مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره دوم – شماره ۱ – بهار ۸۷

فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز جدا شده از لاکتوباسیل‌های موجود در شیر و پنیر

دکتر جمیله نوروزی* دکتر ناهید رهبر روشندل** المیرا قیطانچی***
* استاد میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
** دانشیار فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
*** کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

زمینه و هدف

عدم تحمل لاکتوز، اختلالی است که بعد از هضم شیر در برخی از افراد رخ می‌دهد و ناشی از مقادیر ناکافی آنزیم بتاگالاکتوزیداز جهت هضم لاکتوز در روده انسان می‌باشد. این تحقیق به‌منظور مشاهدهٔ وجود آنزیم بتاگالاکتوزیداز تولید شده توسط لاکتوباسیل‌های جدا شده از شیر و پنیر بوده است.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی، نمونه‌های پنیر و شیر با مارک‌های متفاوت از مغازه‌های مختلف خریداری گردید. لاکتوباسیل‌ها با کشت نمونه‌ها در محیط MRS و با رنگ‌آمیزی گرم و روش‌های استاندارد بیوشیمیایی شناسایی شدند. توانایی تولید بتاگالاکتوزیداز با روش X-gal و ONPG بررسی شد. باند پروتئینی آنزیم بتاگالاکتوزیداز با روش SDS-PAGE نیز مورد مشاهده قرار گرفت.

یافته‌ها

از تعداد ۵۰ نمونه، ۴۱ لاکتوباسیل (۱۴ جنس) از شیر و پنیر جدا شد. تمام باکتری‌ها در محیط‌های دارای X-gal، کلنی‌های سبز (اما در زمان‌های متفاوت) تولید کردند که نشان دهندهٔ حضور آنزیم بتاگالاکتوزیداز در این باکتری‌ها بود. تمام لاکتوباسیل‌های جدا شده در آزمایش ONPG، فعالیت بتاگالاکتوزیدازی را نشان دادند که بیشترین مقدار آنزیم در یک سویه از لاکتوباسیلوس دلبروکی (با ۱۹۶۶ واحد میلر بر۱ میلی لیتر) اندازه‌گیری شد. در برخی از این باکتری‌ها (۳۷٪)، باند پروتئینی ۱۱۶ کیلو دالتونی قوی در ارتباط با آنزیم بتاگالاکتوزیداز در آزمایش SDS-PAGE مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری

با افزودن لاکتوباسیل‌های دارای آنزیم بتاگالاکتوزیداز به‌عنوان پروبیوتیک به شیر و پنیر و سایر فرآورده‌های لبنی می‌توان در هضم لاکتوز به افراد فاقد تحمل لاکتوز کمک نمود. در ضمن از روش X-gal و ONPG که روشی ساده، سریع و ارزان می‌باشد می‌توان به‌جای SDS-PAGE استفاده کرد.

کلید واژه‌ها: لاکتو باسیل، بتاگالاکتوزیداز، نیترو فنیل گالاکتوزیداز

نویسنده مسئول: استاد میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
آدرس: بزرگراه همت، تقاطع بزرگراه شهید چمران و شیخ فضل اله، جنب برج میلاد، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی تلفن: ۸۸۰۵۸۶۴۹-۰۲۱
Email: J_Nowroozi @hotmail.com
تاریخ دریافت: ۸۷/۵/۷ تاریخ پذیرش: ۸۷/۶/۱۸

