ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(2):257-263

Biosurfactant Production Using Molasses by a Local Bacterium and Partial Characterization of Biosurfactants

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Najmi Z.*[1] *MSc,*
Ebrahimipour Gh.[1] *PhD*

How to cite this article
Najmi Z, Ebrahimipour Gh. Biosurfactant Production Using Molasses by a Local Bacterium and Partial Characterization of Biosurfactants. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11 (2):257-263.

[1]Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Biological Science and Technology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

***Correspondence**
Address: Department of Microbiology and Microbial Biotechnology, Faculty of Biological Science and Technology, Shahid Beheshti University, Daneshjou Boulevard, Shahid Chamran Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1983969411.
Phone: +98 (21) 29905905
Fax: +98 (21) 22431919
zibanajmi85@gmail.com

Article History
Received: May 15, 2019
Accepted: May 24, 2020
ePublished: July 07, 2020

ABSTRACT

Although biosurfactants have great advantages over chemical surfactants, their wider industrial applications have been constrained by their relatively high production cost. Using renewable, sustainable, and cheap substrates such as different industrial by-products and wastes maybe decrease biosurfactant production costs. Since in different countries, there are a variety of by-products and wastes so variable substrates are used in different countries. In addition, to hydrocarbon compounds, molasses has been considered as a dominant by-product in Iran. In the current study, among 16 crude oil-degrading isolates, Pseudomonas aeruginosa sp. ZN was selected as the most efficient biosurfactant producer by preliminary methods for detection of biosurfactant producing bacteria. For investigation of the best concentrations of molasses for bacterial growth and biosurfactant production, a wide range of molasses concentrations from 2-12% (v/v) were used. This strain was able to grow and produce biosurfactant in all range of molasses concentrations while the best concentrations were 4-6% (v/v). The concentrations more than 6% decreased the growth and production process. Acid precipitation and solvent extract (ethyl acetate: hexane) methods were carried out for recovery of biosurfactant from the culture broth, then results of spraying on developed TLC and staining fermentation broth without bacterial cells showed the two produced biosurfactants were glycolipid.

Keywords By-Products; Molasses; Biosurfactant Producer; Recovery; Partial Detection

CITATION LINKS

[1] Environmental applications of biosurfactants ... [2] Enhanced biosurfactant production ... [3] Biochemical and molecular detection of biosurfactant ... [4] Bioemulsification activity assessment of an ... [5] Isolation of biosurfactant-producing bacteria ... [6] Rhamnolipids are conserved biosurfactants molecules ... [7] Surface-active compounds and their role in the ... [8] Potential commercial applications of microbial ... [9] Rhamnolipid production by Pseudomonas aeruginosa ... [10] Towards commercial production of microbial ... [11] Cost effective technologies and renewable ... [12] Production of biosurfactants using substrates ... [13] Characterization of pullulan produced from ... [14] Optimization of xanthan gum production by Xanthomonas ... [15] Lead (II) uptake during baker's yeast production ... [16] Citric acid production by selected mutants of ... [17] Production of fructo-oligosaccharides from molasses by ... [18] Multi-response optimization of rhamnolipid production ... [19] Isolation and selection of biosurfactant-producing ... [20] Isolation and screening of biosurfactants produced ... [21] Application of a modified drop-collapse technique ... [22] A study on the structure-function relationship ... [23] An efficient biosurfactant-producing bacterium ... [24] Comparison of methods to detect biosurfactant production ... [25] Use of different methods for detection of thermophilic ... [26] Biosurfactant production in sugar beet molasses ... [27] Biosurfactant production by Bacillus subtilis using corn ... [28] Protocols for the detection and chemical characterisation of ... [29] Characteristics of biosurfactant produced by ... [30] Isolation of biosurfactant-producing ... [31] Isolation and Analysis of Low Molecular ... [32] Hydrolityczna i hemolityczna aktywnosc paleczek ... [33] Rhamnolipids: Detection, analysis, biosynthesis, genetic ... [34] Kinetics of biosurfactant production by Pseudomonas ... [35] Molasses as a whole medium for biosurfactants ... [36] Biosurfactant production using molasses and ... [37] Biosurfactant production by Pseudomonas ... [38] Environmental importance of rhamnolipid production ...

Copyright© 2020, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

تولید بیوسورفاکتانت با استفاده از ملاس توسط یک باکتری بومی و شناسایی نسبی بیوسورفاکتانت‌ها

زیبا نجمی* MSc
گروه میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
زهرا PhD
گروه میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده
علی‌رغم مزیت‌های بیوسورفاکتانت‌ها در مقابل سورفاکتانت‌های شیمیایی، به‌دلیل هزینه‌های بالای تولید استفاده گسترده از آنها محدود شده است. استفاده مواد اولیه تجدیدپذیر، پایدار و ارزان‌قیمت مانند محصولات جانبی و ضایعات کارخانجات و صنایع مختلف ممکن است تا حد زیادی باعث کاهش هزینه‌های تولید شود. با توجه به تنوع و فراوانی مختلف محصولات جانبی و ضایعات در کشورهای متفاوت مواد اولیه استفاده‌شده متنوع هستند. در ایران علاوه بر ترکیبات هیدروکربنی، ملاس نیز از عمده‌ترین محصولات جانبی به شمار می‌رود. در مطالعه حاضر، از میان ۱۶ باکتری تجزیه‌کننده نفت با تکنیک‌های مقدماتی تشخیص تولیدکننده‌های بیوسورفاکتانت، سویه *Pseudomonas aeruginosa* sp. ZN به‌عنوان کاراترین سویه شناسایی شد. برای تعیین بهترین غلظت ملاس برای رشد باکتری و تولید بیوسورفاکتانت غلظت‌های ۱۲-۲% حجمی/حجمی به کار گرفته شد. باکتری قادر به رشد و تولید بیوسورفاکتانت در تمام غلظت‌های تست‌شده بود، اما بیشترین میزان رشد و تولید در غلظت‌های ۶-۴% حجمی/حجمی اتفاق افتاد. غلظت‌های بالاتر از ۶% اثر مهاری روی رشد باکتری و تولید بیوسورفاکتانت دارند. برای شناسایی نسبی بیوسورفاکتانت تولیدشده عملیات بازیابی با روش‌های رسوب‌دهی با اسید و استخراج با حلال (اتیل‌استات: هگزان) انجام گرفت و روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی کاغذهای TLC و مایع‌های رویی محیط کشت فاقد باکتری نشان داد که دو بیوسورفاکتانت تولیدشده از جنس گلیکولیپید هستند.

