بررسی نقش بیولوژیک عصاره‌ی زعفران در تحریک فعالیت ضد میکروبی انتروکوکوس هایرائی

مهسا یگانه[1*]، آنیتا خنافری [2]، محمدرضا فلاحیان [3]، انوشه شریفان[4]

[1] دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
[2] استادیار گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
[3] مربی گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
[4] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

تاریخ دریافت : ۵/۱۲ / ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش : ۱۳/ ۸ /۱۳۸۹

چکیده

هدف از این تحقیق، بررسی نقش بیولوژیک عصاره‌ی زعفران در تحریک فعالیت ضد میکروبی انتروکوکوس هایرائی می‌باشد. پس از کشت انتروکوکوس هایرائی در محیط کشت BHI Broth، سانتریفیوژ و جداسازی توده‌ی میکروبی، ترکیبات ضد میکروبی توسط دیالیز خالص سازی شدند و وزن مولکولی ترکیبات استخراج شده، توسط الکتروفورز SDS-PAGE تخمین زده شد . عصاره‌ی زعفران با سوسپانسیون میکروبی ترکیب شد و غلظت پروتئین، واحد فعالیت و فعالیت کل نمونه ها تعیین گردید. اثر ضد میکروبی این نمونه‌ها با استفاده از روش چاهک ارزیابی شد و در ادامه حداقل غلظت باکتریواستاتیکی ترکیبات ضد میکروبی تعیین گردید. با بررسی تاثیر ضد میکروبی و ارزیابی کم‌ترین غلظت باکتریواستاتیکی انتروسین بر روی باکتری های استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس، لیستریا مونوسیتوجنز و کلبسیلا پنومونیه، مشخص شد که بیش ترین تاثیر ضد میکروبی و کم‌ترین غلظت باکتریواستاتیکی انتروسین، بر روی لیستریا مونوسیتوجنز بوده است. با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، عصاره‌ی زعفران می‌تواند بر روی تولید انتروسین و اثر ضد میکروبی انتروکوکوس هایرائی، تاثیر سینرژیستی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: انتروسین، انتروکوکوس هایرائی، عصاره ی زعفران، لیستریا مونوسیتوجنز.

*مسوول مکاتبه: mahsayeganeh19@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

امروزه، استفاده از مواد طعم دهنده در صنعت غذا رو به گسترش می‌باشد.برخی از این مواد که شامل عصاره ها و اسانس‌های گیاهی هستند، دارای اثر ضد میکروبی وسیعی علیه بسیاری از عوامل میکروبی می‌باشند. زعفران دارای مواد روغنی، املاح معدنی، موسیلاژ، آلورون، تانن، هتروزیدی به نام پیکروکروسین، ترکیبی به نام پیکروکروزینوزید، کروسین، گلوکوزیدی به نام آپی ئین و اسانس است. عصاره‌ی حاصل از زعفران، دارای تاثیر ضد میکروبی قابل ملاحظه ای بر ضد بسیاری از باکتری‌های بیماریزای غذایی می‌باشد. از این گذشته، برای ایجاد طعم زعفران در مواد غذایی مختلف، خصوصاً بستنی می‌توان از این ماده طعم دهنده‌ی گیاهی استفاده نمود (۳). انتروسین‌ها، پروتئین‌های فعال بیولوژیکی هستند که خصوصیات ضد میکروبی در مقابل گونه‌های خیلی نزدیک، مربوط به ارگانیسم تولید کننده نشان می‌دهند(۸). به طور کلی، انتروسین‌ها، پروتئین‌های کاتیونی مشابه کوچک بوده که شامل ۳۰ تا ٦۰ امینو اسید با یک نقطه ایزوالکتریک بالا می‌باشند که در ارگانیسم تولید کننده، دارای طیف عمل، وزن مولکولی و خصوصیات بیوشیمیایی متنوع می‌باشند(۱۲). از دیگرمزایای این پروتئین ها این است که غیر سمی بوده، به آسانی هضم می‌شوند و می‌توانند برای افزایش سلامت و طول عمر مواد غذایی مورد استفاده قرارگیرند. بسیاری از انتروکوک‌های جداشده از فرآورده‌های شیری، قادر به تولید انتروسین‌هایی با طیف ضد میکروبی وسیع بر ضد باکتری‌های بیماریزا و عامل فساد مواد غذایی می‌باشند(۱۰). با توجه به نقش زعفران به عنوان یک ترکیب طعم دهنده و رنگ دهنده در صنعت غذا و هم چنین حضور انتروکوک هایرائی به عنوان یک پروبیوتیک ایمن در مواد غذایی، هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی تحریک کنندگی عصاره‌ی زعفران جهت تولید انتروسین توسط انتروکوکوس هایرائی(PTCC۱۲۳۹) بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سویه های میکروبی

به منظور بررسی توان تولید انتروسین، باکتری انتروکوکوس هایرائی [1] (PTCC 1239)، به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. اثر ضد میکروبی عصاره‌های تخمیری و رسوبات پروتئینی حاصل از باکتری انتروکوکوس هایرائی بر روی شش باکتری جداشده از نمونه‌های بالینی ارزیابی شد. شش باکتری بیماریزا شامل سه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس ارئوس[۲]، لیستریا مونوسیتوجنز[۳]، باسیلوس سرئوس[٤] و سه باکتری گرم منفی اشرشیاکلی[٥]، کلبسیلا پنومونیه [٦] و سالمونلا پاراتیفی[۷] بودند که در پلیت‌های کشت داده شده از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهیه شدند.