www.SID.ir

مقدمه

باکتری‌های اسید لاکتیک که به‌عنوان آغازگر برای تولید فرآورده‌های لبنیاتی مورد استفاده قرار می‌گیرند، عوامل اصلی تخمیر و محافظت کننده غذا بوده و هم‌چنین در ایجاد طعم، بو و بافت فرآورده‌های غذایی نقش بسزایی دارند (۱). بتاگالاکتوزیداز یکی از گلیکوزیدازهایی است که به فراوانی در صنایع لبنیاتی کاربرد دارد و توسط اکثر لاکتوباسیل‌ها تولید می‌شود (۲). این آنزیم قند لاکتوز را که قند اصلی شیر است به گلوکز و گالاکتوز تبدیل می‌کند. این قندها می‌توانند از میان سلول‌های اپی‌تلیال روده به سهولت جذب گردند (۵-۳). لاکتاز (آنزیم روده باریک) دارای دو فعالیت آنزیمی است: فعالیت لاکتازی و فعالیت فلوریزین هیدرولازی. فعالیت لاکتازی مسئول هیدرولیز لاکتوز بوده و هم‌چنین سلوبیوز، سلوتریوز، سلوتتروز و تا حدی سلولز را می‌شکند. فعالیت فلوریزین هیدرولازی سبب شکستن بتا گلیکوزیدها می‌شود (۴). بیشتر فعالیت‌های لاکتازی در روده توسط لاکتاز انجام می‌گیرد و مکان آن در نوک پرزهای روده است (۵). فعالیت کم لاکتاز موجب مشکلاتی در اعمال گوارشی شده که در موارد شدید عدم تحمل لاکتوز بروز می‌کند (۲). علایم عدم تحمل لاکتوز شامل درد شکم، اسهال، استفراغ، نفخ شکم بعد از خوردن لاکتوز و یا مواد غذایی حاوی لاکتوز بوده که می‌تواند منجر به کاهش کیفیت زندگی و کاهش فعالیت‌های روزانه شود. درمان آن نسبتاً آسان است و حذف لاکتوز از رژیم غذایی و یا استفاده از مواد غذایی حاوی آنزیم هیدرولیزکننده است (۵). بتاگالاکتوزیداز جهت هیدرولیز لاکتوز در فرآورده‌های لبنی نظیر شیر و پنیر استفاده می‌شود (۲). جنس‌های مختلف لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم و تعداد معدودی از باکتری‌ها که به‌عنوان آغازگر در فرآورده‌های لبنی به‌کار می‌روند اغلب تولیدکنندهٔ بتاگالاکتوزیداز نیز می‌باشند (۷،۶). هدف از این تحقیق، شناسایی لاکتوباسیل‌های تولیدکنندهٔ آنزیم بتاگالاکتوزیداز موجود در شیر و پنیر با روش‌های بیوشیمیایی X-gal، ONPG و سنجش مقدار آنزیم) و روش مولکولی (SDS-PAGE) بوده است. زیرا شناسایی و افزودن لاکتوباسیل‌های دارای فعالیت زیاد بتاگالاکتوزیدازی می‌توانند به‌عنوان پروبیوتیک مناسب جهت بهبود هضم لاکتوز در فرآورده‌های لبنی به‌ویژه شیر مورد استفاده قرار گیرد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی-مقطعی، ۵۰ نمونه از شیر و پنیر پاستوریزه و محلی (غیر پاستوریزه) از کارخانه‌های مختلف و نواحی روستایی در تهران و اطراف تهران خریداری شد و مورد بررسی قرار گرفت.

محیط کشت باکتری و شرایط نگه‌داری محیط: به‌منظور جداسازی باکتری، ۲ گرم از پنیر و ۲ میلی‌لیتر از شیر به ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع MRS (Merck)اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در جار بی‌هوازی در ۳۷ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شد. بعد از ۲۴ ساعت، ۵۰ میکرولیتر از آن در سطح محیط جامد MRS به‌صورت خطی کشت داده شد. پلیت‌ها در داخل جار بی‌هوازی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. جهت تشخیص تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز توسط باکتری‌ها، از محیط مایع MRS بدون قند گلوکز (MRS-lac) استفاده شد. در این محیط ۱٪ از قند لاکتوز استفاده گردید (۸).

