بیوسورفکتانت‌های باکتریایی: مروری بر جنبه‌های بیولوژیکی، تکنولوژی و کاربردی فسفاتیدیل کولین

مهسا نکته‌سنج اول[1]، منیرالسادات شاکری[2*]

۱. دانشجوی دکتری زیست فناوری مواد غذایی، گروه پژوهشی زیست فناوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

۲. گروه پژوهشی زیست فناوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

***نویسنده مسئول:** *m.shakeri@rifst.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۱

چکیده

بیوسورفکتانت‌ها و بیوامولسیفایرها ترکیبات فعال سطحی هستند که در مقادیر بسیار ناچیز باعث کاهش کشش سطحی آب، به میزان قابل توجهی می گردند. بطور کلی میکروارگانیسم‌ها طیف وسیعی از بیوسورفکتانت‌ها را سنتز می‌کنند. این ترکیبات بر اساس وزن مولکولی، خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و نحوه فعالیت طبقه‌بندی می‌شوند. فسفاتیدیل کولین که یکی از عمده‌ترین اجزاء تشکیل دهنده لسیتین تجاری می‌باشد، مهم‌ترین فسفولیپید غشایی در یوکاریوت‌ها است و می‌تواند توسط هر یک از دو چرخه متیلاسیون یا CDP-کولین سنتز شود. بسیاری از پروکاریوت‌ها فاقد فسفاتیدیل کولین هستند، اما در غشای برخی از باکتری‌ها مقادیر قابل توجهی از این ماده یافت می شود. بدلیل اهمیت زیاد لسیتین در صنعت غذا و پزشکی، مطالعات در مورد اجزاء تشکیل دهنده لستین یعنی فسفاتیدیل‌کولین و فسفاتیدیل‌سرین امروزه هم ادامه دارد. شناخت مسیرهای بیوسنتز ترکیبات فسفاتیدیل‌کولین به ویژه در باکتری‌ها، اهمیت زیادی در تولید بهینه این متابولیت‌های میکروبی دارد. در این مطالعه، ساختار، عملکرد بیوشیمیایی و نیز مسیرهای بیوسنتز بیوسورفکتانت‌ها در باکتری‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد و به تکنولوژی تولید و کاربردهای مهم آنها اشاره می‌گردد.

کلید واژه ها: فسفاتیدیل کولین، لسیتین، بیوامولسیفایر، متابولیت‌های باکتریایی.

مقدمه

بیوسورفکتانت‌های تولید شده توسط برخی از میکروارگانیسم‌ها و گیاهانی از جمله سویا، دانه آفتابگردان، کلزا، برنج و سبوس آن، یکی از محصولات مهم بیوتکنولوژی محسوب می‌شوند، چرا که به دلیل عملکرد ویژه، سمیت کم، سهولت نسبی آماده‌سازی و کاربردی بودن آن‌ها، در صنعت و پزشکی دارای اهمیت هستند. بیوسورفکتانت‌ها به عنوان امولسیفایر، مرطوب کننده و کف‌کننده می‌توانند در صنعت غذا، مواد شوینده، بازیافت مواد نفتی، صنایع پتروشیمی، کنترل محیط زیست، کشاورزی، لوازم آرایشی- بهداشتی و دارویی، صنایع معدنی و متالوژی استفاده شوند. از اواخر دهه ۱۹۸۰، مطالعات زیادی در مورد اهمیت درمانی لسیتین و اجزای تشکیل دهنده آن مثل فسفاتیدیل سرین (PS) و فسفاتیدیل کولین (PC)، به عنوان یک ماده کاربردی مهم در رژیم غذایی انجام گردیده است که این مطالعات بدلیل اهمیت زیاد لسیتین در صنعت غذا و پزشکی، امروزه هم ادامه دارد. در سال ۱۹۹۶ در مطالعه‌ای، موادی از مغز گاو استخراج گردید و به عنوان BC-PS[1] نامگذاری شد (Pepeu et al., 1996). سپس BC-PS در موش‌های سالم تزریق گردید، این مطالعه، بهبود رفتاری مربوط به حافظه را نشان داد. تا اواخر دهه ۱۹۹۰، BC-PS، به دلیل مسائل ناشی از انسفالوپاتی گاوی[2] (بیماری جنون گاوی) در بازار عرضه نشد و این باعث تولید فسفاتیدیل سرین از لسیتین‌های گیاهی، از جمله سویا گردید. مطالعات بالینی بر روی فسفاتیدیل سرین نیز اثرات

[1] Bovine brain-phosphatidylserine
[2] Bovine spongiform encephalopathy

www.SID.ir

Archive of SID

مثبت لسیتین سویا را در بهبود اختلالات حافظه مرتبط با سن نشان داد (Richter et al., 2013). رایج ترین منابع غذایی برای استخراج فسفاتیدیل سرین، سویا و شیر می‌باشند. لسیتین سویا حاوی حدود ۰/۵ درصد PS است، در حالی‌که در شیر حدود ۵ تا ۱۰ درصد کل فسفولیپیدها را شامل می‌شود (Contarini & Povolo, 2013). مقادیر کمی از PS نیز در روغنهای گیاهی مانند روغن ذرت، بادام و آفتابگردان (Boukhchina et al., 2004) و در غلات وجود دارد (Liu et al., 2013) (جدول۱).

علاوه بر اینکه بیوسورفکتانت‌ها از فرآورده‌های گیاهی تولید می‌شوند، تحقیقات اخیر حاکی از آن است که بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات بیولوژیکی آمفیفیلی خارج سلولی هستند که از طریق میکروارگانیسم‌های مختلف نیز تولید می‌شوند. در حال حاضر لسیتین به عنوان یک امولسیفایر عالی در صنعت غذایی کاربردهای متعددی دارد. لسیتین تجاری مخلوطی از فسفولیپیدها در روغن می باشد به طوریکه فسفاتیدیل کولین یکی از فسفولیپیدهای عمده تشکیل دهنده آن است.

از آنجاکه شناخت آنزیم‌ها و مسیرهای بیوسنتز ترکیبات فسفاتیدیل‌کولین به ویژه در باکتری‌ها، اهمیت زیادی در تولید بهینه این متابولیت‌های میکروبی دارد و از طریق این مسیرها دستکاری‌های ژنتیکی مناسب جهت طراحی سویه های نوترکیب صنعتی با قابلیت تولید بالا امکان پذیر می‌باشد در این مطالعه، ساختار، عملکرد بیوشیمیایی ترکیبات فسفاتیدیل‌کولین و نیز مسیرهای بیوسنتز آنها در باکتری‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد. همچنین صنایعی که از بیوسورفکتانت‌ها استفاده می‌کنند و برخی جنبه‌های تکنولوژی تولید این ترکیبات را بررسی می‌کنیم.