۲-۲- تهیه کشت آغازگر

برای تهیه‌ی کشت آغازگر از سویه انتروکوکوس، سویه باکتریایی لیوفیلیزه پودری در ۵ میلی‌لیتر از آب مقطر استریل حل شد و بدین ترتیب، سوسپانسیونی از باکتری ایجاد شد. این سوسپانسیون، جهت رشد باکتری به مدت ٤۸ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷^{oC} با دور ۱۵۰ rpm مدل IRC-1-7 قرار گرفت(۵) .

۲-۳- شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی و انجام آزمون‌های بیوشیمیایی بر روی سوش انتروکوکوس

به منظور تایید باکتری انتروکوکوس هایرائی، پس از کشت این باکتری در پلیت‌های حاوی محیط کشت BHI Agar[۸] (ساخت شرکت مرک آلمان) و گرمخانه‌گذاری نمونه‌ها در گرمخانه ۳۷^{oC} و حاوی ۵٪ گاز $CO_۲$، مدل IRC-1-7 ($CO_۲$مورد نیاز از طریق تنظیم میزان $CO_۲$در انکوباتور حاوی کپسول $CO_۲$فراهم شد)، مشخصات ماکروسکوپی کلنی‌های

1- Enterococcus hirae
2- Staphylococcus aureus
3- Listeria monocytogenes
4- Bacillus cereus
5- Escherichia coli
6- Klebsiella pneumoniae
7- Salmonella paratiphy
8- Brain Hearth Infusion Agar

Archive of SID

www.SID.ir

انتروکوکوس از قبیل شکل، اندازه و مشخصات میکروسکوپی، توسط رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند و توانایی مصرف دو قند لاکتوز و ساکارز و اسید آمینه آرژنین در آن‌ها بررسی شد (٦).

۲-٤- ارزیابی منحنی رشد باکتری بر اساس جذب نور

به منظور ارزیابی نمودار رشد باکتری جدا شده از کشت ۲٤ ساعته، پس از رسیدن میزان جذب نور(OD) سوسپانسیون باکتری توسط طیف نورسنج مدل Genova Frequency 50/60 HZ Cat Ref در طول موج ٦۰۰ nm، به محدوده‌ی ۰/۸-۱، سوسپانسیون حاصل به عنوان کشت تلقیح استفاده شد و به نسبت ۵٪ به محیط کشت BHI Broth (حاوی ۱٪ سوکسینات آمونیوم و آنزیم کاتالاز، ساخت شرکت مرک آلمان) افزوده شد. نمونه‌ها در گرمخانه 37^{oC} (حاوی ۵٪ CO_2) گرمخانه گذاری شدند. میزان جذب نور نمونه‌ها توسط طیف نورسنج در طول موج ٦۰۰ nm، طی ۲٤ ساعت، هر ۲ ساعت یکبار و در فاصله‌ی زمانی ۲٤ ساعت تا ٤۸ ساعت، هر ۲٤ ساعت یکبار تعیین و نمودار رشد باکتری با استفاده از نرم‌افزار Excell رسم شدند (٦).

۲-۵- استخراج مواد ضد میکروبی تولید شده توسط انتروکوک ها

از باکتری انتروکوکوس، سوسپانسیون میکروبی با جذب نور در محدوده‌ی ۰/۸-۱ به عنوان کشت تلقیح تهیه شد و به نسبت ۵٪ به محیط کشت BHI Broth (حاوی ۱٪ سوکسینات آمونیوم) انتقال داده شد. سویه‌ی مورد نظر به مدت ٤۸ ساعت در گرمخانه 37^{oC} (حاوی ۵٪ CO_2) گرمخانه‌گذاری شد. به منظور کنترل pH محیط کشت میکروبی در طی گرمخانه‌گذاری، pH محیط کشت در زمان‌های گوناگون توسط دستگاه pH سنج تعیین و با افزودن محلول ۱ مولار NaoH، در محدوده‌ی ۷ تا ۷/۵ قرار داده شد. پس از خنثی سازی، سوسپانسیون میکروبی، محیط کشت توسط دستگاه سانتریفوژ یخچال دار Beckman model J2-21، در دمای 4^{oC}، به مدت ۵۰ دقیقه در ۱٦۰۰۰× rpm سانتریفیوژ شد و توده‌ی سلولی تولید شده جداسازی گردید. جهت استخراج ترکیب ضد میکروبی موجود در محیط کشت، فاز مایع حاصل از نمونه‌های سانتریفیوژ شده ۲٤ ساعته (مطابق با منحنی رشد در فاز لگاریتمی رشد) به آرامی به ارلن استریل انتقال داده شد. ارلن به ظروف حاوی یخ بر روی همزن مغناطیسی منتقل شد و به نسبت ۵۰٪ حجم موجود در ارلن، سولفات آمونیوم (ساخت شرکت مرک آلمان) افزوده شد. برای رسوب ترکیبات ضدمیکروبی با ماهیت پروتئینی در فاز لگاریتمی رشد از تیمار عصاره‌ی محیط کشت با سولفات آمونیوم استفاده شد. در این روش، حلالیت پروتئین‌ها با افزودن نمک‌ها، حلال‌های آلی و سایر ترکیباتی که حلالیت زیادی دارند، کاهش داده می‌شود(١٤). نمونه‌ها به مدت یک شب در یخچال 4^{oC} قرار داده شدند تا سولفات آمونیوم به خوبی حل شود. محتویات ارلن شامل رسوبات حاصل و محلول حاوی رسوب به لوله‌های استریل منتقل شدند و در دمای 4^{oC} به مدت ۵۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار Beckman model J2-21 با دورrpm×۱٦۰۰۰ سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی جدا شد و رسوب حاصل در یک میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار (pH=7) حل گردید. سپس محلول‌های رویی و رسوبات پروتئینی حاصل از لحاظ فعالیت ضد میکروبی مورد سنجش قرار گرفتند و بخش دیگری از آن رسوبات برای انجام دیالیز کنار گذاشته شدند(۱۵).

