Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iranian J Med Microbiology: Volume 8, Number 1 (06-2014)

Journal homepage: www.ijmm.ir

# Isolation of Yeasts from Bee bread of Honey Bees, *Apis mellifera*, and Evaluation of its Ability to Produce Sophorolipid Biosurfactant

Fereshteh Mousavi [1], Keivan Beheshti Maal [1], Ahmad Reza Massah [2]

1. Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, Iran
2. Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahreza Branch, Islamic Azad University, Shahreza, Isfahan, Iran

## Article Information

**Article history:**
Received:2014/02/12
Accepted:2014/05/27
Available online:2014/05/05

**Article Subject:**
Microbial Biotechnology

**IJMM 1393; 8(1): P 44-53**

**Corresponding author at:**

Dr. Keivan Beheshti Maal

Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Falavarjan, Isfahan, Iran

**Email:**
**beheshtimaal@iaufala.ac.ir**

## Abstract

**Background and Aim:** Biosurfactants are amphipathic molecules with both hydrophilic and hydrophobic moieties that allow them to reduce surface tension. Biosurfactants have several advantages over the chemical surfactants, such as lower toxicity, higher biodegradability and better environmental compatibility. A promising group of glycolipid biosurfactants are sophorolipids that are produced by a group of yeasts. So the aim of this study was isolation of yeasts from bee bread of honey bees.

**Materials and Methods:** The samples were prepared from bee bread of honey bee, *Apis mellifera*. The yeasts were isolated on YMG culture medium. Hemolysis and oil spreading techniques were performed for screening of biosurfactant-producing isolates. The extracted biosurfactants were characterized by thin layer chromatography (TLC) and infrared spectroscopy (FTIR).

**Results:** From a total of 35 isolated yeast strains, 10 isolates had positive oil spreading test. The HG12 isolate showed the highest level of oil spreading character.The TLC and FTIR examinations of the purified Glycolipid biosurfactant confirmed its structure as sophorolipid.

**Conclusions:** This is the first report of production of a sophorolipid biosurfactant from yeast in Iran.

**Key Words:** *Apis mellifera*, Biosurfactant, Sophorolipid, , Surface Tension, Yeast

Copyright © 2014 Iranian journal of medical microbiology. All rights reserved.

Downloaded from ijmm.ir at 5:03 +0330 on Wednesday November 21st 2018

**How to cite this article**:

Mousavi F, Beheshti Mall K, Massah A. Isolation of Yeasts from Bee bread of Honey Bees, Apis mellifera, and Evaluation of its Ability to Produce Sophorolipid Biosurfactant. Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (1) :44-53

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۸ – شماره ۱ – بهار ۱۳۹۳

Journal homepage: www.ijmm.ir

# جداسازی مخمر از نان زنبور عسل *اپیس ملیفرا* و بررسی قابلیت آن در تولید بیوسورفکتانت سوفورولیپید

فرشته موسوی[۱]، کیوان بهشتی مآل[۱]، احمد رضا مساح[۲]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران

۲. گروه شیمی- دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرضا، اصفهان، ایران

***اطلاعات مقاله***

**تاریخچه مقاله**

**دریافت:۱۳۹۳/۰۱/۲۰**

**پذیرش:۱۳۹۳/۰۲/۱۸**

**انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۳/۲۰**

**موضوع:**

بیوتکنولوژی میکروبی

**IJMM 1392; 8(1): P 44-53**

**نویسنده مسئول:**

**دکتر کیوان بهشتی مآل**

**گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران**

تلفن: ۰۳۱۱۷۴۲۰۱۳۶

پست الکترونیک:

**beheshtimaal@iaufala.ac.ir**

## چکیده

**زمینه و اهداف:** بیوسورفکتانت ها ترکیبات آمفی فیلیک، با دو بخش آب دوست و آب گریز درون مولکول هستند که اجازه کاهش کشش سطحی به آن ها را می دهد. بیوسورفکتانت ها نسبت به سورفکتانت شیمیایی دارای مزایای قابلیت تجزیه بیولوژیک، سازگاری با محیط زیست و سمیت کم هستند. یک گروه نوید بخش از بیوسورفکتانت های گلیکولیپیدی سوفورولیپید است که توسط گروهی از مخمرها تولید می گردد. بنابراین هدف این مطالعه جداسازی مخمرهایی از نان عسل است که قابلیت تولید بیوسورفکتانت داشته باشند.

**مواد و روش کار:** در این تحقیق از نان زنبور عسل اپیس ملیفرا نمونه برداری انجام گردید. مخمرها بر روی محیط YMG جداسازی گردیدند. تست همولیز و گسترش نفت جهت غربالگری جدایه های تولید کننده بیوسورفکتانت انجام شد. بیوسورفکتانت تولید شده از طریق کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR) شناسایی گردید.

**یافته‌ها:** از مجموع ۳۵ جدایه مخمری ۱۰ جدایه قادر به گسترش نفت بودند. جدایه ی*HG۱۲* بالاترین میزان گسترش نفت را نشان داد. با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک *(TLC)* و طیف سنجی مادون قرمز *(FT-IR)*، بیوسورفکتانت گلیکولیپیدی خالص به عنوان سوفورولیپید شناسایی گردید.

**نتیجه‌گیری:** این اولین گزارش از تولید بیوسورفکتانت سوفورولیپید از مخمر در ایران است.

**کلمات کلیدی :** بیوسورفکتانت، سوفورولیپید، کشش سطحی، مخمر

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

Downloaded from ijmm.ir at 5:03 +0330 on Wednesday November 21st 2018

## مقدمه

سورفکتانت ها مولکول های آمفی فیلیک یا دوگانه دوست با هر دو دنباله ی آب دوست و آب گریز می باشند که به طور ترجیحی در سطح مشترک بین سیالات با درجات قطبیت و پیوند هیدروژنی مختلف مانند آب- نفت یا آب- هوا شرکت می کنند. بسیاری از ویژگی های قابل توجه فیزیکوشیمیایی سیستم های سورفکتانتی مایع را می توان مرتبط با هم زمانی تمایل گروه های غیر قطبی در اجتناب از تماس با آب و قسمت های قطبی که گرایش شدیدی به هیدراته شدن دارند، دانست. سورفکتانت ها یکی از مهمترین مواد شیمیایی صنعتی با تولید کل بیش از ۱۰ میلیون تن در سال در جهان می باشند که نیمی از آن در مواد شوینده خانگی استفاده می شود. استفاده از این ترکیبات اغلب سمی، منجر به مشکلات زیست محیطی قابل توجهی می شود (۱،۲). بیوسورفکتانت ها با طیف وسیعی از ساختارهای مولکولی متنوع توسط میکروارگانیسم های مختلفی از جمله باکتری، قارچ و مخمرها تولید می شوند. بخش هیدروفیل آنها عمدتا شامل اسید، کاتیون های پپتید یا آنیون های مونو، دی و یا پلی ساکارید است در حالی که بخش آب گریز می تواند یک زنجیره هیدروکربن غیر اشباع یا اشباع یا اسیدهای چرب باشد. جهت گیری ساختار شیمیایی مولکول در سطوح و بین سطوح، طیف وسیعی از خواص مانند توانایی کاهش کشش سطحی و بین سطحی و تشکیل میسل