کلیدواژه‌ها: محصولات جانبی، ملاس، تولیدکننده بیوسورفاکتانت، بازیابی، شناسایی نسبی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۰۴
*نویسنده مسئول: zibanajmi85@gmail.com

مقدمه

بیوسورفاکتانت‌ها ترکیبات دوگانه‌دوستی هستند که توسط برخی میکروارگانیزم‌ها مانند باکتری‌ها، قارچ‌های رشته‌ای و مخمرها تولید می‌شوند. این ترکیبات ممکن است متصل به سلول و یا به‌صورت ترشحی باشند[1,2]. ویژگی اصلی این ترکیبات کاهش کشش سطحی و بین سطحی مایع- هوا، مایع- جامد و مایع- مایع است که به‌دلیل وجود ترکیبات آب‌دوست و آب‌گریز در بیوسورفاکتانت‌ها است[3]. از گروه‌های آب‌دوست می‌توان مونو، اولیگو یا پلی‌ساکاریدها، پپتیدها یا پروتئین‌ها و از گروه‌های آب‌گریز نیز می‌توان به اسیدهای چرب هیدروکسیله یا الکل‌های چرب اشباع یا غیراشباع اشاره کرد[1]. با توجه به نوع گروه‌های شیمیایی آب‌دوست و آب‌گریز، بیوسورفاکتانت‌ها به گروه‌های متفاوت لیپوپروتئین‌ها، لیپوپلی‌ساکاریدها، فسفولیپیدها، گلیسریدها و گلیکولیپیدها طبقه‌بندی می‌شوند[2]. اکثر باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت‌ها از محیط‌های آبی و خشکی آلوده به هیدروکربن‌های نامحلول در آب مانند ترکیبات نفتی و مشتقات آن جدا می‌شوند[4]. با این حال تعدادی از میکروارگانیزم‌ها نیز وجود دارند که از ترکیبات محلول در آب مانند گلوکز، گلیسرول و اتانول قادر به تولید بیوسورفاکتانت‌ها هستند[5]. در مقایسه با سورفاکتانت‌های شیمیایی، بیوسورفاکتانت‌ها دارای مزایای تجزیه‌پذیری، سمیت پایین، سازگاری با محیط و فعالیت در محیط‌های سخت از نظر دمایی، pH و نمک هستند. در نتیجه این ویژگی‌ها، اخیراً بیوسورفاکتانت‌ها به‌عنوان جایگزین مناسبی برای سورفاکتانت‌های شیمیایی به‌منظور بهبود تجزیه زیستی و جداسازی فلزات سنگین مورد توجه قرار گرفته‌اند[6]. از کاربردهای دیگر بیوسورفاکتانت‌ها می‌توان استفاده در صنایع نفت (افزایش بازیافت میکروبی نفت و تجزیه نشت‌های نفتی)، صنایع دارویی، آرایشی و غذایی را نام برد[7,8].

اگرچه بیوسورفاکتانت‌ها نسبت به سورفاکتانت‌های شیمیایی مزایای متعددی دارند اما با توجه به هزینه‌های بالای تولید، استفاده از آنها در حال حاضر مقرون به صرفه نیست. بنابراین استفاده از سوبستراهای ارزان‌قیمت تجدیدپذیر و پسماندهای صنایع مختلف، تعیین شرایط بهینه رشد باکتری و تولید بیوسورفاکتانت، استفاده از سویه‌های باکتری با کارآیی بالا در تولید برای کاهش هزینه‌های تولید مورد توجه قرار گرفته‌اند[9, 10]. از میان سوبستراهای ارزان‌قیمت می‌توان به مواد زاید کشاورزی مانند ملاس، باگاس، محصولات جانبی فرآوری روغن و چربی مانند روغن‌های آفتابگردان و زیتون، گلیسرول، محصولات جانبی صنایع لبنیات مانند آب پنیر و آب پنیر لاکتیکی و محصولات جانبی صنایع غذایی مانند روغن‌های خوراکی و روغن‌های گیاهی اشاره کرد[11]. ملاس یکی از مهم‌ترین محصولات جانبی صنایع تولید شکر از چغندر قند است. درواقع ملاس در مرحله پایانی کریستالی‌شدن شکر تولید می‌شود، به‌طوری که کریستالی‌شدن بیشتر برای به‌دست‌آوردن شکر از ملاس مقرون به صرفه نیست. کیفیت ملاس با توجه به نوع چغندر قند، مقدار شکر استخراجی و روش استخراج متفاوت است، اما به‌طور کلی شامل ۵۶-۴۸% کربوهیدرات (عمدتاً سوکروز)، ۱۲-۹% مواد آلی غیرکربوهیدراتی، ۴-۲% پروتئین، ۵-۱/۵% پتاسیم، ۰/۸-۰/۴% کلسیم، ۰/۰۶% منیزیم، ۲-۰/۶%فسفر، ۳-۱میلی‌گرم در کیلوگرم بیوتین، ۵۵-۱۵میلی‌گرم در کیلوگرم پنتوئیک‌اسید، ۶۰۰۰-۲۵۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم اینوزیتول و ۱/۸میلی‌گرم در کیلوگرم تیامین است[12]. به‌دلیل قیمت پایین ملاس در مقایسه با دیگر منابع قندی و همچنین دارابودن دیگر ترکیبات از جمله ویتامین‌ها، استفاده از آن به‌عنوان سوبسترای ارزان‌قیمت برای تولید محصولات با ارزش زیستی مانند پولولان، صمغ زانتان، مخمر نانوایی، اسیدسیتریک و فروکتواولیگوساکارید و بیوسورفاکتانت مورد توجه قرار گرفته است[13-18].

