Archive of SID

مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
بهار ۱۳۸۹، دوره دوم، شماره چهارم، صفحه ۴۴-۳۷

بررسی نقش سینرژیسمی گیاه گردو بر تحریک فعالیت پروبیوتیکی *انتروکوکوس فکالیس*

مهسا یگانه [۱] ، آنیتا خنافری [۲]، محمدرضا فلاحیان [۲] ، انوشه شریفان [۱]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران
۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، گروه میکروب شناسی، تهران، ایران

نویسنده مسؤول: مهسا یگانه ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران
mahsayeganeh19@yahoo.com

دریافت: ۸۸/۱۰/۹ پذیرش:۸۸/۱۲/۱

چکیده

زمینه و هدف: تعداد محدودی از گیاهان دارویی یافت شده‌اند که دارای نقش سینرجیسمی بر تحریک تولید آنتی‌بیوتیک‌ها بوده اند. هدف این مطالعه، ارزیابی نقش سینرژیسمی برگ گیاه گردو (Juglans regia) بر تحریک فعالیت پروبیوتیکی *انتروکوکوس فکالیس* و توسعه اثر ضد میکروبی آن است.

روش بررسی: پس از کشت *انتروکوکوس فکالیس* (PTCC ۱۳۹٤)، در محیط کشتBHI agar ، سانتریفیوژ و جداسازی توده میکروبی، ترکیب ضد میکروبی آن توسط دیالیز خالص سازی شد و میزان پروتئین تولید شده با روش لوری تعیین شد و وزن مولکولی توسط الکتروفورز SDS-PAGE تخمین زده شد. اثر ضد میکروبی ترکیب موجود، توسط روش چاهک بر روی باکتری‌های بیماریزای گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد. غلظت پروتئین، میزان پروتئین کل، واحد فعالیت، فعالیت کل، فعالیت اختصاصی در نمونه‌های شاهد (فاقد عصاره برگ گردو) و در نمونه‌های حاوی ترکیب ضد میکروبی و عصاره برگ گردو تعیین شدند. قطر هاله‌های عدم رشد حاصل از نمونه‌های شاهد و نمونه‌های حاوی ترکیب ضد میکروبی و گردو، پس از دیالیز، با استفاده از روش چاهک بر روی باکتری‌های بیماریزا اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که وزن مولکولی ترکیب استخراج شده، تقریباً ٦٦ کیلودالتون، مشابه وزن مولکولی تیروتریسین به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی انتروکوکوس است.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده از این گیاه، برگ گردو می‌تواند بر روی غلظت پروتئین، میزان پروتئین کل، واحد فعالیت، فعالیت کل، فعالیت اختصاصی و میزان تولید تیروتریسین در انتروکوکوس و اثر ضد میکروبی آن، تاثیر سینرژیسمی داشته باشد.

واژه های کلیدی: اثر ضد میکروبی، انتروکوکوس فکالیس، برگ گردو ، تیروتریسین، سینرژیسم

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

باکتری انتروکوکوس که بحث برانگیزترین باکتری از گروه باکتری‌های اسیدلاکتیک است، نقش بسزایی در سلامتی انسان ایفا می‌کند. گونه‌هایی از این باکتری یافت شده اند که قادر به تولید آنتی بیوتیک وسیع الطیفی به نام تیروتریسین می‌باشند. از اینرو، در درمان گلودردهای استافیلوکوکی،نقش بسزایی را ایفا می‌نمایند. آنتی بیوتیک تیروتریسین، اولین بار، توسط Dubos در سال ۱۹۳۹، از *باسیلوس برویس* موجود در خاک جداسازی شد، سپس توان تولید این ترکیب در دوگونه *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس هایرائی* نیز یافت شد. از زمان جداسازی تیروتریسین از کشت های *باسیلوس برویس*، تحقیقات بسیاری در رابطه با خصوصیات شیمیایی و زیستی این عامل باکتری‌کش و ترکیباتش(گراماسیدین و تیروسیدین) آشکار شده است. با این وجود،تاکنون،خصوصیات فیزیولوژیکی باسیلوس مولد این آنتی بیوتیک، به طور کامل شناخته نشده است . آنتی بیوتیک تیروتریسین دارای فرمول شیمیایی $C_{65}H_{85}N_{11}O_{13}$ و جرم مولی ۱۲۲۸,۴۴ g/mol است و یک ترکیب پلی پپتید حلقوی و مرکب از دو ترکیب پلی پپتیدی به نام های تیروسیدسن و گراماسیدین می باشد و از لحاظ داروشناسی، رابطه نزدیکی با ترکیباتی نظیر باسیتراسین و پلی میکسین و کلیستین دارد (۱).

