همراه کاهش pH، باعث افزایش نیمه عمر و بهبود کیفیت فراورده های غذایی تخمیری می‌شود (۱۲). یکی از ویژگی‌های لاکتوباسیلوس ها توانایی آنها در تولید ترکیبات بیوسورفکتانت می‌باشد. بیوسورفکتانت‌ها ترکیباتی هستند که قادرند با قرار گرفتن در حد فاصل سیالات غیر قابل امتزاج موجب کاهش کشش سطحی و بین سطحی در حد فاصل مایعات، جامدات و گازها شده و امکان ادغام شدن یا پراکنده شدن این ترکیبات را بصورت امولسیون در آب و یا دیگر سیالات تسهیل کنند (۲، ۲۲). این ها گروه متنوعی از ترکیبات بوده که توسط برخی از باکتری ها، قارچ ها و جلبک ها تولید می شوند (۵). به طورکلی سورفکتانت ها ترکیباتی آمفی فیلیک بوده که شامل یک بخش قطبی و محلول در آب و یک بخش غیر قطبی و محلول در چربی می باشند و همین ویژگی آن ها باعث شده که در صنایع مختلفی از جمله صنعت نفت، پتروشیمی، داروسازی، آرایشی، پزشکی، کشاورزی، نساجی، صنایع غذایی و بسیاری از صنایع دیگر کاربرد داشته باشند. سورفکتانت ها به ویژه کاربرد بالقوه ای در صنایع غذایی دارند و در حال حاضر گروهی از این ترکیبات به عنوان امولسیفایرهای مجاز در مواد غذایی بکار می روند به عنوان مثال لسیتین و مشتقات آن، استرهای اسید چرب حاوی گلیسرول سوربیتان یا اتیلن گلیکول در تمام دنیا به عنوان امولسیفیه کننده در موادغذایی مورد استفاده قرار می گیرند(۶، ۱۵). از قابلیت های دیگر این ترکیبات می توان به پایدارسازی امولسیون ها و بالا بردن میزان کف سازی اشاره کرد. از مزایای عمده بیوسورفکتانت نسبت به سورفکتانت های سنتزی می توان به سمیت کمتر، قدرت تجزیه زیستی بالا، سازگاری زیست محیطی، چند عملکردی بودن آن ها و فعالیت پایدار آن ها تحت شرایط سخت محیطی مانند دمای بالا، pH و شوری اشاره کرد(۷). هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس های تولید کننده بیوسورفکتانت و بررسی خصوصیات امولسیفایری آن ها بود بگونه ای که بتوان از این ترکیبات به عنوان یک امولسیفایر طبیعی در صنعت غذا استفاده کرد.

مواد و روش ها

نمونه گیری و جداسازی لاکتوباسیلوس

به منظورجداسازی لاکتوباسیلوس ها، از محصولات لبنی که منابع غنی از این باکتری می باشند استفاده شد. برای این منظور، نمونه هایی از ماست، کشک و پنیر از مراکز تهیه محصولات لبنی فراهم شده و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. همه نمونه ها با استفاده از آب مقطر استریل رقیق سازی شدند و رقت های 10^{-1} تا 10^{-5} تهیه شد. پس از رقیق سازی ، نمونه ها در محیط کشت جامد MRS (مرک آلمان) که محیط اختصاصی برای رشد و جداسازی لاکتوباسیلوس می باشد کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس درون جار شمعی تحت شرایط میکروآئروفیلیک قرار داده شدند. کلنی های رشد کرده توسط رنگ آمیزی گرم و تست های بیوشیمیایی مورد شناسایی اولیه قرار گرفتند.

غربالگری باکتری های تولید کننده بیوسورفکتانت

کلنی های جداسازی شده لاکتوباسیلوس که با روش بیوشیمیایی شناسایی شده بودند را در محیط کشت مایع MRS به مدت ۲۴ ساعت کشت داده و مایع رویی کشت باکتری به کمک سانتریفیوژ کردن با دور ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه بدست آمد و به کمک چند تست ویژه توانایی تولید بیوسورفکتانت مورد ارزیابی قرار گرفت.

۱- تست همولیز: معمولا گونه هایی از لاکتوباسیلوس که توانایی تولید بیوسورفکتانت را دارند از توانایی ایجاد همولیز نیز بهره مند می باشند لذا در این تحقیق کلنی خالص باکتری بر روی آگار خوندار کشت داده شد و فعالیت همولیزی آن مورد بررسی قرار گرفت(۹).

