

- یگانه ظهیری<sup>۱</sup>، رقیه فلی زاده دوران محله<sup>۲</sup>، ندا مسرت<sup>۳</sup>، شیوا احمدی شعاری<sup>۴</sup>، منصوره پاک نژادی<sup>۵</sup>
- ۱- دانشجوی پزشکی، عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی، زاهدان
- ۲- گروه علوم آزمایشگاهی، واحد زاهدان، دانشگاه آزاد اسلامی، زاهدان
- ۳- کارشناس ارشد ژنتیک دانشگاه سیستان بلوچستان
- ۴- گروه میکروبیولوژی، واحد شهرملکان، دانشگاه آزاد اسلامی، ملکان
- ۵- گروه میکروبیولوژی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

## بیوتکنولوژی مولکولی میکروارگانیسم ها به منظور تولید بیوسورفکتانت ها (Surfactants)

بخش آب دوست و آب گریز هر دو وجود دارد. به طور کلی، سورفکتانت ها، رده ی مهمی از مواد شیمیایی صنعتی راه شامل می شوند که کاربردهای آن ها روز به روز گسترده تر می شود. به عنوان مثال از سال ۱۹۹۲ حجم معامله ی سورفکتانت ها در بازار، سالانه ۳ تا ۵ درصد افزایش یافته است. آمار تولید سالانه این مواد در سال ۱۹۹۸، افزون بر سه میلیون تن و معادل ۴ میلیون دلار است که تا سال ۲۰۰۰ به چهار میلیون تن در سال رسید. در حال حاضر این نوع فرآورده ها از ترکیبات نفتی به طریق شیمیایی سنتز شده و بخش عمده ی آن ها مصرف خانگی و رختشویی دارند. تا به حال تولید سورفکتانت ها در حیطه ی کار مهندسان شیمی و بیوشیمی قرار داشته و اکنون بیوتکنولوژیست ها نیز به تدریج در آن وارد شده اند، زیرا قابل تجزیه بودن این فرآورده ها به اندازه ی نقش کاربردی آن ها اهمیت یافته است. بیوسورفکتانت ها به آسانی در طبیعت تجزیه شده و علاوه بر این اثرات آلرژیک سورفکتانت های شیمیایی و ساختگی را ندارند. بیوسورفکتانت ها به دلیل داشتن خواص ویژه در تولید دارو ها، فرآورده های غذایی و در صنعت نفت قابلیت کاربرد دارند (۱).

### سورفکتانت ها و بیوسورفکتانت ها

سورفکتانت ها به عنوان مولکول های آمفی فیلک در بخش آب گریز اغلب از هیدروکربن ها و در بخش آب دوست از عوامل غیر یونی، آمفوتر و یا ترکیبات باردار (مثبت یا منفی) تشکیل شده اند. متداول ترین سورفکتانت های غیر یونی شامل اتوکسیلات ها (Ethoxylates) کوپلیمرهای اکسید اتیلن و پرو پیلن و استرهای سوربیتان است و سورفکتانت های یونی پرمصرف را اسیدهای چرب، استرهای سولفونات و سولفات (آنیونی) و نمک های چهارگانه آمونیوم (کاتیونی) تشکیل می دهند. به دلیل وجود گروه های آب دوست و آب گریز در

مقدمه و هدف: بیوسورفکتانت ها به واسطه میل به جذب سطحی شناخته می شوند و ترکیبات آلی هستند که به طور گسترده وجود دارند. بیوسورفکتانت ها ترکیبات فعال سطحی دوگانه دوستی هستند که توسط میکروارگانیسم ها تولید می شوند. بیوسورفکتانت ها مزایای متعددی نسبت به سورفکتانت های سنتز شده شیمیایی دارند، مانند: تولید در محل از سوبستراهای قابل تجدید، سمیت کمتر، تجزیه زیستی و سازگاری زیست محیطی است. هدف، بیوتکنولوژی مولکولی میکروارگانیسم ها به منظور تولید بیوسورفکتانت ها است. مواد و روش ها: مطالعه حاضر مروری، اطلاعات مربوطه از پایگاه های Magiran و Google Scholer، Scopus.Pub med جستجو شد. تجزیه و تحلیل داده ها به صورت کیفی انجام شد. نتایج: توانایی میکروارگانیسم ها در تولید