Downloaded from ijmm.ir at 5:03 +0330 on Wednesday November 21st 2018

و میکروامولسیون بین فازهای مختلف را به آن اعطا می کند (۳). بیوسورفکتانت ها می توانند جایگزین بالقوه ای برای سورفکتانت های مصنوعی باشند. از مزایای بیوسورفکتانت ها در برابر سورفکتانت های با منشا شیمیایی می توان قابلیت تجزیه بیولوژیک، سازگاری با محیط زیست، سمیت کم و فعالیت در دماهای بسیار بالا، pH و شوری را نام برد. با توجه به خواص دترجنتی، ایجاد امولسیون، پراکندگی و حل کنندگی ترکیبات آب گریز انتظار می رود از آن ها در برنامه های مختلف صنعتی و زیست محیطی استفاده شود. بیوسورفکتانت های با وزن مولکولی پایین به گلیکولیپید و لیپوپپتید و بیوسورفکتانت های با وزن مولکولی بالا به پلیمرهای پلی ساکاریدی، لیپوپلی ساکاریدی و لیپوپروتئین تقسیم بندی می گردند (۵،۴). یک گروه نوید بخش از بیوسورفکتانت های گلیکولیپیدی، سوفورولیپید (**Sophorolipid**) می باشد که توسط گروهی از مخمرها تولیدی شود. بیوسورفکتانت سوفورولیپید از اسیدهای چرب ۱۶ یا ۱۸ کربنه و کربوهیدرات سوفروز تشکیل شده است. سوفروز یک قند دی ساکاریدی با پیوند غیر معمول β-1,2 است که در موقعیت '۶ و یا "۶ استیله شده است. قند سوفروز با پیوند بتاگلیکوزیدی به کربن ماقبل آخر اسید اولئیک چرب تک اشباع متصل است. هیدروکسی اسید های چرب با پیوند بتا گلیکوزیدی به قند سوفروز متصل هستند. در انتهای کربوکسیلیک، این اسیدهای چرب به طور آزاد یا درونی در موقعیت "۴ استریفه شده اند که شکل آزاد یا اسیدی سوفورولیپید را ایجاد می کند و یا در برخی موارد دیگر '۶ و"۶ استریفیه گردیده که در این صورت شکل لاکتونی سوفورولیپید تولید می شود. هیدروکسی اسید چرب معمولا ۱۶ یا ۱۸ اتم کربن دارد و می تواند یک یا چند پیوند غیر اشباع داشته باشد (۵). انواع مختلف ساختارهای بیوسورفکتانت سوفورولیپید باعث تنوع گسترده ای در خواص فیزیکوشیمیایی آن گردیده است. شکل لاکتونی خواص فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی متفاوتی در مقایسه با شکل اسیدی دارد. درجه لاکتونیزاسیون به شدت، تعادل لیپوفیل- هیدروفیل، ظرفیت شکل گیری کف و اثرات ضد میکروبی این بیوسورفکتانت را تحت تاثیر خود قرار می دهد. به طورکلی، فرم لاکتونی سوفورولیپید فعالیت ضد میکروبی و کاهش کشش سطحی و فرم اسیدی تولید کف و حلالیت بهتر را باعث می شود (۶). هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی مولکولی مخمرهای تولید کننده بیوسورفکتانت سوفورولیپید از نان زنبور (Bee bread) عسل بوده است.

## مواد و روش ها

برای جداسازی مخمرها از زنبورستان از محیط YMG (Yeast Malt Glucose Agar) استفاده گردید که ترکیبات آن گلوکز ۱۰ گرم، پپتون ۵ گرم، عصاره مخمر ۳ گرم، عصاره مالت ۳ گرم، آگار آگار ۲۰ گرم در یک لیتر آب مقطر است. به منظور تولید بیوسورفکتانت از محیط YUG ( Yeast Urea Glucose) تکمیل شده با روغن های گیاهی استفاده گردید که ترکیبات آن [گلوکز ۱۰۰ گرم، عصاره مخمر۱۰گرم، اوره ۱ گرم و روغن های خوراکی ۱۰ میلی لیتر] در یک لیتر آب مقطر است. جهت استخراج بیوسورفکتانت نیز از اتیل استات و حلال هگزان استفاده گردید. کلیه مواد و محیط کشت هایی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند از محصولات شرکت مرک آلمان تهیه گردیدند.

### نمونه برداری

برای انجام این پروژه در اردیبهشت ماه سال ۹۲ از زنبورستان بزرگ عسل طبیعی، واقع در استان چهار محال و بختیاری با زنبور نژاد *آپیس ملیفرا* نمونه برداری انجام شد. نان زنبور، گرده های گل جمع آوری شده توسط زنبورهای عسل است که از مخلوط کردن با کمی شهد گل یا عسل در سلول های شانه ی کندو ذخیره می‌گردد. به این منظور ابتدا نان زنبور در شانه های کندو مشخص گردید و سپس با کاردک استریل از کندو جدا و در درون لوله های حاوی محیط کشت YMG براث قرار داده شد و با یک میله شیشه ای هم زده و یکنواخت گردید. همچنین به طور مستقیم نان زنبور روی محیط YMG آگار، کشت داده شد. (۸،۷). در شکل ۱ نان زنبور و زنبور عسل *آپیس ملیفرا* نشان داده شده است.

### غربالگری اولیه مخمرهای تولید کننده بیوسورفکتانت

پس از بررسی میکروارگانیسم های جداسازی شده از نظر ماکروسکوپی و میکروسکوپی و اطمینان از مخمر بودن آنها جهت غربالگری مخمرهای تولید کننده ی بیوسورفکتانت

Downloaded from ijmm.ir at 5:03 +0330 on Wednesday November 21st 2018

تست همولیز و گسترش نفت (Oil spread method) انجام شد.