متداولترین کاربرد این آنتی بیوتیک، بهبود التهاب گلو و التهاب موکوس معدی و آنژین چرکی می‌باشد (۱). این آنتی بیوتیک، از بیوسنتز پروتئین‌های باکتری‌های گرم مثبت پیشگیری می‌کند . تیروتریسین، سیستم NADH اکسیداز دارای ذرات الکترونی را مهار می‌نماید ، در حالی که سیستم NADH اکسیداز یافت شده در فراکسیون‌های محلول، تحت تاثیر قرار نمی‌گیرند (۲) . از اینرو ، انتروکوک با تولید این ترکیب ضد میکروبی می‌تواند به عنوان یک پروبیوتیک به کار برده شود. گیاه گردو ، یکی از گیاهان دارویی است که دارای اثر ضد میکروبی قوی بر ضد باکتری‌های *استافیلوکوکوس ارئوس و باسیلوس سرئوس* می باشد (۳). برگ‌های این گیاه دارای سه درصد اینوزیت، اسید الاژیک ، اسید گالیک، معادل ۰,۰۱۲ ٪ تا ۲۹ ٪ از اسانسی با بوی مخصوص و محتوی مقدار زیادی پارافین ، تانن ، اسید موسی تانیک ، ژوگلون و اکسی نفتوکینون است . گیاه گردو دارای خواص درمانی بسیاری است. پماد حاصل از شکوفه های این گیاه در جلوگیری از ریزش مو و رفع شوره سر کاربرد دارد. بدلیل جمع شدن مویرگ‌های کوچک توسط سنبله‌های این گیاه، موجب درمان زخم‌های ناشی از بریدگی و خونریزی می‌شود و بدلیل داشتن ترکیبات فنولی از خطر ابتلا به سرطان و بیماری‌های قلبی-کرونری می‌کاهد (۴) . هدف از انجام این تحقیق، استفاده از گیاه دارویی گردو به عنوان یک محرک برای افزایش فعالیت پروبیوتیکی انتروکوک می‌باشد.

روش بررسی

سویه‌های میکروبی : سویه ای از باکتری *انتروکوکوس فکالیس* (Enterococcus faecalis) (۱۳۹۴ PTCC) و پنج باکتری بیماریزا شامل باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس ارئوس* (Staphylococcus aureus) (۱۱۱۳ PTCC)، *لیستریا مونوسیتوژنز*(Listeria monocytogenes) (۱۱۶۵ PTCC) و باکتری‌های گرم منفی *پروتئوس میرابیلیس* (Proteus mirabilis) (۱۰۷۶ PTCC) ، *اشریشیاکلی*(Escherichia coli) (۱۳۹۶ PTCC)، *کلبسیلا پنومونیه*(Klebsiella pneumoniae) (۱۰۵۳ PTCC) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. انتخاب این سویه‌های بیماریزا بر اساس طیف گرم مثبت و گرم منفی بودن باکتری‌ها و کوکسی و باسیل بودن آن‌ها صورت گرفت.

تهیه کشت آغازگر: برای تهیه کشت آغازگر از سویه انتروکوکوس، سویه باکتریایی لیوفیلیزه پودری در ۵ میلی لیتر از محیط کشتBHI broth (Brain Heart Infusion broth) حل شد و بدین ترتیب ، سوسپانسیونی از باکتری ایجاد شد. سپس، به منظور رشد باکتری، محیط حاوی باکتری ، به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ قرار گرفت (۵) .

شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی سوش انتروکوکوس: مشخصات ماکروسکوپی کلنی های انتروکوکوس، در عمق محیط کشت، از قبیل شکل و اندازه و مشخصات میکروسکوپی توسط رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند (۶) .

تایید جنس انتروکوکوس با استفاده از آزمون‌های بیو شیمیایی: به منظور تایید باکتری انتروکوکوس، از آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز و اکسیداز و توانایی استفاده از قند های لاکتوز و ساکارز و آرابینوز و سوربیتول و مانیتول و هیدرولیز اسید آمینه آرژنین استفاده شد (۵) .

ارزیابی نمودار رشد: به منظور ارزیابی نمودار رشد باکتری جدا شده از کشت‌های ۲۴ ساعته، پس از رسیدن میزان جذب نور

www.SID.ir

Archive of SID

(OD) سوسپانسیون باکتری توسط طیف نورسنج در طول موج ۶۰۰ nm ، در محدوده ۰,۸-۱ ، سوسپانسیون حاصله به عنوان کشت تلقیح استفاده شد و به نسبت ۵٪ به محیط کشت BHI broth و حاوی ۱٪ سوکسینات آمونیوم افزوده شد. نمونه‌ها در انکوباتور $^{\circ}c$ ۳۷ و اتمسفر ۵٪ CO_2 گرمخانه گذاری شدند. میزان جذب نور(OD) نمونه‌ها توسط طیف نورسنج در طول موج ۶۰۰ nm ، هر ۲ ساعت یکبار تعیین و نمودار رشد باکتری‌ها رسم شدند(۶) .