شناسایی جنس و گونه لاکتوباسیل: باکتری‌ها با روش استاندارد بیوشیمیایی و باکتریولوژی شناسایی شدند. در این‌حالت، ابتدا باکتری‌های رشد کرده به روش گرم، رنگ‌آمیزی شده و سپس تست کاتالاز و اکسیداز انجام گردید. آزمایش تخمیر قندهای مختلف (شامل گلوکز، گالاکتوز، مالتوز، مانیتول، ریبوز، سوکروز، آرابینوز، لاکتوز، مانوز، رافینوز، رامنوز، گزیلوز، سوربیتول و سالیسین) درمحیط پایه قند (MRS بدون گلوکز و عصارهٔ گوشت) و توانایی رشد در دماهای مختلف (۴،۱۵،۲۵،۳۰،۳۷ و۴۰ درجه سلسیوس) بعد از ۳ الی ۱۰ روز، مشاهده حرکت، تولید اندول و سولفید هیدروژن (H2S) در محیط SIM مورد بررسی قرار گرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی تولید آنزیم: استفاده از سوبسترای X-gal: یک کلنی از باکتری‌های جدا شده در سطح محیط جامد MRS حاوی ۶۰ میکرولیتر سوبسترای X-gal (۵- برومو، ۴- کلرو، ۳- ایندولیل، بتا-دی- گالاکتوپیرانوزید #R0401 خریداری شده از شرکت فرمنتاز، ۴۰ میلی‌گرم X-gal حل شده در ۲ میلی‌لیتر دی متیل فرامید) و ۱۰ میکرولیتر محلول IPTG (ایزو- پروپیل- تایو بتا دی گالاکتوپیرانوزید #R0391 خریداری شده از شرکت فرمنتاز) به‌عنوان القاکننده کشت شدند و به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ درجه نگه‌داری و کلنی‌های سبز رنگ، به‌عنوان تولیدکننده آنزیم بتاگالاکتوزیداز در نظر گرفته شدند (۹).

استفاده از ONPG: تمام باکتری‌ها در لوله‌های حاوی ONPG (ا- نیترو فنیل بتا دی گالاکتو پیرانوزید) و سدیم فسفات بافر PH=۷ و پپتون واتر کشت شدند. تولید رنگ زرد، نشانگر تست ONPG مثبت بود (۹).

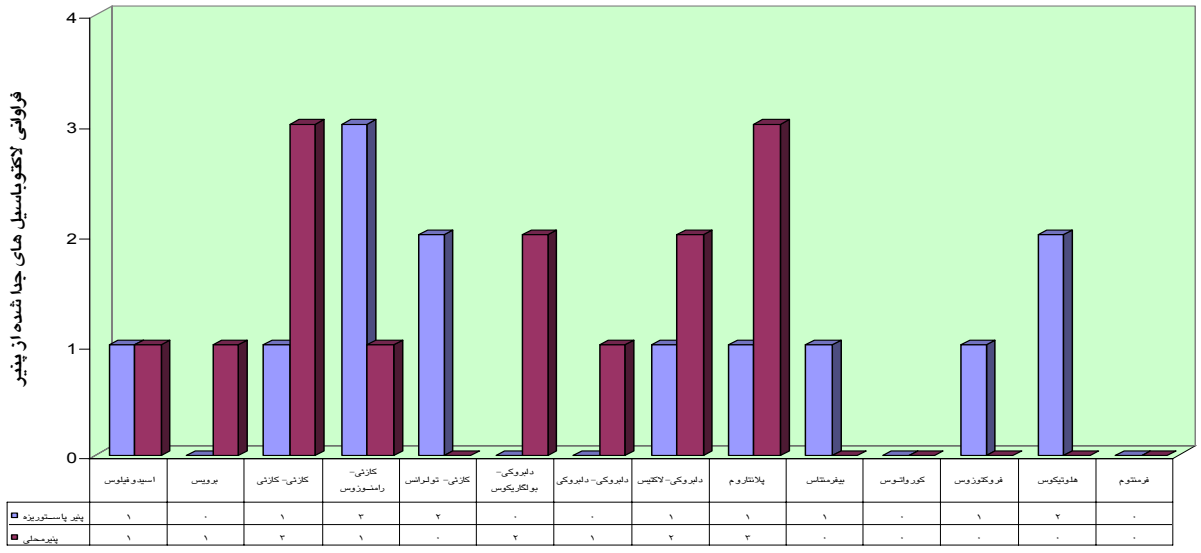
اندازه‌گیری مقدار آنزیم بتاگالاکتوزیداز: این آزمایش، بر اساس روش Miller (۱۰) و Vinderola (۸) انجام گردید. به‌طور خلاصه، در روش تعیین مقدار آنزیم خارج سلولی، تمام باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط مایع MRS-lac کشت شدند. بعد از سانتریفوژ و ۲ بار شستشو در محیط فوق، مجدد کشت داده شدند. سپس غلظت محلول رویی در اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و یادداشت گردید. به‌منظور اندازه‌گیری مقدار آنزیم درون سلولی، ابتدا باکتری‌ها به مدت ۷ دقیقه در معرض محلول تولوئن-استون قرار گرفتند، تا قابلیت نفوذ غشاء سلول باکتری، جهت نفوذ ONPG به‌درون سلول یابد. سپس سوبسترای ONPG (۴ میلی‌گرم بر لیتر) به آن اضافه گردید و لوله‌ها در داخل بن ماری ۳۷ درجه به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. کربنات سدیم به‌منظور توقف واکنش به هر لوله اضافه شد. پس از سانتریفوژ، میزان جذب محلول رویی در دو طول موج ۴۲۰ و ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و یادداشت گردید (۸).