### تست همولیز

هر یک از جدایه ها بر روی پلیت آگار خون دار کشت خطی داده شدند و به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند و سپس از نظر ایجاد همولیز مورد بررسی قرار گرفتند. قطر مناطق روشن به غلظت بیوسورفکتانت بستگی دارد. جدایه های بدون همولیز (-)، همولیز ناقص(۱+)، همولیز کامل با قطر لیز < ۱ سانتی متر (۲+)، همولیز کامل با قطر لیز> ۱سانتی متر اما < ۳ سانتی متر(۳+) و همولیز کامل با قطر لیز> ۳ سانتی متر (۴+) در نظر گرفته شدند (۹).

### تست گسترش نفت

در یک پلیت ۲۵ سانتی متری، ۵۰ میلی لیتر آب افزوده و به آن ۲۰ میلی لیتر نفت خام اضافه شد. به صورتی که نفت به شکل یک لایه ی نازک در سطح آب قرار گرفت. ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت مخمرهای جداسازی شده که در محیط YPG براث به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با سرعت هوادهی ۱۶۰rpm انکوبه گردیده بودند به آن اضافه گردید. گسترش نفت نمایان گر تولید بیوسورفکتانت در نظر گرفته شد (۱۰).

### تولید بیوسورفکتانت در محیط YUG

یک لوپ از کلونی جدایه های مخمری که غربال گردیده بودند ، به ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط YUG (محیط پیش کشت) با pH=۵/۵ اضافه شد و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و سرعت هوادهی ۲۰۰ rpm به مدت۴۸-۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از طی زمان انکوباسیون ۲ میلی لیتر از این محیط به ارلن های حاوی محیط تولید (محیط YUG براث با ۱۰٪ روغن گیاهی) افزوده شد و در شرایط ذکر شده به مدت ۱۰ روز جهت بررسی تولید انکوبه شدند (۱۲،۱۱).

### استخراج بیوسورفکتانت

به اندازه دو برابر حجم محیط کشت، اتیل استات به محیط کشت مایع تولید پس از طی زمان انکوباسیون اضافه شد و سپس به مدت نیم ساعت در شیکر قرار داده شد. پس از آن اتیل استات توسط تبخیر در خلأ در ۵۰ درجه سلسیوس حذف گردید. این عمل سه بار تکرار گردید. برای حذف اسید چرب باقی مانده، سه بار شستشو با ان هگزان انجام گرفت. برای حذف بیومس سلولی با سرعت ۸۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. آنچه باقی ماند بیوسورفکتانت خام بود. بیوسورفکتانت خام در دمای ۵۰ درجه سلسیوس در فور به مدت ۲۴ ساعت خشک گردید (۲).

### سنجش تولید بیوسورفکتانت

### تست گسترش نفت

پس از استخراج بیوسورفکتانت، تست گسترش نفت انجام و قطر هاله برای بیوسورفکتانت استخراج شده اندازه گیری شد. جدایه هایی که بیوسورفکتانت آن ها قادر به ایجاد هاله روشن با قطر بیشتری بود به ترتیب مشخص گردیدند.

### فعالیت امولسیفیه کنندگی

فعالیت امولسیفیه کنندگی مقیاسی برای نشان دادن توانایی بیوسورفکتانت در امولسیفیه کردن هیدروکربن های مختلف است و یکی از اندیکاتورهای متداول فعالیت سطحی بیوسورفکتانت به شمار می رود. ۴ میلی لیتر از مایع رویی محیط کشت با ۶ میلی لیتر نفت خام که با استفاده از فیلتر میلی پور ۰/۴۵ میکرومتر استریل گردیده بود در لوله آزمایش ریخته و به مدت ۲ دقیقه در شیکر مخلوط شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت به حالت سکون قرار داده شد. طبق فرمول زیر اندکس امولسیفیکاسیون اندازه گیری گردید (۱۰).

اندکس امولسیفیکاسیون = (طول کل ستون/طول لایه ی امولسیفیه شده) ×۱۰۰

### اثر نوع و غلظت منبع کربن

Downloaded from ijmm.ir at 5:03 +0330 on Wednesday November 21st 2018

با توجه به وجود دو منبع کربن جهت تولید بیوسورفکتانت، در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری، ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت YUG با ۱۰٪ گلوکز و غلظت (v/v)۱۰٪ از روغن های گیاهی مختلف از قبیل روغن کلزا، روغن ذرت، روغن آفتابگردان، روغن زیتون و روغن کنجد تکمیل گردید. pH اولیه محیط با استفاده از اسید کلریدریک روی ۵ تنظیم شد. ارلن ها پنبه گذاری شده و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ بار به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردیدند. از پیش کشت ۴۸ ساعته جدایه ی مخمری HG۱۲ در محیط YUG، مایه ی تلقیح با کدورت معادل نیم مک فارلند تهیه شد و۲ میلی لیتر از آن به محیط کشت های آماده شده تلقیح گردید. ارلن ها سپس در انکوباتور با سرعت هوادهی ۲۰۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۱ روز انکوبه گردیدند. پس از طی دوره انکوباسیون، مراحل استخراج انجام شد و مقدار تولید بیوسورفکتانت محاسبه گردید. وزن خشک بیوماس از تفریق وزن لوله های خالی از لوله های حاوی بیوماس که در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت یک شبانه روز خشک گردیده بودند محاسبه شد.

### اثر pH و دما

pH اولیه ی ارلن های محیط کشت بر روی ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ و ۹ تنظیم و استریل گردیدند. از پیش کشت ۴۸ ساعته جدایه ی مخمری HG۱۲، مایه ی تلقیح با کدورت نیم مک فارلند تهیه شد و ۲ میلی لیتر از آن به محیط کشت های آماده شده تلقیح و در انکوباتور با سرعت هوادهی ۲۰۰rpm و دمای۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۱ روز انکوبه گردیدند. پس از طی دوره انکوباسیون مراحل استخراج انجام شده و مقدار تولید بیوسورفکتانت محاسبه گردید.

### بررسی دوره زمان رشد سلولی و تولید بیوسورفکتانت

برای بررسی رابطه بین مدت زمان انکوباسیون و تولید بیوماس و تولید سوفورولیپید در طی ۱۴ روز مقدار تولید بررسی شد. بدین منظور هر ۲۴ ساعت مقدار ۵ میلی لیتر از محیط کشت برداشته شد و مراحل استخراج بر روی مایع رویی اعمال شد. تست گسترش نفت در هر مرحله انجام گردید و قطر هاله شفاف یادداشت شد. همچنین وزن خشک سوفورولیپید، وزن خشک بیوماس و میزان گسترش نفت در هر بار استخراج نیز یادداشت گردید. جهت خشک کردن بیوماس و بیوسورفکتانت به مدت ۲۴ ساعت در فور با دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. اندازه گیری وزن خشک از تفریق وزن ظرف نمونه قبل و بعد از افزودن و خشک شدن نمونه ی بیوماس و بیوسورفکتانت حاصل شد.

