Food Hygiene, Vol. 13, No. 49, Spring 2023

"Research article" **DOI: 10.30495/JFH.2023.1982517.1394**

Investigation of antioxidant and antimicrobial properties of biosurfactants derived from *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus casei*

Akbarzade Najar, B.[1], Ariaii, P.[1]*, Esmaeili, M. [1], Bagheri, R.[1]

1. Department of Food Science and Technology, Ayatolla Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
*Corresponding author's: p.aryaye@yahoo.com
(Received: 2023/4/6 Accepted: 2023/6/19)

Abstract

Biosurfactants are amphipathic compounds that are produced by many microorganisms and show a wide range of biological activities due to their unique characteristics. This study aimed to determine the antioxidant and antimicrobial potential of the biosurfactants isolated from Lactobacillus plantarum, Lactobacillus pentosus, and Lactobacillus casei. The antioxidant activity of biosurfactant was evaluated in vitro conditions using the ability to inhibit 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl free radicals and antimicrobial activities using the diffusion method in agar wells against pathogenic bacteria. The results showed that the inhibitory activity of DPPH and hydroxyl of biosurfactants at a concentration of 5 mg/ml was 78.51-81.99% and 69.51-71.56%, respectively, and the highest antioxidant activity was related to Lactobacillus plantarum ($P<0.05$). The results of inhibiting microbial growth showed that all biosurfactants had high antimicrobial activity and the antimicrobial activity against Staphylococcus aureus (gram-positive) was higher than other bacteria (gram-negative). No significant difference was observed among different biosurfactants. It seems that biosurfactants obtained from lactobacilli can be used as natural antioxidants and antimicrobials in the food and pharmaceutical industries.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: biosurfactant, *lactobacillus*, DPPH, hydroxyl, *Staphylococcus aureus*

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2023.1982517.1394

بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بیوسورفکتانت‌های مشتق شده از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس پنتوزوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی*

بیوسورفکتانت‌های مشتق شده از لاکتوباسیلوس‌ها

بهزاد اکبرزاده‌نجار[۱]، پیمان آریایی[۱*]، مهرو اسماعیلی[۱]، رویا باقری[۱]

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت‌الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: p.aryaye@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱/۱۷ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۳/۲۹)

چکیده

بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات آمفی‌پاتیکی هستند که توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و به علت ویژگی‌های منحصر به فردشان طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی را از خود نشان می‌دهند. هدف از این مطالعه تعیین پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بیوسورفکتانت‌های جدا شده از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس پنتوزوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* بوده است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیوسورفکتانت در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از توانایی مهار رادیکال‌های آزاد 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) و هیدروکسیل و فعالیت‌های ضدمیکروبی با استفاده از روش انتشار در چاهک آگار علیه باکتری‌های پاتوژن مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت مهاری DPPH و هیدروکسیل بیوسورفکتانت‌ها در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب ۷۸/۵۱-۸۱/۹۹ درصد و ۶۹/۵۱- ۷۱/۵۶ درصد بود و بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود ($P<0/05$). نتایج مهار رشد میکروبی نشان داد تمامی بیوسورفاکتانت‌ها فعالیت ضدمیکروبی بالایی داشتند و فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (گرم مثبت) بالاتر از سایر باکتری‌ها (گرم منفی) بود ($P<0/05$). فعالیت ضدمیکروبی بیوسورفاکتانت‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری نسبت به هم نداشتند. در مجموع بر اساس نتایج حاصله، به نظر می رسد می‌توان از بیوسورفکتانت‌های حاصل از *لاکتوباسیلوس*‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان و ضدمیکروب طبیعی در صنایع غذایی و دارویی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفکتانت، *لاکتوباسیلوس*، DPPH، هیدروکسیل، *استافیلوکوکوس اورئوس*

