نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۸ شماره ۱/ سال ۱۳۹۷/ صفحات ۴۹ تا ۵۸

بررسی امکان استفاده از ضایعات برنج و گندم برای تولید بیوسورفکتانت توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

نفیسه بخشی[۱]، صبیحه سلیمانیان زاد[۲،۳*] و محمود شیخ زین الدین[۲]

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۱٤ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۳

[۱] دانشجوی مقطع دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

[۲] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

[۳] پژوهشکده زیست‌فناوری و مهندسی زیستی، دانشگاه صنعتی اصفهان

* مسئول مکاتبه: Email: soleiman@cc.iut.ac.ir

چکیده

بیوسورفکتانت‌ها ترکیباتی آمفی‌فیلیک هستند که توسط انواع میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. به نظر می‌رسد اصلی‌ترین دلیل کاربرد محدود بیوسورفکتانت‌ها در حوزه غذا، اطلاعات اندک در مورد سمیت آن‌ها و هزینه بالای تولید است. در این تحقیق از گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 (پروبیوتیک) برای تولید بیوسورفکتانت متصل به دیواره سلولی در محیط کشت سنتزی MRS استفاده شد. همچنین به منظور مقرون به صرفه کردن تولید، چهار سوبسترای لیگنوسلولزی ضایعاتی، ارزان قیمت و فراوان ایران از جمله ساقه و سبوس برنج و گندم برای تولید بررسی شدند. بیوسورفکتانت تولیدی روی عصاره حاصل از هیدرولیز سبوس برنج در مقایسه با سایر بیوسورفکتانت‌های تولیدی در محیط کشت‌های ضایعاتی، کمترین کشش سطحی (۲۳/۷٤ میلی نیوتن بر متر) را نشان داد و برای بررسی بیشتر انتخاب گردید. بیوسورفکتانت‌های تولیدی در محیط کشت MRS و عصاره هیدرولیزشده سبوس برنج، استخراج، خالص‌سازی و شناسایی شدند. آزمایش‌های بیوشیمیایی و طیف سنج تبدیل فوریه مادون قرمز نشان داد که بیوسورفکتانت‌های تولیدی ترکیبی از پلی‌ساکارید و پروتئین با ساختار مختلف هستند. این مطالعه اطلاعات اولیه‌ای برای تولید صنعتی بیوسورفکتانت مقرون به صرفه و ایمن فراهم می‌کند که به نظر می‌رسد می‌تواند در مصارف غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: بیوسورفکتانت، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، ضایعات کشاورزی، عصاره هیدرولیزی سبوس برنج، کشش سطحی

مقدمه

بیوسورفکتانت‌ها ترکیباتی آمفی‌فیلیک هستند که توسط انواع میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و دارای یک جز هیدروفیل و یک جز هیدروفوب می‌باشند. خصوصیات و عملکردهای فیزیولوژیکی متنوع در میکروارگانیسم تولید کننده برای گروه‌های مختلف بیوسورفکتانت محتمل است از جمله افزایش حلالیت ترکیبات نامحلول در آب یا هیدروفوب (که جذب و متابولیسم آن‌ها را در

سلول تسهیل می‌کند)، اتصال به فلزات سنگین، بیماری‌زایی، چسبندگی سلولی و تجمع، کروم سنسینگ[1] و تشکیل بیوفیلم بیوسورفکتانت‌های میکروبی بر حسب ترکیب شیمیایی و منشا میکروبی دسته‌بندی می‌شوند و شامل گلیکولیپیدها، لیپوپپتیدها، کمپلکس‌های پلی‌ساکارید-پروتئین، پروتئین‌ها، لیپوپلی‌ساکاریدها، فسفولیپیدها، اسیدهای چرب و لیپیدهای خنثی هستند که تولید هر کدام بستگی به میکروارگانیسم تولیدکننده، ماده خام و شرایط فرایند دارد (بنت و همکاران ۲۰۱۰).

در سال‌های اخیر بیوسورفکتانت‌های میکروبی به دلیل خصوصیات عملکردی مفید مثل امولسیون‌کنندگی، جدا کردن دو فاز، مرطوب‌کنندگی، تشکیل کف، حل‌کنندگی، جلوگیری از خوردگی، کاهش ویسکوزیته و جلوگیری از تشکیل بیوفیلم به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. آن‌ها نسبت به سورفاکتانت‌های شیمیایی مزایای زیادی داشته و می‌توانند در بسیاری از حوزه‌ها از جمله کشاورزی، تمیز کردن در صنعت، نوشابه‌ها و مواد غذایی، منسوجات، مواد آرایشی و دارویی جایگزین سورفاکتانت‌های سنتی شیمیایی شوند. مزایای آن‌ها عبارتند از: سمیت کمتر، زیست‌تخریب‌پذیری، کارایی در محدوده وسیع‌تر pH، دما و نمک، قابلیت امولسیون‌کنندگی بالا و فعالیت ضدمیکروبی و ضد‌چسبندگی. علاوه بر این، آن‌ها به دلیل خصوصیات فیزیکی و ویژگی‌های ساختاری جدید کاربردهای بالقوه بسیار زیادی خواهند داشت؛ می‌توانند از سوبستراهای تجدیدپذیر تولید شوند و نیز به سادگی از طریق مهندسی ژنتیک تغییر (بیولوژیک یا بیوشیمیایی) داده شوند (مونتیرو و همکاران ۲۰۱۰).