### آنالیز ساختاری بیوسورفکتانت

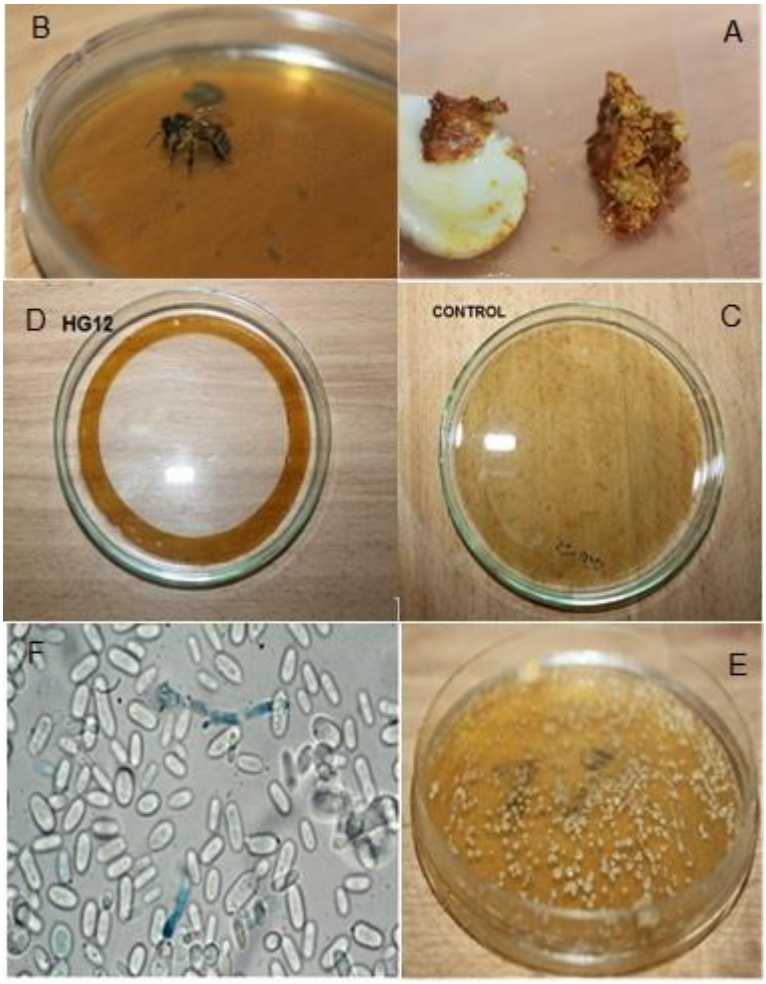
### کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

کاغذ TLC به اندازه ۱۵× ۵ سانتی متر چیده شد و نمونه با فاصله یک سانتی متر از لبه کاغذ، توسط لوله موئین قرار گرفت. سیستم حلال که به عنوان فاز متحرک استفاده شد شامل کلروفرم- متانول-آب به نسبت (v/v/v ،۶۵/۱۵/۲) بود. جهت رنگ آمیزی اسید سولفوریک و اتانول به نسبت (v/v) ۵:۹۵ روی کاغذ اسپری و در دمای ۱۴۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت (۱۳).

### طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)

برای به دست آوردن طیف مادون قرمز از هر نمونه بیوسورفکتانت استخراج شده حدود ۵ تا ۱۵ میلی گرم از بیوسورفکتانت های استخراج شده با حدود ۴۰۰ میلی گرم پتاسیم برمید خالص و خشک مخلوط و با فشار زیاد به صورت یک قرص نازک و شفاف در آورده شد. سپس در دستگاه FTIR قرار داده شد. KBr در ناحیه مادون قرمز جذب ندارد و این امکان را می دهد که از نمونه طیف کاملی به دست آورده شود.

Downloaded from ijmm.ir at 5:03 +0330 on Wednesday November 21st 2018




شکل ۱: A: نان زنبور عسل *آپیس ملیفرا*؛ B: زنبور نژاد *Apis mellifera*؛
C و D: تست گسترش نفت جدایه HG ۱۲ قبل و بعد از افزودن بیوسورفکتانت
E: جدایه مخمری HG ۱۲ بر روی پلیت YMG آگار؛ F: مورفولوژی میکروسکوپی جدایه مخمری HG12

**یافته ها**

با کشت نمونه های مختلف از زنبورستان، ۳۵ جدایه غربالگری گردید. نتایج تست همولیز در تمام موارد منفی گزارش شد. با توجه به منفی بودن تست همولیز، تست گسترش نفت به عنوان معیار اصلی جهت انتخاب جدایه های تولید کننده بیوسورفکتانت در نظر گرفته شد. از بین ۳۵ جدایه ی مخمری، ۱۰ جدایه دارای فعالیت بیوسورفکتانتی در گسترش نفت بودند. جدایه HG۱۲ جداسازی شده از نان زنبور عسل *آپیس ملیفرا* با اندکس امولسیفیکاسیون ۷۵٪، گسترش قطره نفت به قطر ۱۸/۸ سانتی متر و تولید بیوسورفکتانت به مقدار ۲۲/۵ گرم در لیتر به عنوان جدایه ی برتر انتخاب گردید. شکل ۱ تست گسترش نفت جدایه یHG۱۲ را نشان می دهد.

جهت بررسی اثر سوبسترای لیپوفیل، از روغن های گیاهی مختلف استفاده گردید. پس از استخراج بیوسورفکتانت از محیط و اندازه گیری وزن خشک آن نتایج زیر حاصل شد که با توجه به تست گسترش نفت و اندازه گیری میزان تولید بیوسورفکتانت، روغن کلزا با بالاترین بازده تولید بیوسورفکتانت به عنوان منبع لیپوفیل برتر انتخاب گردید. تاثیر منابع کربن لیپوفیل در تولید بیوسورفکتانت حاصل از جدایه ی مخمری HG۱۲ پس از ۱۱روز انکوباسیون در جدول ۱ نشان داده شده است. جهت بررسی تاثیر مقدار منبع کربن هیدروفیل و لیپوفیل غلظت های مختلف از گلوکز و روغن کلزا در محیط کشت استفاده گردید. پس از طی دوره انکوباسیون ۱۱ روزه، استخراج بیوسورفکتانت انجام و وزن خشک بیوسورفکتانت تولید شده اندازه گیری گردید. تمام

Downloaded from ijmm.ir at 5:03 +0330 on Wednesday November 21st 2018

آزمایشات سه مرتبه تکرار و نتایج به صورت میانگین بیان گردید. جدول ۲ نتایج به دست آمده را نشان می دهد.

