



Biosurfactant Production by Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus plantarum* Using Appropriate Nutrient Sources

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Behzadnia A.¹ PhD,
Moosavi-Nasab M.^{*2} PhD,
Shojaosadati S.A.³ PhD,
Setoodeh P.³ PhD

How to cite this article

Behzadnia A, Moosavi-Nasab M, Shojaosadati S.A, Setoodeh P. Biosurfactant Production by Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus plantarum* Using Appropriate Nutrient Sources. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(3):327-332.

ABSTRACT

Biosurfactants are (mainly secondary) metabolites produced by microorganisms which have potential capabilities in various industries due to their abundant beneficial properties. In spite of great advantages, commercial utilization of biosurfactants especially in food industry and pharmaceuticals is limited for the reasons of technical and commercial problems such as low yield, high production cost, and the type of producing strain. Majority of biosurfactant-producing microorganisms ever evaluated, are pathogenic strains and are not effortlessly acceptable in industrial applications and their products cannot be easily utilized in environmental applications as well as in health and cosmetics, pharmaceuticals and food industries. The present study aims to investigate high production of cell-bound biosurfactant by lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) through optimization of the main carbon source of a specific culture medium. Therefore, three culture media with different amounts of glucose were evaluated for biomass and biosurfactants (by surface tension reduction of phosphate-buffered saline) production in shake flasks and bioreactor (controlled temperature, pH and agitating speed). The results from the both shake flasks fermentation and bioreactor showed respectively the maximum biomass concentration of 3.92 and 4.17g/L, the minimum surface tension of 41.17 and 40.48mN/m and subsequently the maximum biosurfactants production in culture medium including 30g/L of glucose. Furthermore, Fourier transform infrared spectroscopy analysis indicated the biosurfactants are structurally a mixture of protein, polysaccharide, and possibly phosphate group, possessing glycoprotein structure.

Keywords Biosurfactant; *Lactobacillus plantarum*; Carbon Source; Bioreactor; Glycoprotein

CITATION LINKS

[1] Microbial biosurfactants: Current trends and applications in agricultural and biomedical industries [2] Production, characterisation and applications of biosurfactants-review [3] Towards commercial production of microbial surfactants [4] Microbial production of surfactants and their commercial potential [5] Microbial biosurfactants production, applications and future potential [6] Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production [7] A review on biosurfactants: Fermentation, current developments and perspectives [8] Environmental sustainability: Role of green technologies [9] Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability [10] Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp [11] Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei* [12] Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53 [13] Enhanced biosurfactant production with low-quality date syrup by *Lactobacillus rhamnosus* using a fed-batch fermentation [14] Stimulation of biosurfactant production by *Lactobacillus plantarum* using ultrasound [15] Biosurfactant production by lactic acid bacterium *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 grown on different carbon sources: Strain screening followed by product characterization [16] Optimization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* N3-1P using the brewery waste as the carbon source [17] *Lactobacillus plantarum*-derived biosurfactant: Ultrasound-induced production and characterization [18] Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria [19] Biosurfactant-producing lactobacilli: Screening, production profiles, and effect of medium composition [20] Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil [21] Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains [22] Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains

¹Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

²"Seafood Processing Research Group" and "Department of Food Science and Technology", Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

³Department of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

⁴Department of Chemical Engineering, School of Chemical and Petroleum Engineering, Shiraz University, Shiraz, Iran

*Correspondence

Address: Seafood Processing Research Group, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran. Postal code: 7144165186
Phone: +98 (71) 32277750
Fax: +98 (71) 32277750
marzieh.moosavi-nasab@mail.mcgill.ca

Article History

Received: April 16, 2019

Accepted: September 21, 2020

ePublished: September 20, 2020

تولید بیوسورفکتانت توسط لاکتیک اسید باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم با استفاده از منابع مغذی مناسب

اسما بهزادینا PhD

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

مرضیه موسوی نسب* PhD

"گروه پژوهشی فرآوری آبزیان" و "گروه علوم و صنایع غذایی"، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

سیدعباس شجاع‌الساداتی PhD

گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پیام ستوده PhD

گروه مهندسی شیمی، دانشکده مهندسی شیمی، نفت و گاز، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

