مقایسه فعالیت سطحی و همولیتیک بیوسورفکتنت تولید شده از باسیلوس سابتیلیس ATCC۶۶۳۳ با چند سورفکتنت صناعی

*دکتر غلامرضا دهقان نوده،** دکتر بی بی صدیقه فضلی بزاز، ***دکتر محمدرضا حسیندخت

* دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد(آدرس فعلی: گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان)

**دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

***گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی، مشهد

خلاصه

از سه سویه باسیلوس سابتیلیس در دسترس، با استفاده از روشهای همولیز در محیط آگار خون دار و تولید کف در کشت مایع نوترینت براس، جهت تولید بیوسورفکتنت استفاده شد. باسیلوس سابتیلیس ATCC۶۶۳۳ به عنوان سویه مناسب و برتر انتخاب و در محیط نوترینت براس رشد داده شد. رشد و تولید بیوسورفکتنت هر ۲۴ ساعت به کمك شاخص های امولسیون سازی و کشش سطحی مایع رویی کشت ارزیابی گردید. سپس سویه برگزیده در محیط های مختلف برای بازده تولید بیشتر رشد داده شد. بهترین محیط کشت مایع، محیط برین هارت اینفیوژن براس همراه با یون های آهن و منگنز بود. پس از جداسازی جسم میکربی با سانتریفوژ، بیوسورفکتنت از مایع رویی کشت با روشهای رسوب گیری با اسید و استخراج با دی کلرومتان و کریستاله شدن مجدد جمع آوری گردید. غلظت بحرانی تشکیل میسل و توانایی سورفکتین برای همولیز گلبول های قرمز با چند سورفکتنت صناعی شامل سدیم دودسیل سولفات (SDS)، بنزآلکونیوم کلراید (BC)، تترادسیل تری متیل آمونیوم برماید (TTAB) و هگزادسیل تری متیل آمونیوم برماید (HTAB) بررسی و مقایسه گردید. حداکثر اثر همولیتیك برای همه این عوامل فعال سطحی در بالای غلظت بحرانی تشکیل میسل بود. اثر همولیتیك سورفکتنت های صناعی بیش از بیوسورفکتنت تولید شده توسط باسیلوس سابتیلیس ATCC ۶۶۳۳ بود. از این رو بیوسورفکتنت به دست آمده از باسیلوس سابتیلیس می تواند به عنوان یك عامل فعال سطحی مناسب به علت سمیت پایین روی غشاهای سلولی مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: باسیلوس سابتیلیس، بیوسورفکتنت، سورفکتین، کشش سطحی، شاخص امولسیون سازی، غلظت بحرانی تشکیل میسل، همولیز.

مقدمه

تولید بیوسورفکتنت ها از میکرو ارگانیسم ها به طور وسیعی در بیش از یك دهه اخیر مورد مطالعه قرار گرفته است (۷، ۹). بیوسورفکتنت ها ساختمان دوگانه آبدوست- آبگریز دارند و کشش سطحی محیطی را که در آن تولید شده اند، کاهش می دهند. این گروه از مواد فعال سطحی کاربردهای متعددی در صنعت، کشاورزی، بازیافت نفت و... دارند و با خواص اساسی نظیر ترکنندگی، کف کنندگی و امولسیون کنندگی در فراورده های دارویی و بهداشتی به کار می روند. این مواد به علت داشتن خاصیت زیست تخریب پذیری، تاثیر در دما، pH و غلظت های متفاوتی از نمك جالب توجه هستند (۵، ۲۱). باسیلوس سابتیلیس لیپوپپتیدی به نام سورفکتین تولید می‌کند که دارای فعالیت سطحی بالایی است (۱۱، ۱۸). سورفکتین به صورت یك لیپوپپتید حلقوی شامل بخش بتا هیدروکسی اسید چرب و بخش هپتا پپتیدی مشتمل بر هفت اسید آمینه با توالی (L-Glu-L-Glu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu) می باشد (۱۸). تحقیقات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نشان داده است که سورفکتین اثر ضد باکتری،

Archive of SID
www.SID.ir

ضد تومور علیه سلولهای کارسینومای Ehrlich ascites و ضد ویروس دارد. همچنین سورفکتین با مهار cAMP فسفو دی استراز باعث کاهش کلسترول می شود (۱۸). از سال ۱۹۸۰ میلادی به عنوان جایگزین سورفکتنت های شیمیایی مورد توجه محققین قرار گرفته است (۱۹). اگر مسئله اقتصادی و قیمت آن حل گردد، مطمئنا کاربردهای جدید در صنایع مختلف از جمله صنعت نفت و کشاورزی خواهد داشت (۱۸). اخیرا نیز خواص و فعالیت های جدیدی برای آن گزارش شده است که شامل خواص امولسیون سازی، کف کنندگی (۲۰)، ضد ویروس (۲۴) و ضد میکوپلاسما (۲۵) می باشند. سورفکتین با داشتن خواص ضد ویروسی و میکوپلاسمایی می‌تواند به عنوان ابزار مفیدی برای غیر فعال سازی ویروس و افزایش سلامت محصولات دارویی پروتئینی به کار رود (۱۵، ۲۵). در این پژوهش ابتدا بیوسورفکتنت از باسیلوس سابتیلیس ATCC ۶۶۳۳ تهیه شد و سپس غلظت بحرانی تشکیل میسل و قدرت همولیز گلبول های قرمز بیوسورفکتنت تولید شده با چند سورفکتنت صناعی شامل SDS، BC، TTAB و HTAB مقایسه شده است.