استخراج ترکیب ضد میکروبی : از باکتری انتروکوکوس، کشت تلقیح مطابق با رسیدن میزان جذب نور (OD) نمونه در محدوده ۰,۸-۱ تهیه شد و به نسبت ۵٪ به محیط کشت BHI broth و حاوی ۱٪ سوکسینات آمونیوم انتقال داده شد. سویه مورد نظر تا زمان ۴۸ ساعت در دمای $^{\circ}c$ ۳۷ گرمخانه گذاری شد. سپس، به منظور بررسی تاثیر ضد میکروبی نمونه‌های ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعته، pH محیط کشت توسط دستگاه pH سنج و با افزودن محلول ۱ مولار NaoH ، در محدوده ۷ تا ۷,۵ تنظیم شد. پس از خنثی سازی سوسپانسیون میکروبی محیط کشت، در شرایط استریل و در دمای $^{\circ}c$ ۴ و به مدت ۵۰ دقیقه در rpm ×۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد و توده سلولی تولید شده جداسازی شد. جهت استخراج ترکیب ضد میکروبی موجود در محیط کشت، فاز مایع حاصله از نمونه‌های سانتریفیوژ شده ۲۴ ساعته (مطابق با منحنی رشد در فاز لگاریتمی رشد قرار داشتند) به آرامی به ارلن استریل انتقال داده شد. ارلن به ظروف حاوی یخ بر روی همزن مغناطیسی انتقال داده شد و به نسبت ۵۰٪ حجم موجود در ارلن، سولفات آمونیوم افزوده شد. نمونه‌ها به مدت یک شب در یخچال $^{\circ}c$ ۴ قرار داده شدند تا سولفات آمونیوم به خوبی حل شود. محتویات ارلن شامل رسوبات حاصله و محلول حاوی رسوب به لوله های استریل منتقل شدند و در دمای $^{\circ}c$ ۴ به مدت ۵۰ دقیقه در rpm×۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی جدا شد و رسوب حاصله در یک میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات 0.05 مولار و دارای pH=7 حل گردید و محلول‌های رویی و رسوبات پروتئینی حاصله از لحاظ فعالیت ضد میکروبی مورد سنجش قرار گرفتند و بخش دیگری از آن رسوبات برای انجام دیالیز کنار گذاشته شدند (۸) .

خالص سازی ترکیبات ضد میکروبی استخراج شده به روش دیالیز: برای این منظور از کیسه دیالیز، با سایز KDa ۱۲۰۰۰ استفاده گردید. کیسه دیالیز درون یک بشر یک لیتری حاوی آب قرار داده شد و به منظور آماده سازی آن برای استفاده و زدودن مواد محافظت پوشاننده از روی کیسه، بشر به مدت ۴ ساعت در زیرجریان شیر آب قرار گرفت. سپس، کیسه دیالیز به قطعه ۸ سانتی متری برای نمونه مورد نظر بریده شد و یک سمت آن توسط خود کیسه گره زده شد. رسوبات پروتئینی رسوب داده شده با سولفات آمونیوم، در بافر پتاسیم فسفات 0.05 مولار و pH=۷ حل شدند. محتویات فوق به درون کیسه دیالیز انتقال داده شد و سمت دیگر کیسه توسط چسب مسدود گردید. سپس در یک ارلن ۲۰۰ میلی لیتری ، به میزان ۱۰۰ میلی لیتراز بافر پتاسیم فسفات 0.05 مولار ریخته و ارلن مذکور در یخچال $^{\circ}c$ ۴ قرار گرفت. نمونه درون کیسه ، در این بافر قرار داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در ان شناور گردید. پس از ۲۴ ساعت، بافر تعویض و مجدداً کیسه در بافر تازه، غوطه ور شد. پس از سه بار تعویض بافر و استفاده از معرف نسلر به منظور خروج سولفات آمونیوم، محتویات کیسه، به لوله‌های استریل منتقل گردیدند و جهت بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی، مورد سنجش قرار گرفتند. حجم نمونه قبل و بعد از دیالیز به دقت اندازه‌گیری و یادداشت گردیدند و از نمونه مورد نظر مقادیر یکسانی برای انجام آزمون لوری و اندازه‌گیری میزان پروتئین کنار گذاشته شد (۸).

بررسی تاثیر ضد میکروبی باکتری انتروکوکوس با روش چاهک: از هریک از ۹ باکتری بیماریزا، کشت تلقیح مطابق با رسیدن میزان جذب نور (OD) نمونه در محدوده ۰,۸-۱ تهیه شد. میزان ۰,۱ میلی لیتر از کشت تلقیح فوق به محیط کشت BHI agar انتقال داده شد و به کمک سواب استریل، کشت یکنواخت و متراکمی تهیه شد. پس از تهیه چاهک، ۵۰ میکرولیتر از ترکیبات ضد میکروبی جدا شده از انتروکوکسی به هرچاهک افزوده شد. به منظور انتشار بهتر ترکیبات ضد میکروبی در محیط کشت ، پلیت‌ها به مدت یک ساعت در یخچال $^{\circ}c$ ۴ سرماگذاری شدند. سپس، پلیت‌ها به انکوباتور $^{\circ}c$ ۳۷ منتقل شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، قطر هاله عدم رشد مربوط به ترکیب ضد میکروبی بر حسب میلیمتر اندازه گیری شد (۳ و ۱۱) .

محاسبه میزان پروتئین‌های استخراج شده: در هر مرحله، برای عصاره تخمیری، رسوبات پروتئینی در قبل و بعد از دیالیز، این موارد محاسبه شدند: حجم نهایی (total volum) ، واحد فعالیت (activity unit) ، فعالیت کل (total activity)، فعالیت اختصاصی (specific activity) ، غلظت پروتئین (protein concentration) ، پروتئین کل

www.SID.ir

Archive of SID

(total protein)، درصد بازیافت (٪ recovery)، ضریب تخلیص (purification factor) و راندمان (yeild). تیتر بخش‌های فوق به عنوان معکوس بیشترین رقتی که قادر به مهار قطعی سویه‌های پاتوژن بود، بر حسب واحد فعالیت / میلی لیتر (activity unit / mL) بیان شد (۱۲).