چکیده

بیوسورفکتانت‌ها متابولیت‌های (عمدتاً ثانویه) تولیدشده توسط میکروارگانیسم‌ها هستند که به دلیل دارابودن ویژگی‌های سودمند فراوان، از قابلیت‌های بالقوه و کاربردی گسترده‌ای در صنایع مختلف برخوردارند. علی‌رغم مزایای بسیار، به دلایل فنی و اقتصادی از جمله راندمان پایین، هزینه بالای تولید و فرآوری و نوع سویه‌های تولیدکننده، استفاده تجاری از بیوسورفکتانت‌ها به‌ویژه در صنایع غذایی و دارویی محدود است. اکثر میکروارگانیسم‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت‌ها که تاکنون مورد بررسی قرار گرفته‌اند، سویه‌هایی بیماری‌زا هستند که کاربرد بیوسورفکتانت خام حاصل از آنها در مصارف صنعتی و زیست‌محیطی به‌ویژه در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی به‌راحتی قابل پذیرش نخواهد بود. از این رو، مطالعه حاضر با هدف ارزیابی و تولید حداکثری بیوسورفکتانت متصل به سلول توسط لاکتیک‌اسیدباکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC 8014) از طریق تغییر و بهینه‌سازی میزان منبع کربنی اصلی محیط کشت میکروبی اختصاصی انجام گرفته است. بدین منظور، سه ترکیب محیط کشت با میزان گلوکز متفاوت، از نظر تولید توده سلولی و بیوسورفکتانت که مقدار آن با معیار میزان کاهش کشش سطحی بافر نمکی فسفات سنجیده می‌شود در فلاسک‌های هم‌خورنده و همچنین در بیوراکتور غیرمداوم تحت شرایط دما، pH و سرعت هم‌زدن کنترل‌شده مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از تخمیر هم در آزمایشات مربوط به فلاسک‌ها و هم در بیوراکتور، نشان‌دهنده حداکثر غلظت توده سلولی 4.0×10^9 (۳/۹۲ و 4.0×10^9 گرم بر لیتر) و حداقل کشش سطحی (۴۱/۱۷ و 4.0×10^9 میلی‌نیوتن بر متر) و در نتیجه حداکثر میزان بیوسورفکتانت تولیدی در محیط کشت حاوی 3.0×10^9 گرم بر لیتر گلوکز است. همچنین، طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز نشان داد که بیوسورفکتانت تولیدشده مخلوطی از پروتئین، پلی‌ساکارید و احتمالاً گروه فسفات و دارای ساختار گلیکوپروتئینی است.

کلیدواژه‌ها: بیوسورفکتانت، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، منبع کربن، بیوراکتور، گلیکوپروتئین

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۱/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۳۱

*نویسنده مسئول: marzieh.moosavi-nasab@mail.mcgill.ca

مقدمه

اکنون کاملاً پذیرفته شده که استفاده گسترده از سورفکتانت‌های سنتزی با اثرات منفی بر محیط زیست همراه است. یکی از

نگرانی‌های عمده در این زمینه استفاده فراوان از سورفکتانت‌های شیمیایی و سنتزی در صنایع مختلف از جمله پزشکی و دارویی، صنایع غذایی، خوراک دام و طیور، کشاورزی، محیط زیست و فرآورده‌های شیمیایی از جمله صنایع پتروشیمی است. نگرانی‌های زیست‌محیطی در کشورهای توسعه‌یافته منجر به افزایش تمایل محققان به تحقیق و توسعه در زمینه تولید ترکیبات فعال سطحی با منشأ زیستی از جمله بیوسورفکتانت‌ها شده است^[1]. لازم به ذکر است که سورفکتانت‌های تولیدشده توسط منابع بیولوژیک از جمله میکروارگانیسم‌ها (باکتری، کپک و مخمر) بیوسورفکتانت نامیده می‌شوند^[2]. بیوسورفکتانت‌ها متابولیت‌های (عمدتاً ثانویه) تولیدشده توسط میکروارگانیسم‌ها هستند که هنگام رشد، با مصرف سوبستراهای محلول و غیر محلول در آب به‌صورت متصل به سلول و یا ترشح‌شده به محیط کشت سلول تولید می‌شوند^[3]. آنها دارای خاصیت کاهش کشش سطحی و بین سطحی با مکانیزم مشابه سورفکتانت‌های شیمیایی و سنتزی هستند. بیوسورفکتانت‌ها گروه متنوعی از مولکول‌های فعال سطحی را تشکیل می‌دهند و شامل ساختارهای شیمیایی مختلفی از جمله گلیکولیپیدها، لیپوپپتیدها و لیپوپروتئین‌ها، اسیدهای چرب، لیپیدهای خنثی، فسفولیپیدها و ساختارهای پلیمری و ذره‌ای هستند. بیوسورفکتانت‌ها دارای ویژگی‌های کاربردی بسیاری از جمله سمیت کمتر، زیست‌تخریب‌پذیری بیشتر، همچنین خاصیت کف‌کنندگی بهتر، فعالیت پایدار در شرایط متنوع pH، دما و درجه شوری شدید هستند که آنها را به جایگزین‌های مناسبی برای سورفکتانت‌های سنتزی تبدیل کرده است^[4,5]. علاوه بر این، این ترکیبات دارای ویژگی‌های بالقوه‌ای مانند امولسیون‌کنندگی، امولسیون‌زدایی، مرطوب‌کنندگی، جداکنندگی فازها و کف‌کنندگی هستند که کاربرد آنها در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی را مرتفع ساخته است. بیوسورفکتانت‌ها به‌واسطه خصوصیات ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی، ضدچسبندگی و ممانعت از تشکیل بیوفیلم توسط میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، از اهمیت به‌سزایی در پزشکی نیز برخوردار هستند^[3]. برخلاف سورفکتانت‌های سنتزی که اغلب از منابع پتروشیمیایی مشتق می‌شوند، بیوسورفکتانت‌ها را می‌توان از طریق فرآیندهای تخمیر میکروبی تولید کرد^[3]. طی سال‌های اخیر، تولید بیوسورفکتانت‌ها توسط میکروارگانیسم‌های مختلف به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌است و اکنون داده‌های بسیاری در مورد تولید، نوع و خصوصیات بیوسورفکتانت‌ها در دسترس است. علی‌رغم مزایای بسیار، استفاده تجاری محدود از بیوسورفکتانت‌ها به‌ویژه در صنایع غذایی و دارویی ناشی از دلایل فنی و اقتصادی از جمله راندمان پایین، هزینه بالای تولید و فرآوری (برای برخی اهداف) و نوع سویه‌های تولیدکننده است^[6]. علاوه بر این، اکثر میکروارگانیسم‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت‌ها که تاکنون مورد بررسی قرار گرفته‌اند، سویه‌هایی بیماری‌زا هستند که کاربرد بیوسورفکتانت خام حاصل از آنها در مصارف صنعتی و زیست‌محیطی به‌ویژه در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی

انتخاب شد. مطالعه حاضر، اثر تغییر غلظت منبع کربنی اصلی (گلوکز) را در این محیط مورد بررسی و ارزیابی قرار می‌دهد. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، مقدار اولیه منبع کربنی اصلی محیط تعریف‌شده متغیر بود و مقادیر اولیه سایر ترکیبات از جمله سدیم استات (۵ گرم بر لیتر)، پتاسیم فسفات دو بازه (۲ گرم بر لیتر)، منیزیم سولفات (۲/۰ گرم بر لیتر)، تری آمونیوم سیترات (۲ گرم بر لیتر) و منگنز سولفات (۵/۰ گرم بر لیتر) ثابت در نظر گرفته می‌شوند. کلیه ترکیبات محیط کشت به صورت جداگانه در مقادیر مشخص آب مقطر حل و در دمای 121°C به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. سپس محلول‌ها در ظروف استریل ۲۵۰ میلی‌لیتری تحت شرایط اسپتیک با یکدیگر مخلوط شدند و pH نهایی محیط کشت توسط محلول هیدروکسید سدیم و کلریدریک اسید ۱ مولار به ۶/۲ رسانده شد. در مرحله تخمیر در فلاسک، به جز تنظیم اولیه pH محیط کشت، تنظیم pH طی دوره تخمیر صورت نگرفت، زیرا ارزیابی تغییر pH در مدت تخمیر از جمله اهداف مطالعه حاضر بود. کلیه مواد شیمیایی و ترکیبات محیط از شرکت سیگما آلدريج (ایالات متحده) خریداری شدند.

جدول ۱) ترکیبات مغذی محیط کشت براساس ترکیبات محیط MRS (گرم بر لیتر)

محیط کشت	گلوکز	عصاره مخمر	پپتون	عصاره گوشت
شماره ۱	۳۰	۱۰	۱۰	۱۰
شماره ۲	۱۷/۵	۱۰	۱۰	۱۰
شماره ۳	۵	۱۰	۱۰	۱۰

میزان رشد باکتری توسط اندازه‌گیری دانسیته نوری محیط کشت در طول موج ۵۹۵ نانومتر در زمان‌های مختلف طی ۴۸ ساعت تعیین شد. توده سلولی (گرم بر لیتر) از طریق سانتریفیوژ با شرایط $10000g$ ، مدت ۵ دقیقه و دمای 4°C جمع‌آوری شد، دو بار با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شد و توسط خشک‌کن انجمادی خشک و نهایتاً توزین شد.