جدول ۱: تاثیر منابع کربن لیپوفیل در تولید بیوسورفکتانت

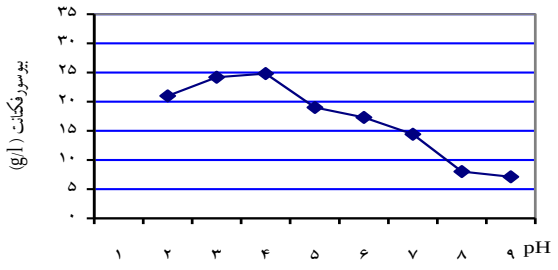
| ردیف | منبع کربن لیپوفیل | وزن خشک بیوماس (g/l) | بیوسورفکتانت (g/l) | گسترش نفت (cm) |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | روغن ذرت | ۲۲/۱ | ۲۰/۱ | ۱۷/۹ |
| ۲ | روغن آفتابگردان | ۲۴/۴ | ۲۱ | ۱۵/۸ |
| ۳ | روغن کلزا | ۲۵ | ۲۲/۲ | ۱۸/۸ |
| ۴ | روغن زیتون | ۲۴ | ۷/۲ | ۱۱ |
| ۵ | روغن کنجد | ۲۰/۳ | ۵ | ۶/۲ |

جدول ۲: تاثیر غلظت های مختلف منبع کربن هیدروفیل و لیپوفیل در تولید بیوسورفکتانت

| ردیف | گلوکز (g/l) | روغن کلزا (ml/l) | وزن خشک بیوماس (g/l) | بیوسورفکتانت (g/l) |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۱۰۰ | ۰ | ۱۷/۵ | ۱۴/۳ |
| ۲ | ۱۰۰ | ۵۰ | ۲۲/۲ | ۱۹/۳ |
| ۳ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ۲۸ | ۲۲/۵ |
| ۴ | ۵۰ | ۱۰۰ | ۲۱/۱ | ۷/۴ |
| ۵ | ۰ | ۱۰۰ | ۲۳ | بسیار کم |

## تاثیر pH

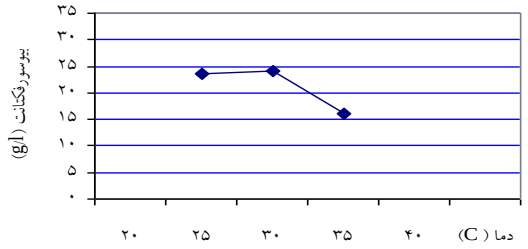
حداکثر مقدار تولید بیوسورفکتانت در pH های ۳ و ۴ به ترتیب برابر با ۲۱/۲ و ۲۲/۵ گرم بر لیتر اندازه گیری شد. نتایج در نمودار ۱ آورده شده است.




نمودار ۱: تاثیر pH بر میزان تولید بیوسورفکتانت

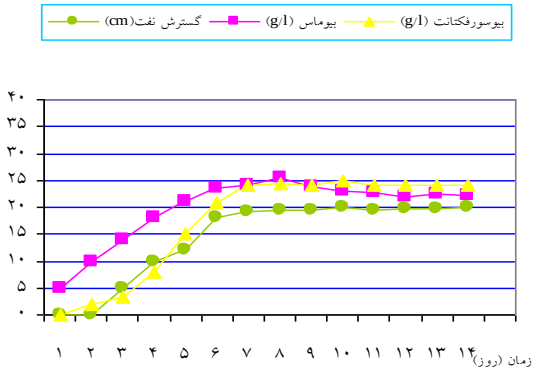
## تاثیر دما

دمای ۲۵ و ۳۰ در تولید بیوسورفکتانت تفاوت چندانی نداشت و به عنوان دمای بهینه در نظر گرفته شدند. نتایج در نمودار ۲ آورده شده است.




نمودار ۲: تاثیر دما بر میزان تولید بیوسورفکتانت

یافته های به دست آمده از اندازه گیری وزن خشک بیوماس و بیوسورفکتانت و همچنین تست گسترش نفت در طی ۱۴ روز انکوباسیون نشان داد که حداکثر تولید بیوسورفکتانت در روز ۸-۵ حاصل می شود. تولید بیوماس نیز از روز۸-۶ تقریبا ثابت باقی ماند. نتایج در نمودار ۳ آورده شده است.




نمودار ۳: بررسی تاثیر زمان انکوباسیون بر میزان تولید بیوسورفکتانت

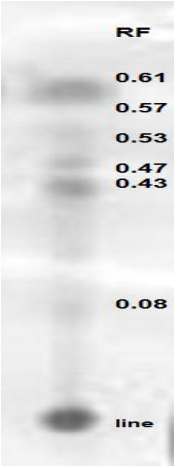
## شناسایی میکروارگانیسم

جدایه ی مخمری HG۱۲ روی محیط YMG رشد نسبتا کندی داشت و پس ۴ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس ظاهر گردید. پرگنه های کوچک، سفید مایل به کرم، محدب، دارای حاشیه صاف و دارای نمای براق و چسبنده بودند. مورفولوژی ماکروسکوپی و میکروسکوپی آنها در شکل ۱ آورده شده است.