با توجه به خصوصیات جالب نشان داده شده توسط بیوسورفکتانت‌ها می‌توانیم روی کاربردهای آینده آن‌ها به عنوان یک جز چندهدفی که همزمان فعالیت امولسیفایری، ضدچسبندگی و ضدمیکروبی نشان می‌دهند و بنابراین برای بسیاری از کاربردهای غذایی مناسب هستند تمرکز کنیم (بنت و همکاران ۲۰۱۰). به نظر می‌رسد اصلی‌ترین دلیل کاربرد محدود بیوسورفکتانت‌ها در حوزه غذا اطلاعات اندک در مورد سمیت آن‌ها و هزینه بالای تولید است. در این راستا استفاده از ضایعات کشاورزی-صنعتی و غذا هزینه تولید بیوسورفکتانت و نیز هزینه تیمار ضایعات را کاهش می‌دهد و بیوسورفکتانت‌های ایمن به دست آمده از میکروارگانیسم‌های ایمن[2] مثل لاکتوباسیلوس‌ها برای کاربردهای غذایی و دارویی، بسیار نویدبخش خواهد بود (نیچکه و کوستا ۲۰۰۷).

در سال‌های اخیر شناسایی نقش لاکتوباسیلوس‌ها در حفظ هموستازیز درون اکوسیستم‌های فعال مثل مجرای معدی-روده‌ای و تناسلی و در جلوگیری از کلونیزه شدن و عفونتی که توسط میکروارگانیسم‌های پاتوژن ایجاد می‌شود در حال افزایش است. مستندات نشان می‌دهد که لاکتوباسیلوس‌ها از طریق تولید محصولاتی مانند پراکسید هیدروژن، اسید لاکتیک، باکتریوسین و بیوسورفکتانت نقش محافظت‌کننده‌ای بازی می‌کنند که از رشد پاتوژن‌های بالقوه جلوگیری می‌کند (گودینا و همکاران ۲۰۱۰). اطلاعات در مورد ساختمان شیمیایی بیوسورفکتانت‌های تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک محدود است. بیوسورفکتانت تولید شده توسط لاکتوباسیلوس‌های مختلف به عنوان مخلوط‌های بیولوژیکی کمپلکس توصیف شده‌اند که از چسبیدن پاتوژن‌ها به مواد زیستی و سطح سلول‌ها جلوگیری می‌کنند اما ساختار شیمیایی این ترکیبات کمتر مورد مطالعه قرار گرفته و اطلاعات اندکی در مورد ساختار شیمیایی این ترکیبات وجود دارد (گودینا و همکاران ۲۰۱۰). در مورد تولید بیوسورفکتانت توسط گونه‌های *لاکتوباسیلوس*، مطالعات اندکی صورت گرفته است، به علاوه، در این مطالعات عمدتا از محیط کشت‌های سنتزی از جمله

1-Quorum sensing

2- Generally Recognized As Safe (GRAS)

MRS[1] استفاده شده است که هزینه تولید را بسیار بالا می‌برد (رودریگز و همکاران ۲۰۰۶؛ گودینا و همکاران ۲۰۱۰). تنها تعداد کمی گزارش راجع به تولید بیوسورفکتانت توسط لاکتوباسیلوس‌ها روی محیط کشت‌های ضایعاتی وجود دارد (ملدس و همکاران ۲۰۰۷؛ پورتیلا-ریورا و همکاران ۲۰۰۸؛ گلک و همکاران ۲۰۰۹؛ توسی و همکاران ۲۰۱۱). مهمترین مشکل در مورد تولید بیوسورفکتانت توسط گونه‌های *لاکتوباسیلوس*، مربوط به استفاده از سوبستراهای جایگزین به عنوان منبع کربنی یا به عبارتی یافتن ضایعاتی با تعادل مناسب مواد مغذی است که اجازه رشد سلولی و تجمع محصول را بدهد. ایجاد یک محیط کشت بر مبنای ضایعات برای تولید بیوسورفکتانت نیز مشکل بعدی است زیرا نوع و خصوصیات محصول نهایی وابستگی زیادی به ترکیب محیط کشت خواهد داشت (توسی و همکاران ۲۰۱۱). تعداد کمی گزارش در مورد تولید بیوسورفکتانت روی ضایعات کشاورزی-غذا توسط *لاکتوباسیلوس پنتوسوس*[2] و *لاکتوباسیلوس دلبروکی*[3] وجود دارد. آب پنیر برای کشت *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* استفاده شده است (رودریگز و همکاران ۲۰۰۶). همچنین برای تولید همزمان بیوسورفکتانت با اسید لاکتیک توسط *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* از تفاله انگور حاصل از شراب‌سازی و شاخه‌های بریده درخت انگور استفاده شده است (بوستز و همکاران ۲۰۰۷؛ پورتیلا-ریورا و همکاران ۲۰۰۸). بیوسورفکتانت با تخمیر توسط *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* روی مایع حاوی قند حاصل از هیدرولیز شاخه‌های بریده درخت انگور، غلاف ذرت، سبوس جو و پولک‌های اوکالیپتوس به دست آمده است. بهترین نتیجه مربوط به بریده درخت انگور بوده است که بیوسورفکتانت متصل به دیواره سلولی فعالیت سطحی بیشتری (۲۱/۳ واحد کاهش) نشان داده است (بوستز و همکاران ۲۰۰۷). در این تحقیق امکان تولید بیوسورفکتانت توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 با خواص پروبیوتیکی روی محیط کشت سنتزی MRS و ضایعات کشاورزی فراوان ایران به عنوان محیط کشت بررسی می‌شود. از آنجا که محیط کشت، منبع کربن و شرایط رشد از قبیل pH، دما، مواد مغذی محدود کننده و عناصر کم مقدار می‌توانند نوع و بازده بیوسورفکتانت را تحت تاثیر قرار بدهند (ملدس و همکاران ۲۰۰۷)، خصوصیات ساختمانی بیوسورفکتانت تولید شده در محیط کشت ضایعاتی بررسی و با ترکیب به دست آمده در محیط کشت MRS مقایسه می‌شود.