۲-٦- خالص سازی رسوبات پروتئینی استخراج شده توسط روش دیالیز

جهت تخلیص ترکیبات پروتئینی رسوب کرده از روش دیالیز استفاده گردید. آزمایش‌های اولترافیلتراسیون نشان داده است که باکتریوسین‌ها قادر به عبور از غشاءهایی با cut-off های ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ کیلودالتون نیستند(۱۷). بدین منظور از کیسه‌ی دیالیز، Arthor H.Thomas Co., Cat No.3787-D 42.1 × 1.8 inch با سایز 12000 KDa استفاده گردید. کیسه‌ی دیالیز، درون یک بشر یک لیتری حاوی آب قرار داده شد. برای پاک کردن مواد محافظ پوشاننده از روی کیسه، بشر به مدت ٤ ساعت در زیر جریان آب قرار گرفت. سپس، کیسه‌ی دیالیز به قطعه‌ی ۸ سانتی‌متری 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 ۰/۰۵ مولار و pH=۷ (ساخت شرکت مرک آلمان) حل شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

محتویات فوق به درون کیسه‌ی 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 ۰/۰۵مولار ریخته و ارلن مذکور در یخچال ^{oC} ٤ قرار گرفت. نمونه‌ی درون کیسه، در این بافر قرار داده شد و به مدت ٤٨ ساعت در آن شناور گردید. پس از ٢٤ ساعت، بافر تعویض و مجدداً کیسه در بافر تازه غوطه ور شد.. پس از دیالیز جهت تائید روند آزمایش از معرف نسلر (ساخت شرکت مرک آلمان) استفاده گردید. ایجاد رنگ قرمز آجری در اثر افزودن معرف نسلر به محلول مورد نظر نشان دهنده‌ی وجود یون‌های آمونیوم در محلول فوق می‌باشد که ناشی از ایجاد ترکیب زیر است:

$$NH_4^+ + 2[HgI_4]^{2-} + 4OH^- \longrightarrow HgO.Hg(NH_2)I + 7I^- + 3H_2O$$

حساسیت تست نسلر تا $0.3\mu g$ NH_3 در $2\mu l$ نمونه می‌باشد(۷).

پس از سه بار تعویض بافر و استفاده از معرف نسلر، به منظور خروج سولفات آمونیوم محتویات کیسه به لوله‌های استریل منتقل شده و جهت بررسی ویژگی های ضد میکروبی، مورد سنجش قرار گرفتند. حجم نمونه قبل و بعد از دیالیز به دقت اندازه‌گیری و یادداشت گردید. از نمونه‌ی مورد نظر، مقادیر یکسانی برای انجام آزمون لوری و اندازه‌گیری میزان پروتئین کنار گذاشته شد(۱۳).

۲-۷- بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های تخمیری و رسوبات پروتئینی قبل و بعد از دیالیز توسط روش چاهک

سوسپانسیون میکروبی با جذب نور (OD) در محدوده‌ی ۱-۰,۸ 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 تهیه‌ی چاهک هایی به قطر ۳ میلی متر توسط پیپت پاستور در درون پلیت ها، ۵۰ میکرولیتر از ترکیبات ضد میکروبی جدا شده از انتروکوکسی به هرچاهک افزوده شد. به منظور انتشار بهتر ترکیبات ضد میکروبی در محیط کشتBHI Agar ، پلیت ها به مدت یک ساعت در یخچال ^{oC} ٤ سرماگذاری شدند. سپس، پلیت‌ها به گرمخانه ^{oC} ۳۷ منتقل شدند. پس از گذشت ٢٤ ساعت، قطر هاله عدم رشد مربوط به ترکیب ضد میکروبی بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد(۱۸).