ارزیابی و سنجش پروتئین استخراج شده توسط روش لوری: برای غلظت‌های ۰، ۱،۵، ۲، ۲،۵، ۳، ۳،۵، ۴ گرم در لیتر از پروتئین سرم آلبومین گاوی در آب مقطر، پس از افزودن محلول کوماسی برلیانت بلو ، منحنی استاندارد در طول موج ۶۰۰ nm رسم شد. میزان پروتئین موجود در نمونه پس از خواندن OD در طول موج ۶۰۰ nm و مقایسه با منحنی استاندارد بر حسب g/L تعیین شد (۹ و۱۰).

میزان تولید ترکیب ضد میکروبی بر حسب U/mL : برای تعیین میزان تولید ترکیب ضد میکروبی بر حسب U/mL، واحد فعالیت این ترکیب (U/mL) در زمان‌های متفاوت، محاسبه شد و منحنی میزان تولید رسم گشت.

تعیین وزن مولکولی تیروتریسین استخراج شده توسط الکتروفورز: به منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های حاصل در این تحقیق، از تکنیک الکتروفورز SDS - PAGE با تکنیک رنگ‌آمیزی کماسی بلو، استفاده گردید. الکتروفورز روی ژل پلی آکریلامید۱۸،۵٪، در حضور عوامل پلیمریزه کننده آمونیوم پرسولفات ۱۰٪ و TEMED انجام گرفت. ژل، به مدت ۱۰ دقیقه در جریان ۶۰ ولت قرار داده شد و سپس، الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۰ ولت انجام شد. رنگ آمیزی ژل با کماسی بلو و رنگ زدایی با محلول ۷٪ اسید استیک انجام شد و باندهای پروتئینی نمایان شدند (۱۰).

آماده سازی عصاره برگ گردو و بررسی تاثیر این عصاره بر روی رشد و تولید تیروتریسین: عصاره برگ گردو توسط حرارت ملایم برگ‌های گردو در بن ماری و عبور محتویات حرارت دیده از کاغذ صافی برای چند مرحله، استخراج گردید. سپس، این عصاره به نسبت ۵۰:۵۰ با سوسپانسیون حاوی باکتری *انتروکوکوس فکالیس* و دارای میزان جذب نور ۱-۰،۸ ، مخلوط گردید . بر طبق روش‌های ذکر شده فوق، مراحل تعیین منحنی رشد و سنجش pH و بررسی تاثیر ضد میکروبی و تعیین میزان تولید تیروتریسین برای نمونه‌های حاوی عصاره برگ گردو و *انتروکوکوس فکالیس* تکرار گردید. لازم به ذکر است که تمام مراحل ذکر شده فوق با ۳ بار تکرار انجام گردیدند.

یافته ها

در نتیجه آزمون‌های میکروسکوپی، کلنی‌های انتروکوکوس در زیر میکروسکوپ به صورت کلنی‌های کروی شکل بنفش رنگ مشاهده شدند و در نتیجه آزمون‌های ماکروسکوپی، کلنی‌های انتروکوکوس بر روی پلیت‌های BHI agar ، به صورت کلنی‌های ریز سرسوزنی مشاهده شدند. نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی در جدول۱، آورده شده است (جدول ۱).

بر طبق جدول۱، باکتری *انتروکوکوس فکالیس* ، قادر به مصرف قندهای مانیتول و سوربیتول و لاکتوز می باشد و دارای آنزیم تجزیه‌کننده آرژنین است و بدین ترتیب، می‌تواند از این اسید آمینه به عنوان منبع ازت استفاده نماید. این باکتری، قادر به مصرف قندهای سوربوز و آرابینوز و ساکارز نیست و فاقد حرکت و پیگمان زرد رنگ است. هم چنین، با انجام ازمون کاتالاز و اکسیداز، به این نتیجه رسیدیم که سوش مورد استفاده، کاتالاز و اکسیداز منفی هست. منحنی رشد باکتری‌ها و منحنی میزان pH محلول رویی پس از سانتریفیوژ در نمونه‌های شاهد و نمونه حاوی عصاره گردو در نمودار های ۱و۲ نشان داده شده است(نمودار های ۱ و ۲).