مواد و روش‌ها

فعال‌سازی میکروارگانیسم

در این تحقیق از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 موجود در کلکسیون میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی-بیوتکنولوژی گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان استفاده شد. این باکتری قبلا در همین آزمایشگاه از مدفوع نوزاد نوزده ماهه جدا شده بود و در آبگوشت MRS دارای ۳۰ ٪ (حجمی/حجمی) گلیسرول در $-80^{\circ}C$ نگهداری می‌شد (میرلوحی و همکاران ۲۰۰۹). خواص پروبیوتیکی این سویه اثبات شده است (میرلوحی و همکاران ۲۰۰۹) و از آن به عنوان یک آنتاگونیست میکروبی به منظور کنترل زیستی فساد توت فرنگی استفاده شده است (زمانی زاده و همکاران ۲۰۱۳). فعال‌سازی میکروارگانیسم منجمد در محیط کشت تازه MRS (مرک، آلمان) و گرمخانه‌گذاری به مدت ۱۸ ساعت در $37^{\circ}C$ انجام شده و از آن برای تلقیح در مراحل بعدی استفاده شد (گودینا و همکاران ۲۰۱۰).

1- de Man, Rogosa and Sharpe
2- *Lactobacillus pentosus*
3- *Lactobacillus delbrueckii*

انتخاب سوبسترای ضایعاتی

آماده‌سازی سوبستراهای لیگنوسلولزی

به منظور مقرون به صرفه کردن تولید بیوسورفکتانت توسط سویه مورد نظر، سوبستراهای ارزان قیمت ساقه و سبوس برنج و گندم به عنوان منبع کربنی استفاده شد. این ضایعات از زمین‌های زراعی و آسیاب‌های منطقه اصفهان خریداری گردید. ساقه‌ها ابتدا با آب و سپس با آب مقطر شستشو و در $70^{\circ}C$ خشک شدند (کی و همکاران ۲۰۱۰). تمام سوبستراها پس از آسیاب شدن در یک آسیاب سنگی، از الک با مش ۶۰ عبور داده شدند. برای هیدرولیز سوبسترا از اسید سولفوریک ۱/۵ ٪ استفاده شد. سبوس برنج یا گندم (۱۰۰گرم) و ساقه برنج یا گندم (۵۰ گرم) در ارلن‌های ۲ لیتری با ۴۰۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱/۵ ٪ مخلوط شد. عملیات تیمار اسیدی در یک انکوباتور شیکردار (آیکا کا اس۴۰۰۰ آی، آلمان) در دمای $80^{\circ}C$، دور همزدن۲۲۰ دور بر دقیقه، و به مدت ۲۰ ساعت انجام شد (لی و همکاران ۲۰۱۰). حالت اسیدی عصاره‌های هیدرولیزی با پودر $CaCo_3$ تا رسیدن به pH= ۶ خنثی شد. سپس $CaSo_4$ به وجود آمده در فرایند خنثی‌سازی، توسط سانتریفوژ (۷۵۰۰ جی، $25^{\circ}C$، ۵ دقیقه) از عصاره‌های هیدرولیزی جدا شد. بعد از آن عصاره‌های هیدرولیزی در $121^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه استریل و به عنوان محیط کشت استفاده شدند (پورتیلا-ریورا و همکاران ۲۰۰۸).

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی عصاره‌های هیدرولیزی

قند کل با روش فنل‌سولفوریک اسید با استفاده از دی-گلوکز به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (دوبیوس و همکاران ۱۹۵۶). اندازه‌گیری قند احیا با روش دی-نیتروسالیسیلیک اسید انجام شد (میلر ۱۹۵۹). میزان پروتئین با روش برادفورد با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (برادفورد ۱۹۷۶).