استخراج پروتئین و انجام SDS-PAGE (سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز)

به‌طور خلاصه، در این روش، سوسپانسیون باکتری یک‌بار در Tris HCl و یک‌بار در مخلوط ساکاروز وTris HCl، گلیسرول، مرکاپتواتانول، بروموفنل بلو در آب مقطر حل شد. پس از مراحل آماده‌سازی، مخلوط پروتئینی با استفاده از سولفات آمونیوم ۴۰ درصد، رسوب داده و سپس درون کیسه دیالیز با آب مقطر ۲ بار تقطیر، تغلیظ شد (۹). نمونه‌ها طبق روش استاندارد به‌درون چاهک‌های روی ژل عمودی منتقل شدند. از آکریل آمید ۴٪ و ۱۲٪ برای ساختن ژل Stacking و ژل Resolving استفاده شد. از مارکر پروتئینی #SM0431 خریداری شده از شرکت فرمنتاز استفاده گردید. باندهای پروتئینی پس از رنگ‌آمیزی با رنگ کوماسی آبی R250 (Merck) به مدت ۲ ساعت و بعد از رنگ‌بری، مشاهده و عکس‌برداری شد (۱۱).

یافته‌ها

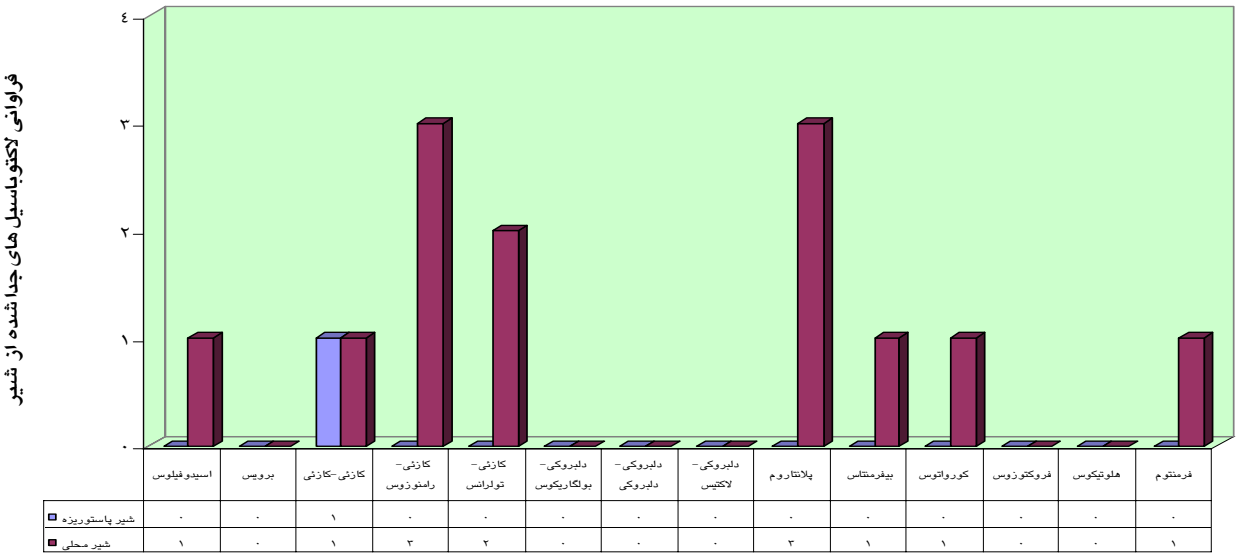
۴۱ لاکتوباسیل از گونه‌های مختلف از ۵۰ نمونه شیر و پنیر جدا شد (نمودار ۱و۲). بر طبق بررسی‌ها تمام باکتری‌ها در دمای ۴ درجه رشد نکردند و بیشترین رشد در تمام لاکتوباسیل‌های جدا شده در دمای ۲۵ درجه مشاهده