۲-۸- تعیین حداقل غلظت باکتریواستاتیکی

برای تعیین حداقل غلظت باکتریواستاتیکی[1]، از روش رقیق‌سازی در محیط مایع[2] استفاده شد. بدین منظور، رقت های ۰/۰۱، ۰/۰۲/۰۳/۰، ۰/۰۵، ۰/۰۶/۰۷/۰، ۰/۰۹، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۰٤/۰۵، ۰/۰۶، ۰/۰۸، ۱، ۱/۲، ۱/۶ گرم بر لیتر ازرسوبات پروتئینی با غلظت مشخص تهیه شدند. سپس، کشت٢٤ ساعته هریک از باکتری‌های بیماریزا، به لوله‌های حاوی رقت‌های مختلف رسوبات پروتئینی تلقیح شدند. لوله‌های حاوی رقت‌های متفاوت، از لحاظ کدورت (میزان OD) در مقایسه با لوله فاقد رسوبات پروتئینی در فواصل زمانی ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت از گرمخانه گذاری نمونه ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کنترل گردیدند. مقدار حداقل غلظت باکتریواستاتیکی، به عنوان حداقل غلظتی از رسوبات پروتئینی که مانع از رشد می‌شود، تعیین گردید(۲).

۲-۹- ارزیابی و سنجش پروتئین استخراج شده توسط روش لوری

غلظت‌های ۰، ۰,۵/۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ٤ گرم در لیتر از پروتئین سرم آلبومین گاوی در آب مقطر تهیه گردید و پس از افزودن محلول کوماسی برلیانت بلو، منحنی استاندارد در طول موج ٦٠٠ nm رسم شد. میزان پروتئین موجود در نمونه پس از خواندن جذب نور در طول موج ٦٠٠ nm و مقایسه با منحنی استاندارد بر حسب g/L تعیین شد (٤).

۲-۱۰- محاسبه‌ی میزان پروتئین های استخراج شده

در هر مرحله، برای هر بخش، این موارد محاسبه شدند : حجم نهایی[3]، واحد فعالیت[4]، فعالیت کل[5]، فعالیت اختصاصی [6]،

1- Minimum Inhibitory Concentration
2- Broth Dilution Technique
3- Total volum
4- Total unit
5- Total activity(حجم نهایی × واحد فعالیت)
6- Specific activity
(فعالیت اختصاصی: واحد فعالیت ÷ غلظت پروتئین)

Archive of SID

www.SID.ir

غلظت پروتئین[1]، پروتئین کل [2]، درصد بازیافت[3]، ضریب تخلیص [4] و راندمان[5]. تیتر بخش های فوق به عنوان معکوس بیش ترین رقتی که قادر به مهار قطعی سویه های بیماریزا بود، بر حسب واحد فعالیت / میلی لیتر (Activity Unit / ml) بیان شد (۱۵) .

۲-۱۱- میزان تولید ترکیب ضد میکروبی

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

۲-۱۲- الکتروفورز

به منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین های حاصل در این تحقیق، از تکنیک الکتروفورزSDS-PAGE با تکنیک رنگ آمیزی کماسی بلواستفاده گردید(٤) .

۲-۱۳- آماده‌سازی عصاره‌ی زعفران و بررسی تاثیر این عصاره بر روی رشد و تولید انتروسین

۵۰ گرم زعفران با ۲۰۰ میلی لیتر از آب مقطرمخلوط گردید و توسط حرارت ملایم (°c ۱۰۰) در بن ماری استخراج شد. محتویات حرارت دیده طی چند مرحله از کاغذ صافی عبور داده شدند و عصاره‌ی تقریباً خالص به دست آمد. سپس، این عصاره به نسبت ۵۰:۵۰ با سوسپانسیون حاوی باکتری انتروکوکوس هایرائی و (با جذب نور ۱-۰/۸) مخلوط گردید. طبق روش‌های ذکر شده، مراحل تعیین منحنی رشد و سنجش pH و بررسی تاثیر ضد میکروبی و تعیین میزان تولید انتروسین برای نمونه‌های حاوی عصاره‌ی زعفران و انتروکوکوس هایرائی تکرار گردید.کلیه‌ی آزمایش ها در ۳ تکرار انجام و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excell رسم شدند.

1- Protein concentration
2- Protein total(غلظت پروتئین فراکسیون÷ حجم نهایی)
3- Recovery
(میزان پروتئینی فراکسیون÷ میزان پروتئین کل عصاره خام × ۱۰۰)
4- Purification factor
(فعالیت اختصاصی فراکسیون خالص شده÷ فعالیت اختصاصی عصاره خام)
5- Yeild
(فعالیت کل فراکسیون خالص شده÷ فعالیت کل عصاره خام × ۱۰۰)

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آزمون های میکروسکوپی و ماکروسکوپی