فرایند تخمیر

عصاره‌های هیدرولیزی آماده شده رقیق شدند به طوری که حاوی ۲۰ گرم بر لیتر قند احیا باشند. تولید بیوسورفکتانت در ارلن‌های با حجم ۲۵۰ میلی لیتر حاوی ۱۰۰ میلی لیتر از عصاره‌های هیدرولیزی رقیق شده یا MRS انجام شد. ارلن‌ها به میزان ۱ ٪ (حجمی/حجمی)، حاوی ۷/۳۱±۰/۰۷ لگاریتم تعداد کلنی بر میلی لیتر، تلقیح شده و به مدت ۷۲ ساعت، در $37^{\circ}C$ و ۱۲۰ دور بر دقیقه گرمخانه‌گذاری گردید. کشت و شمارش توده سلولی (لگاریتم تعداد کلنی بر میلی لیتر) طبق روش مایلز میزرا (۱۹۳۸) انجام گرفت. در این روش پس از رقیق‌سازی دهدهی کشت باکتریایی در سرم فیزیولوژیک، تشتک پتری به چهار قسمت مساوی تقسیم و در هر قسمت چهار لکه ۱۰ میکرولیتری از هر رقت کشت شد. سپس پتری‌ها به مدت ۱۵ دقیقه کنار شعله قرار گرفتند تا لکه‌ها کاملا خشک شوند و در شرایط مناسب گرمخانه‌گذاری شدند. پس از پایان گرمخانه‌گذاری تعداد کلنی‌ها در ٤ لکه با هم جمع زده شد و در عدد ۲۵ و عکس ضریب رقت ضرب شد و نهایتا تعداد باکتری بر حسب لگاریتم تعداد کلنی بر میلی لیتر گزارش شد.

استخراج بیوسورفکتانت متصل به دیواره سلولی

سلول‌ها توسط سانتریفوژ کردن (۱۰۰۰۰جی، $10^{\circ}C$، ۵ دقیقه) از محیط کشت جدا شد، سپس ۲ بار با آب مقطر شستشو داده شده و درون ۲۰ میلی لیتر محلول بافر نمکی فسفات[1](pH=۷/۰) تهیه شده ازمخلوط ۱۰ میلی مول KH_2PO_4/K_2HPO_4 و ۱۵۰ میلی مول NaCl رقیق شدند. آنگاه درون انکوباتور با دور ۱۲۰ دور بر دقیقه به مدت ۲ ساعت در دمای $25^{\circ}C$ نگهداری شده، تا بیوسورفکتانت متصل به دیواره سلولی جدا شود. بعد از آن باکتری‌ها با سانتریفوژ کردن (۱۰۰۰۰جی، $10^{\circ}C$، ۵ دقیقه) حذف شدند. مایع رویی نمونه حاوی بیوسورفکتانت برای اندازه‌گیری کاهش کشش سطحی

1- Phosphate Buffered Saline

استفاده شد. به منظور خالص‌سازی بیوسورفکتانت، مایع رویی نمونه در مقابل آب مقطر درون فیلتر غشایی (۸۰۰۰-۶۰۰۰ کیلودالتون، سلوسپ، محصولات فیلتراسیون غشایی، آمریکا) در $4\ ^{\circ}C$ به مدت یک شب دیالیز و درون یک خشک‌کن انجمادی (کریست آلفا-۱-۴، آلمان) تا رطوبت کمتر از ۵ درصد خشک شدند (گودینا و همکاران ۲۰۱۰).

اندازه‌گیری کشش سطحی (تنسیومتری)

کاهش کشش سطحی توسط تنسیومتر (دیکت ۱۱، دیتا فیزیک، آلمان) با استفاده از حلقه دونوی[1] از جنس پلاتینیوم-ایریدیوم با شعاع ۹/۳۵ میلی‌متر در دمای اتاق اندازه‌گیری گردید (رودریگز و همکاران ۲۰۰۶). کشش سطحی محلول بافر نمکی فسفات در دمای اتاق ۰۱/۲۱±۷۲/۰ میلی نیوتن بر متر بود.

تعیین خصوصیات بیوسورفکتانت

ترکیب بیوشیمیایی بیوسورفکتانت

میزان کربوهیدرات و پروتئین بیوسورفکتانت مطابق روش تعیین قند کل و پروتئین عصاره‌های هیدرولیزی انجام شد.

طیف سنج تبدیل فوریه مادن قرمز

بیوسورفکتانت خشک شده به روش منجمد خشکانی با ۱۰۰میلی گرم برمید پتاسیم مخلوط شده و برای به دست آوردن پلت‌های نیمه شفاف با فشار ۷۵۰۰ کیلوگرم به مدت ۳۰ ثانیه پرس شد، طیف جذب مادون قرمز با استفاده از اسپکترومتر (جاسکو، توکیو، ژاپن) با رزولوشن طیفی و دقت تعداد موج به ترتیب ۴ و ۱۰/۰۱ بر سانتیمتر ثبت شد. تمام اندازه‌گیری‌ها شامل ۵۰۰ اسکن بود (توسی و همکاران ۲۰۱۱).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش‌ها با حداقل دو تکرار انجام شد و در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SAS (9.0) وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