بیوسورفکتانت ها، سبب شده است که میکروارگانیسم های متنوعی در تولید بیوسورفکتانت ها مورد توجه قرار گیرند. این مولکول ها قادرند با قرار گرفتن در حدفاصل سیالات غیرامتزاج پذیر، موجب کاهش کشش سطحی و بین سطحی در حدفاصل مایعات، جامدات و گازها شده و امکان مخلوط شدن یا پراکنده شدن این ترکیبات را به عنوان امولسیون در آب یا سایر سیالات تسهیل کنند و بدین ترتیب قابلیت، قابلیت حرکت، دسترسی زیستی و به دنبال آن تجزیه زیستی مواد هیدروفوبیک و مواد آلی نامحلول را افزایش دهند.

نتیجه گیری: با توجه به کاربردهای زیاد بیوسورفکتانت ها در صنایع، تولید این محصول بیولوژیکی در سال های اخیر مورد توجه محققان قرار گرفته است. روش های مختلفی برای تولید و جداسازی این محصول از طریق بهینه سازی شرایط کشت و مهندسی ژنتیک و استراتژی مهندسی متابولیک انجام شده است.

### بیوسورفکتانت ها

بیوسورفکتانت ها ترکیبات کمپلکسی از چربی ها یا مشتقات آن ها هستند که در فاز رشد توسط میکروارگانیسم ها تولید شده و خاصیت آمفی فیلک دارند یعنی در یک مولکول

نوع سورفاکتانت	مثال	سهم تولید (درصد)	مصارف اصلی
آنیونی	کربوکسیلات، سولفونات و استرهای اسید سولفوریک	۶۶	پوردهای لباسشویی
کاتیونی	آمین اکسیدها، منو آمین ها، نمک های چهارگانه ی آمونیوم	۹	شامپوها، نرم کننده های پارچه
غیریونی	استرهای اسید کربوکسیلیک، گلیسیریدها، استرهای کربوهیدرات و مشتقات اتوکسیل دار آنها	۲۴	سورفاکتانت های کمکی در رختشویی، فراورده های بهداشتی و مواد غذایی
آمفوتریک	الکیل بتاین ها، الکیل دی اتیل آمین ها مشتقات ایمیدازونیلیم	۱	کاربردهای خاص

جدول ۱) انواع جدید سورفاکتانت ها که در صنعت کاربرد دارند

را می سازند. بخش عمده ی این فرآورده ها را باکتری ها می سازند که در آن بخش چرب از دم هیدروکربنی (الکیل) متشکل از یک یا چند زنجیره اشباع یا غیراشباع و هیدروکسیل دار یا شاخه دار ساخته شده که به وسیله پیوند آمیدی یا استری به گروه آب دوست متصل می گردد. غالب بیوسورفاکتانت ها خنثی بوده یا بار منفی دارند؛ ویژگی آنیونی گروه های هیدروکسیل است. انواع بیوسورفاکتانت ها را به لحاظ ساختار شیمیایی می توان در پنج دسته تقسیم بندی کرد (۳).

- گلیکولیپیدها
- فسفولیپیدها و اسیدهای چرب
- لیپوپپتیدها و لیپو پروتئین ها
- بیوسورفاکتانت های پلیمری
- بیوسورفاکتانت های ذره ای