مقدمه

لاکتوباسیلوس‌ها بزرگترین و مهمترین گروه باکتری‌های اسید لاکتیک هستند و بیش از ۵۰ گونه باکتریایی را در خود جای می‌دهند. این باکتری‌ها غیر اسپورزا، گرم مثبت، میله‌ای یا میله‌ای کروی و عموما غیر متحرک‌اند. از معمول‌ترین لاکتوباسیلوس‌ها می‌توان به باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* (*L. casi*) اشاره کرد. *لاکتوباسیلوس کازئی* یکی از پروبیوتیک‌های مهم در فرآورده‌های غذایی است. این باکتری گرم مثبت، مزوفیل، میله‌ای شکل، میکروآئروفیل، کاتالاز منفی و بدون اسپور بوده است (Varedesara *et al.*, 2021). *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* یکی از فراوان‌ترین باکتری‌های جنس لاکتوباسیلوس است که معمولاً در مواد غذایی تخمیری یافت می‌شود. این باکتری گرم مثبت قادر به هیدرولیز ژلاتین است و مشخص شده است که آثار در خور توجهی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارد. این باکتری تاریخچه‌ای طولانی از مصرف ایمن و طبیعی در انواع محصولات غذایی دارد (Wouters et al, 2013). *لاکتوباسیلوس پنتوزوس* یک اسید لاکتیک پروبیوتیک بالقوه جدا شده از تخمیر طبیعی زیتون‌های سبز آلورنا می‌باشد (Abriouel *et al.*, 2017). یکی از ویژگی‌های *لاکتوباسیلوس*‌ها توانایی آنها در تولید ترکیبات بیوسورفکتانت می‌باشد (Mouafo *et al.*, 2020). بیوسورفکتانت‌ها، سورفکتانت‌هایی هستند که توسط باکتری‌ها، مخمرها و قارچ‌ها تولید می‌شوند که خارج سلولی و یا به عنوان بخشی از غشای سلولی هستند آنها مواد زیست تخریب پذیر، غیر سمی، بی‌خطر و سازگار با محیط زیست هستند، بنابراین می‌توانند به عنوان جایگزینی مناسب برای محصولات شیمیایی موجود استفاده شوند. به همین دلیل آنها به عنوان مواد چند منظوره قرن ۲۱ معرفی شده‌اند (Sandri *et al.*, 2018). تولید بیوسورفکتانت بستگی به شرایط تخمیر عوامل محیطی و در دسترس بودن مواد مغذی مانند منبع کربن دارد از مواد مختلف از جمله، قندها، روغن‌ها، انواع هیدروکربن‌ها و روغن‌های گیاهی می‌توان برای تولید بیوسورفکتانت‌ها استفاده کرد (Secato *et al.*, 2017). بیوسورفکتانت‌ها را می‌توان با استفاده از منابع ارزان قیمت تولید نمود و همچنین می‌توان با تغییر در مواد اولیه، ساختمان و کارایی بیوسورفکتانت‌های حاصله را تغییر داد. همینطور بیوسورفکتانت‌ها قادر به تحمل شوری و حفظ کیفیت در دامنه وسیعی از دما و pH می‌باشند (Didar *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2014) همچنین از بیوسورفکتانت‌ها می‌توان در صنایع دارویی، زیست پزشکی و صنایع غذایی استفاده نمود (Merghni *et al.*, 2017). خاصیت آنتی‌اکسیدان (Merghni *et al.*, 2017; Mouafo *et al.*,2020) و ضد میکروبی بیوسورفکتانت-ها علیه باکتری‌های بیماریزا گزارش شده است (Merghni *et al.*, 2017; Mouafo *et al.*,2020; Morais *et al.*, 2017). مکانیسم‌های متعددی برای فعالیت ضدمیکروبی بیوسورفکتانت‌ها پیشنهاد شده است. با توجه به گزارشی بیوسورفکتانت‌ها می‌توانند با عملکرد طبیعی از طریق تعامل با اجزای داخل سلولی تداخل ایجاد کنند و این برهمکنش می‌تواند از طریق شناسایی اهداف سلولی خارجی یا غیر اختصاصی از طریق پیوندهای الکترواستاتیک و آبگریز با لیپوپلی‌ساکاریدها که عموماً در سطح سلول باکتری یافت می‌شوند، باشد (In`es and Dhouha, 2015;

Gomaa, 2013). مکانیسم ضد میکروبی بیوسورفکتانت‌ها بر اساس تخریب دیواره‌ها و غشاهای سلولی باکتریایی نیز گزارش شده است (Mouafo *et al.*, 2020; Sambanthamoorthy *et al.*, 2014).

هدف از این مطالعه تولید بیوسورفاکتانت‌های مشتق شده از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس پنتوزوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* و بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها از طریق آزمون‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و مهار رادیکال هیدروکسیل و خاصیت ضد-میکروبی آنها علیه باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروباکتر ائروژنز* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- تولید و استخراج بیوسورفکتانت

لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC 1058)، *لاکتوباسیلوس پنتوزوس* (ATCC 334) و *لاکتوباسیلوس کازئی* (ATCC 39392) به صورت آمپول لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران (PTCC) تهیه شد. تولید، استخراج و خالص‌سازی نسبی بیوسورفکتانت در طی چندین روز انجام گرفت. ابتدا باکتری در یک ارلن حاوی ۲۰۰ میلی لیتر محیط (Man, Rogosa, Sharpe) MRS broth (مرک، آلمان) کشت داده شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سلسیوس بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه گرمخانه‌گذاری گردید. سپس محتویات ارلن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌سلسیوس و ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار سانتریفیوژ گردید تا سلول‌های باکتریایی کاملا ته‌نشین شوند. توسط اسید کلریدریک ۱ نرمال، pH مایع رویی بدست آمده را به ۲ رسانده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌سلسیوس قرار داده شد تا بیوسورفکتانت رسوب کند. رسوب قهوه‌ای حاوی بیوسورفکتانت با استفاده از سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه در۱۲۰۰ دور در دقیقه جداسازی شد. جهت خالص‌سازی نسبی بیوسورفکتانت، ۱۰ میلی‌لیتر مخلوط کلروفرم/ متانول به نسبت ۲:۱ (حجمی/حجمی)به رسوب بدست آمده افزوده شد و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه‌سلسیوس قرار داده شد. این ترکیب را دوباره در۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ کرده سپس مایع رویی در گرمخانه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا کاملا خشک شود. در نهایت بیوسورفکتانت به صورت رسوب سفید رنگ از مایع رویی بدست آمد (Suresh *et al.*, 2012).

- فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیوسورفاکتانت‌ها (غلظت‌های مختلف ۰/۰۱-۰/۰۵) در مطالعه حاضر از دو روش مهار رادیکال آزاد DPPH و روش مهار رادیکال هیدروکسیل تعیین شد.

به منظور تعیین مهار رادیکال آزاد DPPH، ۱ میلی لیتر بیوسورفکتانت محلولو ۱ میلی لیتر محلول DPPH (۰/۲ میلی مولار) ترکیب و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. از آب دیونیزه به عنوان تیمار شاهد استفاده شد و درصد رادیکال DPPH مهار شده با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Chen *et al.*, 2014).

$$\text{درصد بازداری} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} \times ۱۰۰$$

به‌منظور تعیین مهار رادیکال هیدروکسیل، یک میلی‌لیتر محلول ۱ میلی مول، ۱،۱۰-فنانترولین (۲/۵ میلی مولار) با ۱ میلی لیتر از بیوسورفاکتانت در لوله آزمایش با یکدیگر مخلوط گردیدند. به مخلوط فوق ۱ میلی‌لیتر محلول محلول نمکی بافر فسفات (PBS) (pH برابر ۴)، ۱ میلی لیتر سولفات آهن (۲/۵ میلی مولار) (FeSO4) اضافه و بهم زده شد. با افزودن ۱ میلی لیتر محلول پراکسید هیدروژن (۲۰ میلی مولار) واکنش اکسیداسیونی شروع گردید پس از انکوباسیون برای مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در آون، جذب نمونه‌ها (AS) در طول موج ۵۳۶ نانومتر خوانده شد. آب دیونیزه به عنوان تیمار شاهد استفاده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق فرمول زیر بر حسب درصد محاسبه شد (Zhai *et al*., 2015).

$$\text{درصد بازداری} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} \times ۱۰۰$$

- فعالیت ضد میکروبی

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این تحقیق عبارتند از: *اشریشیاکلی* ATCC:۲۵۹۲۲ ، PTCC:۱۲۷۶ و *استافیلوکوکوس اورئوس* ۶۵۳۸ :ATCC، PTCC:۱۱۱۲ و *انتروباکتر ائروژینوزا* ATCC:۱۳۰۴۸، PTCC:۱۲۲۱ که از مرکز تحقیقات و پژوهش علمی صنعتی ایران تهیه شد. فعالیت های ضد میکروبی با استفاده از روش انتشار در چاهک آگار مورد بررسی قرا گرفت. ۲۰۰ میکرولیتر از میکروارگانیسم مذکور $۱۰^{۷}$ CFU/mL روی صفحه آگار Luria-Bertani (LB)(مرک، آلمان) پخش شد. سپس حفر چاهک روی محیط کشت توسط پیپت استریل (با پیپت شماره ۵ و عمق ۴ میلی متر) انجام شد، و چاهک ها با ۱۰۰ میکرولیتر بیوسورفکتانت (غلظت ۰/۰۵ گرم بر میلی لیتر) پر شدند. پس از آن بلیت های حاوی محیط کشت آلوده همراه با بیوسورفاکتانت‌های ضد میکروبی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد تا جهت تعیین میزان ممانعت کنندگی آنها از رشد باکتری‌ها، قطر هاله‌های تشکیل شده با استفاده از کولیس با دقت ۰/۱ میلی متر اندازه گیری شد (Yan *et al*., 2019).

- تجزیه و تحلیل آماری

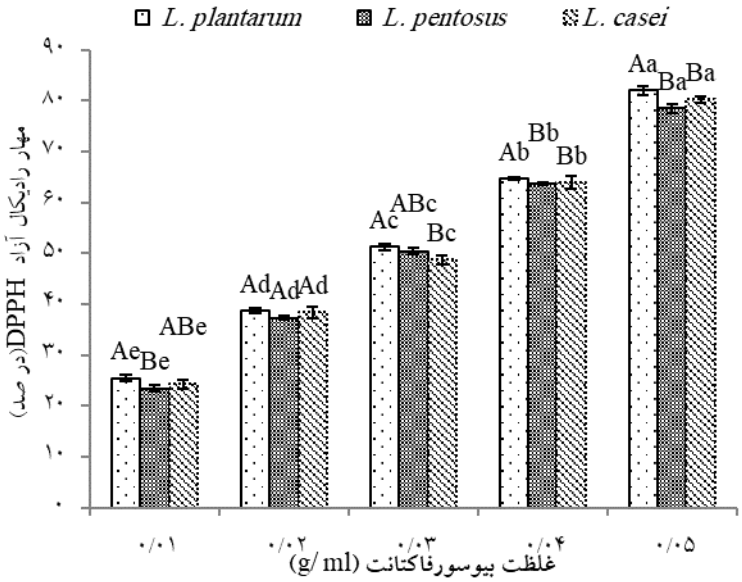
تجزیه و تحلیل داده‌ها، با توجه به نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس، با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد و ارزیابی‌ها در ۳ تکرار صورت پذیرفت. از نرم افزار SPSS(version 18) برای آنالیز داده‌ها و Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