انتخاب سوبسترای ضایعاتی مناسب برای تولید بیوسورفکتانت

به منظور کاهش قیمت تولید بیوسورفکتانت از سوبستراهای فراوان و ارزان قیمت ایران برای تولید توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 (پروبیوتیک) استفاده شد. در جدول ۱ میزان قند کل، قند احیا و پروتئین عصاره‌های هیدرولیزی آورده شده است. با توجه به جدول ۲ *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 قادر به رشد و تولید بیوسورفکتانت روی همه سوبستراهای ضایعاتی است، به طوریکه کشش سطحی بیوسورفکتانت‌های تولیدی (۵۲/۵۶-۴۸/۲۷ میلی نیوتن بر متر) با کشش سطحی بیوسورفکتانت تولیدی در محیط کشت MRS (۴۸/۵۸ میلی نیوتن بر متر) قابل مقایسه است. همچنین کشش سطحی مربوط به بیوسورفاکتانت‌های به دست آمده در این تحقیق با کشش سطحی بیوسورفکتانت گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس‌ها (۸/۰-۴۱/۵۶ میلی نیوتن بر متر) مشابهت دارد (رودریگز و همکاران ۲۰۰۶؛ ملدس و همکاران ۲۰۰۷؛ گلک و همکاران ۲۰۰۹؛ گودینا و همکاران ۲۰۱۰). بیوسورفکتانت تولیدی روی عصاره هیدرولیزی سبوس برنج کمترین کشش سطحی را نشان داد. علاوه بر این، در بین عصاره‌های هیدرولیزی استفاده شده فقط در مایع رویی محیط کشت عصاره هیدرولیزی سبوس برنج اندیس امولسیون‌کنندگی مشاهده شد و جداسازی بیوسورفکتانت خارج سلولی (بیوامولسیفایر) نیز انجام شد (داده‌ها نمایش داده نشد). نوع و تولید بیوسورفکتانت به نوع و میزان ترکیبات محیط کشت بستگی فراوانی دارد و به نظر می‌رسد که عصاره هیدرولیزی سبوس برنج بهترین تعادل ترکیبات مغذی از جمله نسبت کربن به نیتروژن را برای تولید بیوسورفکتانت در بین سوبستراهای ضایعاتی فوق-الذکر دارد و نسبت کربن به نیتروژن شبیه نسبت کربن

1- DuNoüy

به نیتروژن محیط کشت MRS است (جدول ۱). محیط کشت‌های بر پایه مواد لیگنوسلولزی معمولا با مواد مغذی از جمله منابع نیتروژنی مثل عصاره مخمر، پپتون یا شربت خیسانده ذرت غنی‌سازی می‌شوند. همچنین در طول هیدرولیز اسیدی ترکیباتی نظیر اسید استیک، فورفورال یا هیدروکسی متیل فورفورال تولید می‌شود، که باید قبل از استفاده به عنوان محیط کشت میکروارگانیسم، سم‌زدایی عصاره انجام گیرد (بوستز و همکاران ۲۰۰۷).

جدول ۱- ترکیبات تغذیه‌ای سوبستراهای ضایعاتی استریل شده مورد استفاده در این تحقیق

سوبسترا	قند کل (گرم بر لیتر)	قند احیا (گرم بر لیتر)	پروتئین (گرم بر لیتر)	نسبت کربن به نیتروژن
MRS	۲۰	۲۰	۲۲	۰/۹۱
عصاره هیدرولیزی ساقه برنج	۳۹/۳±٦٦/۷۲	۲۷/۱±٤۷/۸٦	۲٦/۱±٤۹/۱۷	۱/۵
عصاره هیدرولیزی ساقه گندم	٤۱/۰±۳٦/۸۲	۲٦/٤±۹۰/۹۲	۱۲/۱±٦۹/۱۸	۳/۲٦
عصاره هیدرولیزی سبوس برنج	۵٦/۱±٤۵/۷۷	٤۱/۰±۹۰/۹۸	۵۱/۰±۱۵/۷۵	۱/۱
عصاره هیدرولیزی سبوس گندم	۱٤٤/۱±۹۹/۹٦	۷۸/۳±۹۰/٦۵	۵۹/۱±٤۰/٦۰	۲/٤٦

داده‌ها میانگین سه تکرار ± انحراف معیار است.

جدول ۲- کشش سطحی بیوسورفکتانت‌های تولیدی روی محیط کشت‌های MRS و عصاره‌های هیدرولیزی ساقه و سبوس برنج و گندم

سوبسترا	کشش سطحی بیوسورفکتانت (میلی نیوتن بر متر)	میزان کاهش کشش سطحی* (میلی نیوتن بر متر)
MRS	٤۸/۰±۵۸/۲۵ a	۲۳/٤۳
عصاره هیدرولیزی ساقه برنج	٤۸/۰±٤۵/۳۰ a	۲۳/۵٦
عصاره هیدرولیزی ساقه گندم	۵۲/۵٦±۱/۰٦ b	۱۹/٤۵
عصاره هیدرولیزی سبوس برنج	٤۸/۲۷±۰/۹۷ a	۲۳/۷٤
عصاره هیدرولیزی سبوس گندم	٤۸/۸۳±۰/۹۱ a	۲۳/۱۸

داده‌ها میانگین دو تکرار ± انحراف معیار است.