#### تولید بیوسورفاکتانت ها توسط میکروارگانیسم ها

انواع بسیار زیادی از بیوسورفاکتانت ها شناخته شده است، که مقدار و کیفیت آن ها متأثر از نوع کربن سوبسترا، غلظت یون های فسفر، نیتروژن، منیزیم و آهن در محیط و همچنین شرایط کشت میکروارگانیسم ها از جمله PH، دما، رقیق سازی وابسته است. میکروارگانیسم های تولیدکننده بیوسورفاکتانت ها به دلیل توانایی تحمل شرایط محیطی سخت از جمله دمای بالا، فشار، شوری و توانایی رشد در محیط های بی هوازی و میکروآنروبیل را دارند. تخمیر بیوسورفاکتانت ها توسط گونه های بسیار مختلفی از میکروارگانیسم ها صورت می گیرد که در تحقیقات گذشته مورد بررسی قرار گرفته است. شرایط تولید و گسترش بیوسورفاکتانت ها توسط چندین گونه از میکروارگانیسم ها مشخص شده است؛ در

یک مولکول، سورفاکتانت ها تمایل دارند که در سطح مرزی فاز نهایی از مایعات که درجه ی قطبیت متفاوتی دارند (مانند حذفاصل روغن/ آب و یا هوا/ آب) قرار بگیرند. تشکیل لایه ی منظم مولکولی در حد فاصل دو فازمختلف، انرژی سطحی و کشش سطحی را کاهش داده و علت ایجاد خواص ویژه ی سورفاکتانت ها است. این خواص، کاربردهای متنوع سورفاکتانت ها به عنوان تولید کف سازها، شوینده ها، مرطوب کننده ها، تعلیق دهنده ها (امالسیفایرها)، حلال ها همگن کننده ها را امکان پذیر می کنند. بسیاری از مولکول های بیولوژیک فعالیت سطحی بالا نقش تعلیق دهنده داشته و در ردیف بیوسورفاکتانت ها قرار می گیرند (۲). سه منبع اصلی بیوسورفاکتانت ها در سلول میکروارگانیسم ها عبارتند از:

- ۱- منبع درون سلولی که شامل چربی های غشای پلاسمایی و اجسام چرب درون سلولی جامد یا مایع است.
- ۲- منبع برون سلولی شامل فرآورده های ترشحی آمفی فیلیک میکروارگانیسم ها است.
- ۳- منبع سطحی سلولی چربی ها و پلیمر های چرب کمپلکس دیواره ی سلولی و پوشینه و نیز بیوسورفاکتانت های رها شده از سلول در سطح آن رویشی پیدا کرده اند، شامل می شود. در صنعت، انواع زیادی از بیوسورفاکتانت ها به مصرف می رسند و یک نوع سورفاکتانت را نمی توان در همه ی موارد به کار برد. بیوسورفاکتانت های بر تنوع این نوع فرآورده ها و کاربردهای اختصاصی آنها افزوده اند، ولی تا سال ۱۹۹۹ بیوسورفاکتانت ها هنوز نتوانسته اند با انواع ساختگی و شیمیایی خود در بازار رقابت نمایند. علت این امر قابلیت تولید ضعیف سوبیه ها، گرانی قیمت سوبسترا و کاستی های تکنولوژی تولید و خلص سازی فرآورده است. میکروارگانیسم ها انواع مختلف بیوسورفاکتانت ها

باکتری سودوموناس آئروژینوزا مشخص شده است که قادر به تولید بیوسورفکتانتی به نام رامنولپید است و به طور متوسط این ماده بر اکسید شدن نیتروژن و افزایش تولید فسفات لیمیت شده است. ردوکوکوس اس پی حداکثر میزان رشد و تولید بیوسورفکتانت ها را در محیط کشت ۲ درصد حجمی/حجمی حاوی ان-پارافین، نیترات به عنوان منبع نیتروژن را دارا است و اولین محصول متابولیسم این باکتری به طور مستمر در محیط کشت تولید می شود (۴).