در مطالعه حاضر، با استفاده از تکنیک‌های مقدماتی تشخیص باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت‌ها مانند فعالیت همولیز خون، تشکیل جفت یونی نامحلول بین بیوسورفاکتانت‌های آنیونی، ستیل‌تری‌متیل‌آمونیوم‌بروماید (CTAB) و متیلن‌بلو، روش فروپاشی قطره و تکنیک گسترش قطره از بین ۱۶ باکتری بومی تجزیه‌کننده نفت خام، کاراترین سویه تولیدکننده بیوسورفاکتانت‌ها شناسایی شد[19-22]. سپس رشد باکتری و تولید بیوسورفاکتانت‌ها در حضور غلظت‌های مختلف ملاس مورد بررسی قرار گرفت تا بدین وسیله غلظت‌های مناسب تولید بیوسورفاکتانت‌ها و همچنین غلظت‌های مهارکننده ملاس به دست آید. در نهایت با استفاده از روش‌های خالص‌سازی و شناسایی بیوسورفاکتانت‌ها به شناسایی بیوسورفاکتانت‌های تولیدشده پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیزم‌های مورد استفاده

۱۶ باکتری بومی تجزیه‌کننده نفت خام از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی و زیست‌فناوری میکروبی دانشگاه شهید بهشتی تهیه شد. در جدول ۱ برخی از مشخصات این سویه‌ها آورده شده است.

جدول ۱) نام و برخی از مشخصات باکتری‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر (ثبت باکتری‌ها در دست اقدام است.)

گونه‌ها	سدیم‌کلرید مورد نیاز (درصد)	رنگ	شکل ظاهری	شماره ثبت
***Roseovarius pacificus* SBU1**	۳	سفید شیری	نرم	KF052989
Halomonas elongata	۳	سفید شیری	نرم	-*
***Bacillus atrophaeus* SBU6**	۳	سفید شیری	خشن	KF052994
***Idiomarina zobellii* SBU4**	۳	سفید شیری	نرم	KF052992
***Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SBU2**	۳	سفید شیری	نرم	KF052990
***Ruegeria* sp. SBU5**	۳	سفید شیری	نرم	KF052993
***Idiomarina sediminum* SBU3**	۳	سفید شیری	نرم	KF052991
***Pseudomonas aeruginosa* sp. ZN**	صفر	بی‌رنگ	نرم	KX808675
Bacillus atrophaeus	صفر	سفید شیری	خشن	-*
***Marinobacter* sp. KK1**	۳	سفید شیری	نرم	KF484912
***Halomonas* sp. MS1**	۳	سفید شیری	نرم	KF452283
Alcanivorax	۳	بی‌رنگ	نرم	KF452284
***Achromobacter* sp. ISA3**	صفر	سفید شیری	نرم	HQ189748
***Klebsiella oxytoca* ISA4**	صفر	سفید شیری	نرم	HQ189749
***Stenotrophomonas acidaminophila* ISA5**	صفر	سفید شیری	نرم	HQ189750
Alcaligenes fecalis	صفر	سفید شیری	نرم	-*

محیط‌های کشت و شرایط تلقیح سویه‌ها

از محیط نوترینت براث برای تهیه ماده تلقیحی استفاده شد که به این صورت زیر آماده شد که ۱گرم عصاره گوشت، ۲گرم عصاره مخمر و ۵گرم پپتون به یک‌لیتر آب مقطر اضافه شد. برخی سویه‌های مورد استفاده در این مطالعه نیاز به ۳% سدیم‌کلرید دارند (جدول ۱). محیط‌های کشت در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۳۰دور در دقیقه و دمای ۳۵°C به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند. برای تولید بیوسورفاکتانت از محیط پایه معدنی (MSM) استفاده شد که برای تهیه آن ۰/۵گرم پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات، ۱گرم آمونیوم‌کلرید، ۰/۲گرم سولفات‌منیزیم ۷آبه، ۰/۰۱گرم سولفات‌آهن ۷آبه، ۰/۰۱گرم کلریدکلسیم ۲آبه در یک‌لیتر آب مقطر اضافه شد. سپس ۱میلی‌لیتر محلول عناصر کمیاب به آن اضافه شد که این محلول عناصر کمیاب شامل ۷۰میلی‌گرم کلریدروی، ۱۰۰میلی‌گرم کلریدمنگنز ۴آبه، ۲۰۰میلی‌گرم کلریدکبالت ۶آبه، ۱۰۰ میلی‌گرم کلریدنیکل ۶آبه، ۲۰میلی‌گرم کلریدمس ۲آبه، ۱۰میلی‌گرم سدیم‌متاوانادات ۱آبه، ۳۰میلی‌گرم تنگستات‌سدیم ۲آبه، ۲۶میلی‌گرم سلنیت‌سدیم ۵آبه، ۵۰میلی‌گرم مولیبدات‌سدیم ۲آبه و ۱میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۰/۲۵% در ۱لیتر آب مقطر بود. به‌منظور انتخاب بهترین سویه تولیدکننده بیوسورفاکتانت از ارلن‌های ۲۵۰میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰میلی‌لیتر محیط MSM استفاده شد که شامل ۱% (حجمی/حجمی) نفت خام به‌عنوان تنها منبع کربن با pH برابر ۷ بودند و در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۳۰دور در دقیقه و دمای ۳۵°C برای ۶ روز گرماگذاری شدند.