حروف متفاوت نشاندهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

*میزان کاهش کشش سطحی در مقایسه با کشش سطحی بافر نمکی فسفات (۰۱/۲۱±۷۲/۰ میلی نیوتن بر متر) محاسبه شده است.

در این تحقیق از عصاره هیدرولیز اسیدی سبوس برنج بدون انجام سم‌زدایی یا غنی‌سازی استفاده گردید. این مسئله مزیت استفاده از سبوس برنج را به عنوان یک منبع فراوان و ارزان قیمت که برای تولید بیوسورفکتانت توسط سویه *لاکتوباسیلوس* مورد نظر مناسب است کاملا آشکار می‌سازد. لی و همکاران در سال ۲۰۱۰ از این روش هیدرولیز برای آماده‌سازی عصاره هیدرولیزی سبوس گندم به منظور تولید اسید لاکتیک توسط *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* استفاده کردند. آن‌ها گزارش کردند که در بین روش‌های مختلف هیدرولیز اسیدی روش تیمار با اسید سولفوریک ۱/۵ ٪ بهترین نتیجه را از نظر رشد و تولید اسید لاکتیک توسط سویه مورد نظر دارد (لی و همکاران ۲۰۱۰). به منظور تولید یک محصول غله‌ای پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* NCIMB 8826 روی محیط دارای ۳ درصد سبوس برنج و بدون افزودن مواد مغذی، به طور

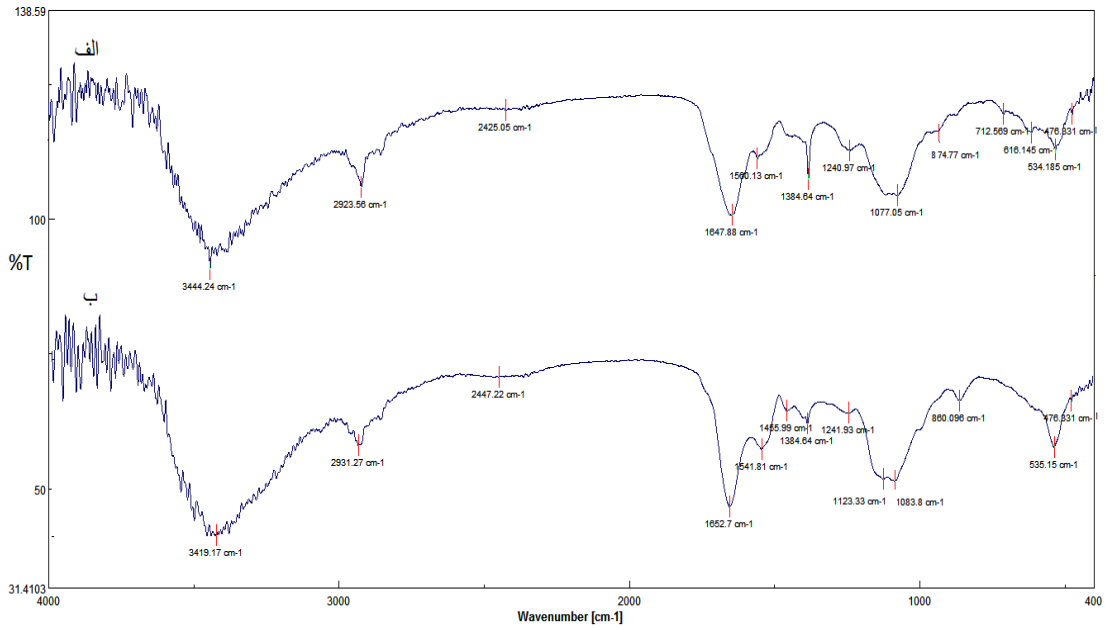
موفقیت‌آمیزی کشت داده شده است (سامان و همکاران ۲۰۱۱).

در جدول ۳ بازده تولید بیوسورفکتانت در محیط کشت MRS و عصاره هیدرولیزی سبوس برنج آورده شده است. بازده تولید بیوسورفکتانت در این پروژه با سایر لاکتوباسیلوس‌ها (۲۰-۱۰۰ میلی گرم بر لیتر) قابل مقایسه است (گودینا و همکاران ۲۰۱۰).

جدول۳- بازده و ترکیب شیمیایی بیوسورفکتانت‌های تولیدی در محیط کشت MRS و عصاره هیدرولیزی سبوس برنج

سوبسترا	بازده توده زیستی (لگاریتم تعداد کلنی بر میلی لیتر)	بازده بیوسورفکتانت (میلی گرم بر لیتر)	ترکیب بیوسورفکتانت	
			کربوهیدرات (٪)	پروتئین(٪)
MRS	۶/۰±۰۹/۱۲	۸۳/۴±۵۰/۹۵	۵۱/۳±۱۵/۴۵	۴۷/۰±۳۵/۷۴
عصاره هیدرولیزی سبوس برنج	۶/۰±۳۷/۱۲	۵۲/۱±۰۰/۴۱	۴۹/۲±۳۶/۳۰	۴۵/۳±۵۱/۲۱

داده‌ها میانگین دو تکرار ± انحراف معیار است.