۲- تست گسترش روغن: میزان ۳۰ میلی لیتر آب مقطر درون یک پتری دیش ریخته و ۲۵۰ میکرولیتر روغن مایع خوراکی بصورت یک لایه نازک به سطح آن اضافه گردید سپس ۱۰۰میکرولیتر از مایع کشت باکتری به سطح روغن اضافه شد. کنار رفتن روغن و مشاهده ناحیه شفاف در سطح آب موید حضور بیوسورفکتانت بود(۲۱).

۳- تست پخش شدن قطره: میزان ۵۰ میکرولیتر از مایع کشت باکتری بصورت یک قطره در سطح پارافیلم قرار داده شد. مسطح شدن قطره در سطح پارافیلم به دلیل کاهش کشش سطحی، به معنای حضور بیوسورفکتانت بود(۱۶).

۴- تست شاخص امولسیفیکاسیون: میزان ۲میلی لیتر از مایع کشت باکتری و ۱میلی لیتر روغن مایع درون یک لوله آزمایش ریخته شد و به مدت ۲ دقیقه به شدت به کمک ورتکس مخلوط گردید، سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد نهایتا به کمک خط کش میلی متری شاخص امولسیون کنندگی از تقسیم نمودن ارتفاع لایه امولسیون شده بر ارتفاع کل مخلوط محاسبه گردید. هر چه ارتفاع لایه امولسیون شده نسبت به ارتفاع کل مخلوط بیشتر باشد شاخص امولسیون بالاتر است. بالاتر بودن شاخص

امولسیون، بیانگر این مطلب خواهد بود که عامل امولسیون کننده از قدرت بیشتری برخوردار بوده و با راندمان بهتری می تواند دو فاز تشکیل دهنده امولسیون را در هم ادغام نماید که این مسئله در صنایع غذایی از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۸).

ضمنا در هر سه روش ذکر شده اخیر، از بافر PBS با pH= 7.0 به عنوان کنترل منفی و از محلول سدیم دو دسیل سولفات (SDS) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

تولید و استخراج بیوسورفکتانت

تولید، استخراج و خالص سازی نسبی بیوسورفکتانت در طی چندین روز انجام گرفت. ابتدا باکتری در یک ارلن حاوی ۲۰۰میلی لیتر محیط MRS broth کشت داده شد و به مدت ۳ شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه گرمخانه گذاری گردید. سپس محتویات ارلن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و دور ۱۴۰۰۰rpm با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار سانتریفیوژ گردید تا سلول های باکتریایی کاملا ته نشین شوند. توسط اسید کلریدریک ۱ نرمال، pHمایع رویی بدست آمده را به ۲ رسانده و به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد تا بیوسورفکتانت رسوب کند. رسوب قهوه ای حاوی بیوسورفکتانت با استفاده از سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه در۱۲۰۰۰rpm جداسازی شد. جهت خالص سازی نسبی بیوسورفکتانت، ۱۰ میلی لیتر مخلوط کلروفرم /متانول به نسبت v/v۲:۱ به رسوب بدست آمده افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰rpm در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. این ترکیب را دوباره در۱۲۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ کرده سپس مایع رویی در گرمخانه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا کاملا خشک شود. در نهایت بیوسورفکتانت به صورت رسوب سفید رنگ از مایع رویی بدست آمد(۲۰).

اثر فاکتورهای محیطی بر تولید بیوسورفکتانت

به منظور بررسی اثر عوامل مختلف بر تولید بیوسورفکتانت، چهار فاکتور دما، pH، زمان و غلظت های نمک مورد مطالعه قرار گرفتند و در هر مورد ضریب امولسیون کنندگی بیوسورفکتانت تولید شده، مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی اثر دما، نمونه ها در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۷، ۴۵و۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. برای مشاهده اثر pH، از محیط کشت اولیه با pHهای ۳، ۵، ۷ و۹ استفاده گردید. جهت بررسی اثر مدت زمان گرمخانه گذاری بر تولید بیوسورفکتانت، محیط های کشت باکتری به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و۹۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند و برای مشاهده اثر غلظت های مختلف نمک NaCl، از محیط کشت حاوی نمک با غلظت های ۰ ، ۲ ، ۴ ، ۶ ، ۸ و۱۰ استفاده شد.