ترکیبات تشکیل دهنده ی این فرآورده ها اسید چرب زنجیره بلند، هیدروکسی اسید چرب، آلفا-الکیل-بتا هیدروکسی اسید چرب و ترکیبات آب دوست شامل کربوهیدرات، اسید کربوکسیل فسفات، اسید آمینه ها، پپتیدهای حلقوی یا الکل هاست. این مواد به وسیله دو راه متابولیک با آنزیم های متمایز از هم ساخته می شوند که یکی به بخش آب گریز و دیگری به بخش آب دوست مولکول منتهی می شود (۵). براساس این که سنتز هر یک از این دو بخش می تواند به طور پیوسته و یا در اثر القای محرک ساخته شود، پژوهشگران چهار راهبرد برای تولید بیوسورفکتانت در سلول باکتری ها پیش بینی کرده اند:

- بیوسنتز بخش آب گریز دائمی و بخش آب دوست در اثر القای محرک صورت می گیرد.
  - بیوسنتز بخش آب دوست دائمی و بخش آب گریز در اثر القای محرک انجام می شود.
  - بیوسنتز هر دو بخش دائمی است.
  - بیوسنتز هر دو بخش توسط القای محرک صورت می گیرد (۶).
- نوع محیط کشت و شرایط رشد و ویژگی های میکرو ارگانیسم، نوع و مقدار بیوسورفکتانت تولید شده را تعیین می کند. منبع کربن می تواند تولید فرآورده را القا و تشدید کرده یا مهار کند. در برخی موارد افزودن منبع کربن نامحلول در آب تولید بیوسورفکتانت را القا می کند. مثال هایی از این حالت عبارتند از:

۱- سنتز سوفرولپیدی ها با افزودن اسیدهای چرب زنجیره بلند با هیدروکربن ها یا گلیسیریدها به محیط رشد تورولوپسیس مگنولی ای (*Torulopsis magnoliae*).

۲- سنتز ترهالولپیدها در ردوکوکوس اریتروپولیس با افزودن هیدروکربن ها (۶ و ۱۳).

۳- سنتز گلیکولپیدها در سودوموناس آئروژینوزا سویه ی SB-30 با افزودن الکان های طبیعی به طور کلی بیوسنتز بیشتر از این قبیل به وسیله ی سوسترهای القایی امکان پذیر است. مهار تولید بیوسورفکتانت ها به وسیله ی اسیدهای و د-گلوکز به ترتیب در باکتری های آرتروباکترکالکواستیکوس (*A.Calcoaceticus*) و آرتروباکترپارافینئوس (*A.Paraffineus*) مشاهده شده است. به همین طریق، مهار و

کاهش سنتز رامنولپیدها سودوموناس آئروژینوزا و کاهش لیپوزان در کاندیدا لیپولیتیکا با افزودن د-گلوکز، استات یا اسیدهای تری کربوکسیلیک اسید گزارش شده است. تغییر منبع کربن بر میزان تولید بیوسورفکتانت ها اثر می گذارد. منابع کربن محلول در آب مانند گلیسرول، د-گلوکز، مانتول، پمیتول، برای تولید رامنولپیدها مناسب هستند. افزودن منبع کربن نامحلول در آب، نظیر افزودن هگزادکان به محیط کشت با ترکیب پایه ی دکستروز، تولید بیوسورفکتانت ها (مانند گلیکولپیدها) را زیاد می کند (۷).

سایر ترکیبات محیط کشت غیر از منبع کربن نیز در تولید این فرآورده ها موثرند. آرتروباکتر پارافیتیکوس در محیط کشت کانی برای تولید بیوسورفکتانت، آمونیوم و اوره رابر نیترات ترجیح می دهد و در این حال سودوموناس مولد رامنولپید در حضور نیترات بهتر عمل می کند. منبع نیتروژن نیز می تواند مانند منبع کربن در میکروارگانیسم های مولد نقش مهار کننده یا القا کننده داشته باشد. محدود کردن تراکم کاتیون های چند ظرفیتی به تولید فراوان برخی بیوسورفکتانت ها کمک می کند. نظیر کاهش تراکم منیزیم، کلسیم، پتاسیم، سدیم و نمک های کمیاب در تولید رامنولپیدها در باسیلوس سوبتیلیس نمک های آهن و منگنز تولید بیوسورفکتانت افزایش می دهند. تاثیر شرایط محیطی، با تغییر در وضعیت رشد و فعالیت میکروارگانیسم ها اثرات متفاوتی در تولید بیوسورفکتانت ها برجای می گذارند. pH نقش مهمی در تولید سوفرولپیدها ایفا می کند. بیشینه ی مقدار رامنولپیدها در pH ۶ تا ۶/۵ تولید شده در pH بالاتر از ۷ به شدت کاهش می یابد، با این حال تولید پنتا و دی ساکاریدها به وسیله نوکاردیا، کورینه باکتریوم و باکتریئیدس در pH ۵/۶ تا ۸ تحت تاثیر قرار نمی گیرد (۸ و ۱۲).