یافته‌ها

- فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH در تیمارهای مختلف در نمودار ۱ ارائه شده است. میزان فعالیت رادیکال آزاد DPPH در بین بیوسورفاکتانت‌های استخراجی از باکتری‌های مختلف در بعضی از غلظت‌ها نسبت به هم اختلاف معنی داری داشتند ($P<۰/۰۵$) کمترین مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH در برخی غلظت‌ها مربوط به *لاکتوباسیلوس پنتوزوس* و بیشترین مقادیر مربوط به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود ($P<۰/۰۵$). با افزایش غلظت میزان فعالیت رادیکال آزاد DPPH در تمامی تیمارها افزایش یافت ($P<۰/۰۵$).

بیشترین مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH در غلظت ۰/۰۵ گرم/ میلی‌لیتر بیوسورفاکتانت حاصل از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مشاهده شد (۸۱/۹۹٪) مشاهده شد ($P<0/05$).

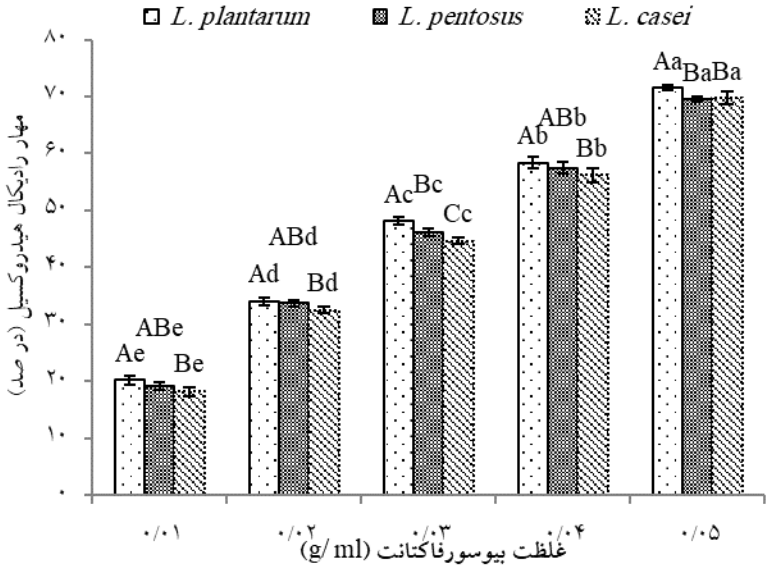


نمودار ۱: اثر استفاده از باکتری‌های مختلف و غلظت بیوسورفاکتانت بر فعالیت رادیکال آزاد DPPH

حروف بزرگ نشان دهنده تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ مابین بیوسورفاکتانت‌ها می‌باشد.

حروف کوچک نشان دهنده تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ مابین غلظت‌های مختلف بیوسورفاکتانت می‌باشد.

مقادیر فعالیت رادیکال آزاد هیدروکسیل در تیمارهای مختلف در نمودار ۲ ارائه شده است. میزان فعالیت رادیکال آزاد هیدروکسیل در بین بیوسورفاکتانت‌های استخراجی از باکتری‌های مختلف در بعضی از غلظت‌ها با هم اختلاف معنی‌داری باهم داشتند ($P<0/05$) کمترین مقادیر فعالیت رادیکال آزاد هیدروکسیل در برخی غلظت‌ها مربوط به *لاکتوباسیلوس پنتوزوس* و بیشترین مقادیر مربوط به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود ($P<0/05$). با افزایش غلظت میزان فعالیت رادیکال آزاد هیدروکسیل در تمامی تیمارها افزایش یافت ($P<0/05$). بیشترین مقادیر فعالیت رادیکال آزاد هیدروکسیل در غلظت ۰/۰۵ گرم/ میلی‌لیتر بیوسورفاکتانت حاصل از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مشاهده شد (۷۱/۵۶٪) ($P<0/05$).



نمودار (۲). اثر استفاده از باکتری‌های مختلف و غلظت بیوسورفاکتانت بر فعالیت رادیکال آزاد هیدروکسیل

حروف بزرگ نشان دهنده تفاوت آماری معنی دار در سطح ۰/۰۵ مابین بیوسورفاکتانت‌ها می‌باشد.

حروف کوچک نشان دهنده تفاوت آماری معنی دار در سطح ۰/۰۵ مابین غلظت‌های مختلف بیوسورفاکتانت می‌باشد.