بعد از اتمام دوره گرماگذاری برای جداسازی سلول‌های باکتریایی، محیط‌های کشت در دستگاه سانتریفیوژ Z323K (Hermle Labortechnik؛ آلمان) با سرعت ۵۰۰۰×g در دمای ۴°C به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعدی بر روی مایع‌های رویی جداشده تکنیک‌های مقدماتی تشخیص تولید بیوسورفاکتانت با سه تکرار انجام و از محیط کشت فاقد باکتری برای کنترل منفی استفاده شد.

تکنیک‌های تشخیص سویه‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت

فعالیت همولیتیکی خون

سویه‌های باکتریایی روی محیط‌های آگاردار حاوی ۵% (حجمی/حجمی) خون گوسفند کشت داده و در دمای ۳۵°C به

مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند. مشاهده هاله شفاف اطراف کلنی (همولیز بتا یا آلفا) ممکن است نشان‌دهنده تولید بیوسورفاکتانت باشد[20].

تشکیل جفت یونی نامحلول (پلیت آگاردار آبی)

در این روش از محیط جامد MSM حاوی ۱% گلوکز، CTAB (۰/۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و متیلن‌بلو (۰/۲میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به‌منظور تشخیص بیوسورفاکتانت آنیونی استفاده شد. این تست به دو روش انجام شد: ۱) ۳۰میکرولیتر از مایع‌های رویی بعد از سانتریفیوژ، داخل چاهک‌های تعبیه‌شده در پلیت‌های CTAB ریخته شد؛ ۲) سویه‌های متفاوت باکتری روی این پلیت‌ها کشت داده شدند. در نهایت محیط‌های آماده‌شده در دمای ۳۵°C به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند[20]. مشاهده هاله آبی تیره در اطراف چاهک‌ها و کلنی‌ها، نشان‌دهنده تولید بیوسورفاکتانت‌های آنیونی است[23]. از سدیم‌دودسیل‌سولفات (SDS) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

گسترش نفت

در این روش ۵۰میلی‌لیتر آب مقطر داخل پتری‌دیش (۸۰میلی‌متر×۱۵میلی‌متر) ریخته، سپس ۱۰۰میکرولیتر نفت خام به آن اضافه شد تا لایه نازکی از نفت تشکیل شود. برای انجام تست ۱۰میکرولیتر مایع‌های رویی روی آنها ریخته شد. قطر هاله شفاف ایجادشده دلالت بر میزان تولید بیوسورفاکتانت دارد[24, 25].

فروپاشی قطره

در این روش ۲میکرولیتر نفت خام در هر یک از چاهک‌های درپوش پلیت میکروتیتر ۹۶خانه ریخته و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۵میکرولیتر مایع‌های رویی به چاهک‌های حاوی نفت خام اضافه شد[24]. اگر قطره مایع، شکل کروی خود را از دست دهد و روی سطح نفت خام گسترش پیدا کند به منزله وجود بیوسورفاکتانت در مایع رویی است[21].

تعیین بهترین غلظت ملاس برای تولید بیوسورفاکتانت

برای این منظور غلظت‌های متفاوتی از ملاس (۲ تا ۱۲% حجمی/حجمی) با استفاده از آب مقطر تهیه شد. کاراترین سویه انتخاب‌شده در ارلن‌های ۲۵۰میلی‌لیتری که حاوی ۱۰۰میلی‌لیتر غلظت‌های مختلف ملاس است، با کدورت اولیه ۰/۱ تلقیح و در شرایط pH برابر ۷، در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۳۰دور در دقیقه، دمای ۳۵°C و به مدت ۶ روز گرماگذاری شد. با توجه به اینکه ملاس محیط کمپلکس و حاوی مواد مورد نیاز اکثر باکتری‌ها است بنابراین منابع غذایی دیگری به محیط‌های کشت اضافه نشد[26]. روزانه رشد باکتری در طول موج ۶۰۰نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-120-02 (Shimadzo؛ ژاپن)، میزان تولید بیوسورفاکتانت با استفاده از روش گسترش نفت و میزان فعالیت آن با استفاده از تست امولسیفیکاسیون (E24) اندازه‌گیری شد.