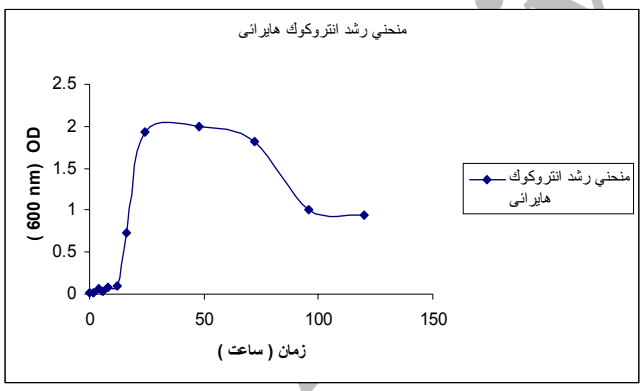
در مشاهدات میکروسکوپی، کلنی های انتروکوکوس هایرائی در زیر میکروسکوپ به صورت کروی شکل و بنفش رنگ مشاهده شدند. مشاهدات ماکروسکوپی این باکتری بر روی پلیت‌های BHI Agar، کلنی های ریز سرسوزنی را نشان داد.

۳-۲- آزمون های بیوشیمیایی

نتایج حاصل از آزمون های بیوشیمیایی، نشان داد که انتروکوکوس هایرائی، قادر به مصرف قند لاکتوز و ساکارز نیست و به دلیل داشتن آنزیم آرژنین دهیدرولاز، توانایی استفاده از اسید آمینه آرژنین را دارد.

۳-۳- تعیین منحنی رشد باکتری

میزان کدورت پس از یک تاخیر کوتاه (Lag phase) در حدود ۸ ساعت پس از تلقیح اولیه، به تدریج افزایش یافته و بعد از ٤٨ساعت از تلقیح اولیه، به حداکثر رسید(شکل ۱). بر این اساس، فاز رشد لگاریتمی باکتری انتروکوکوس هایرائی، در فاصله‌ی زمانی ٤٨-۸ ساعت تعیین گردید.



شکل ۱- منحنی رشد اتنتروکوکوس هایرائی

۳-٤- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های تخمیری به همراه عصاره‌ی زعفران بر ضد سویه‌های بیماریزا

نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد عصاره‌های تخمیری انتروکوکوس هایرائی پس از گذشت ۸، ١٦، ٢٤ و ٤٨ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نشان داد که تاثیر ضد میکروبی عصاره های تخمیری سوش هایرائی، بر روی باکتری‌های گرم مثبت، بیش تر از باکتری‌های گرم منفی است و

Archive of SID
www.SID.ir

عصاره‌ی زعفران، موجب افزایش فعالیت ضد میکروبی سوش هایرائی می‌شود(جدول۱). تاثیر ضد میکروبی عصاره‌ی تخمیری انتروکوک هایرائی، از ساعت ۸ تا ٤٨ به دلیل وجود باکتری در فاز لگاریتمی افزایش یافت. Sabia و همکاران، در سال ۲۰۰۱ تاثیر محلول رویی فیلتر شده خام حاصل از Enterococcus casseliflavus IM416K1 را بر روی لیستریا مونوسیتوجنز بررسی کردند. این محققین قطر هاله عدم رشد به دست آمده را ۱۵ –۱۰ میلی مترگزارش کردند. با مقایسه‌ی نتایج حاصل از تاثیر ضد میکروبی عصاره‌ی این باکتری با تاثیر ضد میکروبی عصاره‌ی حاصل از انتروکوک هایرائی، مشاهده شد که انتروکوک هایرائی تاثیر ضد میکروبی بیش تری بر ضد باکتری لیستریا مونوسیتوجنز داشته است (١٦).

۳-۵- تاثیر عصاره‌ی زعفران بر روی اثر ضد میکروبی رسوبات پروتئینی حاصل از باکتری ها در قبل و بعد از دیالیز

پس از فرایند دیالیز، به‌دلیل حذف برخی از ناخالصی‌های موجود در محیط کشت، خصوصاً سولفات آمونیوم، تاثیر ضد میکروبی کاهش و در برخی از نمونه‌ها ثابت باقی ماند (جدول۲).

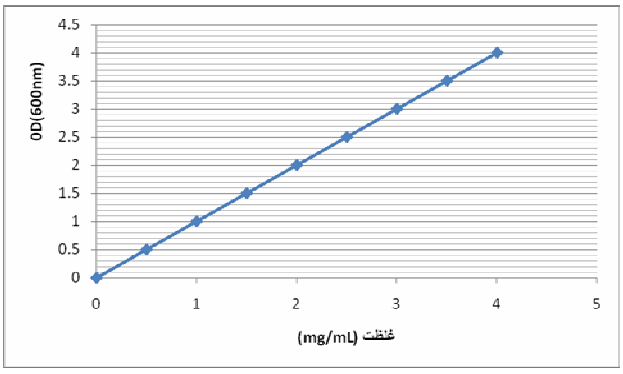
۳-٦- تاثیر عصاره‌ی زعفران بر روی حداقل غلظت باکتریواستاتیکی رسوبات پروتئینی استخراج شده

میزان حداقل غلظت باکتریواستاتیکی رسوبات پروتئینی استخراج شده برای باکتری‌های گرم مثبت بیش‌تر از گرم منفی بود(جدول ۳).