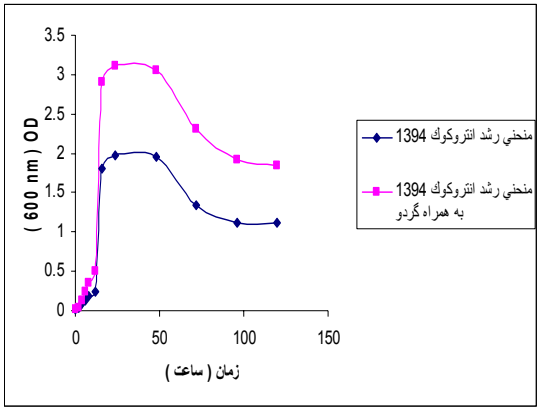
همانطوری که در نمودار ۱و۲ نشان داده شد، مدت فاز لگاریتمی در باکتری *انتروکوکوس فکالیس* ، ۱۶- ۰ ساعت بود و در ساعت ۱۶ به حداکثر رشد خود (یعنی حداکثر فاز لگاریتمی رشد) رسیدند. پس از تلقیح اولیه، میزان کدورت، پس از یک تاخیر کوتاه (Lag phase) در حدود ۴ ساعت، به تدریج افزایش یافته و متقارن با آن، میزان pH نیز با همان میزان تاخیر شروع به کاهش می‌نماید و در ساعت ۱۶، پس از تلقیح اولیه به حداقل میزان pH خود و حداکثر میزان کدورت می‌رسد. با افزودن عصاره گیاه گردو به *انتروکوکوس فکالیس*، طول دوره لگاریتمی افزایش نشان داد و میزان pH کاهش یافت.

جدول۱- نتایج حاصل از آزمون های بیوشیمیایی

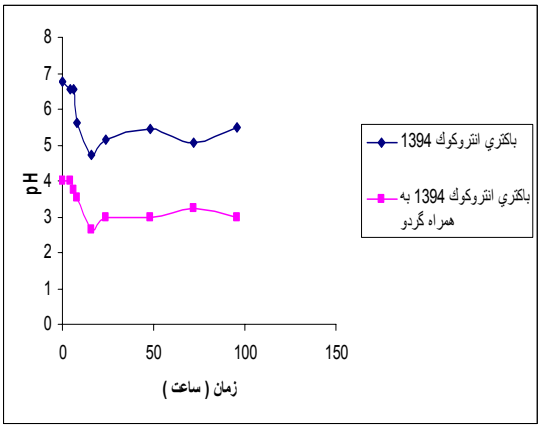
نام باکتری	مانیتول	سوربیتول	سوربوز	لاکتوز	آرابینوز	ساکارز	آرژنین دهیدرولاز	حرکت	پیگمان زرد
انتروکوکوس فکالیس	+	+	-	+	-	-	+	-	-

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱- منحنی رشد *انتروکوک فکالیس* در نمونه شاهد و نمونه حاوی گردو



نمودار ۲.روند تغییرات pH باکتری انتروکوکوس فکالیس در نمونه شاهد و حاوی گردو با گذشت زمان

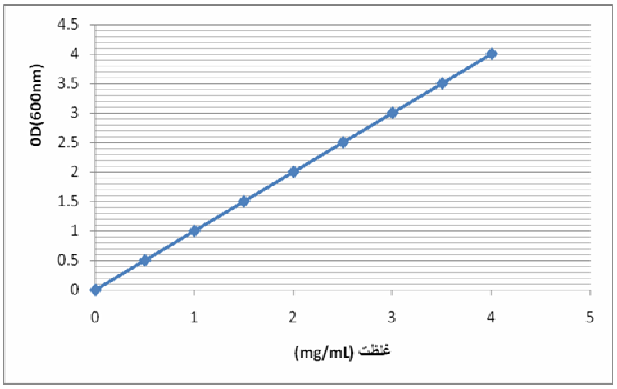
با مشاهده قطر هاله‌های عدم رشد اندازه گیری شده بر حسب میلی‌متر ، این چنین استنباط می‌شود که تاثیر ضد میکروبی عصاره‌های تخمیری *انتروکوکوس فکالیس* ، بر روی باکتری‌های گرم مثبت ، بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود. در میان باکتری‌های بررسی شده، *کلبسیلا پنومونیه* ، مقاوم‌ترین باکتری و *استافیلوکوکوس ارئوس*، حساس‌ترین باکتری به عصاره تخمیری *انتروکوکوس فکالیس* اشند. گیاه گردو، نقش سینرژیسمی بر تاثیر ضد میکروبی عصاره تخمیری *انتروکوکوس فکالیس* داشته است. نتایج حاصل از اثر ضد میکروبی رسوبات پروتئینی باکتری *انتروکوکوس فکالیس* ، به تنهایی و به همراه عصاره گردو در قبل و بعد از دیالیز در جدول۲ آورده شده است(جدول ۲) .

جدول ۲- نتایج اثر ضد میکروبی رسوبات پروتئینی باکتری به همراه عصاره گردو پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در قبل و بعد از دیالیز

قطر هاله عدم رشد (mm) / انتروکوک و عصاره های گیاهی	نمونه های قبل و پس از دیالیز	*انتروکک فکالیس*	*انتروکک فکالیس* و گردو
استافیلوکوکوس ارئوس	۱	۱۹	۲۴
	۲	۱۹	۲۲
لیستریا مونوسیتوژنز	۱	۱۰	۲۸
	۲	۸	۲۰
باسیلوس سرئوس	۱	۱۶	۱۸
	۲	-	۱۰
کلبسیلا پنومونیه	۱	-	-
	۲	-	-

۱- رسوب پروتئین ها قبل از دیالیز
۲- رسوب پروتئین ها پس از دیالیز

همانطوری که در جدول ۲ مشاهده شد، بیشترین تاثیر ضد میکروبی رسوب پروتئین باکتری *انتروکک فکالیس*، پس از دیالیز، بر روی باکتری استافیلوکوکوس بوده است و به دلیل حذف سایر ترکیبات ضد میکروبی پروتئینی در اثر فرایند دیالیز، میزان تاثیر ضد میکروبی رسوبات پروتئینی بعد از دیالیز، کاهش یافته و در برخی از موارد، ثابت مانده است و عصاره گردو موجب افزایش فعالیت ضد میکروبی شد. با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده توسط روش لوری، غلظت پروتئین‌های ضد میکروبی تولید شده محاسبه شد (نمودار ۳) .