گونه های لاکتوبایل های جدا شده از پنیر محلی و پاستوریزه
نمودار شماره نمودار شماره ۱- فراوانی لاکتوباسیلوس های جدا شده از پنیر محلی و پاستوریزه

Archive of SID
www.SID.ir

گردید. رشد در دمای ۴۵ درجه در لاکتوباسیلوس کازئی منفی بود و در سایر لاکتوباسیل‌ها رشد ضعیف در این دما دیده شد.



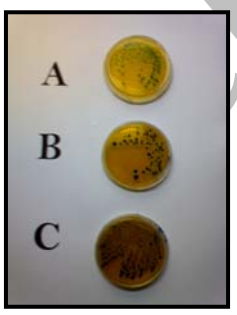
گونه های لاکتوباسیل های جدا شده از شیر محلی و پاستوریزه

نمودار شماره ۲: فراوانی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از شیر

تمام باکتری‌ها در محیط‌های دارای X-gal، کلنی‌های سبز (اما در زمان‌های متفاوت) تولید کردند که نشان‌دهندهٔ حضور آنزیم بتاگالاکتوزیداز در این باکتری‌ها بود (شکل شماره ۱). به‌طوری که کلنی‌های سبز پررنگ دارای هاله یا فاقد هاله در اطراف کلنی در ۳۷٪ از باکتری‌ها بعد از ۲۴ ساعت نگه‌داری در دمای ۳۷ درجه (باکتری‌های تولیدکنندهٔ سریع آنزیم) و در ۶۳٪ از باکتری‌ها بعد از ۴-۲ روز نگه‌داری (باکتری‌های تولیدکنندهٔ هستهٔ آنزیم)، مشاهده شدند. مقدار آنزیم بتاگالاکتوزیداز در لاکتوباسیل‌های جدا شده از شیر حدود ۱۳۲۵/۵-۲۲/۷ و در لاکتوباسیل‌های جدا شده از پنیر حدود ۱۹۶۶-۱۰۳/۱ واحد میلر بر ۱ میلی‌لیتر (Miller units/ml) بود. بیشترین مقدار آنزیم در لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس کازئی زیرگونه کازئی (۱۹۶۶-۸۶۷ واحد میلر بر ۱ میلی‌لیتر) جدا شده از پنیر و در لاکتوباسیلوس کازئی زیر گونه‌های کازئی و تولرانس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۱۳۲۶-۶۰۶ واحد میلر بر ۱ میلی‌لیتر) جدا شده از شیر و کمترین مقدار آنزیم در

منفی بود و در سایر لاکتوباسیل‌ها رشد ضعیف در این دما دیده شد.

لاکتوباسیلوس کازئی زیرگونه رامنوزوس (۶۴/۴-۲۲/۷ واحد میلر بر ۱ میلی‌لیتر) و لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۴۴/۴ واحد میلر بر۱ میلی‌لیتر) جدا شده از شیر مشاهده گردید.