مواد و روش کار

میکرو ارگانیسم ها: سه سویه مختلف باسیلوس سابتیلیس شامل HR ۱۶۸، CA ۱۶۸ و ATCC ۶۶۳۳ مورد استفاده قرار گرفتند. از هر کدام از سویه ها کشت یك شبه تهیه شد. به این صورت که روی پلیت های جداگانه حاوی محیط کشت آگار مغذی (HiMedia Laboratories Limited, Mumbai, India) به روش streaking تلقیح صورت گرفت، به طوری که تمام سطح پلیت را بپوشاند. این پلیت ها برای ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (۳).

تعیین سویه تولید کننده بیوسورفکتنت

بررسی فعالیت همولیز: از کشت ۲۴ ساعته بر روی محیط کشت آگار خون دار (Merck) دارای ۵ درصد (v/v) خون گوسفند، تلقیح انجام شد. این عمل در مورد هر سه سویه باسیلوس سابتیلیس به طور جداگانه صورت گرفت. کشت ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. نتایج به صورت بروز همولیز در سویه های مختلف ثبت و با همدیگر مقایسه شدند (۳).

تعیین میزان تولید کف: سه سویه مختلف از باسیلوس سابتیلیس در سه ارلن ۵۰۰ میلی لیتری محتوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع نوترینت براس(Merck, pH = ۷/۴)، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، برای مدت ۹۶ ساعت توسط شیکر انکوباتور (۲۲۰ دور در دقیقه) کشت داده شدند. پس از پایان کار محتویات ارلن ها را به طور جداگانه در مزورهای مدرج ریخته و ارتفاع کف به سانتی متر یادداشت شد. عمر کف از زمان ریختن در مزور تا از بین رفتن کف به دقیقه برآورد گردید(۱۱). براساس این دو آزمایش مقدماتی (فعالیت همولیتیك و تولید کف) که برای تشخیص سویه تولید کننده بیوسورفکتنت به کار می روند، سویه مناسب انتخاب و در مراحل بعدی کار تنها همان یك سویه مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه گیری فعالیت سطحی مایع رویی کشت : کشش سطحی و رقت بحرانی میسل (Critical Micelle Dilution) یعنی، CMD^{-2} و CMD^{-1} هریك از نمونه ها با تانسیومتر دونوی (Sigma, modle- 703) اندازه گیری شد. اندازه گیریهای CMD^{-1} و CMD^{-2} به صورت اندازه گیری کشش سطحی مایع رویی که به ترتیب ۱۰ و۱۰۰ مرتبه با آب مقطر استریل رقیق شده بود، انجام گرفت. برای افزایش دقت پس از هر بار استفاده، حلقه تمیز شد. برای کنترل منفی از محیط کشت استریل محتوی باسیلوس سابتیلیس ATCC۶۶۳۳ در زمان صفر استفاده شد (۱۹،۱۳،۳).

تعیین شاخص امولسیون سازی: برای تعیین شاخص امولسیون سازی برای هریك از نمونه های کشت مایع، پنج میلی لیتر روغن پارافین مایع به پنج میلی لیتر مایع کشت در یك لوله سانتریفوژ اضافه شد و در سرعت بالا به مدت دو دقیقه با استفاده از دستگاه ورتکس به شدت تکان داده شد تا امولسیون تشکیل شود. با اندازه گیری ارتفاع امولسیون تشکیل شده بعد از ۲۴ ساعت (E_{24}) شاخص امولسیون سازی به دست آمد که نشان دهنده میزان پایداری امولسیون است (۳، ۵، ۱۳، ۱۹).

Archive of SID
www.SID.ir

شرایط رشد: برای رسیدن به بازدهی مناسب تولید از سویه منتخب باسیلوس سابتیلیس، با توجه به منابع موجود و گزارشات قبلی از سه محیط کشت استفاده شد. این سه محیط کشت شامل، محیط های نوترینت براس (Merck) (۴،۱) ، لندی (محیط نیمه صناعی و شامل گلوکز ۲۰ گرم، اسید گلوتامیک ۵ گرم، سولفات منیزیم ۰/۵ گرم، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۱ گرم، سولفات آهن ۰/۱۵ گرم، سولفات منگنز ۰/۰۰۵ گرم، سولفات مس ۰/۱۶ گرم و عصاره مخمر ۱ درصد در یك لیتر آب در pH=۷) (۴، ۱۴، ۱۹، ۲۲، ۲۳) و محیط برین هارت اینفیوژن براس (BHIB) (Merck) (۲، ۸، ۱۶، ۱۷، ۱۹) می باشند.