جدول ۱. محتوای فسفولیپید در مواد غذایی مختلف (Weihrauch & Son, 1983)

مواد غذایی	فسفولیپید کل (میلی گرم در ۱۰۰ گرم ماده غذایی)	PI	PS	PC	PE
لوبیای سویا	۲۰۳۸	۲۸۷	۱۲۰	۹۱۷	۵۳۶
زرده تخم مرغ	۱۰۳۰۶	۶۴	۰	۶۷۷۱	۱۹۱۷
شیر	۳۴	۱	۲	۱۲	۱۹
گوشت گاو	۶۶۰	—	—	۴۰۷	۲۰۷
گندم	۲۵۱	—	—	۴۷	۱۰
سیب	۴۰	۰/۴	۶	۲۱	۱۰
سیب زمینی	۷۶	۱	۱۲	۳۸	۲۲

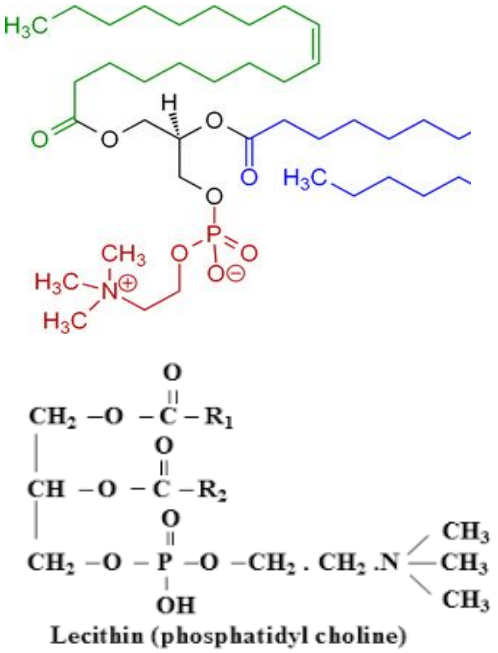
فسفاتیدیل سرین؛ PS، فسفاتیدیل اینوسیتول؛ PI، فسفاتیدیل اتانول آمین؛PE، فسفاتیدیل کولین؛ PC

www.SID.ir

ساختار ترکیبات فعال سطحی (SAC[1]) میکروبی

ترکیبات فعال سطحی میکروبی، گروهی از ترکیبات با ساختار مولکولی متنوع هستند که توسط میکروارگانیسم‌های مختلف تولید می‌شوند، و به‌طور کلی بر اساس ساختار شیمیایی و منشاء میکروبی طبقه‌بندی می‌شوند. بیوسورفکتانت‌ها از یک بخش هیدروفیلی که دارای یک اسید، پپتید کاتیونی یا آنیونی، منو، دی و یا پلی‌ساکارید می‌باشد و نیز یک بخش هیدروفوبی که حاوی زنجیره‌های هیدروکربنی غیر اشباع یا اشباع و یا اسیدهای چرب می‌باشد، تشکیل شده‌اند. این ساختارها طیف وسیعی از ویژگی‌ها از جمله توانایی کاهش سطح، کاهش کشش بین فازی مایع، تشکیل میسل و میکروامولسیون بین دو فاز مختلف را ایجاد می‌کنند. این ترکیبات را تقریبا می‌توان به دو گروه اصلی تقسیم کرد ، دسته اول شامل ترکیباتی با وزن مولکولی کم مانند لیپوپپتیدها، گلیکولیپیدها و پروتئین‌ها هستند که بیوسورفکتانت نامیده می‌شود و دسته دوم پلی‌مرهای با وزن مولکولی بالا مانند پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌های لیپوپلی‌ساکاریدی و لیپوپروتئین‌ها می‌باشند که به‌طور کلی بیوامولسیون یا بیوامولسیفایر نامیده می‌شوند. گروه اول مولکول‌هایی هستند که به طور موثر می‌توانند باعث کاهش کشش سطحی و تنش بین مولکولی شوند در حالی‌که گروه دوم آمفی‌فیلیک هستند و قادر به تغییر شرایط فیزیکوشیمیایی بوده و در نتیجه منجر به توزیع مواد شیمیایی در میان دو فاز می‌شوند (Smyth et al., 2010). در سال‌های اخیر بیوسورفکتانت‌ها به عنوان جایگزینی مناسب برای سورفکتانت‌های مشتق شده از پتروشیمی مورد توجه قرار گرفته‌اند. دو دسته از بیوسورفکتانت‌ها (شامل گلیکولیپیدها و لیپوپپتیدها) توجه تجاری زیادی را به خود جلب کرده‌اند. علی‌رغم مزایای زیست محیطی، تجاری‌سازی این مولکول‌ها به لحاظ قیمت بالاتر و عدم تنوع ساختاری با چالش‌هایی مواجه است.

به طور کلی سورفکتانت‌ها معمولاً بوسیله گروه های باردار به ۴ گروه سورفکتانت آنیونی (دارای بار منفی) ، سورفکتانت کاتیونی (دارای بار مثبت)، سورفکتانت غیر یونی (بدون بار) و آمفوتریک (دارای هر دو بار مثبت و منفی ولی در مجموع خنثی) تقسیم بندی می‌شوند. این ترکیبات آلی دارای گروه‌های هیدروفوبیک (دافع آب) که نقش دم و دنباله و گروه‌های هیدروفیلیک (جاذب آب) که نقش سر را دارد، می باشند. بنابراین به تناسب ساختار مولکولی، در حلال‌های آلی و آبی حل می‌شوند و باعث کاهش کشش سطحی در مرز مشترک هوا- آب و یا روغن- آب می‌گردند. ساختار لسیتین (فسفاتیدیل کولین) بسیار شبیه به ساختار چربی یا تری گلیسیرید ها می باشد و تنها از طریق جایگزین شدن یکی از اسیدهای چرب تری گلیسیرید با کمپلکس اسید فسفریک کولین تشکیل شده است (شکل ۱).



شکل ۱. ساختار مولکولی و فضایی لسیتین (Ahmad & Xu, 2015)