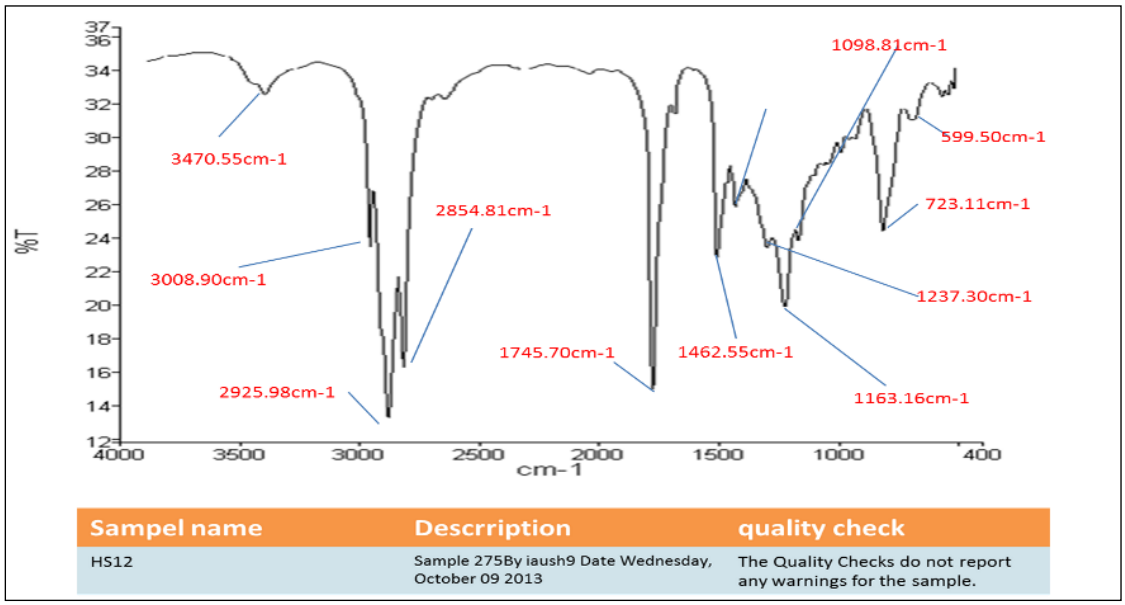
Downloaded from ijmm.ir at 5:03 +0330 on Wednesday November 21st 2018

## آنالیز شیمیایی بیوسورفکتانت

بیوسورفکتانت تولید شده توسط جدایه ی HG۱۲ در محیط YUG با ۱۰٪ گلوکز، ۱۰٪ روغن کلزا با روش TLC شناسایی شد. از مشاهده کاغذ سلیکاژل پس از خشک شدن حلال با نورUV، ۶ جز با $R_f$ برابر با ۰/۰۸، ۰/۳۰، ۰/۴۳، ۰/۴۷، ۰/۵۷، ۰/۶۱ مشاهده گردید که در شکل ۲ نشان داده شده است. اسمر و همکاران $R_f$ های ۰/۰۸، ۰/۱۳، ۰/۱۸، ۰/۲۷، ۰/۳۰، ۰/۳۳، ۰/۳۸، ۰/۴۳، ۰/۴۸، ۰/۵۷ و ۰/۶۰ را با روش TLC به دست آورده و مشخص کرده بودند که سوفورولیپید با $R_f$ برابر با ۰/۰۸ و ۰/۱۳ شکل اسیدی سوفورولیپید و مابقی از نوع لاکتونی سوفورولیپید می باشند (۱۳). جهت شناسایی و آنالیز ساختمانی بیوسورفکتانت استخراج شده از جدایه ی مخمری HG۱۲ طیف FTIR گرفته شد. پیک جذبی در محدوده عدد موجی ($۳۶۴۰-۳۶۱۰cm^{-1}$) نمایانگر کشش گروه OH یا هیدروکسیل آزاد بوده و در گروه عاملی الکل و فنول مشاهده می گردد. پیک جذبی در محدوده عدد موجی ($۳۰۰۰-۳۱۰۰cm^{-1}$) و ($۲۸۵۰-۳۰۰۰cm^{-1}$) نشان دهنده پیوند C-H بوده و گروه آلکان ها را نشان می دهد. پیک جذبی در محدوده عدد موجی ($۱۶۶۵-۱۷۶۰cm^{-1}$) کشش پیوند C=O و گروه کربونیل را نشان می دهد و مربوط به لاکتون، استر یا اسیدها می باشد. پیک جذبی در محدوده عدد موجی ($۱۶۴۰-۱۶۸۰cm^{-1}$) کشش پیوند C-C در گروه آلکان و پیک جذبی در محدوده عدد موجی ($۱۴۵۰-۱۴۷۰cm^{-1}$) و پیک جذبی در محدوده عدد موجی ($۱۰۰۰-۱۳۲۰cm^{-1}$) کشش C-O از گروه C-O-H، وجود قند و پیک جذبی در محدوده عدد موجی $۱۴۶۲cm^{-1}$ وجود عامل کربوکسیلیک اسید را نشان می دهد. با توجه به نمودار حاصل شده و تفسیر آن و همچنین از مطابقت نمودار با طیف های FTIR به دست آمده از مطالعات Lo و همچنین ما و همکاران ساختار گلیکولیپیدی بیوسورفکتانت استخراج شده به عنوان سوفورولیپید شناسایی گردید (۱۴،۱۵). شکل ۳ طیف FTIR به دست آمده از بیوسورفکتانت تولید شده را نشان می دهد.