- فعالیت ضد میکروبی

نتایج مربوط به فعالیت ضد میکروبی بیوسورفاکتانت‌های مختلف علیه باکتری‌های پاتوژن در جدول ۱ ارائه شده است. با توجه به نتایج تمامی بیوسورفاکتانت‌ها فعالیت ضد میکروبی بالایی داشتند و فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به طور معنی داری بالاتر از سایر باکتری‌ها بود ($P<۰/۰۵$). فعالیت ضد میکروبی بیوسورفاکتانت‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری نسبت به هم نداشتند ($P>۰/۰۵$).

جدول (۱). فعالیت ضد میکروبی (قطر هاله عدم رشد) بیوسورفاکتانت‌ها

	استافیلوکوکوس اورئوس	*اشریشیاکلی*	*انتروباکتر ائروژینوزا*
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۱۸/۰±۵۸/۲۵^{Aa}	۱۴/۰±۱۷/۲۵^{Ba}	۱۵/۰±۰۸/۵۲^{Ba}
لاکتوباسیلوس پنتوزوس	۱۸/۰±۲۰/۳۶^{Aa}	۱۳/۰±۶۳/۲۳^{Ba}	۱۳/۰±۸۸/۲۹^{Ba}
لاکتوباسیلوس کازئی	۱۸/۰±۳۰/۲۶^{Aa}	۱۳/۰±۷۷/۲۵^{Ba}	۱۳/۰±۸۵/۳۶^{Ba}

۱) همه اعداد بر حسب میلی متر بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

۲) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند. (a, b, c,...)

۳) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند. (A, B, C,...)

بحث و نتیجه‌گیری

برخی از آنتی‌اکسیدانی‌های فنولی مهم سنتزی شامل بوتیلید هیدروکسی آنیزول (Butylhydroxyanisole)، بوتیلید هیدروکسی تولوئن (Butylated hydroxytoluene) و ترت بوتیل هیدروکینون (Tert-Butylhydroquinone) به عنوان نگهدارنده در صنایع غذایی و دارویی به طور گسترده استفاده می‌شود (Yehye *et al*., 2015). اخیرا عوارض نامطلوبی از مصرف این آنتی‌اکسیدان‌ها گزارش شده است که در حیوانات آزمایشگاهی باعث سرطان‌زایی و آسیب کبدی شده است. اگر چه آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در مقادیر کم استفاده می‌شوند ولی نیاز به انواع آنتی‌اکسیدان‌های بدون عوارض جانبی نیز احساس می شود. بنابراین تعیین منبع آنتی‌اکسیدانی طبیعی مانند بیوسورفکتانت ضروری است (Merghni *et al*., 2017; Nieva *et al*., 2015). برای ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی مواد زیست فعال، استفاده از دو یا چند روش می‌تواند اطلاعات جامعی در مورد ظرفیت آنتی اکسیدانی کل آن ارائه دهد بنابراین در این مطالعه از دو روش مهار کنندگی رادیکالDPPH و رادیکال آزاد هیدروکسیل استفاده شد (Giri *et al*., 2019).

خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، برای بررسی قابلیت هیدروژن دهندگی ترکیبات استفاده می‌شود. حذف رادیکال آزاد مکانیزمی است که توسط آن ترکیبات ضد اکسایش قادر هستند از واکنش‌های اکسایشی جلوگیری نمایند. رادیکال DPPH یکی از معدود رادیکال‌های پایدار در دمای اتاق است. زمانی که این ترکیب در مجاورت یک ترکیب هیدروژن دهنده مانند یک ضد اکساینده قرار گیرد، یک هیدروژن پذیرفته، به یک ترکیب پایدار تبدیل شده و در نتیجه‌ی مهار رادیکال، تغییر رنگ محسوس از بنفش به زرد و کاهش میزان جذب در ۵۱۷ نانومتر مشاهده می‌گردد (Moo-Huchin *et al*., 2015).

تمامی بیوسورفاکتانت‌ها از خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار بودند، میزان فعالیت رادیکال آزاد DPPH در بین بیوسورفاکتانت‌های استخراجی از باکتری‌های مختلف در بعضی از غلظت‌ها با هم اختلاف معنی‌داری داشتند. کمترین مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH در برخی غلظت‌ها مربوط به *لاکتوباسیلوس پنتوزوس* و بیشترین مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH در برخی غلظت‌ها مربوط به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود. با افزایش غلظت میزان فعالیت رادیکال آزاد DPPH در تمامی تیمارها افزایش یافت. قدرت مهار رادیکال آزاد بیوسورفکتانت‌ها ممکن است به دلیل حضور گروه‌های هیدروکسیل در ساختار مولکولی آنها باشد (Abdollahi *et al*., 2020). بیشترین مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH در غلظت ۰/۰۵ گرم/ میلی‌لیتر مشاهده شد. به طوریکه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت ۵ میلی‌گرم برای بیوسورفاکتانت‌های مختلف مابین ۷۸/۵۱-۸۱/۹۹ درصد بوده است. افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیوسورفاکتانت‌ها، با افزایش غلظت توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (Merghni *et al*., 2017; Giri *et al*., 2019; Abdollahi *et al*., 2020). در مطالعه ای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بیوسورفکتانت‌های جدا شده از *Bacillus subtilis* VSG4 و *Bacillus licheniformis* VS16بررسی شد. مطابق نتایج با افزایش غلظت فعالیت

آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد و در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از بیوسورفکتانت، مهار رادیکال های DPPH برابر با ۶۹/۱-۷۳/۵ درصد بود (Giri *et al*., 2019). در مطالعه دیگری، بیوسورفاکتانت‌های تولیدی از باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* دارای توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH بودند و افزایش غلظت نیز تاثیر مثبتی بر ویژگی مذکور داشت و در غلظت ۵ میلی گرم، مهار رادیکال‌های DPPH برابر با ۷۴/۶-۷۷/۳۰درصد بود (Merghni *et al*., 2017).

در بین انواع اکسیژن‌های واکنش‌دهنده، رادیکال هیدروکسیل فعالترین رادیکال آزاد است که با شروع واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال آزاد به همه مولکول‌های زیستی حمله می‌کند. نتایج مربوط به مهار رادیکال آزاد DPPH و رادیکال هیدروکسیل باهم، هم خوانی دارد. کمترین مقادیر فعالیت رادیکال آزاد هیدروکسیل در برخی غلظت‌ها مربوط به *لاکتوباسیلوس پنتوزوس* و بیشترین مقادیر فعالیت رادیکال آزاد هیدروکسیل در برخی غلظت‌ها مربوط به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود. همچنین با افزایش غلظت میزان فعالیت رادیکال آزاد هیدروکسیل در تمامی تیمارها افزایش یافت. بیشترین مقادیر فعالیت رادیکال آزاد هیدروکسیل در غلظت ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر مشاهده شد. به طوری‌که فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت غلظت ۰/۰۵ گرم/ میلی‌لیتر برای بیوسورفاکتانت‌های مختلف مابین ۶۹/۵۱-۷۱/۵۶ درصد بوده است. در هر دو آزمون اندازه‌گیری، با افزایش غلظت بیوسورفاکتانت‌ها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش یافت که دلیل آن ورود مقدار بیشتر ترکیبات موثره (گروه‌های هیدروکسیل) به محیط واکنش است، بدین معنا که افزایش غلظت بیوسورفاکتانت‌ها به طور مستقیم میزان توانایی آنها را در مهار رایکال‌های آزاد افزایش می‌دهد (Abdollahi *et al*., 2020). در مطالعه ای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بیوسورفکتانت‌های جدا شده از *Bacillus subtilis* VSG4 و *Bacillus licheniformis* VS16 بررسی شد. مطابق نتایج آنها با افزایش غلظت فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد و در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیوسورفکتانت، مهار رادیکال‌های هیدروکسیل برابر با ۶۳/۳-۶۹/۸ درصد بود (Giri *et al*., 2019). بنابر نتایج آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی، می‌توان از بیوسورفکتانت‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در صنعت غذایی و دارویی استفاده نمود.

مواد غذایی به دلیل ترکیبات مغذی موجود در آن بستر بسیار مناسبی برای رشد و تکثیر بسیاری از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها وکپک‌ها می‌باشند. به دلیل افزایش روز افزون جمعیت جهانی و افزایش رقابت بر بدست آوردن موادغذایی، لازم است راهکارهایی جهت حفاظت از موادغذایی در برابر فساد و افزایش ماندگاری آن با روش‌های ایمن و به صرفه اندیشیده شود (Amiri *et al*., 2019). میکروارگانیسم‌ها از جمله مشکلات مهم در ایمنی و نگهداری موادغذایی هستند. معمولاً برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها و افزایش ماندگاری در صنایع غذایی از مواد نگهدارنده شیمیایی استفاده می‌شود. استفاده از نیتریت‌ها و دی اکسیدگوگرد به عنوان ترکیبات شیمیایی می‌تواند عوارض جانبی بر سلامت انسان داشته باشد. همچنین نگرانی‌هایی از طرف مصرف‌کنندگان در مورد ایمنی نگهدارنده‌های مصنوعی به کار رفته در مواد غذایی وجود دارد. در نتیجه تقاضا برای افزایش استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی جهت جایگزینی مواد ضد