طبق نتایج مشاهده شده در جدول ۲، میان حداقل غلظت مورد نیاز برای جلوگیری از رشد باکتری های مورد بررسی با میزان مقاومت باکتری‌ها به ترکیبات ضد میکروبی، رابطه‌ی معکوس وجود دارد. با مقایسه‌ی نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از تاثیر ضد میکروبی رسوبات پروتئینی استخراج شده به همراه عصاره‌ی زعفران، تاثیر زعفران بر افزایش فعالیت ضد میکروبی انتروکوک هایرائی کاملاً مشخص شد.

۳-٦- تعیین منحنی استاندارد تست لوری

غلظت پروتئین رسوبات استخراج شده از باکتری ها، پس از خواندن OD در طول موج nm ٦۰۰ و مقایسه با منحنی استاندارد بر حسب g/L تعیین شد (شکل ۲).



شکل ۲- منحنی استاندارد تست لوری

۳-۷- تعیین حجم نمونه، واحد فعالیت، فعالیت کل، فعالیت اختصاصی، غلظت پروتئین و پروتئین کل، ضریب تخلیص، راندمان و درصد بازیافت نمونه‌های شاهد و نمونه‌های حاوی عصاره زعفران

مقادیر مربوط به حجم نمونه، واحد فعالیت، فعالیت کل، فعالیت اختصاصی، غلظت پروتئین و پروتئین کل، ضریب تخلیص، راندمان و درصد بازیافت نمونه‌های شاهد و نمونه‌های حاوی عصاره‌ی زعفران در جدول ٤ و ٥ آورده شده است. با مقایسه‌ی نتایج به دست آمده از این تحقیق با نتایج حاصل از تحقیق Jianhua Xie و همکاران در سال ۲۰۰۹، بر روی فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین‌های حاصل از باکتری‌های Bacillus CGMCC1.354، E.Coli IVDC C83901 ،Bacillus subtilis CGMCC1.769 ،subtilis Staphylococcus aureus IVDC 6538، مشاهده شد که واحد فعالیت باکتریوسین حاصل از باکتری‌های فوق، به ترتیب، ۱۵۳/۹U ،۰U،۰U /۷U ٤۲۲ بوده است. از این‌رو، باکتریوسین‌های حاصل از انتروکوک هایرائی، دارای فعالیت بیش‌تری(U ۳۷۵۰) نسبت به کلیه‌ی باکتریوسین‌های فوق بوده‌اند. این اختلاف به علت قوی‌تر بودن تاثیر ضد میکروبی باکتریوسین انتروکوک هایرائی و مناسب بودن ماده‌ی شیمیایی سولفات آمونیوم برای استخراج این باکتریوسین‌ها بوده است(۱۱).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱- نتایج قطر هاله‌ی عدم رشد عصاره ی انتروکوکس هایرائی در نمونه ی شاهد و نمونه‌ی حاوی عصاره‌ی زعفران در طی دوره‌ی گرمخانه گذاری

قطر هاله ی عدم رشد (mm)	لیستریا مونوسیتوژنز				استافیلوکک آرئوس				باسیلوس سرئوس				کلبسیلا نومونیه				سالمونلا پاراتیفی				اشرشیاکلی			
	گرمخانه گذاری(h)				گرمخانه گذاری(h)				گرمخانه گذاری(h)				گرمخانه گذاری(h)				گرمخانه گذاری(h)				گرمخانه گذاری(h)			
	۸	۱۶	۲۴	۴۸	۸	۱۶	۲۴	۴۸	۸	۱۶	۲۴	۴۸	۸	۱۶	۲۴	۴۸	۸	۱۶	۲۴	۴۸	۸	۱۶	۲۴	۴۸
انتروکک هایرائی	۱۹	۲۴	۳۹	۴۱	۱۰	۱۸	۳۰	۳۳	۱۸	۲۲	۳۳	۳۵	–	۷	۱۸	۲۰	–	۷	۱۷	۱۹	–	۷	۲۳	۲۷
انتروکک هایرائی و زعفران	۲۷	۳۵	۴۵	۴۷	۲۳	۲۹	۳۹	۴۰	۲۸	۳۳	۴۱	۴۵	–	۱۲	۲۶	۲۹	–	۱۲	۲۱	۳۶	۱۰	۱۵	۳۰	۳۴

جدول ۲- تاثیر عصاره‌ی زعفران بر روی اثر ضد میکروبی رسوبات پروتئینی باکتری‌ها پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در قبل و بعد از دیالیز

قطر هاله عدم رشد (mm)	استافیلوکوس ارئوس		لیستریا مونوسیتوژنز		باسیلوس سرئوس		کلبسیلا پنومونیه	
	قبل از دیالیز	پس از دیالیز	قبل از دیالیز	پس از دیالیز	قبل از دیالیز	پس از دیالیز	قبل از دیالیز	پس از دیالیز
انتروکک هایرائی	۱۸	۱۴	۲۵	۲۳	۱۱	۱۱	۱۴	۱۲
انتروکک هایرائی و زعفران	۲۴	۲۳	۳۲	۳۰	۱۴	۱۶	۱۸	۱۸