[1] Surface-active compounds

www.SID.ir

Archive of SID

تنوع لیپیدهای غشایی در باکتری‌ها

دانشمندان با مطالعاتی که روی متابولیسم تولید لیپید باکتریایی در *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سوبتلیس* به عنوان میکروارگانیسم‌های گرم منفی و گرم مثبت شاخص انجام داده‌اند، به این نتیجه رسیده‌اند که این میکروارگانیسم‌ها، فسفاتیدیل‌اتانول‌آمین (PE)[1]، فسفاتیدیل‌گلیسرول (PG)[2] و کاردیولیپین (CL)[3] را به عنوان چربی‌های اصلی تشکیل‌دهنده غشاء تولید می‌کنند و معمولا در بیشتر پروکاریوت‌ها نیز این روند صادق است. با این حال، علاوه بر PE، PG و CL، تنوع زیادی در لیپیدهای غشایی باکتری‌ها وجود دارد که برخی از آن‌ها به عنوان ترکیبات جزئی و برخی دیگر نیز به عنوان ترکیبات اصلی در غشای باکتری‌ها یافت می‌شوند. حتی در میان لیپیدهای حاوی فسفر در باکتری اشریشیا کلی، تعداد زیادی لیپیدهای جزئی نیز می‌توان یافت اما ساختار و عملکرد اکثر آن‌ها تاکنون مشخص نشده است. یکی از مهم‌ترین فسفولیپیدهای موجود در باکتری‌ها، که برای پروکاریوت‌ها نیز اختصاصی می‌باشند، می‌توان به O- آمینو آسیل فسفاتیدیل گلیسرول[4] اشاره کرد که از PG مشتق شده است. در این لیپیدها، یک اسید آمینه با موقعیت SN- 3 موجود در گلیسرول، پیوند استری برقرار کرده است. مهم‌ترین اسید آمینه متصل شده به این قسمت از O- آمینوآسیل فسفاتیدیل گلیسرول، لیزین می‌باشد اما در برخی موارد وجود اسیدآمینه‌های اورنیتین و آلانین نیز در این لیپیدها گزارش شده است. این تغییرات می‌تواند بار منفی PG را حذف کرده و در نتیجه باعث افزایش مقاومت آن‌ها در برابر پپتیدهای کاتیونی ضد میکروبی حاصل از پاسخ ایمنی ذاتی گردد. اخیرا ژن *mprF* که برای اصلاح لیزین در PG مورد نیاز است نیز شناسایی شده است. اگرچه در بعضی موارد نادر وجود اسفینگولیپیدهای باکتریایی هم گزارش شده است (Sohlenkamp et al., 2007)، اما بیشترین لیپیدهای غشایی موجود در پروکاریوت‌ها همانند یوکاریوت‌ها، شامل فسفولیپیدهای ۱و ۲ دی رادیل sn - گلیسرول مانند فسفاتیدیل گلیسرول، فسفاتیدیل اتانول‌آمین، فسفاتیدیل سرین (PS)[5] فسفاتیدیک اسید (PA)[6] و فسفاتیدیل کولین (PC)[7] می‌باشد. برخی از فسفولیپیدهای غشایی مانند PS، فسفاتیدیل اینوزیتول (PI)[8] یا مشتقات متیله شده PE (شکل ۲)، منو متیل فسفاتیدیل اتانول آمین (MMPE)[9]؛ دی متیل-فسفاتیدیل‌اتانول آمین (DMPE)[10] و PC معمولا به عنوان اجزاء معمول غشاهای یوکاریوتی هستند، این نوع از فسفولیپیدها در برخی از باکتری‌ها نیز دیده می‌شوند. PS لیپید غشایی عمده در *ساکارومیسس-سرویزیه* و دیگر یوکاریوت‌هاست. PS در پروکاریوت‌ها به عنوان یک واسطه در بیوسنتز PE عمل می‌کند و در غشاها به ندرت در مقادیر بالا یافت می‌شود. PS به عنوان یک چربی غشایی عمده در چندین باکتری که نقش تخمیر بی‌هوازی اسیدلاکتیک را بر عهده دارند و نیز در *برادی-ریزوبیوم ژاپونیکوم*[1] که قادر به تثبیت نیتروژن در ریشه سویا است، به مقدار جزئی وجود دارد. در سویه‌های *مایکوباکتریوم*، PI یک جزء مهم و ضروری غشاء سلولی محسوب می‌شود، ولی PC یا لسیتین، فراوان‌ترین فسفولیپید در غشاهای یوکاریوتی هستند (Minder et al., 2001).

PC علاوه بر نقش ساختاری در غشاها و لیپو پروتئین-ها، نقش مهمی در انتقال سیگنال دارد زیرا به عنوان منبع اصلی برای پیام‌رسان‌های ثانویه لیپیدی در یوکاریوت‌ها شناخته می‌شود (Sohlenkamp et al.,

[1] Phosphatidylethanolamine
[2] Phosphatidylglycerol
[3] Cardiolipin
[4] O-aminoacyl-phosphatidylglycerol
[5] Phosphatidyl Serin
[6] Phosphatidic Acid
[7] Phosphatidyl choline
[8] Phosphatidyl Inositol
[9] Mono methyl phosphatidyl ethanol amine
[10] Di methyl phosphatidyl ethanol amine

[1] *Bradyrhizobium japonicum*

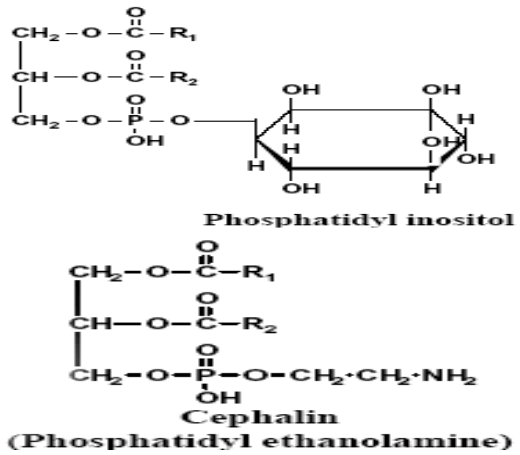
www.SID.ir

2003). برای مدت طولانی اعتقاد بر این بود که PC تنها در چند باکتری اختصاصی، یعنی باکتری‌هایی که حاوی ساختارهای غشایی داخلی یا در باکتری‌هایی که در ارتباط نزدیک با میزبان‌های یوکاریوتی هستند، تشکیل می‌گردد، در حالیکه هم اکنون با شناسایی بیش از ۱۰۰ توالی ژنوم میکروبی تکمیل شده، مشخص شده است ژن های دخیل در بیوسنتز PC به گروه خاصی از باکتری‌ها محدود نمی‌شود و PC بیشتر از آنچه که در ابتدا تصور می‌شد، در باکتری‌ها گسترده است. علاوه بر فسفولیپیدهای غشایی، در بعضی از باکتری‌ها، لیپیدهای غشایی دیگری نیز گزارش شده است که حاوی فسفر نیستند. به عنوان مثال، هاپانوئیدها[1] که در طیف گسترده‌ای از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت وجود دارند و به نظر می‌رسد ترکیبات مشابه با استروئیدهای یوکاریوتی در باکتری‌ها هستند. گلیکولیپیدها اغلب مسئول حمل دی آسیل گلیسرول متصل به یک بنیان ساکاریدی هستند و در ارگان‌های مختلف وجود دارند. همچنین گزارش شده است مقدار لیپید سولفوکواینوسیل دی‌آسیل‌گلیسرول حاوی سولفور و لیپیدهای مشتق شده از اسیدآمینه اورنیتین و لیپید بتائینی مانند دی آسیل گلیسرول - تری متیل هومو سرین[2] DGTS، بطور چشمگیری در شرایط محدودیت مواد مغذی، بویژه در دسترس نبودن فسفر، افزایش پیدا می‌کند. تحت چنین شرایطی که میزان فسفر، محدود است، ممکن است DGTS بتواند به لحاظ عملکردی جایگزین PC در غشا باشد (Moghis & Xuebing, 2015).