میکروبی مصنوعی روز به روز در حال افزایش است (Soltan-Dallal *et al*., 2019). در میان ترکیبات ضد میکروبی طبیعی، بیوسورفکتانت‌ها به خاطر فعالیت ضد-میکروبی علیه پاتوژن‌های انسانی و گیاهی شناخته شده-اند. بیوسورفکتانت‌ها با اثرات ضدمیکروبی بر روی طیف گسترده‌ای از ارگانیسم‌ها و همچنین قابلیت مصارف غذایی آنها در برخی موارد و کمتر بودن اثرات جانبی آنها نسبت به آنتی‌بوتیک‌های رایج می‌توانند در برخی موارد جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها شوند (Abdollahi *et al*., 2020). با توجه به نتایج تمامی بیوسورفاکتانت‌ها فعالیت ضد میکروبی بالایی داشتند و فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بالاتر از سایر باکتری‌های گرم منفی بود. فعالیت ضد میکروبی بیوسورفاکتانت‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری نسبت به هم نداشتند. بیوسورفکتانت‌ها غشاهای سیتوپلاسمی را مختل نموده و در نتیجه منجر به لیز شدن سلول و همچنین نشت یون پتاسیم و فسفات به خارج از سلول می‌شود و از طرفی با ایجاد منافذ بر روی غشا نیروی حرکتی پروتون را مختل می‌کند ترشح یون‌ها به بیرون غشا باعث تعادل pH میشود و هیدرولیز ATP مرگ سلول را به دنبال دارد (Giri *et al*., 2019; Sharma *et al*., 2016). باکتری‌های گرم منفی به دلیل نفوذناپذیر بودن دیواره سلولی‌شان در مقابل ترکیبات ضد میکروبی مقاوم‌اند (Soltan-Dallal *et al*., 2019). بنابر نتایج بیوسورفاکتانت‌ها می‌تواند به عنوان یک عامل ضد میکروب مانع موثری در برابر رشد باکتری‌ها، متعاقب با آن فساد مواد غذایی و انتقال عوامل بیماری‌زا گردد. Merghni و همکاران (۲۰۱۵ و ۲۰۱۷) نیز اعلام نمودند سایر محققین نیز اعلام نمودند بیوسورفکتانت مشتق شده از *لاکتوباسیلوس کازئی* فعالیت ضد باکتریایی در برابر سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد (Merghni *et al*., 2015; 2017). بر اساس مطالعه ای، اعلام شد بیوسورفکتانت‌های جدا شده از *Bacillus subtilis* VSG4و *Bacillus licheniformis* VS16 دارای فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، اشیرشیاکلی، باسیلوس سروئوس و سالمونلا تیفی موریوم* بوده اند (Giri *et al*., 2019). همچنین بر اساس مطلعه ای دیگر، بیوسورفکتانت های تولید شده از *لاکتوکوکوس لاکتیس (L. lactis)* دارای فعالیت ضد میکروبی علیه پاتوژن های میکروبی *اشیرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین (MRSA) بودند (Saravanakumari *et al*., 2010). در تحقیقی دیگر نیز اعلام شد بیوسورفاکتانت‌های مشتق شده از باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* دارای فعالیت ضد-باکتریایی در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد (Yan *et al*., 2019).

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بیوسورفکتانت‌های مشتق شده از هر سه گونه لاکتوباسیلوس‌ها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند و کمترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به بیوسورفاکتانت‌های مشتق شده از *لاکتوباسیلوس پنتوزوس* و بیشترین مقادیر مربوط به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود علاوه بر این، بیوسورفکتانت‌ها دارای فعالیت ضدمیکروبی بالایی علیه باکتری‌های پاتوژن مذکور بودند. بنابراین، بیوسورفکتانت‌های تولید شده توسط *لاکتوباسیل*‌ها می‌توانند برای استفاده احتمالی به

عنوان عوامل آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی در صنایع زیست پزشکی و غذایی مورد استفاده قرار گیرند.

تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Abdollahi, S., Tofighi, Z., Babaee, T., Shamsi, M., Rahimzadeh, G., Rezvanifar, H., *et al*. (2020). Evaluation of Anti-oxidant and Anti-biofilm Activities of Biogenic Surfactants Derived from Bacillus amyloliquefaciens and Pseudomonas aeruginosa. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 19 (2): 115-126.
- Abriouel, H., Pérez Montoro, B., Casimiro-Soriguer, C.S., Pérez Pulido, A.J., Knapp, C.W., Caballero Gómez, N., Castillo-Gutiérrez, S., Estudillo-Martínez. M.D., Gálvez, A. and Benomar, N. (2017). Insight into Potential Probiotic Markers Predicted in Lactobacillus pentosus MP-10 Genome Sequence. Front Microbiollogy, 8:891, 1-17.
- Amiri, S., Rezazadeh-Bari, M., Alizadeh Khaledabad, M. and Amiri, S. (2019). New formulation of vitamin C encapsulation by nanoliposomes: production and evaluation of particle size, stability and control release. Food Science and Biotechnology, 28(2): 423-432.
- Chen, P., Zhang, Q., Dang, H., Liu, X., Tian, F. and Zhao, J. (2014). Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α-glucosidase inhibitory activity. Food Control, 35: 65–72.
- Didar, Z. 2019. The effect of biosurfactant of saccharomyces cerevisiae on biofilms produced by *staphylococcus aureus*, epidermidis and saprophyticus: A Laboratory Study. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 18 (5):441-454.
- Giri, S. S., Ryu, E., Sukumaran, V. and Chang Park, S. 2019. Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from Bacillus strains. Microbial Pathogenesis, 113: 66- 72.
- Gomaa, E. Z. (2013). Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. Journal of General and Applied Microbiology, 59: 425–436.
- In`es, M. and Dhouha, G. (2015). Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. Peptides, 71: 100–112.
- Merghni, M., Ben Nejma, I., Helali, H., Hentati, A., Bongiovanni, F., Lafont, M., Aouni, M. and Mastouri, M. (2015). Assessment of adhesion, invasion and cytotoxicity potential of oral *Staphylococcus aureus* strains, Microb. Pathog, 86:1–9.
- Merghni, A., Dallel, I., Noumi, E., Kadmi, Y., Hentati, H. and Tobji, S., (2017). Antioxidant and antiproliferative potential of biosurfactants isolated from *Lactobacillus casei* and their anti-biofilm effect in oral Staphylococcus aureus strains. Microbial Pathogenesis, 104: 84–89.
- Moo-Huchin, V. M., Moo-Huchin, M. I., Estrada-León, R. J., Cuevas-Glory, L., Estrada-Mota, I.A., *et al*. (2015). Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. Food Chemistry, 166, 17–22.
- Morais, I. M. C., Cordeiro, A. L., Teixeira, G. S., Domingues, V. S., Nardi, R. M. D. and Monteiro, A. S., et al. (2017). Biological and physicochemical properties of biosurfactants produced by Lactobacillus jensenii P 6A and Lactobacillus gasseri - P 65. Microbial Cell Factories, 1–15.

- Mouafo, H. T., Mbawala, A., Tanaji, K., Somashekar, D., and Ndjouenkeu, R. (2020). Improvement of the shelf life of raw ground goat meat by using biosurfactants produced by lactobacilli strains as biopreservatives. LWT- Food Science and Technology, 110071, 133, 1-8.
- Nieva-Echevarria, M.J., Manzanos, E., Goicoechea, M.D. and Guillen, M. (2015). 2,6-di-tert-butylhydroxytoluene and its metabolites in foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 14: 67–80.
- Sambanthamoorthy, K., Feng, X., Patel, R., Patel, S. and Paranavitana, C. (2014). Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. BMC Microbiology, 14(1): 1-9.
- Sandri, D. and Kholiq M. A. (2018). Biosurfactant producing bacteria from oil contaminated soil: Screening, identification, and process optimization. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences, 1(2):49-56.
- Saravanakumari, P. and Mani, K. (2010). Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from *Lactococcus lactis* and analysis of antibacterial activity against multidrug resistant pathogens, Bioresource Technology, 101 (22): 8851-8854.
- Secato, J. F. F., dos Santos, B. F., Ponezi, A. N. and Tambourgi, E.B. (2017). Optimization Techniques and Development of Neural Models Applied in Biosurfactant Production by Bacillus subtilis Using Alternative Substrates. Advances in Bioscience and Biotechnology, 8 (10):343- 360
- Sharma, B.S., Saharan, N., Chauhan, A., Bansal, S. and Procha, S. (2014). Production and structural characterization of Lactobacillus helveticus derived biosurfactant. Scientific World Journal, 493548.
- Varedesara MS, Ariaii P, Hesari J. (2021). The effect of grape seed protein hydrolysate on the properties of stirred yogurt and viability of *Lactobacillus casei* in it. Food Science & Nutrition, 9:2180–2190.
- Soltan-Dallal, M. M. and Didar Z. (2019). Investigation of the effect of biosurfactant of Bacillus subtilis against Staphylococcus strains biofilms. Feyz, 23 (3) :261-268.
- Suresh Chander, C.R., Lohitnath, T., Mukesh Kumar, D. J. and Kalaichelvan, P.T. (2012). Production and characterization of biosurfactant from bacillus subtilis MTCC441 and its evaluation to use asbioemulsifier for food bio – preservative. Advances in Applied Science Research, 3 (3):1827-1831.
- Wouters, D., Grosu-Tudor, S., Zamfir, M and De Vuyst, L. (2013). Applicability of Lactobacillus plantarum IMDO 788 as a starter culture to control vegetable fermentations. Journal of the Science of Food and Agriculture, 93 (13): 3352- 61.
- Yan, X., Gu, S., Cui, X., Shi, Y., Wen, S., Chen, H. and Ge, J. (2019). Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from Pediococcus acidilactici and Lactobacillus plantarum against Staphylococcus aureus CMCC26003. Microbial Pathogenesis, 127: 12–20.
- Yehye, N.A., Rahman, A., Ariffin, S.B., Abd Hamid, A.A., Alhadi, F.A., *et al*. (2015). Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): a review. European Journal of Medicinal Chemistry, 101: 295-312.
- Zhai, R., Yin, L., Yu, G., Wang, F., Tian, R., *et al*. (2015). Screening of lactic acid bacteria with potential protective effects against cadmium toxicity. Food Control, 54: 23–30