اندازه گیری میزان پایداری و فعالیت امولسیونی بیوسورفکتانت

برای اندازه گیری فعالیت امولسیونی بیو سورفکتانت تولید شده، میزان ۱ میلی گرم از بیوسورفکتانت استخراج شده را در ۳ میلی لیتر بافر فسفات با pH= 7.0حل نموده و ۱میلی لیتر روغن مایع خوراکی به عنوان سوبسترا به آن افزوده شد و به مدت ۲ دقیقه با سرعت بالا ورتکس شد سپس به مدت ۱۰ دقیقه بی حرکت رها نموده و پس از این مدت میزان کدورت مخلوط حاصله توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. عدد بدست آمده فعالیت امولسیونی محسوب می شود. هر چه عدد خوانده شده با دستگاه اسپکتروفتومتر بالاتر باشد فعالیت امولسیون کنندگی نیز بالاتر خواهد بود. در این تست از بافر PBS به عنوان کنترل منفی و از ماده SDS به عنوان کنترل مثبت استفاده شد(۱۸، ۱۹).

جهت بررسی میزان ثبات و پایداری امولسیون تولید شده نیز، پس از اندازه گیری فعالیت امولسیفیکاسیون، جذب نوری امولسیون هر ۱۰ دقیقه یکبار، به مدت ۶۰ دقیقه در ۵۴۰ نانومتر اندازه گیری شد. لگاریتم جذب نور های بدست آمده در زمان های مختلف تعیین شده و منحنی مربوط به آن ترسیم گردید. شیب منحنی بیان کننده میزان ثبات امولسیون می باشد. هرچه شیب منحنی کمتر باشد امولسیون پایدارتر بوده که این امر در صنعت غذا بسیار حائز اهمیت می باشد(۱۸، ۱۹).

همچنین در این تحقیق به منظور بررسی میزان کارایی بیوسورفکتانت تولیدی ، طی آزمایشی بیوسورفکتانت خالص سازی شده را با لسیتین که به عنوان امولسیفایر سنتزی در صنایع غذایی به فراوانی مورد مصرف قرار می گیرد مورد مقایسه قرار دادیم به این صورت که ۱میلی گرم بیوسورفکتانت استخراج شده در یک ترکیب آب و روغن (آفتابگردان) به نسبت ۲:۱ میلی لیتر ریخته شد و به مدت دو دقیقه به شدت ورتکس گردید. در مورد لسیتین نیز ۵ از این ماده به مخلوط آب و روغن با نسبت ذکر شده افزوده شد.

شناسایی مولکولی باکتری های تولید کننده بیوسورفکتانت

شناسایی ژنوتیپی جدایه های لاکتوباسیلوس با استفاده از تکثیر قطعه ای از توالی ژن 16SrDNA مربوط به باکتری ها انجام گرفت. به این صورت که پس از استخراج DNA باکتری ها با روش جوشاندن، واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای همگانی 27F و 1492R بر روی آنها انجام شد و در نهایت با روش تعیین توالی و مراجعه به بانک ژنی ، سویه های جداسازی شده مورد شناسایی قرار گرفتند.

یافته ها

در این مطالعه براساس روش های بیوشیمیایی ۹ گونه لاکتوباسیلوس شناسایی شد که از بین آنها براساس قابلیت تولید بیوسورفکتانت ، دو گونه برتر انتخاب شدند. این دو گونه پس از شناسایی مولکولی و تعیین توالی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس پنتوزوس شناخته شدند.

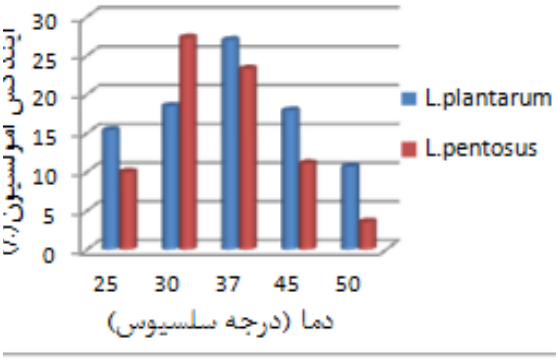
جهت بررسی قابلیت تولید بیوسورفکتانت یکسری تست های ویژه انجام گرفت . در تست همولیز، هر دو گونه جداسازی شده از قابلیت ایجاد همولیز بتا در محیط آگار خوندار برخوردار بودند. در تست گسترش روغن، شیرابه کشت هر دو گونه لاکتوباسیلوس با کنار زدن لایه روغنی در سطح آب، ناحیه شفافی را ایجاد کردند، در حالی که بافر PBS (به عنوان کنترل منفی) در سطح روغن هیچ گونه تغییری ایجاد نکرد(شکل ۱).