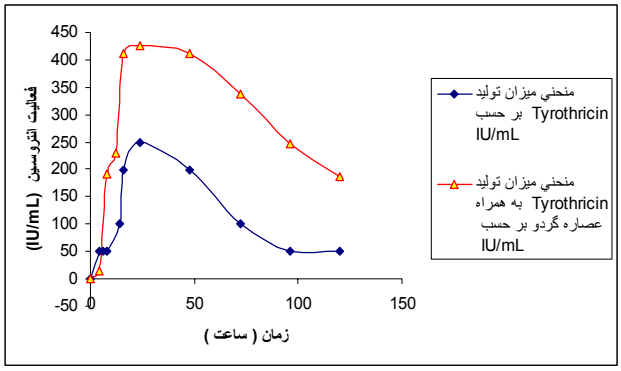


نمودار ۳- منحنی استاندارد روش لوری

www.SID.ir

Archive of SID

پس از انجام الکتروفورز ، مشاهده شد که ترکیب پروتئینی استخراج شده از *انتروکوکوس فکالیس* ، تیروتریسین است. وزن مولکولی آنتی بیوتیک تیروتریسین استخراج شده، ۶۶ کیلودالتون می‌باشد. منحنی میزان تولید تیروتریسین با گذشت زمان بر حسب U/mL در نمودار ۴ آورده شده است (نمودار ۴) . تعیین میزان و فعالیت پروتئین در نمونه‌های شاهد و نمونه حاوی عصاره گردو:جدول ۳و ۴ آورده شده است.



نمودار ۴- منحنی میزان تولید تیروتریسین توسط انتروکوکوس فکالیس بر حسب U/mL

همانطوری که در جدول ۳ نشان داده شد، پس از دیالیز، واحد فعالیت وفعالیت اختصاصی و ضریب تخلیص افزایش یافت. فعالیت کل وغلظت پروتئین و میزان پروتئین کل و راندمان و درصد بازیافت کاهش یافت. با توجه به افزایش در واحد فعالیت و فعالیت کل و غلظت پروتئین ومیزان پروتئین کل و فعالیت اختصاصی و درصد بازیافت نمونه‌های حاوی عصاره نسبت به نمونه‌های شاهد و کاهش راندمان و ضریب تخلیص نمونه‌های حاوی عصاره نسبت به نمونه های شاهد، عصاره برگ گیاه گردو برای *انتروکک فکالیس* ، نقش سینرژیسمی در تحریک تولید متابولیت ضد میکروبی داشته است.

جدول ۳- میزان و فعالیت پروتئین و سایر فاکتورها در نمونه‌های شاهد و نمونه حاوی عصاره گردو

سویه ها / فاکتورها	*انتروکوک فکالیس*			*انتروکوک فکالیس* و گردو		
فاکتورها	مایع تخمیر	قبل از دیالیز	پس از دیالیز	مایع تخمیر	قبل از دیالیز	پس از دیالیز
حجم نمونه (mL)	۱۰۰	۳۵	۲۵	۱۰۰	۳۵	۲۵
واحدفعالیت (Unit/mL)	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۵۰	۳۰۰
فعالیت کل (Unit)	۱۰۰۰۰	۵۲۵۰	۵۰۰۰	۲۰۰۰۰	۸۷۵۰	۷۵۰۰
غلظت پروتئین (mg/mL)	۲،۶	۱،۹	۰،۸	۳،۷	۲،۹	۱،۷
پروتئین کل (mg)	۲۶۰	۶۶،۵	۲۰	۳۷۰	۱۰۱،۵	۴۲،۵
فعالیت اختصاصی (U/mg)	۳۸،۴۶	۷۸،۹۵	۲۵۰	۵۴،۰۵	۸۶،۲۱	۱۷۶،۴۷
راندمان (٪)	-	۵۲،۵	۵۰	-	۴۳،۷۵	۳۷،۵
درصد بازیافت (٪)	-	۲۵،۵۸	۷،۶۹	-	۲۷،۴۳	۱۱،۴۹
ضریب تخلیص	-	۲،۰۵	۶،۵۰	-	۱،۵۹	۳،۲۶