تست امولسیفیکاسیون (E24)

۲میلی‌لیتر هیدروکربن کروزن به حجم برابری از مایع رویی فاقد سلول باکتری اضافه و بعد از هم‌زدن شدید به مدت ۲ دقیقه و تشکیل امولسیون، در دمای اتاق برای ۲۴ ساعت قرار داده شد. E24 به‌صورت زیر محاسبه می‌شود[27]:

$$E24=\frac{h1}{h0}\times ۱۰۰$$

h1: ارتفاع لایه امولسیونه (میلی‌متر) بعد از ۲۴ ساعت؛ h0: ارتفاع کل مایع (میلی‌متر)

بازیابی بیوسورفاکتانت‌های تولیدشده

برای بازیابی بیوسورفاکتانت‌ها از محیط کشت از روش‌های رسوب‌دهی با اسید و استخراج با حلال استفاده شد. در این روش pH مایع رویی محیط کشت فاقد سلول با افزودن اسیدکلریدریک غلیظ (۶مولار) به ۲ کاهش و به مدت یک شب در دمای یخچال (۴°C) قرار داده شد. رسوب حاصله با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰۰×g و دمای ۴°C به مدت ۱۰ دقیقه، جدا و در بی‌کربنات ۰/۰۵مولار با pH برابر ۸/۶ حل شد. سپس مراحل کاهش pH و سانتریفیوژ تکرار شد[23]. در مرحله بعدی رسوبات جداشده، سه بار با حجم‌های برابر حلال اتیل‌استات شست‌وشو داده و برای بررسی‌های بیشتر در حلال اتیل‌استات نگهداری شدند[28].

شناسایی نسبی بیوسورفاکتانت‌های تولیدشده

یکی از روش‌های شناسایی نسبی، تکنیک‌های مختلف رنگ‌آمیزی صفحات کروماتوگرافی کاغذی (TLC) است. در این روش فاز ساکن سیلیکاژل ۶۰، f254 و فاز متحرک حلال اتیل‌استات: هگزان با نسبت ۲۰:۸۰ بود. روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی استفاده‌شده به این صورت هستند: نین‌هیدرین (۰/۵گرم نین‌هیدرین در ۱۰۰میلی‌لیتر استون بدون آب)، مشاهده نقاط قرمز یا ارغوانی دلیل بر وجود اسیدهای آمینه است؛ بخار ید (ظرف درپوش‌دار اشباع از بخار ید)، نقاط زرد- قهوه‌ای ایجادشده نشان‌دهنده بخش‌های لیپیدی است و معرف مولیش (۵ تا ۸ قطره اسیدسولفوریک به محلول ۱۰% آلفانفتول در اتانول ۹۶% اضافه شد) که در این روش ترکیبات کربوهیدراتی به رنگ قرمز در می‌آیند[29, 30].

علاوه بر رنگ‌آمیزی روی صفحات TLC چندین روش رنگ‌آمیزی دیگر نیز برای شناسایی بیوسورفاکتانت‌ها در مایع رویی محیط کشت فاقد سلول باکتری وجود دارد. روش برادفورد برای تشخیص میزان کمی و کیفی اسیدهای آمینه استفاده و غلظت‌های مختلف سرم آلبومین گاوی به‌عنوان محلول استاندارد به کار گرفته شد[23]. معرف آنترون (۵میلی‌لیتر اتانول خالص به ۲۰۰میلی‌گرم ۹-۱۰دی‌هیدرو-۹-اگزانتراسن اضافه شد و با استفاده از اسیدسولفوریک ۷۵% به حجم نهایی ۱۰۰میلی‌لیتر رسانده شد) برای شناسایی میزان گلیکولیپیدها و نمونه خالص گلیکولیپید به‌عنوان منحنی استاندارد به کار گرفته شد[31].

یافته‌ها

مطابق جدول ۲، ۴ سویه همولیز کامل خون (بتا) و ۱۲ سویه دیگر همولیز گاما را نشان دادند که سویه *Klebsiella oxytoca* ISA4

بیشترین قطر هاله ایجادشده را دارد که ۹میلی‌متر است. ایجاد هاله آبی‌رنگ تیره در اطراف کلنی‌های *Pseudomonas aeruginosa* sp. ZN و چاهک‌های حاوی مایع رویی در پلیت‌های آگاردار آبی نشان‌دهنده این است که بیوسورفاکتانت تولیدشده توسط این سویه ممکن است آنیونی باشد. در تست گسترش نفت، از آنجایی که هاله شفاف ایجادشده در اطراف محیط کشت فاقد سلول باکتری (کنترل منفی) کمتر از ۱میلی‌متر است، بنابراین قطرهای بزرگ‌تر از آن به‌عنوان نتیجه مثبت در نظر گرفته شدند. با توجه به جدول ۲، سویه *P. aeruginosa* sp. ZN بیشترین قطر هاله شفاف را بر روی سطح آب/نفت تشکیل داده است. در تست فروپاشی قطره، قطره‌های مربوط به مایع‌های رویی محیط‌های کشت دو سویه *Bacillus atrophaeus* و *P. aeruginosa* sp. ZN تغییر شکل یافتند و روی سطح نفت گسترش پیدا کردند و این در حالی است که علاوه بر این دو سویه، ۵ سویه دیگر نیز قادر به ایجاد هاله در روش گسترش نفت بوده‌اند. با توجه به نتایج مشاهده‌شده، سویه *P. aeruginosa* sp. ZN به‌عنوان کاراترین سویه در تولید بیوسورفاکتانت برای بررسی‌های بیشتر مورد مطالعه قرار گرفت.