شکل ۱: هاله ایجاد شده توسط شیرابه کشت باکتری در تست گسترش روغن

در تست پخش شدن قطره، شیرابه کشت باکتری ها، با کاهش کشش سطحی و مسطح و پهن شدن در سطح پارافیلم نشان دادند که دارای بیوسورفکتانت می باشند(شکل ۲).

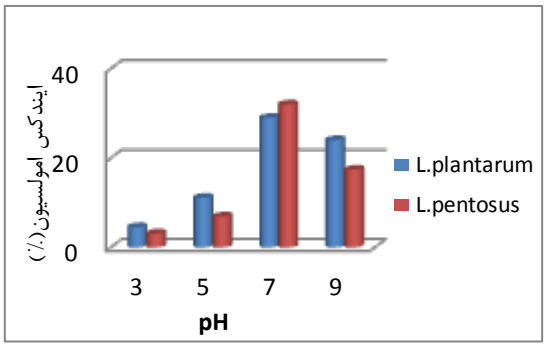
شکل ۲: نتایج حاصل از تست پخش شدن قطره توسط دو سویه (از راست به چپ لاکتوباسیلوس پلانتاروم ، آب مقطر، لاکتوباسیلوس پنتوزوس، SDS)

نتایج حاصل از فعالیت امولسیفیکاسیون نشان داد که از میان سویه های مورد بررسی ، این دو گونه با بیش از ۴۵ درصد فعالیت امولسیفیه کنندگی، سویه‌های مناسبی برای تولید بیوسورفکتانت می‌باشند.



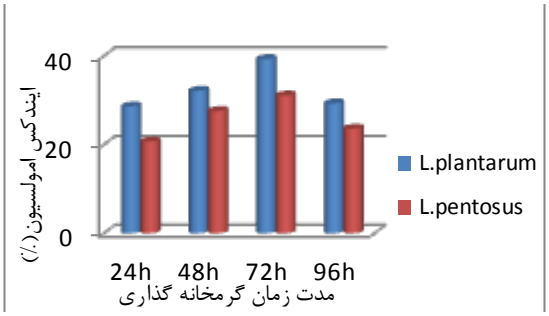
نمودار۱ : میزان فعالیت امولسیون کنندگی در دماهای مختلف

در بررسی اثر فاکتورهای محیطی بر تولید بیوسورفکتانت مشخص گردید که فاکتور دما تاثیر زیادی بر میزان تولید بیوسورفکتانت دارد که در این تحقیق توسط شاخص امولسیون کنندگی مشخص شد. طبق نتایج بدست آمده بالاترین شاخص امولسیون کنندگی لاکتوباسیلوس پلانتاروم در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و در خصوص لاکتوباسیلوس پنتوزوس در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بود ضمن اینکه کمترین فعالیت امولسیون کنندگی در هر دو باکتری در دمای ۵۰ درجه سلسیوس مشاهده شد(نمودار۱).



نمودار۲ : میزان فعالیت امولسیون کنندگی در pH های مختلف

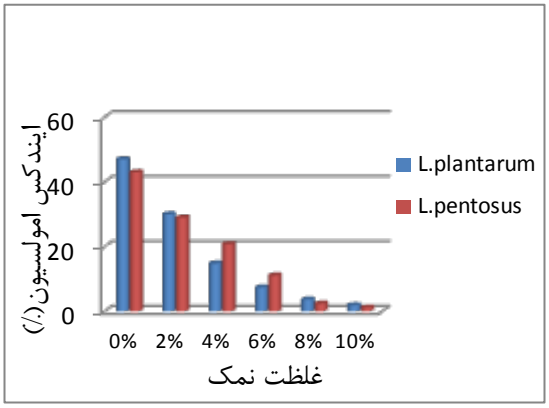
با بررسی اثر pHبر تولید بیوسورفکتانت مشاهده گردید که بیشترین میزان تولید در هر دو باکتری در pH=7.0و کمترین میزان تولید در pH=3.0انجام می گیرد (نمودار۲).