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- تاثیر عصاره‌ی زعفران بر روی حداقل غلظت باکتریواستاتیکی رسوبات پروتئینی استخراج شده

	حداقل غلظت باکتریواستاتیکی(g/l)			
	استافیلوکوکوس ارئوس	لیستریا مونوسیتوجنز	باسیلوس سرئوس	کلبسیلا پنومونیه
انتروکوک هایرائی	۱/۵	۰/۵	۱/۵	۲
انتروکوک هایرائی و زعفران	۱	۰/۳	۱	۱/۵

جدول ٤- تعیین حجم نمونه، واحد فعالیت، فعالیت کل، فعالیت اختصاصی، غلظت پروتئین و پروتئین کل، ضریب تخلیص، راندمان و درصد بازیافت در نمونه‌های شاهد

	انتروکوک هایرائی		
فاکتورهای مورد بررسی	مایع تخمیر	قبل از دیالیز	پس از دیالیز
حجم نمونه(ml)	۱۰۰	۳۵	۲۵
واحدفعالیت(Unit/ml)	۵۰	۱۰۰	۱۵۰
فعالیت کل (Unit)	۵۰۰۰	۳۵۰۰	۳۷۵۰
غلظت پروتئین (mg/ml)	۲	۱/۵	۰/۵
پروتئین کل (mg)	۲۰۰	۵۲/۵	۱۲/۵
فعالیت اختصاصی (U/mg)	۲۵	٦٦/٦٧	۳۰۰
راندمان (٪)	-	۷۰	۷۵
درصد بازیافت (٪)	-	۲٦/۲۵	٦/۲۵
ضریب تخلیص	-	۲/٦٧	۱۲

Archive of SID

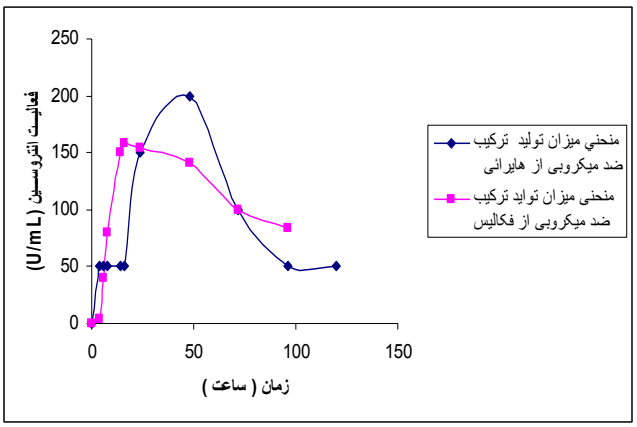
www.SID.ir

جدول ۵- تعیین حجم نمونه، واحد فعالیت، فعالیت کل ، فعالیت اختصاصی، غلظت پروتئین و پروتئین کل، ضریب تخلیص، راندمان و درصد بازیافت در نمونه های حاوی عصاره‌ی زعفران

	انتروکوک هایرائی و زعفران		
فاکتورهای مورد بررسی	مایع تخمیر	قبل از دیالیز	پس از دیالیز
حجم نمونه(mL)	۱۰۰	۳۵	۲۵
واحدفعالیت(Unit/mL)	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰
فعالیت کل (Unit)	۱۰۰۰۰	۵۲۵۰	۵۰۰۰
غلظت پروتئین(mg/mL)	۲,۵	۱/۸	۰/۹
پروتئین کل (mg)	۲۵۰	۶۳	۲۲/۵
فعالیت اختصاصی(U/mg)	٤۰	۸۳/۳۳	۲۲۲/۲۲
راندمان (٪)	–	۵۲/۵	۵۰
درصد بازیافت(٪)	–	۲۵/۲	۹
ضریب تخلیص	–	۲/۰۸	۵/۵۵

۹-۳- تاثیر عصاره‌ی زعفران بر میزان تولید ترکیبات ضدمیکروبی

با توجه به منحنی‌های تولید ترکیبات ضدمیکروبی، میزان تولید این ترکیبات در ٤ ساعت اولیه‌ی رشد(Lag phase)، تقریباً صفر بوده است. به عبارت دیگر، از آن جا که در این مرحله، رشدی صورت نگرفته، در نتیجه، متابولیتی هم تولید نشده است. اما به تدریج، با افزایش رشد باکتری، این متابولیت‌ها نیز افزایش می‌یابند (شکل ۳) .



شکل ۳- تاثیر عصاره‌ی زعفران برروی میزان تولید ترکیبات ضد میکروبی توسط انتروکوک هایرائی

نتایج به دست آمده حاکی از آن است که تولید ترکیبات ضدمیکروبی انتروکوک هایرائی به ترتیب پس از ۲٤ ساعت از تلقیح اولیه، یک افزایش شدید نشان می‌دهد. این زمان، دقیقاً مقارن با افزایش تعداد باکتری و به عبارتی، همزمان با فاز لگاریتمی رشد بود. به عبارت دیگر، تولید این ترکیبات در فاز لگاریتمی رشد صورت گرفته است. با ورود باکتری به فاز رکود، میزان این ترکیبات، تقریباً ثابت ماند و سپس به تدریج کاهش یافت. بنابراین، می‌توان گفت که تولید ترکیبات ضدمیکروبی توسط باکتری انتروکوک هایرائی، از شمای تولید یک متابولیت اولیه پیروی می‌کند (۱).با مشاهده منحنی میزان تولید انتروسین در نمونه‌ی حاوی زعفران، نقش آن به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی سالم، در تحریک تولید انتروسین مشخص می‌شود.