جدول ۲) نتایج حاصل از روش‌های شناسایی باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت

گونه‌ها	تشکیل هاله آبی‌رنگ تیره روی پلیت آگاردار آبی	فروپاشی قطره	قطر هاله شفاف روی سطح آب/نفت در گسترش نفت (میلی‌متر)	قطر هاله همولیز روی محیط کشت خوندار (میلی‌متر)
***Roseovarius pacificus* SBU1**	-	-	۲/۵	<۱
Halomonas elongata	-	-	<۱	<۱
***Bacillus atrophaeus* SBU6**	-	-	<۱	۲/۵
***Idiomarina zobellii* SBU4**	-	-	<۱	<۱
***Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SBU2**	-	-	<۱	<۱
***Ruegeria* sp. SBU5**	-	-	<۱	<۱
***Idiomarina sediminum* SBU3**	-	-	٤	<۱
***Pseudomonas aeruginosa* sp. ZN**	+	+	۱۵	۳
Bacillus atrophaeus	-	+	۸	٤
***Marinobacter* sp. KK1**	-	-	<۱	<۱
***Halomonas* sp. MS1**	-	-	۳/۵	<۱
Alcanivorax	-	-	<۱	<۱
***Achromobacter* sp. ISA3**	-	-	۳	<۱
***Klebsiella oxytoca* ISA4**	-	-	<۱	۹
***Stenotrophomonas acidaminophila* ISA5**	-	-	<۱	<۱
Alcaligenes fecalis	-	-	۲	<۱

علایم + و - به ترتیب نشان‌دهنده شناسایی بیوسورفاکتانت و عدم شناسایی آن هستند.

اندازه‌گیری کدورت سلولی، گسترش نفت و E24 در غلظت‌های مختلف ملاس (۱۲-۲% حجمی/حجمی) نشان داد که سویه انتخابی قادر به رشد و تولید بیوسورفاکتانت در تمام غلظت‌ها است، در حالی که بیشترین رشد باکتری و تولید بیوسورفاکتانت در غلظت‌های ۶-۴% اتفاق افتاده است. به‌دلیل کاهش کدورت سلولی و قطر هاله شفاف روی سطح آب/نفت به نظر می رسد که غلظت‌های بالاتر از ۶% ملاس اثر مهاری روی رشد باکتری و تولید بیوسورفاکتانت داشته‌اند. علاوه بر این، نتایج نشان داد که تولید بیوسورفاکتانت‌ها وابسته به رشد باکتری است، به‌طوری که فرآیند تولید ۴۸ ساعت بعد از گرماگذاری آغاز و در روز ششم به بیشترین مقدار رسید.

بعد از رنگ‌آمیزی کاغذهای TLC دو لکه به فاصله‌های ۱۳ و ۴۰میلی‌متر از خط لکه‌گذاری ظاهر شدند که حاوی مقدار زیادی کربوهیدرات و ترکیبات لیپیدی بودند و همچنین مقدار جزئی اسیدهای آمینه نیز مشاهده شد که ممکن است به‌دلیل برخی از ناخالصی‌های به‌جامانده از سلول‌های باکتری باشد. همچنین رنگ‌آمیزی مایع رویی محیط کشت فاقد باکتری با معرف برادفورد غلظت کم ترکیبات پروتئینی را تایید کرد. علاوه بر این، رنگ‌آمیزی با استفاده از آنترون نشان داد که بیوسورفاکتانت‌های تولیدشده ساختار گلیکولیپیدی دارند.

بحث

با اینکه فعالیت همولیزی باکتری‌ها به‌عنوان یکی از روش‌های شناسایی باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت‌ها به کار می‌رود اما به‌دلیل اینکه برخی باکتری‌ها قادر به تولید فاکتورهای بیماری‌زا و لیزکننده سلول‌های قرمز خون هستند و همچنین مقادیر ناچیز بیوسورفاکتانت قادر به لیز سلول‌ها نیست بنابراین این روش به‌عنوان روش قطعی و معتبر در نظر گرفته نمی‌شود و استفاده از روش‌های دیگر مانند گسترش نفت، فروپاشی قطره و تشکیل جفت یونی نامحلول با سورفاکتانت‌های کاتیونی نیز توصیه می‌شود[22, 24]. در این مطالعه سویه *Klebsiella oxytoca* ISA4 بیشترین

فعالیت همولیتیکی را نشان داد و گزارشاتی مبنی بر تولید فاکتور بیماری‌زایی لیزکننده سلول‌های قرمز خون توسط این باکتری ارایه شده است[32]. با توجه به جدول ۲، ۷ سویه نتایج مثبت با روش گسترش نفت را نشان دادند در حالی که تنها ۲ سویه از آنها باعث تغییر شکل و گسترش قطره (فروپاشی قطره) شدند. علی‌رغم شباهت‌های بین روش‌های گسترش نفت و فروپاشی قطره مانند کم‌هزینه‌بودن و سریع‌بودن، روش گسترش نفت به غلظت‌های پایین بیوسورفاکتانت حساس است. بنابراین در بین تکنیک‌های اولیه برای شناسایی سویه‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت‌ها روش گسترش نفت روش معتبرتری محسوب می‌شود[5].