نمودار۳ : میزان فعالیت امولسیون کنندگی در زمان های مختلف

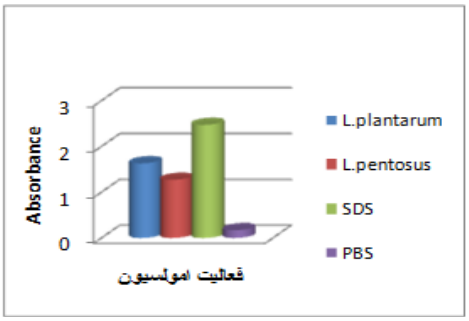
بررسی اثر فاکتور زمان بر میزان تولید بیوسورفکتانت نشان داد که میزان تولید در مورد هر دو باکتری با گذشت زمان یعنی از روز اول تا روز سوم به تدریج افزایش یافته اما در روز چهارم مجددا میزان تولید کاهش یافت(نمودار۳).

در بررسی اثر غلظت های مختلف نمک بر تولید بیوسورفکتانت، بیشترین میزان تولید در مورد هر دو باکتری در غلظت ۰ نمک صورت گرفت و با افزایش غلظت نمک شاخص امولسیون کاهش یافت (نمودار ۴).

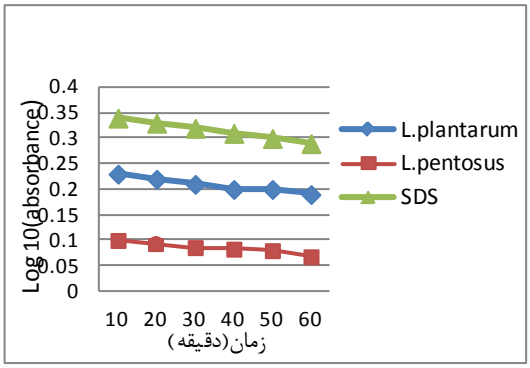


نمودار۴ : میزان فعالیت امولسیون کنندگی در غلظت های مختلف نمک

بررسی میزان فعالیت امولسیون کنندگی و میزان پایداری امولسیون ایجاد شده نشان داد که بیوسورفکتانت تولید شده توسط گونه پلانتاروم از فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون بالاتری در مقایسه با گونه پنتوزوس برخوردار می باشد (نمودارهای ۵ و ۶).

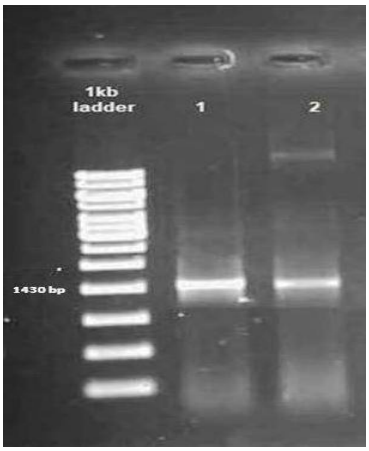


نمودار۵ : میزان فعالیت امولسیون



نمودار۶ : میزان ثبات امولسیون

شناسایی مولکولی محصولات PCR هر یک از نمونه‌ها که مربوط به ناحیه ژنی 16S rDNA بود و با استفاده از آغازگرهای27F و1492R صورت گرفت توالی‌هایی حدود ۱۴۳۰ جفت باز را نشان داد (شکل ۳). دو سویه جداسازی شده براساس مطابقت دهی با اطلاعات موجود در سایت NCBI به میزان ۱۰۰ با باکتریهای لاکتوباسیلوس پلانتاروم سوش R-LP4و لاکتوباسیلوس پنتوزوس سوش JCM 1558 خویشاوندی داشتند.



شکل۳: باندهای ناحیه تکثیر شده 16S rDNA مربوط به سویه‌های جداسازی شده

(۱: لاکتوباسیلوس پلانتاروم ، ۲: لاکتوباسیلوس پنتوزوس)

نتایج حاصل از مقایسه بیوسورفکتانت تولید شده توسط دو باکتری با لسیتین نشان داد که هر سه مورد فعالیت امولسیون کنندگی برابری داشتند و قادر بودند ترکیب آب و روغن را بطور کامل در هم ادغام کنند و تشکیل امولسیون دهند. ولی با گذشت زمان دو روز، ثبات امولسیون ایجاد شده توسط هر دو گونه لاکتوباسیلوس در مقایسه با لسیتین تا حدودی کاهش یافت (شکل ۴).