به منظور تولید بیوسورفکتانت در فلاسک‌های هم‌خورنده، میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت آماده‌سازی (شماره‌های ۱، ۲ و ۳) توسط ۱٪ پیش‌کشت تلقیح شد و به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه در دمای 30°C با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از این مرحله، سلول‌ها توسط سانتریفیوژ با شرایط $10000g$ ، مدت ۵ دقیقه و دمای 4°C برداشت شدند، دو بار توسط آب مقطر شست‌وشو داده و سپس در ۲۰ میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات (pH برابر ۷/۲) تشکیل‌شده از پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات/پتاسیم فسفات دو بازه ۱۰ میلی‌مولار و کلرید سدیم ۱۵۰ میلی‌مولار معلق شدند. به منظور جداسازی بیوسورفکتانت متصل به سلول، سوسپانسیون‌ها به مدت ۲ ساعت با هم‌زدن ملایم در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس، سلول‌ها توسط سانتریفیوژ ($10000g$)، مدت ۵ دقیقه و دمای 4°C جدا شدند و سوسپانسیون‌های باقیمانده برای بررسی فعالیت سطحی و میزان بیوسورفکتانت تولیدشده مورد ارزیابی قرار

به راحتی قابل پذیرش نخواهد بود [7,8]. بر این اساس، برای کاهش موانع اقتصادی مربوط به تولید رقابتی‌تر بیوسورفکتانت‌ها، سه استراتژی پایه در دنیا اتخاذ می‌شود که شامل استفاده از سوبستراهای ضایعاتی و ارزان‌قیمت، بهینه‌سازی شرایط عملیاتی کشت میکروبی و برداشت مقرون به صرفه محصول و استفاده از سویه‌های جهش‌یافته یا نوترکیب برای افزایش راندمان تولید بیوسورفکتانت‌ها است [6]. به علاوه، اخیراً تولید بیوسورفکتانت‌ها توسط سویه‌های غیربیماری‌زا به واسطه ممانعت از بیماری‌زایی و پیچیدگی تنظیمات متابولیکی، توجه بسیاری از محققان را به خود جلب نموده است [8]. طی سال‌های گذشته، نقش لاکتیک اسیدباکتری‌ها به عنوان تولیدکنندگان بالقوه بیوسورفکتانت‌ها شناسایی و توسط مطالعات مختلف گزارش شده است [9, 10]. هر چند اطلاعات در مورد ساختمان شیمیایی بیوسورفکتانت‌های تولیدشده توسط این باکتری‌ها محدود است اما این ترکیبات نقش مهمی در کاهش ظرفیت چسبندگی عوامل میکروبی بیماری‌زا ایفا می‌کنند، چراکه چسبندگی این عوامل یکی از مراحل ضروری برای تکثیر و تشکیل بیوفیلم در مجاری روده‌ای- معده‌ای و تناسلی است [10].

از آنجا که لاکتیک اسیدباکتری‌ها به میزان قابل توجهی سخت‌رشد و برای رشد به فاکتورهای پیچیده‌ای نیازمند هستند، در مطالعه حاضر سه ترکیب محیط کشت براساس تغییر مقادیر منبع کربنی اصلی (گلوکز) محیط کشت اختصاصی لاکتوباسیلوس‌ها (MRS) برای افزایش میزان تولید بیوسورفکتانت توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC 8014) در فلاسک‌های هم‌خورنده و همچنین در بیوراکتور غیرمداوم بررسی شد. علاوه بر این، خصوصیات ساختمانی بیوسورفکتانت تولیدی مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از لاکتیک اسیدباکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC 8014) برای تولید بیوسورفکتانت استفاده شد. فعال‌سازی میکروارگانیزم منجمد روی محیط کشت MRS آگار (اوکسوئید، کمبریج؛ انگلستان) انجام گرفت که به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه در دمای 30°C قرار داده شد و کشت حاصل برای تلقیح در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. کشت ذخیره در دمای 4°C به مدت ۲ هفته قابل نگهداری است. برای آماده‌سازی پیش‌کشت، یک کلنی از پلیت MRS آگار به ۱۰ میلی‌لیتر MRS براث (اوکسوئید، کمبریج؛ انگلستان) منتقل و برای مدت ۱۸ ساعت در گرمخانه در دمای 30°C قرار داده شد [11].