اخیراً تولید مواد زیستی باارزش مانند بیوسورفاکتانت‌ها از محصولات جانبی و ضایعات کارخانجات و صنایع مختلف مورد توجه قرار گرفته است، زیرا نه‌تنها باعث تولید مواد باارزش و ارزان‌قیمت می‌شود بلکه حذف آلودگی‌ها را نیز به همراه دارد. با توجه به متفاوت‌بودن محصولات کشاورزی، محصولات جانبی و ضایعات کارخانه‌ها در کشورهای مختلف به‌عنوان طیف وسیعی از مواد ارزان قیمت برای تولید بیوسورفاکتانت‌ها استفاده می‌شود[33]. در ایران از عمده‌ترین ضایعات می‌توان هیدروکربن‌های نفتی و ملاس را نام برد و با توجه به اینکه ایران کشوری نفت‌خیز است، مطالعات بر روی ترکیبات نفتی و استفاده از آنها به‌منظور کاربردهای متفاوت، بسیار صورت گرفته است اما مطالعات کمی در مورد استفاده از ملاس برای تولید ترکیبات زیستی به‌خصوص بیوسورفاکتانت‌ها انجام شده است.

سوداکار بابو و همکاران برای اولین‌بار تولید بیوسورفاکتانت رامنولیپید توسط *P. aeruginosa* با استفاده از ضایعات صنایع لبنی به‌عنوان ماده اولیه را گزارش کردند[34]. *انسبالی* و همکاران بهترین غلظت ملاس استفاده‌شده در تولید رامنولیپید را ۵% گزارش کرده‌اند و همچنین در مطالعه‌ای دیگر غلظت‌های مختلف۱۰-۲ وزنی/حجمی ملاس را برای بررسی میزان رشد باکتری و تولید بیوسورفاکتانت سورفاکتین به کار بردند. بیشترین میزان رشد باکتری در غلظت ۱۰% و بیشترین میزان تولید بیوسورفاکتانت در غلظت ۴% مشاهده شد. در غلظت‌های ۷-۴% تغییری در میزان تولید بیوسورفاکتانت رخ نداد این در حالی است که غلظت‌های بالاتر از ۷% باعث کاهش تولید بیوسورفاکتانت شدند[26, 35-38].

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، از بین ۱۶ سویه بومی با قابلیت تجزیه نفت خام با استفاده از تکنیک‌های شناسایی تولیدکننده‌های بیوسورفاکتانت سویه *P. aeruginosa* sp. ZN به‌عنوان کاراترین سویه تولیدکننده بیوسورفاکتانت‌ها انتخاب شد. این سویه قابلیت رشد و تولید دو بیوسورفاکتانت در حضور محدوده وسیعی از غلظت‌های ملاس را نیز دارد ولی بهترین رشد باکتری و تولید بیوسورفاکتانت در غلظت‌های ۶-۴% حجمی/حجمی صورت گرفته است. در این مطالعه روش‌های بازیابی بیوسورفاکتانت‌ها از مایع رویی فاقد سلول با استفاده از رسوب‌دهی با اسید و استخراج با حلال اتیل‌استات: هگزان انجام شد و در نهایت نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی صفحات کاغذهای TLC و مایع رویی محیط کشت نشان داد که دو بیوسورفاکتانت تولیدشده در حضور ملاس از جنس گلیکولیپید هستند.

تشکر و قدردانی: از دانشجویان آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه شهید بهشتی قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زیبا نجمی (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی (۵۰%)؛ غلامحسین ابراهیمی‌پور (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی (۵۰%)

منابع مالی: هزینه‌های مطالعه از اعتبار مالی دکتر *غلامحسین ابراهیمی‌پور* تامین شده است.

منابع

1- Pacwa-Płociniczak M, Płaza GA, Piotrowska-Seget Z, Cameotra SS. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. Int J Mol Sci. 2011;12(1):633-54.

2- Sekhon KK, Khanna S, Cameotra SS. Enhanced biosurfactant production through cloning of three genes and role of esterase in biosurfactant release. Microb Cell Factories. 2011;10(1):49.

3- Tambekar DH, Gadakh PV. Biochemical and molecular detection of biosurfactant producing bacteria from soil. Int J Life Sci Biotech Pharma Res. 2013;2(1):204-11.

4- Ebrahimipour G, Gilavand F, Karkhane M, Kavyanifard AA, Teymouri M, Marzban A. Bioemulsification activity assessment of an indigenous strain of halotolerant Planococcus and partial characterization of produced biosurfactants. Int J Environ Sci Technol. 2014;11(5):1379-86.

5- Belcher RW, Huynh KV, Hoang TV, Crowley DE. Isolation of biosurfactant-producing bacteria from the Rancho La Brea Tar Pits. World J Microbiol Biotechnol. 2012;28(12):3261-7.

6- Perfumo A, Rudden M, Smyth TJ, Marchant R, Stevenson PS, Parry NJ, et al. Rhamnolipids are conserved biosurfactants molecules: Implications for their biotechnological potential. Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97(16):7297-306.

7- Franzetti A, Bestetti G, Caredda P, La Colla P, Tamburini E. Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in Gordonia strains. FEMS Microbiol Ecol. 2008;63(2):238-48.

8- Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl Microbiol Biotechnol. 2000;53(5):495-508.

9- Li AH, Xu MY, Sun W, Sun GP. Rhamnolipid production by Pseudomonas aeruginosa GIM 32 using different substrates including molasses distillery wastewater. Appl Biochem Biotechnol. 2011;163(5):600-11.

10- Mukherjee S, Das P, Sen R. Towards commercial production of microbial surfactants. TRENDS Biotechnol. 2006;24(11):509-15.