شکل۴: امولسیون تشکیل شده توسط بیوسورفکتانت استخراج شده توسط دو سویه (از راست به چپ: لسیتین ، لاکتوباسیلوس پنتوزوس، لاکتوباسیلوس پلانتاروم)

بحث:

هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس های تولید کننده بیوسورفکتانت، بررسی شرایط بهینه تولید بیوسورفکتانت و همچنین مطالعه ویژگی های بیوسورفکتانت تولیدی جهت بکارگیری در صنایع غذایی به منظور ایجاد امولسیون های پایدار بود. جداسازی اولیه باکتری با استفاده از محیط کشت MRS که محیط اختصاصی لاکتوباسیلوس ها می باشد انجام گرفت. غربالگری سویه های جداسازی شده با تست های مربوطه نشان داد که از میان ۹ گونه لاکتوباسیلوسی که از محصولات لبنی جداسازی شدند، دو گونه توانایی تولید بیوسورفکتانت را داشتند. شناسایی مولکولی این دوگونه به روش PCR و تعیین توالی ژن 16SrDNA نشان داد که سویه جدا شده از ماست با سویه لاکتوباسیلوس پنتوزوس JCM 1558 و سویه جدا شده از کشک با سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم R-LP4 به میزان ۱۰۰ خویشاوندی دارند.

تحقیقات متعدد نشان داده است که علاوه بر لاکتوباسیلوس ها، بسیاری از میکروارگانیسم های دیگر نیز قادر به تولید بیوسورفکتانت می باشند. اگرچه اکثر تحقیقات در خصوص میکروارگانیسم های تولیدکننده بیوسورفکتانت در آب، خاک و مناطق آلوده به هیدروکربن ها صورت گرفته اما این تحقیق و تحقیقات مشابه تولید این ترکیبات را در لبنیات و مواد غذایی مورد توجه قرار داده است. به عنوان مثال Suresh Chander و همکارانش در سال ۲۰۱۲ توانستند از باسیلوس سوبتیلیس بیوسورفکتانتی جدا کنند که به عنوان امولسیفایر در صنایع غذایی نقش نگه دارنده را داشته باشد(۲۰). کسری کرمانشاهی و همکارانش توانستند از محصولات لبنی لاکتوباسیلوسی جدا کنند که خاصیت بیوسورفکتانتی داشته است (۱۴).

در مطالعاتی که با هدف جداسازی باکتری های مولد بیوسورفکتانت از منابع مختلف صورت گرفته به طور معمول از تست همولیز به عنوان معیاری برای جداسازی اولیه سویه های مولد بیوسورفکتانت استفاده شده است. فعالیت همولیتیک باکتری های تولیدکننده بیوسورفکتانت اولین بار در سال ۱۹۷۰ توسط Bernheimer و Avigad در خصوص بیوسورفکتانت تولید شده توسط باسیلوس سوبتیلیس گزارش شد(۴). هر دو باکتری مورد مطالعه ما در این تحقیق نیز قادر به تجزیه گلبول های قرمز و ایجاد هاله شفاف همولیز اطراف کلنی ها بودند. روش دیگر برای تایید تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری ها، تست گسترش روغن می باشد. در این روش ، زمانی که قطره ای از محلول حاوی بیوسورفکتانت در مجاورت روغن شناور بر سطح آب قرار گیرد هاله شفافی تشکیل می شود. در تست پخش شدن قطره، قطره ای که حاوی بیوسورفکتانت است در یک سطح هیدروفوبیک مسطح و پهن خواهد شد این روش ساده بوده و برای غربالگری همزمان تعداد زیادی از سویه ها استفاده می شود. راه دیگر غربالگری سویه های مولد بیوسورفکتانت، فعالیت امولسیفیه کنندگی آن ها می باشد(۳). فعالیت امولسیفیه کنندگی یک امولسیفایر، به میزان تمایل آن نسبت به سوبسترای هیدروکربنی آن وابسته است. طبق نتایج به دست آمده در این تحقیق ، فعالیت امولسیون کنندگی در هر دو سویه جداسازی شده بالای ۴۵ درصد بود که در مقایسه با SDS با ۶۰ درصد فعالیت امولسیون کنندگی که یک کاهش دهنده قوی کشش سطحی بوده و به عنوان کنترل مثبت در این تحقیق استفاده شده، عملکرد مطلوبی را نشان می دهند.