شکل ۲: کروماتوگرام بیوسورفکتانت جدایه ی مخمری HG۱۲




شکل ۳: طیف FTIR بیوسورفکتانت استخراج شده از جدایه ی مخمرHG۱۲

Downloaded from ijmm.ir at 5:03 +0330 on Wednesday November 21st 2018

## بحث

بیوسورفکتانت ها گروهی از ترکیبات آمفی فیلیک هستند که توسط طیف وسیعی از میکرو ارگانیسم ها تولید می شوند. در مطالعاتی که با هدف جداسازی میکروارگانیسم های تولید کننده بیوسورفکتانت انجام گرفته است، معمولا از بررسی فعالیت همولیتیک به عنوان معیاری برای غربالگری اولیه سویه های مولد بیوسورفکتانت استفاده شده است (۹). با وجود سهولت این روش معایبی می توان برای آن برشمرد. از جمله متغیر بودن جواب های حاصله و غیر اختصاصی بودن محیط کشت و غیره. Carrillo و همکاران به بررسی ارتباط بین فعالیت همولیتیک و تولید بیوسورفکتانت پرداختند و نشان دادند که تنها ۱۳/۵٪ از گونه های همولیتیک قادر به کاهش کشش سطحی به کمتر از ۴۰(mN/m) می باشند. بنابراین کاملا روشن نیست که آیا لیز سلولهای خون برای غربالگری تمام میکروارگانیسم های تولید کننده بیوسورفکتانت می تواند مورد استفاده قرار گیرد یا خیر(۱۶). در مطالعه حاضر تست همولیز مورد بررسی قرار گرفت اما نتایج تست همولیز برای تمام گونه ها منفی گزارش شد. کاهش کشش سطحی محیط کشت مهمترین و اصلی ترین معیار تولید بیوسورفکتانت در نظر گرفته می شود. در مطالعه حاضر معیار اصلی تشخیص و میزان تولید بر اساس تست گسترش نفت قرار داده شد. این روش به راحتی توانست گونه های تولید کننده ی بیوسورفکتانت را مشخص نماید و قطر ناحیه روشن غلظت بیوسورفکتانت تولید شده را نیز نشان می داد. همچنین روش گسترش نفت علاوه بر آن که نیاز به تجهیزات تخصصی ندارد نسبت به سایر تست ها سریع تر و آسان تر انجام شده و تنها حجم کوچکی از نمونه جهت انجام تست لازم است. در این مطالعه سعی ما بر تولید بیوسورفکتانت سوفورولیپید با استفاده از روغن های گیاهی مختلف بوده است. روغن های رایج گیاهی علاوه غنی از اسیدهای چرب C16-C18 می باشند، که استفاده از آن ها به عنوان منبع کربن لیپوفیل جهت تولید بیوسورفکتانت سوفورولیپید را مناسب می سازد، همچنین نسبت به اسید های چرب خالص مانند اسید اولئیک و همچنین سوبستراهای لیپوفیل خالص گوناگون دیگر که جهت تولید سوفورولیپید استفاده شده است از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیز می باشد. بررسی منابع لیپوفیل مختلف از جمله روغن ذرت، آفتابگردان، کلزا، کنجد و زیتون خوراکی به عنوان سوبسترا نشان داد، اگر چه در تمام موارد جدایه ی مخمری قادر به تولید سوفورولیپید و استفاده از آن ها به عنوان سوبسترا بود، اما در محیط YUG تکمیل شده با روغن گیاهی کلزا با تولید تولید بیوسورفکتانت به مقدار ۲۲/۵ گرم در لیتر بازده بالاتری در تولید را نشان داد. از آن جا که اسیدهای چرب C16- C18 نقش به سزایی در تولید بیوسورفکتانت سوفورولیپید دارند، به نظر می رسد روغن کلزا نسبت به سایر روغن های گیاهی مورد استفاده از این نظر غنی تر بوده است. Arthur Felse با استفاده از محیط حاوی ۱۰۰ گرم بر لیتر گلوکز، ۴۰ گرم بر لیتر اسید چرب (C18:1)، ۱۰ گرم بر لیتر عصاره مخمر و ۱ گرم بر لیتر اوره از مخمر *کاندیدا بومبیکولا*، ۵۴/۵ گرم برلیتر سوفورولیپید تولید نمود (۱۷). Soleiman و همکاران از محیط کشت حاوی فقط ملاس سویا و اسید اولئیک به عنوان مواد تشکیل دهنده برای تولید سوفورولیپید برای اولین بار استفاده کردند. آنها توانستند ۳ ± ۵۳ گرم سوفورولیپید خالص به دست آورند. سپس با افزودن اوره و عصاره مخمر به عنوان منابع نیتروژن توانستند میزان تولید را تا ۴ ± ۷۱ افزایش دهند (۱۸). در مطالعه ای که توسط Kurtzman و همکاران بر روی گونه *کاندیدا بومبیکولا* و چندین گونه *کاندیدا* دیگر انجام شد. در محیط نمکی حاوی ۱۰۰ گرم بر لیتر گلوکز و ۸۷/۵ گرم بر لیتر اسید اولئیک، گونه *کاندیدا بومبیکولا* ۶۹/۹ گرم بر لیتر و سایر گونه های کاندیدا ۳۸/۶ گرم بر لیتر سوفورولیپید پس از زمان ۱۶۸ ساعت تولید کردند (۱۹). نتایج بررسی تولید بیوسورفکتانت در این مطالعه در طی ۱۴ روز انکوباسیون نشان داد که تولید در روز ۴-۳ افزایش یافت و پس از آن در روزهای ۵، ۶، ۷، ۸ تولید روند صعودی و در روزهای بعدی تقریبا ثابت باقی مانده است. داده های به دست آمده از اندازه گیری میزان بیوماس نشان داد که بیوماس به طور متوسط تا روز ۶-۷ افزایش و پس از آن تغییر چندانی نداشته است. پس می توان بیان کرد که حداکثر مقدار تولید، در اواخر فاز رشد اتفاق افتاده است. بررسی pH های مختلف نشان داد که پس از ۴۸ ساعت از تولید به دلیل تولید فراورده های مختلف در محیط کشت، pH تا ۳/۵-۲/۵ کاهش می یابد. با این وجود حداکثر میزان تولید در pH اولیه ۴-۳ بوده است. Vedaraman نیز نتایج مشابهی از غلظت های مختلف از هر دو سوبسترای لیپوفیل و هیدروفیل در محیط کشت را گزارش کرده اند (۲۰). جهت شناسایی اولیه ی بیوسورفکتانت در مطالعه حاضر از روش TLC استفاده گردید. به علت عدم وجود استاندارد بیوسورفکتانت سوفورولیپید، نتایج به دست آمده با مقایسه با $R_f$ های اندازه گیری شده در دیگر مقالات تفسیر گردید. سیستم TLC با همان نسبت های سیستم Asmer و همکاران انجام گردید. ۵ جز با $R_f$

برابر با ۰/۰۸، ۰/۳۳، ۰/۵۱، ۰/۵۵، ۰/۶۲ مشاهده شد. $R_f$ های به دست آمده با نتایج اسمر و همکاران مطابقت داشت. Cavalero و کوپر نیز برای شناسایی ابتدایی سوفورولیپید تولید شده از گونه *کاندیدا بومبیکولا* ATCC 22214 از روش TLC به کار برده شده توسط Asmer و همکاران استفاده نمودند و نتایج مشابه به دست آوردند (۱۱). نتایج طیف FTIR نشان داد که کشش نامتقارن و کشش متقارن CH2 به ترتیب در محدوده ی طول موج $cm^{-1}$ ۲۸۵۴ و ۲۹۲۵ نمایان گر وجود زنجیره آلکیل، باند جذبی گروه C= O در محدوده ی طول موج $cm^{-1}$ ۱۷۴۴ شامل گروه های لاکتون، استرها و یا اسید می باشد. کشش CO از گروه های COH قند (سوفروز) در $cm^{-1}$ ۱۰۹۹ مشاهده شده است. گروه COH در$cm^{-1}$۱۴۶۲ نیز مرتبط با گروه کربوکسیلیک اسید (COOH) است که روغن و اسید چرب باقی مانده پس از شستشو با هگزان را نشان می دهد. در ناحیه $cm^{-1}$ ۳۴۷۳ نیز باند جذبی گروه هیدروکسیل مشاهده می شود. نتایج به دست آمده با طیف جذبی FTIR گزارش Parekha و همکاران از گونه ی *استارمرلا بومبیکولا* مطابقت دارد (۲۱). همچنین نتایج به دست آمده در این مطالعه، طیف جذبی FTIR به دست آمده از گونه ی *استارمرلا بومبیکولا* از مطالعه ی Wadekar و همکاران نیز مطابقت دارد (۲۲). این تحقیق اولین گزارش از تولید بیوسورفکتانت سوفورولیپید توسط مخمر در ایران می باشد. جدایه ی مخمری تولید کننده بیوسورفکتانت از نان زنبور عسل جداسازی گردیده که در مقایسه با تمرکز اغلب مطالعات انجام شده بر تولید بیوسورفکتانت از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* که یک باکتری پاتوژن است دارای برتری است. پیشنهاد می گردد در مطالعات آینده اثر سوبسترا های هیدروفیل ارزان قیمت مانند ملاس، آب پنیر و غیره به عنوان جایگزین منبع کربن هیدروفیل گلوکز و سوبسترا های لیپوفیل ارزان قیمت مانند پسماندهای صنعتی لیپیدی به عنوان منبع کربن لیپوفیل در میزان تولید بیوسورفکتانت سوفورولیپید مورد بررسی قرار گیرد. همچنین میزان بهینه اثرات همزمان فاکتورهای بررسی شده مثل منبع کربن، اثر pH، اثر دما، و دوره زمانی رشد با روش های طراحی آزمایش مانند تاگوچی و .... مطالعه گردد.