بیوسنتز فسفاتیدیل کولین

بیوسنتز فسفاتیدیل کولین در یوکاریوت‌ها

دو چرخه اصلی برای بیوسنتز فسفاتیدیل کولین (PC)، در یوکاریوت‌ها وجود دارد که عبارتند از چرخه N–متیلاسیون‌فسفولیپیدی (شکل ۳) و چرخه CDP-کولین (شکل ۴).



شکل ۲. ساختار فسفاتیدیل اتانول آمین و فسفاتیدیل اینوزیتول (Ahmad & Xu, 2015)

اهمیت نسبی هر چرخه تولید از یک ارگانیسم به ارگانیسم دیگر و حتی از بافتی به بافتی دیگر در همان ارگانیسم متفاوت است، چرخه N- متیلاسیون مسیر سنتز از نو (De novo)[3] برای بیوسنتز PC است، در حالیکه چرخه CDP-کولین اساسا یک مسیر بازیافت و یک چرخه مرحله به مرحله شامل کولین و کولین فسفات است که در طی تغییر و تبدیل از طریق فسفولیپازها، PC تولید می شود. در چرخه N- متیلاسیون فسفولیپیدی (شکل ۳)، PC بوسیله متیلاسیون‌های متوالی فسفاتیدیل اتانول آمین (PE) از طریق مونو متیل فسفاتیدیل اتانول آمین (MMPE) و دی متیل فسفاتیدیل اتانول آمین (DMPE) بعنوان ترکیبات حد واسط با استفاده از سدیم آدنوزیل متیونین (SAM) و آنزیم فسفولیپید N- متیل ترانسفراز تولید می‌گردد (Sohlenkamp et al., 2007). ژن‌های کدکننده آنزیم N- متیل ترانسفراز فسفولیپیدی (Pmt)[4] از منابع مختلفی کلون شده‌اند. در چرخه CDP- کولین، که به عنوان چرخه (کندی) kennedy شناخته شده است، کولین آزاد به وسیله ترکیبات حد واسط مانند کولین‌فسفات و CDP-کولین

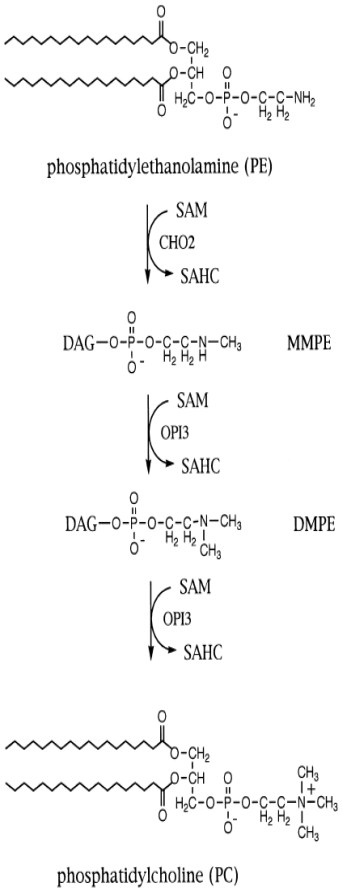
[1] Hopanoid
[2] Diacylglycerol-trimethyl homoserine
[3] De novo synthesis
[4] N-methyltransferase

www.SID.ir

Archive of SID

از طریق یک سری واکنش‌های متوالی، به فسفاتیدیل کولین (لسیتین) تبدیل می‌شود، که این واکنش‌های متوالی از طریق یکسری آنزیم‌هایی مانند (CKI): CTP، کولین‌کیناز: فسفوکولین‌سیتیدیل‌ترانسفراز (CCT)[1] و CDP-کولین: ۱،۲ دی‌آسیل‌گلیسرول‌کولین فسفوترنسفراز (CPT) انجام می‌شوند (شکل ۴) (Kawai et al., 2006). با پیشرفت سریع ژنتیک مولکولی، ژن‌های کدکننده این آنزیم‌ها در ابتدا از ساکارومایسس سرویزیه کلون گردید. تنظیم چرخه CDP- کولین از طریق دو آنزیم موثر در مرحله اول (کولین کیناز و CCT) رخ می‌دهد. در یوکاریوت‌ها دو مسیر دیگر هم می‌تواند منجر به تشکیل PC شود. مثلا با ایجاد یکسری تغییرات در گروه اصلی، یعنی اگر کولین جایگزین گروه اصلی PS شود با آزاد شدن سرین، فسفاتیدیل کولین تولید خواهد شد و بالعکس و یا اینکه PC را می‌توان با فرآیند آسیلاسیون از لایزو-PC سنتز کرد (Kent, 1995).

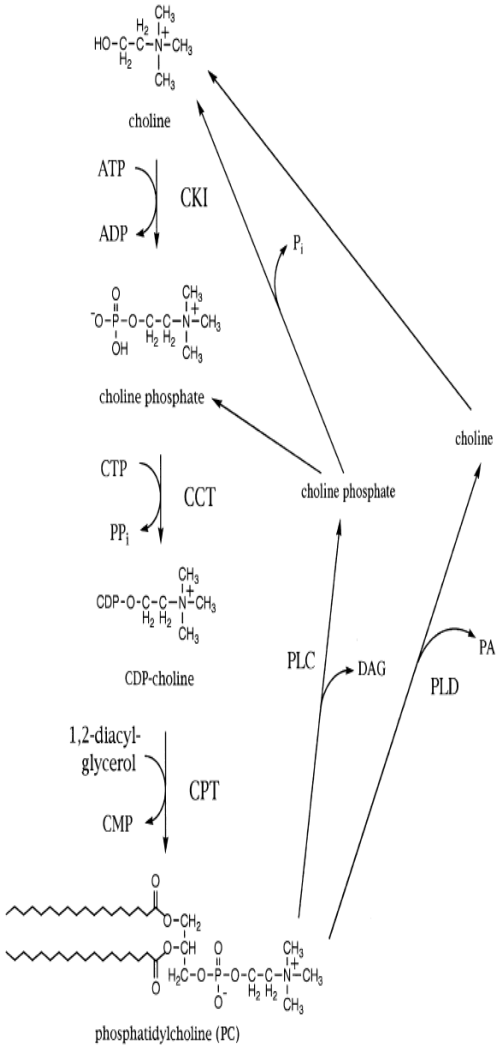
در مخمرها و قارچ ها چرخه N- متیلاسیون فسفولیپیدی، مسیر غالب در بیوسنتز PC است و چرخه CDP- کولین نقش کمکی در تولید PC دارد. اما در پستانداران عکس این مطلب صادق است و چرخه CDP- کولین، مسیر اصلی بیوسنتز می باشد. در مورد گیاهان مطالعات کمی انجام شده‌است اما به نظر می‌رسد که چرخه CDP- کولین، مسیر اصلی تولید این ترکیب است.