همچنین از سه محیط مایع دیگر نیز شامل BHIB و یون منگنز ($1/3\times10^{-3}M$) (۲۶،۴)، BHIB و یون آهن ($4\times10^{-3}M$) (۲۷،۴) و BHIB همراه با دو یون آهن و منگنز استفاده شد. سویه منتخب در این شش محیط کشت داده شدند. برای این منظور محیط های کشت پس از تهیه و استریل کردن در گرمخانه قرار داده شدند تا دمای آن جهت تلقیح آماده و مناسب باشد. از روی کشت های یك شبه، و با آنس پرگنه تك از سویه برگزیده برداشته و در محیط مایع یعنی هر یك از سه محیط بالا به طور جداگانه تلقیح انجام شد. لازم به ذکر است که محیط های کشت مایع مورد استفاده (حدود ۱۰۰ میلی لیتر) در داخل ارلن های ۵۰۰ میلی لیتری ریخته شد تا هوا دهی میکرب ها، حداکثر باشد. محیط های تلقیح شده درون شیکر انکوباتور (ISH-3000, AKHTARIAN Co. Ltd) با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۲۲۰ دور در دقیقه به مدت ۹۶ ساعت قرار داده شدند. برای هر محیط دو کشت صورت گرفت. پس از گذشت چهار روز کشت های مایع از شیکر انکوباتور خارج شدند و جسم میکربی از کشت های مایع (با سانتریفوژ در ۱۵۰۰۰ g به مدت ۲۵ دقیقه) جدا شد و سپس بیوسورفکتنت از مایع رویی کشت استخراج گردید و میزان بازده تولید برای هر یك از محیط های مایع به صورت میلی گرم درصد گزارش گردید. همچنین پارامترهای فعالیت سطحی مثل کشش سطحی مایع رویی کشت و شاخص امولسیون سازی مایع رویی کشت بعد از ۲۴ ساعت (E_{24}) نیز برای هر یك از محیط ها به طور جداگانه انجام و نتایج حاصل با هم مقایسه شدند(۱۹،۱۳،۵،۳).

جداسازی بیوسورفکتنت: پس از جداسازی جسم میکربی از کشت مایع با سانتریفوژ (Beckman mod. JA. 25.50 rotor) در شرایط g ۱۵۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه و دمای $10^{o}C$ بیوسورفکتنت خام از مایع رویی کشت جمع آوری و اسیدکلریدریك ۶ نرمال به آن اضافه شد تا pH به حد ۲ رسید. تحت این شرایط یك رسوب فلوکوله تشکیل شد که با عمل سانتریفوژ (۱۵۰۰۰g برای ۲۰ دقیقه، دمای ۱۰ درجه سانتی گراد) جدا گردید و تحت شرایط دسیکاتور در دمای $4^{o}C$ برای مدت یك شب نگهداری شد تا خشك شود. محصول خام حاصل در دی کلرومتان به شکل سوسپانسیون در آمد. بعد از همزدن مداوم با همزن مغناطیسی برای مدت یك شب، سوسپانسیون با کاغذ صافی واتمن نمره ۱ صاف شد تا ذرات ناخالصی درشت برداشته شوند. سپس به نسبت (V/V) ۱/۱ آب مقطر قلیایی با pH برابر ۸ به این سوسپانسیون اضافه شد و همزدن مداوم برای ۲۰ دقیقه ادامه یافت. این عمل دو بار تکرار شد. سپس دو فاز با قیف دکانتور جدا شدند و فاز آبی محتوی بیوسورفکتنت جمع آوری شد. برای خالص سازی بیشتر ماده استخراجی، دوباره مقدار کافی اسید کلریدریك ۶ نرمال به محلول آبی افزوده شد تا pH آن مجدداً به حد ۲ رسید. محلول شفاف قبلی در اثر این کار به محلول کاملاً کدر و شیری رنگ تبدیل شد که نشانه رسوب مجدد پروتئین ها (لیپو پروتئین ها) است. سپس با عمل سانتریفوژ در شرایط ۱۵۰۰۰g برای ۱۵ دقیقه رسوب برداشته شد و به وسیله دستگاه فریز درایر (Freeze Dryer 3, LABCONCO) خشك شد و در نهایت پودر شفاف رنگ زرد روشن مایل به قهوه ای که همان بیوسورفکتنت بود، در ته ظرف باقی ماند (۱۹،۸،۵،۴،۳).

مقایسه فعالیت سطحی و ظرفیت همولیز بیوسورفکتنت تولید شده با چند سورفکتنت صناعی

تعیین کشش سطحی و غلظت بحرانی تشکیل میسل: غلظت های مختلف نمونه استخراج شده (SU)، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، بنزآلکونیوم کلراید (BC)، تترادسیل تری متیل

Archive of SID

www.SID.ir

آمونیوم برماید (TTAB) و هگزادسیل تری متیل آمونیوم برماید (HTAB) در آب مقطر تهیه شد و به ترتیب افزایش غلظت با استفاده از تانسیومتر حلقه دونوی کشش سطحی محلول ها در دمای ^{o}C ۲۳ مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت. برای افزایش دقت پس از هر بار استفاده، حلقه تمیز شد. آزمایش سه بارتکرار گردید. با استفاده از میانگین اعداد به دست آمده نمودار کشش سطحی رسم شد. در هر یك از نمودارها، شروع محدوده ای از غلظت که در آن کشش سطحی به موازات تغییر غلظت، تغییر قابل توجه و محسوسی نمی کند، به نام غلظت بحرانی تشکیل میسل (cmc) معرفی شد.