در این تحقیق اثر یکسری فاکتورهای محیطی نیز بر میزان و قابلیت تولید بیوسورفکتانت مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی اثر دما مشخص شد که بالاترین میزان تولید بیوسورفکتانت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای گونه پلانتاروم و ۳۰ درجه سلسیوس برای گونه پنتوزوس بوده است. در مطالعه ای که توسط Husamو همکارانش در سال ۲۰۱۳ بر روی اثر دما بر تولید بیوسورفکتانت در باکتری ازتوباکتر کروکوسیوم صورت گرفت مشخص شد که دمای ۳۰ درجه سلسیوس مناسب ترین دما برای تولید بیوسورفکتانت می باشد(۱۰). در بررسی اثرpH در مطالعه حاضر مشخص گردید که بهینه pH برای هر دو سویه شرایط خنثی یعنی pH=7.0 می باشد. در تحقیقی که در سال ۲۰۱۰ بر روی تولید بیوسورفکتانت در pH های مختلف در باکتری اسینتوباکتر صورت گرفت نیز نتایج موید این امر بود که بیشترین میزان تولید بیوسورفکتانت در pH =7.0صورت می گیرد (۱۱).

در این تحقیق مشخص گردید که بهترین غلظت نمک برای تولید بیوسورفکتانت توسط هر دو سویه، غلظت صفر و مناسب ترین دوره زمانی برای تولید بیوسورفکتانت روز سوم گرمخانه گذاری بوده است. Husamو همکارانش همچنین با بررسی اثر زمان بر روی تولید بیوسورفکتانت نشان دادند که بیشترین میزان تولید بیوسورفکتانت در طی ۶ روز، در روز چهارم بود که به ماکزیمم مقدار خود رسید و به تدریج کاهش یافت(۱۰). Karanth و همکارانش نیز در طی تحقیقات خود بیان کردند که کمیت و کیفیت بیوسورفکتانت تولید شده، بواسطه pH، دما و غلظت نمک تحت تاثیر قرار می گیرد(۱۳).

در این تحقیق به منظور بررسی میزان کارایی بیوسورفکتانت تولیدی، طی آزمایشی بیوسورفکتانت خالص سازی شده را با لسیتین که به عنوان امولسیفایر سنتزی در صنایع غذایی به فراوانی مورد مصرف قرار می گیرد مورد مقایسه قرار دادیم که نتایج بدست آمده نشان داد که یک ساعت پس از تشکیل امولسیون، بیوسورفکتانت یا بیوامولسیفایر تولید شده توسط هر دو گونه لاکتوباسیلوس توان امولسیون کنندگی برابری با لسیتین به عنوان یک امولسیفایر صنعتی از خود نشان دادند.

هم چنین بررسی ثبات امولسیون ایجاد شده توسط هر دو گونه لاکتوباسیلوس پس از ۴۸ ساعت حاکی از آن بود که پایداری امولسیون ایجاد شده، نسبت به لسیتین کاهش یافت اما بیوامولسیفایر تولید شده توسط دو باکتری توان امولسیون کنندگی قابل ملاحظه ای از خود نشان دادند.

نتیجه گیری:

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان می دهد که بیوسورفکتانت تولید شده توسط سویه های مورد مطالعه، دارای توانایی قابل قبولی در کاهش کشش سطحی بوده و می توان از آنها به عنوان یک امولسیفایر طبیعی در صنایع غذایی استفاده کرد. با توجه به بی ضرر بودن امولسیفایر طبیعی تولید شده توسط گونه های لاکتوباسیلوس در مقایسه با امولسیفایرهای صنعتی که بعضی اثرات جانبی نامطلوبی دارند، می توان میزان سلامت محصول غذایی تولید شده را با این روش افزایش داد. با انجام تحقیقات بیشتر به منظور یافتن سوبسترای مناسب و ارزان قیمت جهت تولید بیوسورفکتانت می توان هزینه تولید این ترکیبات طبیعی را کاهش داده و صنایع غذایی را به سمت استفاده از امولسیفایرهای طبیعی و جایگزین نمودن آنها بجای امولسیفایرهای صنعتی سوق داد.

سپاسگزاری:

در خاتمه تحقیق لازم می دانیم از بخش آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد کازرون که در به ثمر رساندن این پژوهش نهایت همکاری را به عمل آوردند صمیمانه تشکر و قدردانی کنیم.