شکل ۳. فسفو لیپیدی (Pmt)، در طی سه مرحله، متیلاسیون فسفاتیدیل اتانول آمین را کاتالیز می‌کند. در قارچها و مخمرها مرحله اول توسط یک متیل ترانسفراز نوع II (CHO_2) کاتالیز می‌شود و دو مرحله آخر توسط متیل ترانسفراز نوع I (OPI_3) کاتالیز می‌شوند. OPI_3 و CHO_2 نام محصولات ژنی کد کننده N- متیل ترانسفراز فسفو لیپیدی از *ساکارومایسس سرویزیه* هستند. DAG: دی آسیل گلیسرول، DMPE: دی متیل فسفاتیدیل اتانول آمین، MMPE: منومتیل فسفاتیدیل اتانول آمین، SAM: اس-آدنوزیل متیونین، SAHC: اس آدنوزیل هومو سیستئین (Sohlenkamp et al., 2003).

[1] Cytidylyl transferase

www.SID.ir



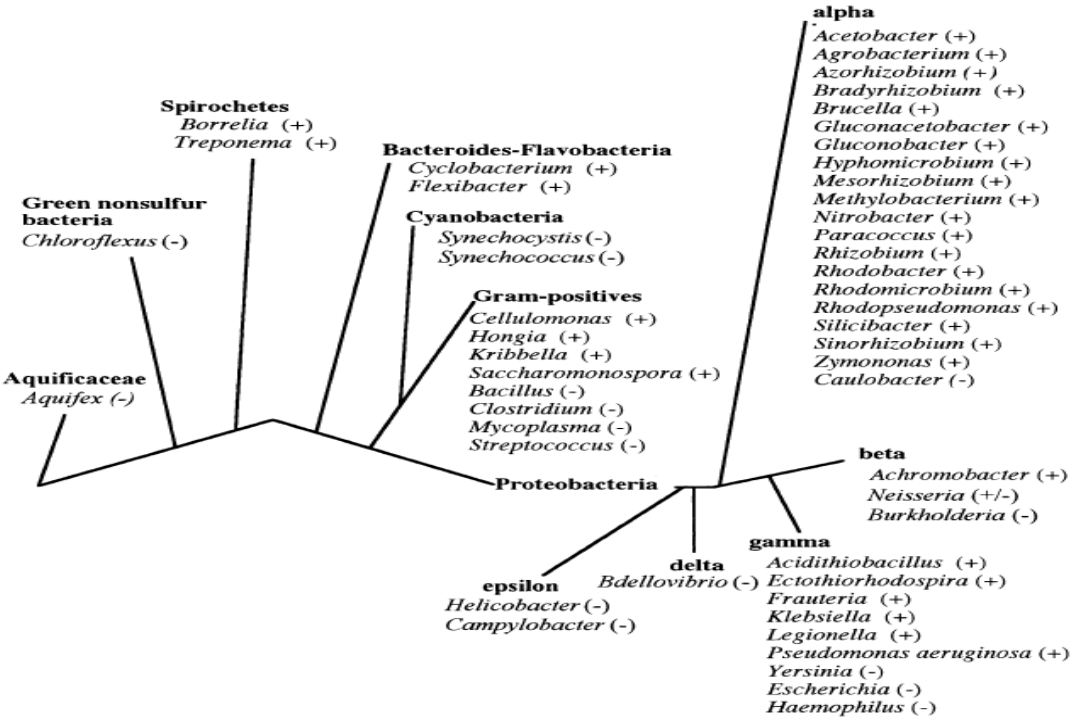
شکل ۴. مسیر-CDP کولین برای بیوسنتز فسفاتیدیل کولین در یوکاریوت‌ها (Sohlenkamp et al., 2003).

بیوسنتز فسفاتیدیل کولین در باکتری‌ها

اکثر باکتری‌ها حاوی فسفاتیدیل اتانول آمین (PE)، فسفاتیدیل گلیسرول (PG) و کاردیولیپین (CL) به عنوان فسفولیپیدهای غشایی می‌باشند. مطالعات نشان می‌دهد، تنها باکتری‌های بسیار اختصاصی، عمدتا باکتری‌های فتوسنتزکننده، با دارا بودن ساختارهای غشایی گسترده داخلی و یا باکتری‌هایی که رابطه همزیستی با یوکاریوت‌ها دارند، حاوی فسفاتیدیل کولین (PC) در غشاء فسفولیپیدی خود می‌باشند. با این وجود مشخص شده است باکتری‌های حاوی مقادیر بالای اسیدهای چرب غیر اشباع، غالبا در غشاهای سلولی خود حاوی PC هستند و به نظر می‌رسد گروههای اصلی قطبی و بزرگتر به منظور حفظ حالت دو لایه پایدار در غشا، مورد نیاز است (Johnston & Goldfine, 1992). در گونه‌های مختلف باکتریها، مقدار فسفاتیدیل کولین از درصد کم نسبت به کل لیپیدهای غشایی در سودوموناس آئروجنوزا تا بیش از ۷۳ درصد در استوباکتراستی متفاوت می‌باشد (Martínez-Morales et al., 2003). در شکل ۵، تولید فسفاتیدیل کولین در انواع مختلفی از یوباکترها نشان داده شده است. اکثر باکتری‌هایی که حاوی PC هستند، متعلق به زیر گروه‌های پروتئوباکتریایی آلفا و گاما هستند. البته در زیر گروه بتا پروتئوباکترها و گروه‌هایی که غرابت کمتری دارند مانند باکتریهای گرم مثبت، باکتروئیدزها مخصوصا گروه فلاوی باکتریوم و اسپیروشیتها نیز یافت می‌شود (شکل ۵). لازم بذکر است که، در باکتری شاخص گرم منفی یعنی *Escherichia coli* و باکتری شاخص گرم مثبت یعنی *Bacillus subtilis* فسفاتیدیل‌کولین وجود ندارد. به این ترتیب، احتمالا تخمین درستی از وجود PC در پروکاریوت‌ها در گذشته وجود نداشته است. لذا، وجود PC در باکتری‌ها گسترده‌تر از آن است که در ابتدا تصور می‌شد.

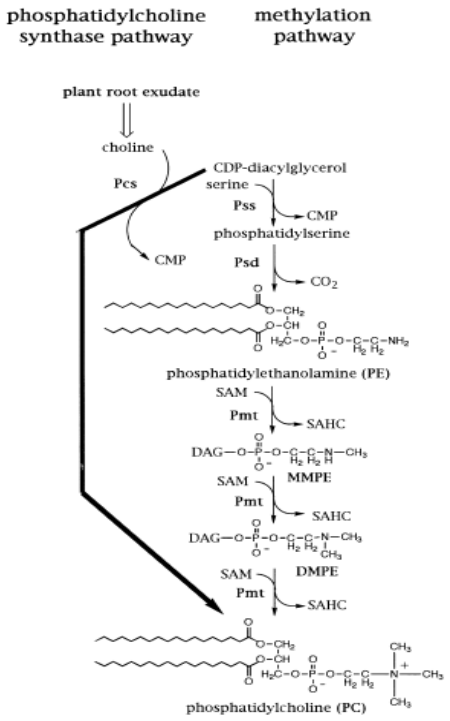
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵. تولید فسفاتیدیل کولین در یوباکترها. در درخت فیلوژنتیکی یوباکترها که بر اساس شباهت‌های توالی ژن *16 SrRNA* بین دسته‌های مختلف باکتریها رسم شده، وجود (+) و یا عدم وجود (-) فسفاتیدیل کولین در یک ارگانیسم نشان داده شده است (Sohlenkamp et al., 2003).