### تقدیر و تشکر

جا دارد از آقای مهندس پویا حقیقت مدیریت زنبورستان عسل طبیعی اصفهان و خانم مهندس شراره حبیبی مود کارشناس زنبورستان که در انجام مراحل نمونه برداری از هیچ کوششی در راستای انجام این پروژه دریغ ننمودند نهایت تشکر و قدردانی به عمل آید.


### تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

## References


1- Mann RM, Bidwell JR. The acute toxicity of agricultural surfactants to the tadpoles of four Australian and, two exotic frogs. Environ Pollut. 2001; 114:195-205.

2- Chen J, Song X, Zhang H, Qu YB, Miao JY. Sophorolipid produced from the new yeast strain Wickerhamiella domercqiae induces apoptosis in H7402 human liver cancer cells. Appl Microbiol Biotechnol. 2006; 72:52-59.

3- Gautam KK, Tyagi VK. Microbial surfactants: a review J Oleo Sci. 2006; 55:155-166.

4- Viramontes-Ramos S, Portillo-Ruiz MC, Lourdes MD, Casarrubias B, Torres Munoz J, Rivera-Chavira BE ,Nevarez-Moorillon GV. Selection of biosurfactan/ bioemulsifier producing bacteria from hydrocarbon contaminated. Braz J Microbiol. 2010; 41:668-675.

5- Zhang TZQ, Shi Hu LB, Cheng LG, Wang F. Antifungal compounds from Bacillus subtilis BFS06 inhibiting the growth of Aspergillus flavus. World J Microbiol. Biotechnol. 2008; 24:783-788.

6- Shah V, Doncel GF, Seyom T, Eaton KM, Zalenskya I, Singh A, Van Hamme JD, Ward OP. Surfactants in microbiology and biotechnology. Biotechnol Adv. 2007; 25: 99-122.

7- Gilliam M. Microbiology of pollen and bee: the yeasts. Apidologie. 1979; 10: 43-53.

8- Gautam KK, Tyagi VK. Microbial surfactants: a review. J Oleo Sci 2006. 55:155-166.

9- Youssef NH, Duncana KE, Naglea DP, Savagea KN, Knappb RM, McInerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J Microbiol Methods. 1979; 6: 339-347.

10- Satpute SK, Banporkar AG, Dhakephalkar PK, Banat IM, Chopade BA. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. Crit Rev Biotechnol 2010. 3: 1-18.

11- Cavalero DA, DG Cooper. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by Candida bombicola ATCC 22214. J Biotechnol 2003. 103: 31-41.




Downloaded from ijmm.ir at 5:03 +0330 on Wednesday November 21st 2018

Downloaded from ijmm.ir at 5:03 +0330 on Wednesday November 21st 2018


12- Pekin G, Sukan FV, Kusaric N. Production of sophorolipid from *candida bombicola* ATCC 22214 using turkish corn oil and honey. Engineering in Life Sciences. 2005; 5: 357-362.

13- Asmer HJ, Lang S, Wagner F, Wray V. Microbial production structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. J Am Oil Chem Soc. 1998; 65: 1460-1466.

14- Lo CM, Ju LK. Sophorolipids induced cellulase production in cocultures of hypocrea jecorina Rut C30 and *Candida bombicola*. Enzyme Microb Technol 2009. 44: 107-111.

15- Ma Xiaojing, Hui Li, Xin Song. Surface and biological activity of sophorolipid molecules produced by Wickerhamiella domercqiae var. sophorolipid CGMCC 1576. J Colloid Interface Sci. 2012; 376: 165-172.

16- Carrillo PG, Mardaraz C, Pitta-Alvarez SJ, Giulietti AM. 1996. Isolation and selection of biosurfactant producing bacteria. World J Microbiol Biotechnol. 2007; 12: 82- 84.

17- Arthur Felse P, Shah V, Chan J, Kandula J, Gross RA. Sophorolipid biosynthesis by *Candida bombicola* from industrial fatty acid residues. Enzyme Microb Technol. 2007; 40: 316-323.

18- Solaiman DKY Ashby RD Nunez A Foglia TA. Production of sophorolipids by *Candida bombicola* grown on soy molasses as substrate. Biotechnol Lett. 2004; 26:1241-1245.

19- Kurtzman CP Price NPJ Ray KJ Kuo TM. Productionof sophorolipid biosurfactants by multiple species of the Starmerella (Candida) bombicola yeast clade. FEMS Microbiology. Letters 2010 ; 311:140-146.

20- Vedaraman N, Venkatesh NM. The effect of medium composition on the production of sophorolipids and the tensiometric properties by Starmerella bombicola MTCC 1910. Pol. J Chem Technol. 2010; 12: 9 -13.

21- Parekha VJ, Patravaleb VB, Pandita Mango AB. kernel fat: A novel lipid source for the fermentative production of sophorolipid biosurfactant using Starmerella Bombicola NRRL-Y 17069. Annals of Biological Research. 2012; 3:1798-1803.

22- Wadekar SD, Kale SB, Lali AM, Bhowmick DW, Pratap AP. Utilization of sweetwater as acost effective carbon sourceefor sophorolipid production by starmererella bombicola (ATCC 22214). Prep Biochem Biotechnol. 2012; 42: 125-142.