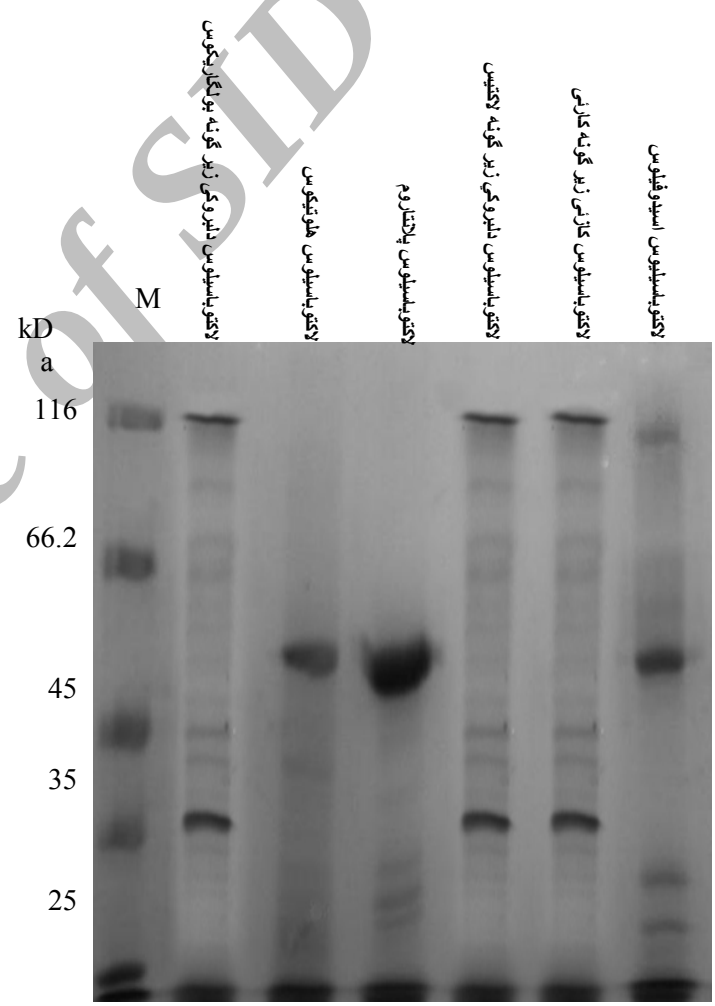


شکل شماره ۱: کلنی‌های مولد آنزیم (کلنی سبز) در محیط MRS حاوی X-gal

نتایج این بررسی نشان داد که حضور ۱٪ لاکتوز به‌جای گلوکز سبب افزایش تولید مقدار آنزیم بتاگالاکتوزیداز می‌شود. مقدار آنزیم در حضور قند گلوکز به‌عنوان تنها منبع کربن نیز کاهش می‌یابد.

www.SID.ir

در این بررسی، نتایج حاصل از X-gal و ONPG برای مشاهده تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز تقریباً یکسان (مثبت) بود. پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۱۱۶ کیلو دالتون (نشان‌دهندهٔ وجود آنزیم بتاگالاکتوزیداز)، تنها در برخی از باکتری‌ها (۳۷٪) به‌صورت باندی ضخیم و پررنگ در بررسی SDS-PAGE مشاهده شد و در بقیه موارد (۶۳٪)، باند ۱۱۶ کیلو دالتونی بسیار ضعیف مشاهده گردید که در عکس دیده نمی‌شود (شکل ۲).