تهیه سوسپانسیون گلبولهای قرمز: حدود ۱۰ میلی لیتر خون از یك فرد داوطلب سالم گرفته شد و به یك لوله حاوی هپارین اضافه و در ظرف یخ قرار داده شد. سپس این مقدار خون در ۴ لوله به طور مساوی تقسیم شد (تقریباً هر لوله ۲/۵ گرم) و لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی و لایه زرد رنگ رویی شامل پروتئین ها، گلبول های سفید و پلاکت ها دور ریخته شد و گلبول های قرمز جدا گردید. گلبول های قرمز سه بار با بافر مك ایوان (اسید سیتریك ۳۸۱/۱۵ میلی گرم، سدیم دی فسفات ۲/۹۱۳ گرم، سدیم کلراید ۷/۸۳ گرم و آب مقطر سه بار تقطیر تا حجم ۱ لیتر و pH برابر ۷) شستشو و سانتریفوژ شد. در هر مرحله از شستشو حداقل ۵ برابر حجم گلبول ها، بافر اضافه شد. پس از شستشوی گلبول های قرمز، با اضافه کردن بافر مك ایوان، سوسپانسیون گلبول قرمز با هماتوکریت ۱۲ درصد تهیه شد. برای این منظور ۳/۳۳ برابر وزن اولیه خون به گلبول های قرمز نهایی، بافر مك ایوان اضافه شد. سوسپانسیون حاصل در صورت نگهداری در یخ و دمای ^{o}C ۴ حداکثر تا ۴۸ ساعت پس از تهیه قابل استفاده است (۱۰).

اندازه گیری همولیز گلبول قرمز: ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون گلبول قرمز با ۲۰۰ میکرولیتر محلول حاوی یکی از سورفکتنت ها شامل SDS، BC، TTAB، HTAB و SU با غلظت مشخص در بافر مك ایوان در یك میکروتیوپ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از این مدت، میکروتیوپ ها در میکروسانتریفوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۵ ثانیه سانتریفوژ گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به ۳ میلی لیتر معرف درابکینز (Sigma) اضافه شد. کنترل مثبت شامل ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اولیه گلبول قرمز (هماتوکریت ۱۲ درصد، یعنی سوسپانسیون سانتریفوژ نشده) و ۲۰۰ میکرولیتر بافر است که به ۳ میلی لیتر معرف درابکینز اضافه شد تا همولیز ۱۰۰ درصد حاصل شود. به عنوان کنترل منفی که برای بررسی خود به خود در محیط تهیه گردید، فقط ۲۰۰ میکرولیتر بافر و ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون گلبول قرمز با هم مخلوط شد. پس از سانتریفوژ نمودن به مدت ۳۵ ثانیه، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی را برداشته و به ۳ میلی لیتر معرف درابکینز اضافه شد. سپس جذب نمونه ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu Corporation, UV-160 A, Japan) اندازه گیری شد که شدت جذب خوانده شده با درصد همولیز نسبت مستقیم دارد. سپس نمودار درصد همولیز در برابر غلظت عامل فعال سطحی رسم شد (۱۰).

بحث و نتیجه گیری

تعیین سویه تولیدکننده بیوسورفکتنت

برای تعیین باکتریهای تولید کننده بیوسورفکتنت از یك سری فاکتورهای تعیین کننده که فعالیت سطحی را برآورد کند مثل کشش سطحی، کشش بین سطحی و توانایی برای امولسیون کردن روغن ها و قدرت همولیز، استفاده می گردد (۱۱،۳). از این رو در بررسی حاضر برای انتخاب و جداسازی سویه تولید کننده بیوسورفکتنت از میان سه سویه باسیلوس سابتیلیس CA۱۶۸ ، HR۱۶۸ و ATCC۶۶۳۳ از روش بررسی فعالیت همولیتیك روی پلیت های آگار خونی استفاده شد. کشت آگار خون دار هر سه سویه فعالیت همولیز نشان دادند. بیشترین اثر همولیز مربوط به باسیلوس سابتیلیس ATCC۶۶۳۳ بود (جدول۱). همچنین برای تایید بیشتر کار، بررسی مشخصات کف تولید شده توسط سویه های باسیلوس سابتیلیس نیز انجام شد. یکی از بارزترین خصوصیات مواد فعال سطحی تولید کف است که از آن به عنوان روشی برای بررسی حضور عامل فعال سطحی در محلول استفاده می شود و این موضوع به ساختمان دوگانه سورفکتنت ها بستگی دارد. بیوسورفکتنت لیپوپپتیدی (سورفکتین) با اثرات پاك کنندگی و کف کنندگی عالی است که توسط باسیلوس سابتیلیس تولید می شود (۱۱).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: فعالیت همولیتیک برای سویه های مختلف باسیلوس سابتیلیس، رشد در محیط آگار خون دار.

سویه میکربی	قطر هاله (cm)	نوع همولیز
باسیلوس سابتیلیس ۱۶۸ CA	۰/۸	+
باسیلوس سابتیلیس ۱۶۸ HR	۱/۳	++
باسیلوس سابتیلیس۶۶۳۳ ATCC	۲/۲	++++

(+): حضور ناحیه نامعلوم اطراف کلنی با رنگ قرمز.
(++): حضور ناحیه تقریبا روشن اطراف کلنی با رنگ نارنجی.
(++++): حضور ناحیه روشن و واضح اطراف کلنی با رنگ زرد روشن.

جدول ۲: خواص کف مایع رویی کشت سویه های مختلف باسیلوس سابتیلس در اثر رشد در محیط نوترینت براس.