در پروکاریوت‌ها دو مسیر شامل متیلاسیون-فسفولیپیدی و فسفاتیدیل‌کولین‌سینتاز[1] برای سنتز PC تا کنون شناسایی شده‌اند که در شکل ۶، این مسیرها در باکتری *سینوریزوبیوم ملیلوتی*[2] نشان داده شده است. در مسیر دوم، کولین توسط آنزیم فسفاتیدیل کولین سینتاز (Pcs) مستقیما با CDP-دی‌آسیل‌گلیسیرید ترکیب شده و PC طی یک مرحله تولید می‌شود همچنین CMP به عنوان محصول جانبی این واکنش آزاد می‌گردد.



شکل ۶. بیوسنتز فسفاتیدیل کولین در باکتری *سینورایزوبیوم ملیلوتی* (Sohlenkamp et al., 2003).

[1] Phosphatidylcholine synthase
[2] Sinorhizobium meliloti

www.SID.ir

باکتری‌های تولیدکننده بیوسورفکتانت‌ها

به طور کلی پتانسیل تولید بیوسورفکتانت توسط باکتری، از منظر بیوتکنولوژی مورد مطالعه قرار گرفته است. ارگانیسم‌های تولید کننده بیوسورفکتانت از محیط‌های متنوعی از جمله خاک، آب دریا، رسوبات دریایی، صنایع نفتی و حتی محیط‌های با مقادیر بالای نمک و pH بالا جداسازی شده‌اند (Cameotra et al., 2010). علاوه بر تولید بیوسورفکتانت‌ها از محصولات زراعی و یا حیوانی مانند لوبیای سویا، سبوس برنج، شیر و فرآورده‌های شیری و فرآورده‌های دیگر، بسیاری از میکروب‌های مختلف نیز بیوسورفکتانت تولید می‌کنند. جنس‌های باکتریایی که برای تولید سورفکتانت‌ها توصیف می‌شوند عبارتند از: *سودوموناس، رودوکوکوس، میکوباکتریوم، نوکردی، فلاوی باکتریوم، کورینه باکتریوم، کلستریدیوم، اسنیتوباکتر، تیوباسیلوس، باسیلوس، سراتیا، آرتروباکتر و آلکانی وراکس* است. برخی از باکتری‌ها گونه‌های متعددی دارند که بعضی از این گونه‌ها، انواع مختلفی از سورفکتانت‌ها را تولید می‌کنند. به عنوان مثال، *سودوموناس آئروجنوزا*، رامنولیپیدها و گونه‌هایی از سودوموناس‌ها، از جمله *سودوموناس فلوروسنس*، لیپوپپتیدهای حلقوی (CLP)[1] را تولید می‌کنند (Moghis & Xuebing, 2015) که شبیه به سورفکتین و دیگر لیپوپپتیدهای حلقوی تولید شده توسط باسیلوس‌ها است. کمپلکس پلی‌ساکارید- لیپید توسط گونه‌های اسنیتوباکتر سنتز می‌شوند. همچنین پژوهشگران، لاکتوباسیلوس‌های موجود در فرآورده‌های پروبیوتیکی بر پایه لبنی را مورد بررسی قرار دادند، بر طبق این گزارش، دو گونه مهم از خانواده *لاکتوباسیل‌ها، شامل لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس پنتوزئوس*، از بین ۹ سویه لاکتوباسیل، بعنوان سویه‌های دارای بیشترین قابلیت تولید بیوسورفکتانت جداسازی شدند. بیوسورفکتانت تولید شده توسط سویه‌های فوق، دارای توانایی قابل قبولی در کاهش کشش سطحی بودند و می‌توان از آنها، به عنوان یک امولسیفایر طبیعی در صنایع غذایی استفاده کرد (کیانی و محمودی، ۱۳۹۴).

تولید صنعتی بیوسورفکتانت‌های میکروبی

تا به امروز، کاربرد صنعتی بیوسورفکتانت‌ها به دلیل هزینه بالای تولید نسبت به هزینه سورفاکتانت‌های شیمیایی محدود شده است. طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها می‌توانند بیوسورفکتانت‌ها را با استفاده از منابع مختلف مانند قندها، روغن‌ها، آلکان‌ها و ضایعات حاصل از محصولات زراعی مانند ملاس و ضایعات حاصل از فرآوری محصولاتی همچون سیب زمینی تولید کنند (Mulligan, 2005). میکروب‌ها، اغلب بیوسورفکتانت‌ها را در طول رشد، در محیط براث سنتز می‌کنند چرا که بیوسورفکتانت‌ها اغلب ترکیبات خارج سلولی هستند، بهمین خاطر جدا کردن آن‌ها از سوپرناتانت سلول، با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ، براحتی انجام می‌شود. البته به دلایل مختلف از جمله هزینه‌های زیاد، تولید تجاری این سورفکتانت‌ها توسط سویه‌های میکروبی معمولا از لحاظ تجاری مقرون به صرفه نیست (Youssef et al., 2004) و همچنان نیاز به یافتن سویه‌هایی با راندمان تولید بالا وجود دارد (Banat et al., 2014).

فرایند استخراج فسفاتیدیل‌کولین و فسفاتیدیل‌سرین مانند یکدیگر می‌باشد، بطور معمول فسفاتیدیل‌سرین با کمک حلال‌هایی مانند کلروفرم - متانول به نسبت ۱:۲ از دیگر فسفولیپیدها جداسازی و با کمک استون و فرآیند رسوب‌گذاری، از حلال‌ها و سایر ترکیباتی مانند تری‌گلیسیریدها و اسیدهای چرب موجود در محیط جدا می‌شود. PS را می‌توان از دیگر گلیسرو فسفولیپیدها (PC، PE، PI و PA) توسط دتکتور UV و کروماتوگرافی سیلیکاژل، شناسایی کرد. گونه‌های

[1] Cyclic lipopeptides

www.SID.ir

Archive of SID

مختلف PS را نیز می‌توان از طریق طیف‌سنجی‌جرمی شناسایی نمود. امروزه روش استخراج و تعیین مقدار PS به خوبی در منابع مختلف گزارش شده است (Myers et al., 2011).

اثرات بیولوژیکی

فسفولیپیدهای غشایی عمدتا در ساختمان غشا سلولی وجود دارند و نقش‌های بیولوژیکی مهمی را بر عهده دارند. به عنوان مثال هنگامیکه فسفاتیدیل‌سرین به مقدار قابل توجهی وجود دارد به علت دارا بودن بار منفی، نیروی الکتراستاتیکی لازم برای جذب کاتیون‌ها و قطعات پروتئینی با بار مثبت را، ایجاد می‌کند. یکی دیگر از ویژگی‌های بیوسورفکتانت‌ها، خواص ضد-میکروبی آن‌ها می باشد به طوریکه قابلیت جایگزینی برخی از آنها با عوامل ضد میکروبی سنتزی و آنتی بیوتیک‌ها که باعث ایجاد مقامت در باکتری های بیماریزا شده اند، ثابت شده است (Banat et al., 2010).