11- Banat IM, Satpute SK, Cameotra SS, Patil R, Nyayanit NV. Cost effective technologies and renewable substrates

for biosurfactants' production. Front Microbiol. 2014;5:697.
12- Maneerat S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. Songklanakarin J Sci Technol. 2005;27(3):675-83.
13- Lazaridou A, Roukas T, Biliaderis CG, Vaikousi H. Characterization of pullulan produced from beet molasses by Aureobasidium pullulans in a stirred tank reactor under varying agitation. Enzym Microb Technol. 2002;31(1-2):122-32.
14- Kalogiannis S, Iakovidou G, Liakopoulou-Kyriakides M, Kyriakidis DA, Skaracis GN. Optimization of xanthan gum production by Xanthomonas campestris grown in molasses. Process Biochem. 2003;39(2):249-56.
15- Skountzou P, Soupioni M, Bekatorou A, Kanellaki M, Koutinas AA, Marchant R, et al. Lead (II) uptake during baker's yeast production by aerobic fermentation of molasses. Process Biochem. 2003;38(10):1479-82.
16- Ikram-ul H, Ali S, Qadeer MA, Iqbal J. Citric acid production by selected mutants of Aspergillus niger from cane molasses. Bioresour Technol. 2004;93(2):125-30.
17- Shin HT, Baig SY, Lee SW, Suh DS, Kwon ST, Lim YB, et al. Production of fructo-oligosaccharides from molasses by Aureobasidium pullulans cells. Bioresour Technol. 2004;93(1):59-62.
18- Raza ZA, Ahmad N, Kamal Sh. Multi-response optimization of rhamnolipid production using grey rational analysis in Taguchi method. Biotechnol Rep. 2014;3:86-94.
19- Carrillo PG, Mardaraz C, Pitta-Alvarez SI, Giulietti AM. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. World J Microbiol Biotechnol. 1996;12(1):82-4.
20- Sneha KS, Padmapriya B, Rajeswari T. Isolation and screening of biosurfactants produced by Pseudomonas aeruginosa from oil spilled soils. Int J Pharm Biol Arch. 2012;3(2):321-5.
21- Bodour AA, Miller-Maier RM. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. J Microbiol Methods. 1998;32(3):273-80.
22- Morikawa M, Hirata Y, Imanaka T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2000;1488(3):211-8.
23- Lotfabad TB, Shourian M, Roostaazad R, Najafabadi AR, Adelzadeh MR, Noghabi KA. An efficient biosurfactant-producing bacterium Pseudomonas aeruginosa MR01, isolated from oil excavation areas in south of Iran. Colloids Surf B Biointerfaces. 2009;69(2):183-93.
24- Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J Microbiol Methods. 2004;56(3):339-47.
25- Płaza GA, Zjawiony I, Banat IM. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. J Pet Sci Eng. 2006;50(1):71-7.
26- Onbasli D, Aslim B. Biosurfactant production in sugar beet molasses by some Pseudomonas spp. J Environ Biol. 2009;30(1):161-3.
27- Gudiña EJ, Fernandes EC, Rodrigues AI, Teixeira JA, Rodrigues LR. Biosurfactant production by Bacillus subtilis using corn steep liquor as culture medium. Front Microbiol. 2015;6:59.
28- Smyth TJ, Rudden M, Tsaousi K, Marchant R, Banat IM. Protocols for the detection and chemical characterisation of microbial glycolipids. In: McGenity TJ, editor. Hydrocarbon and lipid microbiology protocols. Berlin: Springer; 2014. pp. 29-60.
29- Yin H, Qiang J, Jia Y, Ye J, Peng H, Qin H, et al. Characteristics of biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa S6 isolated from oil-containing wastewater. Process Biochem. 2009;44(3):302-8.
30- Saikia RR, Deka S, Deka M, Banat IM. Isolation of biosurfactant-producing Pseudomonas aeruginosa RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production. Ann Microbiol. 2012;62(2):753-63.
31- Smyth T, Perfumo A, Marchant R, Banat I. Isolation and Analysis of Low Molecular Weight Microbial Glycolipids. In: Timmis KN, editor. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Berlin: Springer; 2010. pp. 3705-23.
32- Sekowska A, Gospodarek E, Janicka G, Jachna-Sawicka K, Sawicki M. Hydrolityczna i hemolityczna aktywnosc paleczek Klebsiella pneumoniae i Klebsiella oxytoca [Hydrolytic and hemolytic activity Klebsiella pneumonia and Klebsiella oxytoca sticks]. Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia. 2006;2(58):135-41. [Polish]
33- Abdel-Mawgoud AM, Hausmann R, Lépine F, Müller MM, Déziel E. Rhamnolipids: Detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation, and bioengineering of production. In: Soberón-Chávez G, editor. Biosurfactants. Berlin: Springer; 2011. pp. 13-55.
34- Sudhakar Babu P, Vaidya AN, Bal AS, Kapur R, Juwarkar A, Khanna P. Kinetics of biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa strain BS2 from industrial wastes. Biotechnol Lett. 1996;18(3):263-8.
35- Saimmai A, Sobhon V, Maneerat S. Molasses as a whole medium for biosurfactants production by Bacillus strains and their application. Appl Biochem Biotechnol. 2011;165(1):315-35.
36- Joshi S, Bharucha Ch, Jha S, Yadav S, Nerurkar A, Desai AJ. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. Bioresour Technol. 2008;99(1):195-9.
37- Patel RM, Desai AJ. Biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosaGS3 from molasses. Lett Appl Microbiol. 1997;25(2):91-4.
38- Rashedi H, Assadi MM, Bonakdarpour B, Jamshidi E. Environmental importance of rhamnolipid production from molasses as a carbon source. Int J Environ Sci Technol. 2005;2(1):59-62.