سویه میکربی	خواص کف	زمان پایداری کف (min)	ارتفاع کف (mm)
باسیلوس سابتیلیس ۱۶۸ CA	+	۱۰	۸
باسیلوس سابتیلیس ۱۶۸ HR	++	۶۰	۱۵
باسیلوس سابتیلیس ۶۶۳۳ ATCC	++++	۱۴۵	۳۰
کنترل منفی	–	۵	۵

(–): حبابهای خیلی بزرگ، بسیار پراکنده و با پایداری خیلی پایین.
(+): حبابهای خیلی بزرگ، بسیار پراکنده و با پایداری پایین.
(++): حبابهای با اندازه متوسط، متمرکز و با پایداری متوسط.
(++++): حبابهای ریز، متراکم و با پایداری بالا.

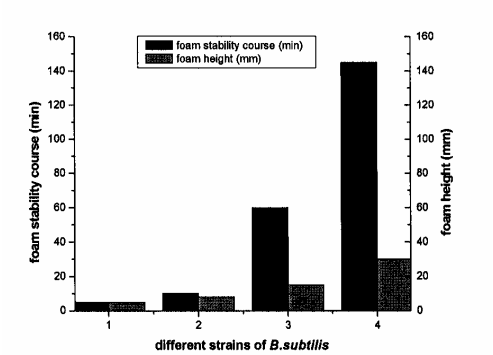
جدول ۳: مطالعه کشش سطحی مایع رویی کشت، مایع رویی کشت ده بار رقیق شده (CMD^{-1}) و مایع رویی کشت صد مرتبه رقیق شده (CMD^{-2}) مربوط به رشد باسیلوس سابتیلیس ATCC۶۶۳۳ در محیط کشت مایع نوترینت براس.

زمان (h)	کشش سطحی (mN/m)±SD	CMD^{-1} (mN/m)±SD	CMD^{-2} (mN/m)±SD
۰	۶۸/۱۵ ±۰/۱۲	۷۰/۶۰ ±۰/۳۵	۷۱/۵۷ ±۰/۱۷
۲۴	۶۴/۵۰ ±۰/۳۱	۶۷/۷۵ ±۰/۴۴	۶۹/۵۲ ±۰/۱۷
۴۸	۶۱/۳۰ ±۰/۳۳	۶۴/۶۵ ±۰/۴۰	۶۶/۰۵ ±۰/۳۵
۷۲	۵۶/۲۷ ±۰/۳۴	۵۹/۵۰ ±۰/۳۵	۶۱/۵۵ ±۰/۴۶
۹۶	۵۰/۲۵ ±۰/۵۵	۵۴/۴۲ ±۰/۴۰	۵۷/۶۷ ±۰/۴۱
۱۲۰	۵۴/۲۵ ±۰/۴۷	۵۴/۶۲ ±۰/۳۳	۶۰/۵۷ ±۰/۳۹

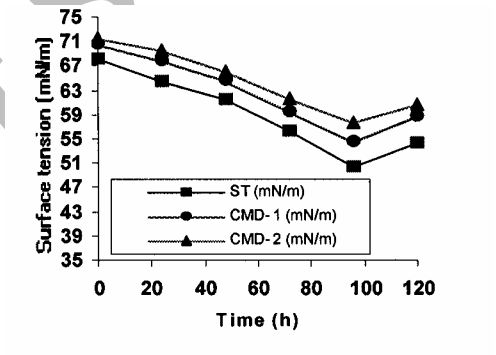
جدول ۴: شاخص امولسیون سازی مربوط به مایع رویی کشت باسیلوس سابتیلیس ATCC۶۶۳۳ در اثر رشد روی محیط کشت مایع نوترینت براس.

زمان (h)	شاخص امولسیون سازی (E_{24}) ± SD
۰	۰ ±۰/۰۰
۲۴	۷/۱۴ ±۰/۱۰
۴۸	۱۴/۲۸ ±۰/۱۵
۷۲	۲۱/۴۳ ±۰/۱۲
۹۶	۲۹/۵۷ ±۰/۱۷
۱۲۰	۲۵/۱۰±۰/۱۱

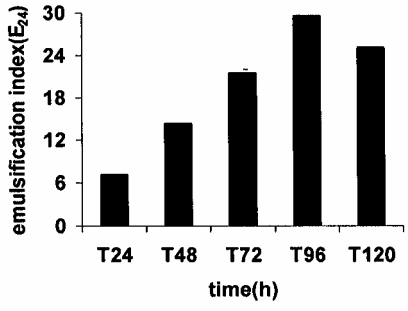
Archive of SID
www.SID.ir



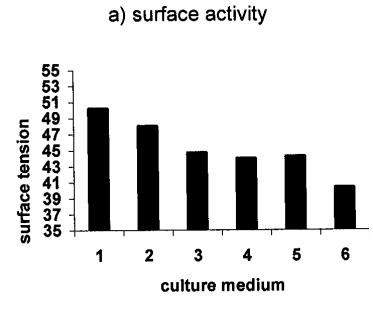
شکل ۱: زمان پایداری و ارتفاع کف مایع رویی کشت سویه های مختلف باسیلوس سابتیلیس در دسترس در اثر رشد در محیط نوترینت براس. (۱): کنترل منفی، (۲): باسیلوس سابتیلیس CA۱۶۸، (۳): باسیلوس سابتیلیس HR۱۶۸ ، (۴): باسیلوس سابتیلیس ATCC۶۶۳۳.