نتایج بالینی PS، در زمینه بهبود اختلالات افسردگی در بیماران پیر نشان می‌دهد تجویز تزریقی- وریدی PS می تواند شرایط روحی را بهبود بخشد و اضطراب زنان با علائم شدید یائسگی را بهبود دهد (Rachev et al., 2001). تجویز PS به مقدار ۳۰۰ میلی گرم در روز برای کاهش استرس ذهنی و بهبود خلق در بزرگسالان سالم و جوانان نیز گزارش شده است (Benton et al., 2001). نتایج آزمایشات بالینی نشان می‌دهد تجویز n-3 غنی شده با PS می‌تواند در بهبود استرس مزمن، به ویژه در افراد مبتلا به استرس مزمن و خیلی حاد موثر باشد (Hellhammer et al., 2012). لسیتین بیشترین فسفولیپید در غشاهای سلولی پستانداران می‌باشد. کولین و لسیتین به عنوان ترکیبات اولیه ساخت استیل کولین محسوب می‌گردند. این مواد علاوه بر این‌که سبب کاهش کلسترول خون می‌شوند، به‌عنوان پیش ساز استیل‌کولین نقش بسیار مهمی در افزایش فعالیت های سیستم عصبی مرکزی دارند (Mineur et al., 2013).

خصوصیات آنتی اکسیدانی بیوسورفکتانت‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Nitsche & e Silva, 2016). PS یک آنتی اکسیدان شناخته شده است و می‌تواند به عنوان مکمل‌ورزشی در کنترل استرس ذهنی به ورزشکاران کمک کند (Jger et al., 2007). در بیماران مبتلا به سندرم متابولیک که اکثرا دارای اضافه وزن، کبد چرب و یا اختلال در متابولیسم چربی هستند، شدت استرس و اکسیداسیون چربی، زیاد می باشد. تحقیقات نشان می‌دهد تجویز PI-PS در متابولیسم لیپید و عملکرد مربوط به کبد، کاملا اثر بخش است. در واقع بدلیل اینکه PS دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است، ترکیب PS و PI در بهبود سندرم متابولیک موثرتر عمل می‌کند (Shimizu et al., 2010).

کاربردهای صنعتی

علاوه بر کاربردهای گسترده لستین و سایر فسفولیپیدها در صنایع غذایی و دارویی، کاربرد اصلی بیوسورفکتانت‌ها در مصارف صنعتی مربوط به استخراج و فرآوری نفت است. از آنجایی که تکنولوژی استخراج نفت به شیوه سنتی و قدیمی است با این وجود فقط می‌توان تقریبا ۴۰ تا ۴۵ درصد از نفت موجود در مخازن را با کمک بیوسورفکتانت‌ها بازیابی کرد. به طور کلی بعضی از تکنولوژی‌ها، به عنوان بهبود استخراج نفت (EOR)[1] تعریف شده‌اند در این بین، بهبود استخراج میکروبی نفت (MEOR)،[2] که از تولید ترکیبات سطحی فعال میکروبی بهره می‌برد، دارای بیشترین هزینه بالقوه است. بیوسورفکتانت‌ها ممکن است در برخی از فرآیندهای معدنکاری و تولید، مانند استخراج فلزات پیشرفته از سنگ معدن نیز کارایی داشته باشند. گونه‌های سودوموناس و

[1] Enhanced oil recovery
[2] Microbial enhanced oil recovery

www.SID.ir

Achromobacter که قادر به تخریب سورفکتانت-های آنیونی هستند، به‌عنوان بیوسنسورهای میکروبی برای تشخیص سورفکتانت استفاده شده‌اند و نشان داده‌اند که پتانسیل کافی برای ارزیابی سریع سورفکتانت‌ها را، در محیط آبی دارند (Dastgheib et al., 2008).

کاربردهای زیست محیطی

در بسیاری از موارد، آلودگی محیط زیست، ناشی از فعالیت‌های صنعتی، به دلیل انتشار اتفاقی یا عمدی ترکیبات ارگانیک و یا غیرگانیک به محیط زیست است. کاربرد بیوسورفکتانت‌ها در اصلاح ترکیبات آلی مانند هیدروکربن‌ها، به منظور رسیدن به اهدافی همچون افزایش قابلیت زیستی آن‌ها، رقیق‌سازی و حذف آلاینده‌ها مشخص شده است (Sachdev & Cameotra, 2013). بیوسورفکتانت‌ها در اصلاح و بهبود ترکیبات معدنی مانند فلزات سنگین نیز به کار می‌روند. به عبارت دیگر شلاته کردن و حذف یون‌ها در طی مرحله شستشو بوسیله مداخله‌گری یا ترکیب حد واسط شیمیایی بین آمفی‌فیل‌ها و یون‌های فلزی با کمک بیوسورفکتانت‌ها تسهیل می‌شود (Franzetti et al., 2008).

نتیجه‌گیری کلی

امروزه تقاضا برای سورفکتانت‌های ویژه و جدید در صنایع کشاورزی، لوازم آرایشی و بهداشتی، مواد غذایی، دارویی و محیط زیست به طور پیوسته در حال افزایش است که بسته به هر صنعت، نوع سورفکتانتی که استفاده می‌شود، متفاوت است. از آنجاکه این سورفکتانت‌ها باید هم موثر، هم سازگار با محیط زیست باشند و هم به مقدار فراوان و با هزینه کمتر تولید شوند و در دسترس نیز باشند، طبیعی است که برای برآورده ساختن این تقاضا، به دنیای میکروبی روی آورده شده است. با توجه به بی ضرر بودن امولسیفایر-های طبیعی توسط بعضی از لاکتوباسیلوسها در مقایسه با سایر امولسیفایرهای صنعتی که بعضا دارای اثرات جانبی نیز هستند، می‌توان میزان سلامت محصول غذایی تولید شده را با این روش افزایش داد و با انجام تحقیقات بیشتر به منظور یافتن سوبسترای مناسب و ارزان قیمت جهت تولید بیوسورفکتانت می‌توان هزینه تولید این ترکیبات طبیعی را کاهش داده و صنایع غذایی را به سمت استفاده از امولسیفایرهای طبیعی و جایگزین نمودن آنها بجای امولسیفایرهای صنعتی سوق داد.

منابع

۱. کیانی، پریوش.، محمودی، محمد مهدی. (۱۳۹۴). تولید بیوسورفکتانت توسط لاکتوباسیلوس جهت استفاده در صنایع غذایی به عنوان جایگزینی برای امولسیفایرهای سنتزی. مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی دوره پنجم، شماره نوزدهم، صفحات ۶۱-۶۸.