### تولید در مقیاس بزرگ

موادخام اولیه ۱۰ تا ۳۰ درصد هزینه های تولید در مقیاس بزرگ را به خود اختصاص می دهند. بخش عمده ی بیوسورفکتانت ها در مرحله رکود یا مرحله رشد نمایی در محیط رها می شوند. تولید این فرآورده ها در کشت بسته و کشت باز در سرعت رقیق سازی کم، تجزیه شده و تولید انواع گلیکولپیدی آن به وسیله ی سلول های شده ی تورولوپسیس بامبیکولا (*Torulopsis bombicula*) نشان داده شده است. تولید سورفکتین در باسیلوس سوبتیلیس نوترکیب در بستر جامد (Solid State) به تولید ۰/۸ گرم از این فرآورده در هر لیتر محیط کشت انجامیده است. بخش عمده ی این فرآورده همراه کف حذف شده و از دست می رود. با جمع آوری کف و

10- Pornsunthorntawe O, Wongpanit P, Chavadej S, Abe M, Rujiravanit R. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. *BioresourTechnol*, 2008; 99 (6): 1589-1595.

11- Suresh Chander CR, Lohitnath T, Mukesh Kumar D J, Ka-laichelvan PT. Production and characterization of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MTCC441 and its evaluation to use as bio-emulsifier for food bio – preservative. *Adv App Sci Res*, 2012; 3 (3):1827-1831.

12- Talaie AR. Parametric study of petroleum compounds biodegradation using microorganisms. *Sci Res Azad Uni Branch Ahvaz*, 2008; 21 (75):20-27. [full text in Persian]

13- Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. Devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol Advances*, 2006; 24 (6):604-620.

Molecular biotechnology of microorganisms to produce biosurfactants

Yeganeh Zahiri<sup>1</sup>, Roghayeh Gholizadeh Doran Mahalleh<sup>2</sup>, Neda Maserat<sup>3</sup>, Shiva Ahmadi Shoar<sup>4</sup>, Mansoureh Paknejad<sup>5</sup>

1- Medical student, member of Young and Elite Researchers Club of Islamic Azad University, Zahedan, Iran.

2- Department of Laboratory Sciences, Zahedan Branch, Islamic Azad University, Zahedan, Iran.

3- Maserat of Genetics, Sistan Baluchestan University.

4-Department of Microbiology, Malekan Branch, Islamic Azad University, Malekan, Iran.

5-Department of Microbiology, Shahr-e-Qod Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Email : [zahiri.yeganeh@gmail.com](mailto:zahiri.yeganeh@gmail.com)

Abstract

**Introduction and goal;** Biosurfactants are known for their affinity for adsorption and are the most abundant organic compounds. Biosurfactants are dual-friendly surfactants produced by microorganisms. Biosurfactants have several advantages over chemically synthesized surfactants, such as: on-site production of renewable substrates, lower toxicity, biodegradability, and environmental compatibility. The goal is the molecular biotechnology of microorganisms to produce biosurfactants.

**materials and methods;** In the present study, relevant information was searched from Pub med, Scopus, Google Scholar and Magiran databases. Data analysis was performed qualitatively.