بحث

اثر ضد میکروبی عصاره تخمیری انتروکوکوس بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی بود. Sabia و همکاران، در سال ۲۰۰۱ تاثیرمحلول رویی فیلتره شده خام حاصل از *Enterococcus casseliflavus* IM416K1 را برروی *Listeria Monocytogenes* بررسی کردند و قطر هاله عدم رشد به دست آمده، ۱۵-۱۰ mm بود . قطر هاله‌های عدم رشد حاصل از اثر ضد میکروبی عصاره‌های تخمیری سوش *انتروکوکوس فکالیس* موجود در این تحقیق، بر روی *Listeria Monocytogenes* ۲۴ میلی متر بود. از اینرو، سوش مورد استفاده در این تحقیق، نسبت به *Enterococcus* casseliflavus IM416K1 ، دارای تاثیر ضد میکروبی قوی‌تری بر ضد *لیستریا مونوسیتوژنز* بود (۱۳) . با توجه به فاز لگاریتمی موجود در منحنی رشد *انتروکوکوس فکالیس* در ساعت ۱۶، عصاره ۱۶ ساعته محیط کشت تحت تیمار با سولفات آمونیوم قرار گرفت. سولفات آمونیوم یک روش شناخته شده برای رسوب دهی و بازیابی پروتئین‌ها است و به طور گسترده برای بازیافت پروتئین‌ها استفاده می شود. در این روش، حلالیت پروتئین‌ها با افزودن نمک‌ها، حلال‌های آلی و سایر ترکیباتی که حلالیت زیادی دارند، کاهش داده می‌شود. (۱۴).

پس از تیمار با سولفات آمونیوم و رسوب دادن مایع حاصله توسط سانتریفوژ، فاز سبک رویی (حاوی لیپیدها و سایر مواد سبک موجود در محیط است که ممکن است آنتی بیوتیک‌ها نیز در آن به دام افتاده باشند) و فاز آبی (مایع حاصل از سانتریفوژ پروتئین‌های رسوب داده شده توسط سولفات آمونیوم است) و فاز رسوب سنگین زیرین (حاوی پروتئین‌ها می‌باشد) در هر لوله ایجاد شد. بیشترین تاثیر ضد میکروبی رسوب پروتئین *انتروکوکوس فکالیس* ، پس از دیالیز، بر روی باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* بوده است. دکتر خنافری و همکاران، در سال ۱۳۸۷، با بررسی اثر ضد میکروبی رسوبات

www.SID.ir

Archive of SID

پروتئینی استخراج شده از باکتری های *Lactobacillus casei*، *Lactobacillus reuteri*، *Lactobacillus rhamnosus*، به این نتیجه رسیدند که قطر هاله عدم رشد حاصل از این ترکیبات بر روی باکتری باسیلوس سرئوس، در طی ۲۴ساعت گرماگذاری، به ترتیب ، ۱۱،۱۰،۱۰میلی متر بوده است که نتایج به دست آمده از تاثیر ضد میکروبی رسوبات پروتئینی استخراج شده از باکتری *انتروکوکس فکالیس* بر روی باکتری باسیلوس سرئوس، ۱۴ میلی متر بوده است.

از اینرو، بیشترین تاثیر ضد میکروبی بر روی *باسیلوس سرئوس*، مربوط به باکتری *فکالیس* بوده است (۱۵) . Mahboub و همکارانش در سال ۲۰۰۸، با بررسی اثر ضد میکروبی عصاره گیاه پونه، اثبات نمودند که عصاره این گیاه دارای اثر ضد میکروبی بر علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* با ایجاد قطر هاله ۲۱-۸ میلی متر می‌باشد که متناسب با نتایج اثر ضد میکروبی *انتروکوکوس فکالیس* بود (۱۶). رسوبات پروتئین حاصله پس از حل شدن در بافر پتاسیم فسفات، به منظور خالص‌سازی، مورد فرایند دیالیز قرار گرفتند. آزمایشات اولترافیلتراسیون نشان داده است که آنتی‌بیوتیک‌ها قادر به عبور از غشاءهایی با cut-off های ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ کیلودالتون نیستند. در این تحقیق، به منظور خلوص بیشتر مایع پروتئینی، یک مرحله دیالیز در حضور بافر پتاسیم فسفات pH=7, 0.05M انجام گرفت. در زمان دیالیز، تعویض بافر باید تا زمانی ادامه یابد که اطمینان حاصل شود که تمام یون‌های آمونیوم از مایع پروتئینی درون کیسه خارج گردیده اند و فقط پروتئین‌ها باقی مانده‌اند. برای تائید این موضوع از معرف نسلر استفاده گردید. ایجاد رنگ قرمزآجری در اثر افزودن معرف نسلر به محلول مورد نظر نشان دهنده وجود یون های آمونیوم در محلول فوق می‌باشد (۱۷) . چنانچه نتایج نشان می‌دهد، پس از دیالیز، به دلیل حذف سولفات آمونیوم و برخی از ناخالصی‌های موجود در محیط، تاثیر ضد میکروبی، تقریباً ثابت و در برخی از نمونه ها به طور جزئی کاهش یافت. به منظور سنجش وزن مولکولی و اثبات وجود تیروتریسین در نمونه‌ها، نمونه های دیالیز شده به همراه مارکر، در دستگاه الکتروفورز SDS-PAGE قرار داده شدند. ایجاد تک باند ، پس از انجام الکتروفورز SDS-PAGE نشان دهنده خلوص ماده پروتئینی به دست آمده در طی فرایندهای فوق بود. پس از انجام الکتروفورز مشاهده شد که ترکیب پروتئینی استخراج شده از انتروکوکوس فکالیس ، تیروتریسین است. وزن مولکولی آنتی بیوتیک تیروتریسین استخراج شده، ۶۶ کیلودالتون بود.