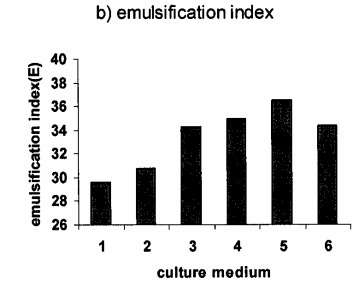


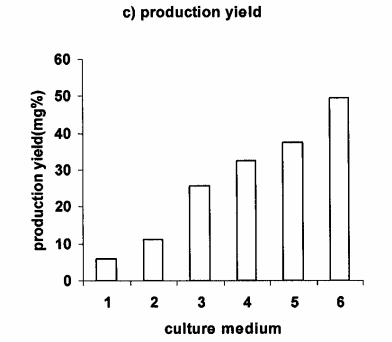
شکل ۲: روند فعالیت سطحی مایع رویی کشت (ST)، مایع رویی کشت ده مرتبه رقیق شده (CMD^{-1}) و مایع رویی کشت صد بار رقیق شده (CMD^{-2}) مربوط به رشد باسیلوس سابتیلیس روی محیط کشت مایع نوترینت براس.



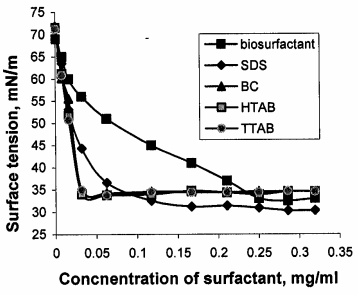
شکل ۳: شاخص امولسیون سازی (E24) مایع رویی کشت باسیلوس سابتیلیس سویه ATCC۶۶۳۳ در اثر رشد روی محیط کشت مایع نوترینت براس در زمانهای مختلف پس از انکوباسیون.





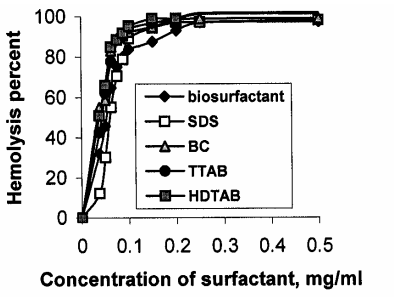


شکل ۴: الف) کشش سطحی، ب) شاخص امولسیون سازی و ج) بازدهی بیوسورفکتنت از رشد باسیلوس سابتیلیس ATCC۶۶۳۳ در محیط های کشت مایع مختلف بعد از ۹۶ ساعت از انکوباسیون. (۱): محیط نوترینت براس، (۲): محیط لندی، (۳): محیط برین هارت اینفیوژن براس(BHIB)، (۴): محیط BHIB همراه با آهن، (۵): محیطBHIB همراه با منگنز و (۶): محیط BHIB همراه با منگنز و آهن.



شکل ۵: تغییرات کشش سطحی SU، SDS، BC، TTAB و HTAB در برابر غلظت.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۶: مقایسه قدرت اثر SU با SDS، BC، TTAB و HTAB روی غشای گلبول قرمز.

باتوجه به نتایج جدول ۲ ملاحظه می شود که از میان سویه های مورد بررسی، باسیلوس سابتیلیس ATCC۶۶۳۳ کف با کیفیت مطلوب تری در کشت مایع تولید کرده و زمان پایداری کف نیز نسبت به دو سویه دیگر محسوس تر است. آزمایشات همولیز و بررسی کف (جدولهای ۱، ۲ و شکل ۱) نشان دادند که ارتباط خوبی بین میزان کف و همولیز وجود دارد و سویه ای که همولیز بیشتری داشت، کف متراکم و با پایداری بیشتری تولید کرد. از این رو با انجام این دو آزمایش مقدماتی باسیلوس سابتیلیس ATCC۶۶۳۳ به عنوان سویه برگزیده و تولید کننده بیوسورفکتنت برای انجام سایر مراحل تحقیق انتخاب گردید.