۱۰-۳- نتایج حاصل از الکتروفورز رسوبات پروتئینی

پس از انجام الکتروفورز، مشاهده شد که باندهای پروتئینی به دست آمده، دارای وزن مولکولی مشابهی با باکتریوسین‌ها بوده‌اند. از این‌رو، می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات پروتئینی استخراج شده از انتروکوک هایرائی، باکتریوسین باشند. وزن مولکولی ترکیبات استخراج شده، ۳۵ کیلودالتون بود.

Archive of SID

www.SID.ir

٤- نتیجه‌گیری

بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک، انواع متعددی از باکتریوسین‌ها را تولید می‌نمایند. این باکتریوسین ها در مواد غذایی تخمیری و غیرتخمیری متعدد به عنوان نگه دارنده به کار برده می‌شوند(۹). با توجه به نقش سینرژیستی زعفران در افزایش غلظت و میزان انتروسین تولید شده و در نتیجه، تحریک تولید انتروسین توسط انتروکوکوس هایرائی، استفاده از این ماده‌ی طعم دهنده و رنگ دهنده برای افزایش ماندگاری مواد غذایی می‌تواند بسیار سودمند باشد.

٥- سپاس گزاری

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران که در انجام این تحقیق، مساعدت فرمودند، سپاس گزاری می‌گردد.

٦- منابع

۱- آقاقزوینی، ش. ۱۳۸۵ . بررسی تاثیر ضد میکروبی لاکتوکوکوس لاکتیس و مقایسه آن با پیوسین. پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی مهندسی کشاورزی- علوم و صنایع غذایی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علو م و تحقیقات تهران.

۲- خنافری، آ. و حسینی، ف. ۱۳۸۵ . میکروب‌شناسی عملی و اصول بیوشیمیایی واکنش‌ها. انتشارات پورسینا، تهران.

۳- عیدی، ا. و عیدی، م . ۱۳۸۵ .گیاهان دارویی ایران. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران. صفحه‌ی ۲۱۵ .

4- Aroutcheva Alla , A. and Simoes Jose, A . 2001. Antimicrobial protein produced by vaginal Lactobacillus acidophilus that inhibits Gardnerellavaginalis . *Infect Dis Obstet Gynecol. Microbiology*, 9: 33–39.

5- Aymerich,T. Artigas, M.G. Garriga, M. Monfort, J.M. and Hugas, M. 2008. Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocin A and B by Enterococcus faecium CTC492, *Applied Microbiology*, 8: 686-694.

6- Baron Ellen, J.o. and Finegold Sydney, M. 1990. Diagnostic microbiology. Bailey & Scott, USA, pp.112-115.

7- Brummer ,W. and Gunzer ,G. 1987. Laboratory techniques of enzymes recovery. *Biotechnology*, 7a: 213-279.

8- Bruno ,M.E.C. and Montville ,T.J. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology,* 59: 3003-3010.

9- Cleveland, J. Montville ,T.J. Nes, I.F. and Chikindas,T. 2001. Bacteriocins safe natural antimicrobials for food preservation. *Food Microbiology,* 71:1-20.

10- Hugas, M. Garriga, M. and Aymerich, M. T. 2003. Functionalty of enterococci in meat products. *Food Microbiology*, 88: 223-233.

11- Jianhua , X. Rijun, Z. Changjiang, Sh . and Yaoqi, G. 2009. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated Bacillus subtilis LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens. *Biotechnology*, 8 : 5611-5619.

12- Kaiser, A.L . and Montville, T.J. 1996. Purification of bacteriocin and characterization of its mode of action against Listeria monocytogenes scolta cell and lipid vesicle. *Appl. Environ. Microbiol,* 62: 4525-4535.

13- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS *Microbiology Review*, 12: 39-86.

14- Krijsman, J. 1992. Product recovery in bioprocess technology. Butterworth Heinemann, Oxford, London..

15- Ogunbanwo, S.T. Sanni, A.I. and Onilude, A.A. 2003. Characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum F1 and Lactobacillus brevis og1. *Biotechnology*, 2: 219-227.

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

17- Toba, T. Samant, S.K. Yoshioka, E . and Itoh, T . 1991 . Reutericin 6, a new bacteriocin produced by Lactobacillus reuteri LA 6. *Applied Microbiol*, 13: 281 - 286

18- Yamazaki, S. 1982. Protective effect of Bifidobacterium monassociation against lethal activity of E.coli. *Bifidobacteria Microflora*, 1: 55-60.

Archive of SID

www.SID.ir