**Results;** The ability of microorganisms to produce biosurfactants has led to the attention of various microorganisms in the production of biosurfactants. These molecules are able to reduce the surface and interfacial tension between liquids, solids, and gases by being at the interface of non-biodegradable fluids, and facilitate the mixing or dispersion of these compounds as emulsions in water or other fluids. Thus increasing solubility, mobility, bioavailability and subsequent biodegradation of hydrophobic materials and insoluble organic matter.

**Conclusion;** Due to the many applications of biosurfactants in industry, the production of this biological product has been considered by researchers in recent years. Various methods for production and isolation of this product have been done by optimizing the culture conditions and genetic engineering and metabolic engineering strategy.

**Keywords:** Microorganisms, Production, Biosurfactants and Biotechnology.

رسوب دادن سورفکتین موجود در آن در محیط اسیدی در شرایط مشابه از همان کشت، ۴/۵ گرم در لیتر سورفکتین به دست آمده است (۱۰ و ۹). مهم ترین تولید کننده های زیستی سورفکتانت ها شامل باکتری های جنس باسیلوس، سودوموناس، اسیتوباکتر، کورینه باکتریوم و در بین مخمرها کاندیدا و رودوتورولا است. بیوسورفکتانت ها درون سلول فعال باقی مانده ولی در شرایط شیمیایی خارج سلول معمولاً شرایط دشوار مانند پروکاریوت های هایپرترموفیل، هالوفیل و سایکروفیل توجه خاصی شده است. کاربردهای انحصاری این فرآورده های جدید می تواند وضع بازار سورفکتانت ها را به سود انواع بیولوژیک آن تغییر دهد (۱۱).

### نتیجه گیری

باتوجه به پژوهش های انجام گرفته در این زمینه میکرواگانسیم های مولد بیوسورفکتانت که از مؤثرترین این میکروارگانسیم ها در تجزیه نفت می توان به سودوموناس آئروژینوزا با تولید بیوسورفکتانت رامنولپید و سودوموناس فلورسانس با تولید بیوسورفکتانت لیوپتید را نام برد؛ قابلیت بالای میکروارگانسیم های تولید کننده بیوسورفکتانت ها در کاهش کشش سطحی دارای پتانسیل فراوانی برای کاربردهای بیوتکنولوژی و زیست محیطی است.

### منابع:

- 1- Farn, R.J., 2006., *Chemistry and Technology of surfactant*, Blackwell publishing, 1, Britain, 315.
- 2- Tabatabaee, A., Mazaheri Assadi, M., Noohi, A. A., Sajadian, V. A., 2005., Isolation of biosurfactant producing Bacteria from oil reservoirs, *Iranian JENV health*, 1, 6-12.
- 3- Banat, I.M. ,1994., Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation *bioresource technology*, 51, 1-12.
- 4- Salehizadeh, H. and Mohammadizad, S. ,2009., Microbial enhanced oil recovery using biosurfactant produced by *Alcaligenes faecalis*, *Iranian journal of Biotechnology*, 4, 216-223.
- 5- Gudina, E.J., Pereira, J.F.B, Costa, R., Coutinho, A. P., Teixeira, J.A. and Rodrigues, L. R. ,2013., Biosurfactant- producing and oil degrading *Bacillus*.
- 6- Kosaric N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technol and Biotechnol*, 2001; 39 (4):295-304.
- 7- Kuiper I, Lagendijk EL, Pickford R, Derrick JP, Lamers GEM ,Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV. Characterization of two *Pseudomonas* utidalipopeptidebiosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol*, 2004; 51 (1):97-113.
- 8- Lars A. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In, Hoang-Dung T, Fennema O, Hui Y, Walstra P, Karel M, et al. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 3th ed. New York, USA, Marcel Dekker Inc, 2004; 18-85.
- 9- Lee SC, Lee SJ, Kim SH, Park IH, Lee YS, Chung SY, Choi YL. Characterization of new biosurfactant produced by *Klebsiella* sp. Y6-1 isolated from waste soybean oil. *BioresourTechnol*, 2008; 99 (7):2288-2292.