شکل۱- طیف تبدیل فوریه مادون قرمز بیوسورفکتانت تولیدی روی الف) محیط کشت MRS، و ب) عصاره هیدرولیزی سبوس برنج

شناسایی ساختار بیوسورفکتانت

آزمایشات بیوشیمیایی نشان داد که بیوسورفکتانت‌های تولیدی ترکیبی از پروتئین و پلی‌ساکارید هستند (جدول ۳). برای بررسی خصوصیات ساختاری بیوسورفکتانت‌ها از آنالیز طیف سنج تبدیل فوریه مادون قرمز استفاده گردید (شکل ۱). این روش معمولا برای بررسی گروه‌های عاملی موجود در یک ترکیب ناشناخته انجام می‌گیرد. اگرچه باندهای مربوط به پلی-ساکارید و پروتئین در هر دو طیف وجود دارد ولی وجود بعضی از باندها و همچنین جابجایی بعضی از باندهای مشخصه گروه‌های عاملی، پیشنهاد می‌کند که ترکیب بیوسورفکتانت‌ها متفاوت است. باند مشاهده

شده در۳٤٤٤/۲٤ (الف) و ۳٤۱۹/۱۷ (ب) بر سانتیمتر مربوط به عامل هیدروکسیل است. باند مشاهده شده در۲۹۲۳/٥٦ (الف) و ۲۹۳۱/۲۷ (ب) بر سانتیمتر مربوط به پیوند C—H بوده که این باند به عنوان باند شاخص قندها محسوب می‌شود (تدینی و همکاران ۲۰۱٥). باندهای مربوط به آمید نوع اول و آمید نوع دوم پروتئین‌ها به ترتیب در۱٦٤۷/۸۷ و ۱٥٦۰/۱۳ (الف) و ۱٦٥۲/۷۰ و ۱٥٤۱/۸۱ (ب) بر سانتیمتر دیده شد. وجود باندهای ۱۳۸٤/٦٤ و ۱۲٤۰/۹۷ بر سانتیمتر در طیف مربوط به بیوسورفکتانت تولیدی روی محیط MRS و وجود باندهای ۱۳۸٤/٦٤، ۱۲٤۱/۹۳ و ۱٤٥٥/۹۹ بر سانتیمتر در طیف مربوط به بیوسورفکتانت تولیدی روی محیط عصاره هیدرولیزی شیمیایی سبوس برنج مربوط به پیوندهای C—H، COH و C-O-C می باشد. همچنین حضور باند در محدوده ۱۲٤۰ بر سانتیمتر می‌تواند مبین حضور فسفات در ترکیب باشد (گلک و همکاران ۲۰۰۹). باندهای مشاهده شده در ۱۰۷۷/۰٥ (الف) و ۱۰۸۳/۸ (ب) بر سانتیمتر مشخصه حضور پلی ساکارید در ترکیب هستند. وجود باند در ناحیه ۸۷٤/۷۷ (الف) و ۸٦۰/۰۹ (ب) بر سانتیمتر مبین وجود پیوندهای آلفا در فرم پیرانوزی قندهاست (تدینی و همکاران ۲۰۱٥). اطلاعات بسیار اندکی درباره ترکیب بیوسورفکتانت‌ها، به دلیل پیچیدگی‌های ساختاری بسیار زیاد آن‌ها، در دست است. بیوسورفکتانت‌های لاکتوباسیلوس‌های مختلف، اغلب ترکیبی از پلی‌ساکارید و پروتئین هستند، در بعضی از موارد گروه‌های فسفات نیز در ساختمان آن‌ها مشاهده شده است (ولرادز و همکاران ۱۹۹٦؛ گلک و همکاران ۲۰۰۹؛ گودینا و همکاران ۲۰۱۰).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه امکان استفاده از ضایعات لیگنوسلولزی فراوان ایران برای تولید بیوسورفکتانت متصل به دیواره سلولی توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 ارزیابی شد. نتایج نشان داد که در میان سوبستراهای استفاده شده عصاره هیدرولیزی سبوس برنج می‌تواند به طور موفقیت‌آمیزی برای تولید مقرون به صرفه بیوسورفکتانت استفاده شود. این بیوسورفکتانت خالص‌سازی و شناسایی شد. ترکیب شیمیایی و کاهش کشش سطحی این بیوسورفاکتات با بیوسورفکتانت تولیدی در محیط کشت MRS و نیز با سایر لاکتوباسیلوس‌ها قابل مقایسه است. از آنجا که سویه مورد نظر یک باکتری پروبیوتیک است، بیوسورفکتانت تولیدی می‌تواند در بسیاری از زمینه-های مرتبط با غذا و پزشکی مورد استفاده قرار گیرد. چگونگی عملکرد این بیوسورفکتانت در زمینه‌های مختلف نیازمند مطالعات بیشتر است.