براساس مطالعات پیشین این گروه و ارزیابی‌های انجام‌گرفته، محیط کشتی بر مبنای ترکیبات محیط MRS استاندارد با تغییر منابع نیتروژن به صورت عصاره مخمر (۱۰ گرم بر لیتر)، پپتون (۱۰ گرم بر لیتر) و عصاره گوشت (۱۰ گرم بر لیتر) به عنوان محیط کشت پایه مناسب با قابلیت تولید توده سلولی (گرم بر لیتر) و بیوسورفکتانت (گرم بر لیتر) توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC 8014)،

به منظور تحقیق جامع تر در رابطه با تولید بیوسورفکتانت با راندامان بالا و تخمیر تحت شرایط کنترل شده تر، از بیوراکتور ۵ لیتری (مینی فورس، اینفورس HT؛ سوئیس) حاوی ۲ لیتر از محیط های کشت مورد آزمون در فلاسک ها استفاده شد. طی تخمیر، دما، pH و سرعت هم زدن، اندازه گیری و کنترل شدند. فرآیند تخمیر در دمای ۳۰°C، pH برابر ۶/۲ و سرعت هم زدن ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت. در طول تخمیر، pH محیط کشت توسط افزودن اتوماتیک محلول هیدروکسید سدیم ۳ مولار کنترل می شد.

پس از پایان تخمیر، سلول ها توسط سانتریفیوژ با همان شرایط جمع آوری شدند، دو بار با آب مقطر شست و شو داده، در ۱۰۰ میلی لیتر بافر نمکی فسفات (pH برابر ۷/۲) معلق شدند و به مدت ۲ ساعت با هم زدن ملایم در دمای اتاق نگه داشته شدند. سپس سلول ها توسط سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰g، مدت ۵ دقیقه و دمای ۴°C) جدا و سوسپانسیون های باقیمانده از طریق فیلتر سرسرتگی ۰/۲۲ میکرومتری فیلتر شدند. به منظور خالص سازی جزیی بیوسورفکتانت، سوسپانسیون فیلتر شده به مدت ۲۴ ساعت در مقابل آب مقطر با دمای ۴°C درون فیلتر غشایی با وزن مولکولی ۸۰۰۰-۶۰۰۰ دالتون (اسپکتروم؛ ایالات متحده) دیالیز و در یک خشک کن انجمادی خشک شد[11].

به منظور تعیین فعالیت سطحی، برای تایید تولید بیوسورفکتانت متصل به سلول، کشت سطحی بافر نمکی فسفات توسط تنسیومتر نانومتریک با زاویه تماس ۱۰۱- (شرکت نانومتری پژوه؛ ایران) با استفاده از روش پلیت و پلهلمی در دمای اتاق اندازه گیری شد[13]. برای کالبراسیون دستگاه، قبل از هر خوانش، کشت سطحی آب خالص (۱۰/۲±۷۲ میلی نیوتن بر متر) اندازه گیری شد. برای افزایش دقت اندازه گیری، همه تست ها با سه بار تکرار انجام شدند و مقدار میانگین ثبت شد. محلول بافر نمکی فسفات به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

برای شناسایی ترکیب مولکولی بیوسورفکتانت تولید شده روش طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز به کار گرفته شد. این روش قادر به آنالیز گروه های عاملی یک ترکیب ناشناخته است. از این رو، سنجش بیوسورفکتانت تولید شده توسط یک طیف سنج تبدیل فوریه مادون قرمز (اسپکتروم آرایکس آی، پرکین المر؛ ایالات متحده) در دامنه ۴۰۰۰-۴۰۰ بر سانتی متر با سرعت اسکن ۲ میلی متر بر ثانیه انجام گرفت[13].

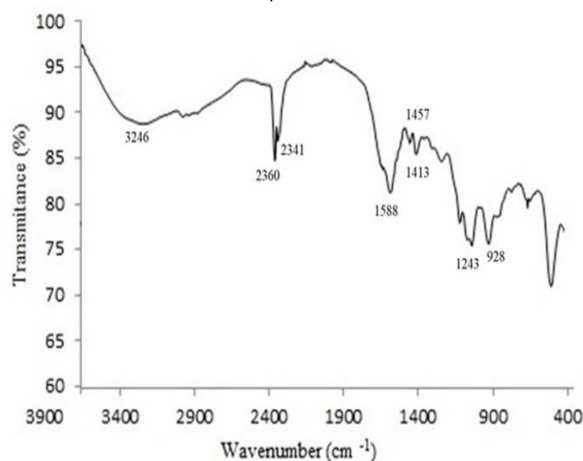
تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS 22.0 انجام گرفت. آنالیز واریانس و آزمون توکی برای تخمین وجود یا عدم وجود تفاوت معنی دار بین داده ها با سطح اطمینان کمتر از ۰/۰۵ به کار گرفته شد.