تولید بیوسورفکتنت

یکی از شاخص هایی که می تواند برای تشخیص تولید و مقدار بیوسورفکتنت در مایع رویی کشت به کار رود، اندازه گیری فعالیت سطحی مایع رویی کشت می باشد (۱۹،۴،۳). همه اندازه گیریهای کشش سطحی بر روی مایع رویی کشت، مایع رویی ده بار رقیق شده و همچنین صد بار رقیق شده مطابق با مطالعات قبلی انجام شد (جدول ۳). بر اساس شکل ۲ می توان گفت که تولید بیوسورفکتنت همراه با کاهش کشش سطحی مایع رویی کشت از روز اول شروع و تا ۹۶ ساعت بعد از انکوباسیون ادامه داشت. مقادیر CMD در این زمان حداقل بودند که این روند با برخی از کارهای قبلی همخوانی دارد (۴، ۱۹). بیوسورفکتنت ها از جمله سورفکتین به علت داشتن خاصیت دوگانه یعنی چربی دوستی- آب دوستی به کمک فاکتورهایی مثل تعیین شاخص امولسیون سازی می‌توانند مورد ارزیابی قرار گیرند. نتایج آزمایشات اندازه گیری کشش سطحی و شاخص امولسیون سازی نشان داد که ارتباط منطقی بین میزان فعالیت سطحی و شاخص امولسیون سازی وجود دارد و زمانی که کشش سطحی مایع رویی کشت بیشترین کاهش را داشت، شاخص امولسیون سازی بالاترین مقدار را نشان داد (۱۹،۱۳،۳)، (جدول۴ و شکل ۳). تولید بیوسورفکتنت در اثر رشد باسیلوس سابتیلیس ATCC۶۶۳۳، در محیط نوترینت براس نسبتاً کم و حدود ۵/۸ میلی گرم درصد بود (۱۴، ۱۸). با جایگزینی محیط نوترینت براس با محیط نیمه صناعی لندی بهره وری بیوسورفکتنت بهبود یافت. با تغییر محیط کشت و استفاده از محیط کشت مایع BHIB بازدهی بیوسورفکتنت بیشتر شد. شاخص امولسیون سازی هم نسبت به محیط لندی بیشتر شد و به حدود ۳۶ درصد رسید. افزودن املاح آهن و منگنز به محیط کشت مایع BHIB سبب افزایش تولید بیوسورفکتنت شد (۲۷،۲۶،۴). البته منگنز نسبت به آهن موجب افزایش بیشتری در فعالیت سطحی و شاخص امولسیون سازی مایع رویی کشت محتوی بیوسورفکتنت شد. به عبارتی بهره دهی بیوسورفکتنت افزایش بیشتری داشت. همچنین بازده تولید در استفاده همزمان از منگنز و آهن نسبت به زمانی که از منگنز و آهن به تنهایی استفاده گردید، بیشتر شد و مقدار تولید به حدود ۰/۵ گرم در لیتر رسید. نتایج حاصل با بررسی مشابهی که بر روی باسیلوس سابتیلیس ATCC۱۳۳۲ در محیط نوترینت براس محتوی آهن و منگنز انجام شده است، مطابقت دارد (۴). براساس این مطالعات افزودن یون های آهن و منگنز به محیط کشت مایع باعث تحریک رشد سلول میکربی و تولید بیشتر بیوسورفکتنت شده است و بازدهی آن حدود ۵۰ میلی گرم درصد بود (شکل۴).

بررسی خصوصیات بیوسورفکتنت

رفتار کاهش کشش سطحی عوامل فعال سطحی مورد بررسی متفاوت است و روند کاهش دارای شیب های متفاوتی است. بیوسورفکتنت تولید شده نسبت به عوامل فعال سطحی صناعی فعالیت سطحی ملایم تری از خود نشان داد و سورفکتنت های صناعی SDS، BC، TTAB و HTAB

Archive of SID
www.SID.ir

دارای قدرت کاهندگی کشش سطحی بیشتری هستند. SDS بیشترین کاهش در کشش سطحی را داشت (شکل ۵). البته مقایسه بیوسورفکتنت ها و سورفکتنت های صناعی از نظر مطالعات کشش سطحی تاکنون انجام نشده است. شکل ۶ قدرت همولیز SDS، BC، TTAB، HTAB و بیوسورفکتنت تولید شده را نشان می دهد. بر اساس نتایج به دست آمده HTAB بیشترین قدرت را در تخریب غشای گلبول قرمز داشت. بر اساس شکل ۶ در غلظت های کمتر از cmc افزایش بارزی در همولیز به موازات افزایش غلظت سورفکتنت ها مشاهده می‌شود و حداکثر فعالیت همولیتیک (حدود ۱۰۰درصد) در غلظت های بالاتر از cmc بروز می کند. از این رو گفته می شود که خاصیت افزایش در نفوذپذیری غشا و به دنبال آن لیز اسموتیک سلول به واسطه تشکیل میسل های مخلوط در غشا دو لایه است (۲۵). اثر قدرت همولیتیک سورفکتنت های آنیونی (SU و SDS) از سورفکتنت های کاتیونی (HTAB, TTAB, BC) کمتر بود. اندازه گیری مقدار همولیز گلبول قرمز نشان داد که بیوسورفکتنت تولید شده توانایی تخریب غشاء گلبول قرمز را مشابه سورفکتنت های شیمیایی دارد. مطالعات طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی (CD)، فرو سرخ و فرابنفش (UV) برای تایید ساختمان بیوسورفکتنت به دست آمده از باسیلوس سابتیلیس ATCC۶۶۳۳ انجام شد. طیف دورنگ نمایی دورانی بیوسورفکتنت در ناحیه فرابنفش دور در محلول بافر فسفات ۱۰ میلی مولار در ۲۱۷ نانومتر رفتار صفحات چین خورده بتا را نشان داد. طیف CD نشان داده است که سهولت تشکیل میسل و ایجاد خواص سطحی مربوط به تشکیل صفحات چین خورده بتا توسط مولکولهای بیوسورفکتنت است. طیف FTIR نمونه باند جذبی قوی پپتیدها را در $۳۱۵۰\ cm^{-1}$ نشان داد. همچنین وجود باند جذب در ناحیه $۱۶۸۰-۱۷۳۰cm^{-1}$ وجود حلقه لاکتون را تایید می کند. طیف UV وجود باندهای پپتیدی را در ۲۳۷ نانومتر تایید کرد (داده های به دست آمده چاپ نشده اند).

نتایج به دست آمده از مطالعات طیف سنجی با گزارشات قبلی همخوانی دارد (۴،۱ ، ۶، ۱۲).