منابع:

۱.نوحی اشرف‌السادات ، میکروبیولوژی عمومی، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۱۳۶۷، ۱۰۰-۱۲۸.
2. Banat IM, Makkar RS, Cametora SS .Potential commercial application of microbial surfactants .ApplMicrobiolBiotechnol, 2000; 53:495-508.
3. Batista SB, Mounteer AH .Isolation and characterization of biosurfactant / bioemulsifier producing bacteria from petroleum contaminated sites. BioresourceTechnol, 2006; 97:868-875.
4. Bernbeimer AW, Avigad LS. Nature and properties of a cytological agent produced by Bacillus subtilis .J Gen Microbiol, 1970; 61 (3):361-369.
5. Besson F, Michel G .Biosynthesis of iturin and surfactin by Bacillus subtilis: Evidence for amino acid activating enzymes .BiotechnolLett, 1992; 14 (11):1013-1018.
6. Bodour AA, Gerrero-Barajas C, Maier M .Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by Flavolipid sp. Strain MTN11 .Appl and EnvMicrobiol, 2004; 10 (6):14-20.
7. Christofi N, Ivshina IB .Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. Appl Microbiol, 2002; 93 (6):915-929.
8. Cooper DG, Goldenberg BG .Surface active agents from two Bacillus species .Appl Environ Microbiol, 1987; 53:224-229.
9. Gerson DF .Biosurfactants production, properties, applications (surfactant science) CRC Press .The 1st edition, 1998; 269-270.
10. Husam SA, Ahmed I .Effect of Different Environmental and Nutritional Factors on Biosurfactant Production from Azotobacterchrococcum .IJAPBC, 2013; 2 (3):2277– 4688.
11. Jagtap S, Yavankar S, Pardesi K, Chopade P. Production of bioemulsifier by Acinetobacter species isolated form healthy human skin .Indian Journal of Experimental Biology, 2010; 48:70-76.
12. Kandler O, Nobert Weiss .Bergey's Manual of systematic Bacteriology, 1989; 1208-1234.
13. Karanth NGK, Deo PG, Veenading NK. Microbial production of biosurfactants and their importance .Curr Sci, 1999; 77 (1):116-126.
14. KasraKermanshahi R, Peymanfar SH .Isolation and Identification of Lactobacilli From Cheese, Yoghurt and Silage by 16SrRNA Gene and study of bacteriocin and biosurfactant production ,Jundishapur J Microbiol. 2012; **5** (4):528-532.
15. Kosaric N .Biosurfactants and their application for soil bioremediation .Food Technol and Biotechnol, 2001; 39 (4):295-304.
16. Kuiper I, Lagendijk EL, Pickford R, Derrick JP, Lamers GEM ,Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV .Characterization of two Pseudomonas putidalipopeptidebiosurfactants, putisolvin I and II,which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms .Mol Microbiol, 2004; 51 (1):97-113.
17. Lars A .Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In, Hoang-Dung T ,Fennema O ,Hui Y ,Walstra P ,Karel M, et al. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3th ed. New York, USA, Marcel Dekker Inc, 2004; 18-85.
18. Lee SC, Lee SJ, Kim SH, Park IH, Lee YS, Chung SY, Choi YL .Characterization of new biosurfactant produced by Klebsiella sp. Y6-1 isolated from waste soybean oil .BioresourTechnol,2008; 99 (7):2288-2292.
19. Pornsunthorntawee O, Wongpanit P, Chavadej S, Abe M, Rujiravanit R. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa SP4 isolated from petroleum-contaminated soil .BioresourTechnol, 2008; 99 (6): 1589-1595.
20. Suresh Chander CR, Lohitnath T, Mukesh Kumar D J, Kalaichelvan PT .Production and characterization of biosurfactant from bacillus subtilis MTCC441 and its evaluation to use as bioemulsifier for food bio – preservative .Adv App Sci Res, 2012; 3 (3):1827-1831.
21. Talaie AR. Parametric study of petroleum compounds biodegradation using microorganisms .Sci Res Azad Uni Branch Ahvaz, 2008; 21 (75):20-27. [full text in Persian]
22. Van Hamme JD, Singh A, Ward OP .Devoted to surfactants in microbiology and biotechnology .Biotechnol Advances, 2006; 24 (6):604-620.