یافته ها و بحث

لاکتیک اسید باکتری ها برای رشد به سوبستراهای پیچیده شامل کربوهیدرات ها به عنوان منابع انرژی و کربن، نوکلئوتیدها،

آمینواسیدها، ویتامین ها و مواد معدنی نیاز دارند[13-15]. مقدار بهینه نسبت کربن به نیتروژن یک فاکتور مهم برای رشد باکتری و تولید بیوسورفکتانت است. از این رو، نسبت غیر بهینه این منابع منجر به رشد و یا تولید نامناسب می شود[16]. بدین منظور، براساس مطالعه پیشین این گروه، یک محیط کشت انتخاب شد و در مطالعه حاضر با تغییر میزان گلوکز اثر منبع کربن بر رشد و تولید بیوسورفکتانت مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). هدف، دستیابی به بالاترین میزان توده سلولی لاکتوباسیلوس پلانتروم و بیوسورفکتانت تولیدی بود. مقادیر توده سلولی (گرم بر لیتر) و کشت سطحی (میلی نیوتن بر متر) در جدول ۲ نشان داده شده اند. مقادیر کشت سطحی گزارش شده تاثیرپذیر از مولکول های بیوسورفکتانت متصل به سلول رهاسده در بافر نمکی فسفات هستند. همه محیط های کشت میزان کاهش کشت سطحی را در محدوده ۳۱-۲۶ میلی نیوتن بر متر نشان دادند. براساس نتایج، محیط کشت اثر معنی داری ($p < 0.05$) بر میزان تولید توده سلولی و بیوسورفکتانت نشان داد. همان طور که از نتایج حاصل استنباط می شود، محیط شماره ۱ با بالاترین میزان گلوکز (۳۰ گرم بر لیتر)، تولید توده سلولی و بیوسورفکتانت را به صورت معنی داری ($p < 0.05$) در مقایسه با دیگر محیط ها افزایش داد[14, 17]. این یافته ها در تطابق با گزارشات پیشین هستند[18]. گودینا و همکاران[19] با استفاده از ترکیب پپتون و عصاره گوشت، موفق به تولید میزان بیوسورفکتانت بیشتری در مقایسه با MRS استاندارد شدند. در یک مطالعه دیگر تولید بیوسورفکتانت لیجنیزین از باسیلوس لیجینی فورمیس R2 توسط بهینه سازی مقادیر منابع کربن و نیتروژن محیط کشت مربوطه به میزان ۴ برابر در مقایسه با محیط کشت غیر بهینه بهبود یافت[18]. در تطابق با مطالعه حاضر، اونوسی و اودیو[20] به طور قابل ملاحظه ای تولید بیوسورفکتانت توسط سودوموناس نیترو دیوسنس را با استفاده از بهینه سازی منبع کربن افزایش دادند. در مطالعه ذکر شده گلوکز به عنوان بهینه ترین منبع کربن در مقایسه با سوکروز، گلیسرول، روغن پالم، روغن بادام زمینی و دیزل شناسایی شد. همان طور که در جدول ۲ مشاهده می شود محیط کشت شماره ۱ به عنوان مغذی ترین محیط کشت با حداکثر میزان گلوکز، عصاره مخمر، پپتون و عصاره گوشت بیشترین میزان توده سلولی و کمترین میزان کشت سطحی را نسبت به دیگر محیط ها ایجاد نمود و برای بررسی های بیشتر در بیوراکتور انتخاب شد.

به دلیل تولید متابولیت های مختلف از جمله اسید لاکتیک توسط سویه های لاکتوباسیلوس طی تخمیر، pH محیط کشت به طور موثری کاهش می یابد که اثر قابل ملاحظه تغییرات pH بر رشد و تولید بیوسورفکتانت را تایید می نماید. در طول آزمون های انجام شده در فلاسک های هم خورنده، میزان pH محیط های کشت از ۶/۲ تا حدود ۴ کاهش یافت، در حالی که در بیوراکتور، pH محیط کشت در طول دوره تخمیر ثابت نگه داشته شد. محیط های کشت مورد آزمون به منظور تشکیل توده سلولی و به دنبال آن بیوسورفکتانت بیشتر، تحت شرایط کنترل شده در بیوراکتور مورد ارزیابی مجدد قرار



نمودار ۱) طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز بیوسورفکتانت تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (ATCC 8014)