2. Ahmad, M.U, and Xu, X. eds. 2015. Polar lipids: biology, chemistry, and technology. Elsevier, Urbana, pp. 145-235.

3. Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Marchant, R. 2010. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Appl Microbiol Biotechnol, 87, 427-444.

4. Banat, I.M., Satpute S.K., Cameotra S.S., Patil R. and Nyayanit N.V. 2014. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants'production. Front. Microbiol. 5, 1-18.

5. Benton, D., Donohoe, R., Sillance, B., & Nabb, S. 2001. The influence of phosphatidylserine supplementation on mood and heart rate when faced with an acute stressor. Nutr Neurosci, 4, 169-178.

6. Boukhchina, S., Sebai, K., Cherif, A., Kallel, H., & Mayer, P.M. 2004. Identification of glycerophospholipids in rapeseed, olive, almond, and sunflower oils

www.SID.ir

Archive of SID

by LC MS and LC MS MS. Can J Chem, 82, 1210-1215.

7. Cameotra, S.S., Makkar, R.S., Kaur, J., & Mehta, S. 2010. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind Biosurfactants. Springer.pp. 261-280.

8. Contarini, G., & Povolo, M. 2013. Phospholipids in milk fat: composition, biological and technological significance, and analytical strategies. Int J Mol Sci, 14, 2808-2831.

9. Dastgheib, S ,.Amoozegar, M., Elahi, E., Asad, S., & Banat, I. 2008. Bioemulsifier production by a halothermophilic Bacillus strain with potential applications in microbially enhanced oil recovery. Biotechnol Lett, 30, 263-270.

10. Franzetti, A., Bestetti, G., Caredda, P ,. La Colla, P., & Tamburini, E. 2008. Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in Gordonia strains. FEMS Microbiol Ecol, 63, 238-248.

11. Jager, R., Purpura, M., Geiss, K.-R., Weiß, M., Baumeister, J., Amatulli, F., Herwegen ,H. 2007. The effect of phosphatidylserine on golf performance. J Int Soc Sports Nutr, 4, 23.

12. Johnston, N.C., & Goldfine, H. 1992. Replacement of the aliphatic chains of Clostridium acetobutylicum by exogenous fatty acids :regulation of phospholipid and glycolipid composition. J Bacteriol, 174, 1848-1853.

13. Kawai, Y., Kiyokawa, H., Kimura, Y., Kato, Y., Tsuchiya, K., & Terao, J. 2006. Hypochlorous acid-derived modification of phospholipids: characterization of aminophospholipids as regulatory molecules for lipid peroxidation. Biochemistry, 45, 14201-14211.

14. Kent, C. 1995. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. Annu Rev Biochem, 64, 315-343

15. Liu, L., Waters, D.L., Rose, T.J., Bao, J., & King, G.J. 2013. Phospholipids in rice: significance in grain quality and health benefits: a review. Food Chem, 139, 1133-1145.

16. Martínez-Morales, F., Schobert, M., Lopez-Lara, I.M., & Geiger, O. 2003. Pathways for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria. Microbiol, 149, 3461-3471.

17. Minder, A.C ,.De Rudder, K.E.E., Narberhaus, F., Fischer, H.-M., Hennecke, H., & Geiger, O. 2001. Phosphatidylcholine levels in *Bradyrhizobium japonicum* membranes are critical for an efficient symbiosis with the soybean host plant. Mol Microbiol, 39, 1186-1198

18. Mineur, Y.S., Obayemi, A., Wigestrand, M.B., Fote, G.M., Calarco, C.A., Li, A.M., & Picciotto, M.R. 2013. Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior. Proc Natl Acad Sci U S A, 110, 3573-3578.

19. Mulligan, C.N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. Environ Pollut, 133, 183-198.

20. Myers, D.S., Ivanova, P.T., Milne, S.B., & Brown, H.A. 2011 .Quantitative analysis of glycerophospholipids by LC-MS: acquisition, data handling, and interpretation. Biochim Biophys Acta, 1811, 748-757.

21. Nitsche M. & e Silva S. S. 2016. Recent Food Applications of Microbial Surfactants. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1-35.

22. Pepeu, G., Pepeu, I.M., & Amaducci, L. 1996. A review of phosphatidylserine pharmacological and clinical effects .Is phosphatidylserine a drug for the ageing brain? Pharmacol Res, 33, 73-80.

23. Rachev, E., Nalbansky, B., Kolarov, G., & Agrosì, M. 2001. Efficacy and Safety of

www.SID.ir

Phospholipid Liposomes in the Treatment of Neuro-psychological Disorders Associated with the Menopause: A Double-blind, Randomised, Placebo-controlled Study. Curr Med Res Opin, 17, 105-110.

24. Sachdev D. P. & Cameotra S. S. 2013. Biosurfactants in agriculture. Appl Microbiol Biotechnol, 97,1005-1016.

25. Sohlenkamp, C., Galindo-Lagunas, K.A., Guan, Z., Vinuesa, P., Robinson, S., Thomas-Oates, J., Geiger, O. 2007. The lipid lysyl-phosphatidylglycerol is present in membranes of Rhizobium tropici CIAT899 and confers increased resistance to polymyxin B under acidic growth conditions. Mol Plant Microbe Interact, 20, 1421-1430.

26. Weihrauch, J.L., & Son, Y.S. 1983. Phospholipid content of foods. J Am Oil Chem Soc, 60 ,1971-1978.

27. Youssef, N.H., Duncan, K.E., Nagle, D.P., Savage, K.N., Knapp, R.M., & McInerney, M.J. 2004. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. J Microbiol Methods, 56, 339-347.

www.SID.ir

Bacterial biosurfactants: A review of the biological, technological, and application aspects of Phosphatidylcholine

Noktehsanj M[1], Shakeri M[2*]

1. Ph.D. student of Food Biotechnology, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran.

2. Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran.

*__Corresponding author:__ *m.shakeri@rifst.ac.ir*

Received: 22 May 2019 Accepted: 23 August 2019

Abstract

Biosurfactants and bioemulsifiers are active surface compounds that significantly reduce the surface tensions in very small amounts. Generally, microorganisms synthesize wide ranges of bio surfactants. These compounds are classified based on molecular weight, physicochemical properties, and mode of action. Phosphatidylcholine (PC), one of the major components of commercial lecithin, is the most important membrane phospholipid in eukaryotes which can be synthesized by two pathways, methylation and/or the CDP-choline pathways. Many prokaryotes lack PC, but in the membranes of some bacteria, significant amounts of this material are found. Due to the high importance of lecithin in the food and medicine industry, studies on the ingredients of lecithin such as phosphatidylcholine and phosphatidylserine are a matter of interest. Recognition of the biosynthesis pathways of phosphatidylcholine compounds, especially in the bacteria for optimal production of these microbial metabolites is a matter of great importance. In this study, the structure, biochemical function, and biosynthesis pathways of bio surfactants are investigated in bacteria, the production technology, and their important applications are also described.

Key words: Phosphatidylcholine, Lecithin, Bioemulsifier, Bacterial metabolites.

www.SID.ir