بر اساس منحنی‌های میزان تولید تیروتریسین بر اساس IU/mL، میزان تولید این ترکیبات، در ۴ ساعت اولیه رشد (Lag phase) ، تقریباً صفر است، یعنی از آن جایی که رشدی صورت نگرفته، در نتیجه متابولیتی هم تولید نشده است. اما به تدریج، شروع به افزایش می‌کند و در ساعت ۱۶ پس از تلقیح اولیه، یک افزایش شدید در میزان تولید روی می‌دهد . این زمان، دقیقاً مقارن با افزایش تعداد باکتری و به عبارتی، همزمان با فاز لگاریتمی رشد است. این امر، نشان دهنده تولید این ترکیبات در فاز لگاریتمی رشد است. بنابراین، می‌توان گفت که تولید تیروتریسین ، از شمای تولید یک متابولیت اولیه پیروی می‌کند. با ورود باکتری به فاز سکون (رکود)، میزان این ترکیبات تولید شده، تقریباً ثابت است و سپس، به تدریج کاهش می‌یابد. این کاهش می تواند در اثر تاثیر آنزیم های پروتئازی باشد که از سلول‌های مرده آزاد می شود. زیرا خود تیروتریسین به pH اسیدی مقاوم هستند و بهترین فعالیت آن‌ها در محدوده اسیدی است. با مشاهده منحنی میزان تولید تیروتریسین در نمونه حاوی گردو، نقش گردو، به عنوان یک گیاه دارویی و ترکیب ضد میکروبی سالم، در تحریک تولید تیروتریسین مشخص شد. دکتر خنافری و همکاران، در سال ۱۳۸۷، با بررسی فعالیت و میزان لاکتوسین تولید شده، دریافتند که پس از دیالیز، فعالیت ویژه و ضریب تخلیص افزایش یافتند، که این ویژگی‌ها، متناسب با نتایج به دست آمده از این تحقیق بودند (۱۵) .

نتیجه گیری

با توجه به نقش سینرژیسمی گیاه گردو در افزایش غلظت و میزان تیروتریسین تولید شده و در نتیجه، تحریک تولید تیروتریسین توسط سوش ۱۳۹۴، استفاده از برگ‌های این گیاه برای افزایش اثر ضد میکروبی و خواص درمانی و افزایش تولید این آنتی بیوتیک می‌تواند بسیار سودمند باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله، کمال قدردانی خود را از مسئولین محترم سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران ابراز می‌نماییم.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Dobus RJ, Hotchkiss RD. *Isolation of tyrothricin from Bacillus brevis cultures*. Exp.Med . 1941; 629.

2- *Kretschmar M, Witte W, Hof H.* Bactericidal activity of tyrothricin against methicillin-resistant Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to mupirocin*. Clinical microbiol and Infectious disease. 1996; 15:261-263.*

3- *Khanafari A.* Evaluation of antimicrobial effects of three plants on the airborn bacteria *[dissertation]*. *Tehran: Islamic Azad University, North Branch of Tehran; 1375.*

4- *Fallahian F, Eidi A, Eidi M. Iran Medicinal Plants.Islamic. Tehran: Islamic Azad University, Sciences and Researches Branch. 1385; pp: 215-216*

5- *Kandler O, Nobert W. Bergeys mannual of systematic. New York: Springer.1989; pp: 205-216.*

6- Baron Ellen Jo , Finegold Sydney M. Diagnostic microbiology. Bailey & Scott :USA.1990;pp:112-136

7- Khanafari A, Hosseini F. Practical microbiology and biochemical principles of reactions. Tehran: Poorsina.1385; pp: 20-27.

8- Klaenhammer TR. *Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. FEMS Microbiol Review. 1993; 12:39-86.

9- Bruno MEC , Momntville TJ. *Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria.* Appl Environ Microbiol. 1993; 59:3003-10.

10- Aroutcheva Alla A, Simoes Jose A. *Antimicrobial protein produced by vaginal Lactobacillus acidophilus that inhibits Gardnerella vaginalis*. Infect Dis Obstet Gynecol. 2001; 9(1): 33–39.

11- Yamazaki S, Kamimuura H, Momose H. *Protective effect of Bifidobacterium monoassociation against lethal activity of E.coli.* Bifidobacterium Microflora. 1982; 1:55-60.

12- Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA.*Characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum F1 and Lactobacillus brevis OG1*. Journal of Biotechnol. 2003; 8:219-227.

13- Sabia C, de Niederhäusern S, Messi P, Manicardi G , Bondi M. *Bacteriocin-producing Enterococcus casseliflavus IM 416K1, a natural antagonist for control of Listeria monocytogenes in Italian sausages ("cacciatore").* Food Microbiol. 2003; 87:173-179.

14- Krijsman J. Product recovery in bioprocess technology. Oxford: London.1992; pp: 22-65.

15- Mahboubi M, Haghi G. *Antimicrobial activity and chemical composition of Mentha pulegium L. essential oil* .Ethnopharmacol. 2008; 119:325-327.

16- Brummer W, Gunzer G. *Laboratory techniques of enzyme recovery*. Biotechnol. 1987; 7a:213-279.

www.SID.ir