نتیجه گیری

سویه های *لاکتوباسیلوس* به عنوان تولیدکنندگان بیوسورفکتانت شناسایی شده اند. آنها معمولاً برای استفاده در صنایع غذایی و دارویی مطلوب هستند. در مقایسه با دیگر تولیدکنندگان بیوسورفکتانت مانند *باسیلوس* و *سودوموناس*، *لاکتوباسیلوس* ها مقادیر کمتری بیوسورفکتانت تولید می کنند. از این رو، بهینه سازی منابع کربن و نیتروژن می تواند به افزایش راندمان تولید کمک کند. بر این اساس، در مطالعه حاضر، سه محیط کشت مختلف با مقدار منابع نیتروژن (عصاره مخمر، پپتون و عصاره گوشت) یکسان و مقدار گلوکز متفاوت برای بررسی اثر منبع کربنی اصلی بر بهره وری توده سلولی و بیوسورفکتانت توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (ATCC 8014) مورد ارزیابی قرار گرفت. غنی ترین محیط کشت از لحاظ منبع کربن بیشترین میزان توده سلولی و در نتیجه بیوسورفکتانت را تولید کرد. علاوه بر این، راندمان تولید به طور قابل ملاحظه ای در بیوراکتور غیرمداوم نسبت به تولید فلاسک های هم خورنده افزایش یافت. طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز نشان داد که بیوسورفکتانت تولید شده مخلوطی از پروتئین، پلی ساکارید و احتمالاً گروه فسفات و دارای ساختار گلیکوپروتئینی است.

تشکر و قدردانی: موردی توسط نویسندگان بیان نشد.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان بیان نشد.

تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: اسما بهزادینا (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۵٪)؛ مرضیه موسوی نسب (نویسنده دوم)، روش شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۵٪)؛ سید عباس شجاع الساداتی (نویسنده سوم)، روش شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۵٪)؛ پیام ستوده (نویسنده چهارم)، روش شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۵٪).

منابع مالی: منابع مالی این مطالعه توسط دانشگاه شیراز (گرنه شماره GR-56) تامین شده است.

گرفتند. فرآیند تخمیر غیرمداوم در یک بیوراکتور ۵ لیتری با حجم کاری ۲ لیتر در دمای ۳۰°C، pH برابر ۶/۲ و سرعت هم زدن ۱۲۰ دور در دقیقه انجام گرفت. جدول ۳ غلظت توده سلولی و کشش سطحی نتایج حاصل از تخمیر در بیوراکتور را نشان می دهد. محیط شماره ۱ از لحاظ آماری بیشترین مقدار توده سلولی (۴/۱۷ گرم بر لیتر) و کمترین کشش سطحی (۴۰/۴۸ میلی نیوتن بر متر) را در مقایسه با دیگر محیط ها نشان داد ($p < 0.05$). نتایج مشابهی توسط رودریگز و همکاران [21] در رابطه با استفاده از چهار سویه *لاکتوباسیلوس* برای تولید بیوسورفکتانت گزارش شده است. نتایج به دست آمده از تخمیر در بیوراکتور به طور قابل ملاحظه ای بالاتر از آزمون های انجام شده فلاسک های هم خورنده هستند.

روش طیف سنجی مادون قرمز برای تعیین گروه های عاملی ترکیب بیوسورفکتانت ناشناخته حاصل از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (ATCC 8014) مورد استفاده قرار گرفت (نمودار ۱). همان طور که در شکل مشاهده می شود باند ۳۲۴۶ بر سانتی متر مربوط به عامل هیدروکسیل است. باندهای ۲۳۴۱ و ۲۳۶۰ بر سانتی متر گروه P-H را نشان می دهند. جذب در ۱۵۸۸ بر سانتی متر مربوط به باند آمید نوع دوم پروتئین ها است. باندهای مشاهده شده در ۱۴۵۷ و ۱۴۱۳ بر سانتی متر نشانگر حضور -CH، -CH₂- و -CH₃ در زنجیره آلیفاتیک هستند. جذب در طول موج های ۱۲۴۳ و ۹۲۸ بر سانتی متر مولکول های آروماتیک و آلیفاتیک آراسته شده توسط اتم های فسفر و اکسیژن (P-O-C) را نشان می دهد. وجود باندهای ۱۱۲۱ و ۱۰۴۰ بر سانتی متر مربوط به باندهای پلی ساکارید (C-O-C) هستند. بنابراین، باندهای مشاهده شده از بیوسورفکتانت مخلوطی از پروتئین و پلی ساکارید پیوسته به گروه فسفات را نشان می دهند. در تطابق با نتایج مطالعه حاضر، ولگردز و همکاران [22]، ساختار بیوسورفکتانت حاصل از سویه های *لاکتوباسیلوس* را به صورت مخلوطی از پروتئین، پلی ساکارید و گروه فسفات گزارش دادند.

جدول ۲) توده سلولی و کشش سطحی حاصل از محیط های کشت مورد آزمون در فلاسک های هم خورنده

محیط کشت	توده سلولی (گرم بر لیتر)	کشش سطحی (میلی نیوتن بر متر)
شماره ۱	a ۳/۹۲±۰/۰۲	A ۴۱/۱۷±۰/۰۴
شماره ۲	b ۲/۷۲±۰/۰۲۲	B ۴۴/۹۳±۰/۰۲۱
شماره ۳	b ۲/۲۲±۰/۰۰۷	C ۴۵/۸۹±۰/۰۲۳

داده ها به صورت میانگین آماری سه تکرار بیان شده اند. حروف بزرگ و کوچک مختلف در هر ستون اختلاف معنی دار بین داده ها را نشان می دهد ($p < 0.05$).