منابع مورد استفاده

Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, and Marchant R, 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Applied Microbiology and Biotechnology 87(2):427-44.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72(1-2):248-54.

Bustos G, de la Torre N, Moldes AB, Cruz JM, and Domínguez JM, 2007. Revalorization of hemicellulosic trimming vine shoots hydrolyzates trough continuous production of lactic acid and biosurfactants by *L. pentosus*. Journal of Food Engineering 78(2):405-12.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, and Smith F, 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28(3):350-6.

Golek P, Bednarski W, Brzozowski B, and Dziuba B, 2009. The obtaining and properties of biosurfactants synthesized by bacteria of the genus *Lactobacillus*. Annals of Microbiology 59(1):119-26.

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

Li Z, Han L, Ji Y, Wang X, and Tan T, 2010. Fermentative production of l-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*. Biochemical Engineering Journal 49(1):138-42.

Miles A, and Misra SS, 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. Journal of Hygiene 38:732-749.

Miller GL, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31(3):426-8.

Mirlohi M, Soleimanian-Zad S, Dokhani S, Sheikh-Zeinodin M, and Abghary A, 2009. Investigation of acid and bile tolerance of native lactobacilli isolated from fecal samples and commercial probiotics by growth and survival studies. Iranian Journal of Biotechnology 7(4):233-40.

Moldes AB, Torrado AM, Barral MT, and Domínguez JM, 2007. Evaluation of biosurfactant production from various agricultural residues by *Lactobacillus pentosus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(11):4481-6.

Monteiro AS, Bonfim MRQ, Domingues VS, Correia Jr A, Siqueira EP, Zani CL, and Santos VL, 2010. Identification and characterization of bioemulsifier-producing yeasts isolated from effluents of a dairy industry. Bioresource Technology 101(14):5186-93.

Nitschke M, and Costa S, 2007. Biosurfactants in food industry. Trends in Food Science & Technology 18(5):252-9.

Portilla-Rivera O, Torrado A, Domínguez JM, and Moldes AB, 2008. Stability and emulsifying capacity of biosurfactants obtained from lignocellulosic sources using *Lactobacillus pentosus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56(17):8074-80.

Qi B, Chen X, Wan Y, 2010. Pretreatment of wheat straw by nonionic surfactant-assisted dilute acid for enhancing enzymatic hydrolysis and ethanol production. Bioresource Technology 101:4875–4883.

Rodrigues L, Moldes A, Teixeira J, and Oliveira R, 2006. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by Lactobacillus strains. Biochemical Engineering Journal 28(2):109-16.

Saman P, Fucinos P, Vazquez JA, Pandiella SS, 2011. Fermentability of Brown Rice and Rice Bran for Growth of Human *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826. Food Technology and Biotechnology 49(1):128-132

Tadayoni M, Sheikh-Zeinoddin M, and Soleimanian-Zad S, 2015. Isolation of bioactive polysaccharide from acorn and evaluation of its functional properties. International Journal of Biological Macromolecules 72:179-84.

Thavasi R, Jayalakshmi S, and Banat IM, 2011. Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. Bioresource Technology 102(3):3366-72.

Velraeds MMC, Van Der Mei HC, Reid G, and Busscher HJ, 1996. Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 8(1):51-61.

Zamani-Zadeh M, Soleimanian-Zad S, and Sheikh-Zeinoddin M, 2013. Biocontrol of gray mold disease on strawberry fruit by integration of *Lactobacillus plantarum* A_7 with ajwain and cinnamon essential oils. Journal of Food Science 78(10):M1582-M8.

Investigation on the possibility of using rice and wheat wastes for biosurfactant production by *Lactobacillus plantarum*

N Bakhshi [1], S Soleimanian-Zad [2, 3*] and M Sheikh-Zeinoddin [2]

Received: October 5, 2016 Accepted: December 13, 2016
[1]PhD Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
[2]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
[3]Research Institute for Biotechnology and Bioengineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
[*]Corresponding author: E mail: soleiman@cc.iut.ac.ir

Abstract
Biosurfactants are amphiphilic molecules that produced by microorganisms and have both hydrophilic and hydrophobic moieties. Scant information regarding their toxicity, combined with high production cost seem to be the major barrier for the limited uses of biosurfactants in the food area. In this work, *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* PTCC 1896 (probiotic) was used for biosurfactant production in MRS medium. Also, in order to reduce the production cost of biosurfactant, four abundant and low cost lignocellolosic wastes, including rice and wheat bran and straw were evaluated. The biosurfactant produced using rice bran hydrolysate exhibited the minimal surface tension (23.74 mN/m) as compared to other produced biosurfactants and it was selected for further studies. The biosurfactants produced in MRS and rice bran hydrolysate media were extracted, purified and characterized. Biochemical and FTIR spectroscopy analysis showed the biosurfactants are structurally different polysaccharide-protein complexes. These results could provide incentives for the industrial production of the low cost and safe biosurfactant, which seems to offer potential applications in the food and medical industries.

Keywords: Biosurfactant, *Lactobacillus plantarum*, Agricultural by-products, Rice bran hydrolysate, Surface tension