نتیجه گیری کلی

بیوسورفکتنت تولید شده از باسیلوس سابتیلیس ATCC۶۶۳۳ به علت سمیت پایین روی غشای سلول می‌تواند به عنوان یك عامل فعال سطحی مناسب در فرمولاسیون های دارویی مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با استفاده از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شده است.

References

1. Arima K., Kakinuma A., Tamura G., 1968, Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation, Biochem. Biophys. Res. Commun., 31(3): 488-494.
2. Bortolato M., Besson F., Roux B., 1997, Inhibition of an alkaline phosphatase by surfactin, a natural chelating lipopeptide from *Bacillus subtilis*, Biotechnol. Lett., 19(5): 433-435.
3. Carrillo P.G., Mardaraz C., Pitta-Alvarez S. I., Giulietti A. M., 1996, Isolation and selection of biosurfactant producing bacteria, World J. Microbiol. Biotechnol., 12: 82-84.
4. Cooper D. G., Macdonald C. R., Duff S. J., Kosaric N., 1981, Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions, Appl. Environ. Microbiol., 42(3): 408-412.
5. Desai J. D., Banat I. M., 1997, Microbial production of surfactant and their commercial potential, Microbiol. Molecul. Biol., 61: 47-64.
6. Ferre G., Besson F., Buchet R., 1997, Conformational studies of the cyclic L, D-lipopeptide surfactin by Fourier transform infrared spectroscopy, Spectrochim. Acta. Part A. ,53: 623-635.
7. Fiechter A., 1992, Biosurfactants: Moving towards industrial, Tibtech., 10: 208-217.
8. Feignier C., Besson F., Michel G., 1995, Studies on lipopeptide biosynthesis by *Bacillus subtilis*: isolation and characterization of iturin-, surfactin mutants, FEMS Microbiol. Lett., 127: 11-15.
9. Gergious G., Chyr S., Sharma M., 1992, Surface active compounds from microorganisms, Bio/Technol., 10: 60-65.
10. Gould L. A., Lansley A. B., Brown M. B., Forbes B., Martin G. P., 2000, Mitigation of

Archive of SID

www.SID.ir

surfactant erythrocyte toxicity by egg phophatidylcholine, J. Pharm. Pharmacol., 52: 1203-1209.
11. Heerklotz H., Seelig J., 2001, Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes, Biophys. J., 81: 1547-1554.
12. Ishigami Y., Osman M., Nakahara H., Sano Y., Ishiguro R., Matsumoto M., 1994, Siginficance of β-sheet formation for micellization and surface adsorption of surfactin, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces., 4: 341-348.
13. Kim H. S., Yoon B. D., Lee C. H., Suh H. H., Oh H. M., Katsuragi T., Tani Y., 1997, Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9, J. Ferment. Bioeng., 84(1): 41-46.
14. Nakano M. M., Marahiel M. A., Zuber P., 1989, Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*, J. Bacteriol., 170: 5662-5668.
15. Nissen E., Vater J., Pauli G., Vollenbroich D., 1997, Application of surfactin for mycoplasma inactivation in virus stocks, In Vitro Cell Dev. Biol. Anim., 33: 414-415.
16. Peypoux F., Bonmatin J. M., Labbe H., Grangemard I., Das B. C., Tak M., Wallach J., Michel G., 1994, [Ala 4] surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies, Eur. J. Biochem., 224:89-96.
17. Peypoux F., Bonmatin J. M., Labbe H., Das B. C., Ptak M., Michel G., 1991, Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [val7] surfactin, J. Biochem., 202: 101-106.
18. Peypoux F., Bonmatin J. M., Wallach J., 1999, Recent trends in the biochemistry of surfactin, Appl. Microbiol. Biotechnol., 51: 553-563.
19. Randhir S. M., 1997, Utilization of molasses for biosurfactant production by two Bacillus strains at thermophilic conditions, JAOCS, 74(7): 887-889.
20. Razafindralambo H., Popineau Y., Deleu M., Hbid C., Jacques P., *et al.*, 1998, Foaming properties of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*: effect of lipid and peptide structural attributes, J. Agric. Food Chem., 46: 911-916.
21. Rosenberg E., Ron E. Z., 1999, High and low molecular-mass microbial surfactant, Appl. Microbiol. Biotechnol., 52: 154-162.
22. Sandrin C., Pepoux F., Michel G., 1990, Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*, Biotechnol. Appl. Biochem., 12: 370-375.
23. Ullrich C., Kluge B., Palacz Z., Vater J., 1991, Cell-free. Biosynthesis of surfactin, a cyclic lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, Biochem., 30(26): 6503-6508.
24. Vollenbroich D., Ozel M., Vater J., Kamp R. M., Pauli G., 1997, Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*, Biologicals, 25: 289-297.
25. Vinardell M. P., Characteristics of interaction between amphiphiles and membranes. 1996, In: Trends in comparative biochemistry and physiology, vol. 2, 73-82.
26. Wei Y. H., Chu I. M., 2002, Mn^{++} improves surfactin production by *Bacillus subtilis*, Biotechnol. Lett., 24: 479-482.
27. Wei Y. H., Chu I. M., 1998, Enhancement of surfactin production in iron enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332, Enzyme Microb. Technol., 22: 724-728.

Archive of SID

www.SID.ir