جدول ۳) توده سلولی و کشش سطحی حاصل از محیط کشت های مورد آزمون در بیوراکتور

محیط کشت	توده سلولی (گرم بر لیتر)	کشش سطحی (میلی نیوتن بر متر)
شماره ۱	a ۴/۱۷±۰/۰۰۲	A ۴۰/۴۸±۰/۰۰۸
شماره ۲	b ۳/۲۱±۰/۰۰۴	B ۴۴/۰۱±۰/۰۱۲
شماره ۳	c ۲/۶±۰/۰۱۱	C ۴۴/۸۸±۰/۰۱۴

داده ها به صورت میانگین آماری سه تکرار بیان می شوند. حروف بزرگ و کوچک مختلف در هر ستون اختلاف معنی دار بین داده ها را نشان می دهد ($p < 0.05$).

biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Coll Surf B Biointerfaces*. 2006;49(1):79-86.

13- Ghasemi A, Moosavi-Nasab M, Behzadnia A, Rezaei M. Enhanced biosurfactant production with low-quality date syrup by *Lactobacillus rhamnosus* using a fed-batch fermentation. *J Food Sci Biotechnol*. 2018;27(4):1137-44.

14- Behzadnia A, Moosavi-Nasab M, Tiwari BK. Stimulation of biosurfactant production by *Lactobacillus plantarum* using ultrasound. *Ultrason Sonochem*. 2019;59:104724.

15- Ghasemi A, Moosavi-Nasab M, Setoodeh P, Mesbahi G, Yousefi G. Biosurfactant production by lactic acid bacterium *Pediococcus dextrinicus* SHU1593 grown on different carbon sources: Strain screening followed by product characterization. *Scientific Rep*. 2019;9(1):1-2.

16- Moshtagh B, Hawboldt K, Zhang B. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* N3-1P using the brewery waste as the carbon source. *Environ Technol*. 2019;40(25):3371-80.

17- Behzadnia A, Moosavi-Nasab M, Tiwari BK, Setoodeh P. *Lactobacillus plantarum*-derived biosurfactant: Ultrasound-induced production and characterization. *Ultrason Sonochem*. 2020;65:105037.

18- Rodrigues LJ, Teixeira RJ, Oliveira R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochem Eng J*. 2006;32(3):135-42.

19- Gudiña EJ, Teixeira JA, Rodrigues LR. Biosurfactant-producing lactobacilli: Screening, production profiles, and effect of medium composition. *Appl Environ Soil Sci*. 2011;2011:201254.

20- Onwosi CO, Odiibo FJ. Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. *World J Microbiol Biotechnol*. 2012;28(3):937-42.

21- Rodrigues L, Moldes A, Teixeira J, Oliveira R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochem Eng J*. 2006;28(2):109-16.

22- Velraeds MM, Van Der Mei HC, Reid G, Busscher HJ. Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. *Coll Surf B Biointerfaces*. 1996;8(1-2):51-61.

1- Naughton PJ, Marchant R, Naughton V, Banat IM. Microbial biosurfactants: Current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *J Appl Microbiol*. 2019;127(1):12-28.

2- Rahman PK, Gakpe E. Production, characterisation and applications of biosurfactants-review. *Biotechnology*. 2008;7(2):360-70.

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

4- Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997;61(1):47-64.

5- Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *J Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;87(2):427-44.

6- Makkar RS, Cameotra SS, Banat IM. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*. 2011;1(1):5.

7- Saharan BS, Sahu RK, Sharma D. A review on biosurfactants: Fermentation, current developments and perspectives. *Genet Eng Biotechnol J*. 2011;2011(1):1-14.

8- Sridevi G, Thangavel P. Environmental sustainability: Role of green technologies. New Delhi: Springer; 2015.

9- Gomaa EZ. Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *J Gen Appl Microbiol*. 2013;59(6):425-36.

10- Gudiña EJ, Rocha V, Teixeira JA, Rodrigues LR. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Lett Appl Microbiol*. 2010;50(4):419-24.

11- Gudina EJ, Teixeira JA, Rodrigues LR. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Coll Surf B Biointerfaces*. 2010;76(1):298-304.

12- Rodrigues LR, Teixeira JA, Van Der Mei HC, Oliveira R. Physicochemical and functional characterization of a