شکل شماره ۲: SDS-PAGE پروتئین‌های لاکتوباسیلوس

بحث

لاکتوباسیل‌ها، فراوان‌ترین باکتری فلور طبیعی مجرای گوارشی انسان هستند. این باکتری‌ها مهم‌ترین تخمیرکننده مواد غذایی بوده و به‌عنوان آغازگر تخمیر به‌کار می‌روند. هم‌چنین در ایجاد طعم و بوی مواد غذایی تخمیری مانند فرآورده‌های لبنیاتی و سوسیس و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرند. آنزیم بتاگالاکتوزیداز، آنزیمی است که توسط برخی از باکتری‌ها از جمله لاکتوباسیل‌ها در فرآورده‌های لبنی نظیر شیر و پنیر تولید می‌شود. سالیان متمادی عدم تحمل لاکتوز به‌علت فقدان آنزیم بتاگالاکتوزیداز، مشکل شایع در برخی از کودکان و افراد بزرگسال بوده است (۵). بنابراین، با افزودن باکتری‌های تولیدکننده این آنزیم به شیر و یا مصرف فرآورده‌های لبنی حاوی این آنزیم می‌توان به بهبودی علایم عدم تحمل لاکتوز کمک نمود. مقدار گلوکز و گالاکتوز می‌تواند فعالیت بتاگالاکتوزیداز را با مهار کاتابولیتی (Catabolite Repression) و یا با حذف القاکننده تنظیم نماید. نتایج این بررسی نشان داد، هنگامی‌که ۱٪ قند لاکتوز به‌جای قند گلوکز به‌عنوان تنها منبع کربن به محیط MRS فاقد قند اضافه شد، مقدار آنزیم بتاگالاکتوزیداز به‌ویژه در لاکتوباسیل‌های دارای کمترین مقدار آنزیم، افزایش یافت. البته در سایر مطالعات نیز تأیید شده است که افزودن گلوکز به محیط کشت دارای لاکتوز سبب کاهش فعالیت و مقدار آنزیم بتاگالاکتوزیداز می‌گردد (۱۲). تأثیر محیط Skim Milk (که به‌عنوان تنها منبع قند لاکتوز می‌باشد) نیز در افزایش تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز تأیید شده است (۱۳). این امر نشان دهندهٔ آن است که لاکتوز به‌عنوان یک فاکتور القاکنندهٔ آنزیم عمل می‌کند. نتایج این بررسی با نتایج حاصل از سایر مطالعات یکسان می‌باشد. بنابراین بهتر است به طریقی قند گلوکز در شیر حذف شده و به‌جای آن از قند لاکتوز جهت القای تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز استفاده شود. در این بررسی، با کشت شیرهای پاستوریزه در محیط MRS مایع حتی بعد از غنی کردن محیط با عصارهٔ مخمر و سپس کشت در محیط جامد، لاکتوباسیل‌ها رشد نکردند. به استثنای یک مورد لاکتوباسیلوس کازئی که از شیر پاستوریزه جدا گردید. احتمالاً باکتری‌های موجود در شیر به حرارت حساس بوده و به‌علت حرارت پاستوریزاسیون از بین رفته‌اند، زیرا لاکتوباسیل‌های متنوعی در این بررسی نیز از شیرهای

Archive of SID
www.SID.ir

محلی جدا شد که نشانگر مناسب بودن شرایط موجود برای رشد لاکتوباسیل‌ها در شیرهای محلی بوده است. در مطالعه‌ای نیز که توسط Aquilanti و همکارانش در سال ۲۰۰۵ بر روی یک نوع پنیر ایتالیایی تهیه شده از شیر خام انجام گرفت، با توجه به این‌که هیچ‌گونه کشت آغازگری به شیر خام اضافه نشد، ۳۰۴ باکتری اسید لاکتیک جدا گردید که بیشتر آن‌ها متعلق به جنس انتروکوکوس و لاکتوباسیلوس بودند (۱۴). نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که امکان جداسازی لاکتوباسیل‌ها از شیر خام (به‌دلیل عدم پاستوریزاسیون شیر) بیشتر است و با توجه به این‌که لاکتوباسیل‌ها در پنیر تهیه شده از شیر خام که هیچ‌گونه کشت آغازگری به آن اضافه نشده است، جدا می‌گردند. بنابراین نتایج حاصل از این بررسی با نتایج مطالعات قبلی مشابه است. به‌همین دلیل، تدابیر مختلفی جهت بهبود میزان رشد پروبیوتیک‌ها در شیر معمولی، با غنی سازی و افزودنی‌های مختلف و یا با افزودن آنزیم بتاگالاکتوزیداز خالص پیشنهاد شده تا بتوان به هضم لاکتوز در افراد کمک نمود (۱۳). با نظر به این‌که حذف شیر از رژیم غذایی اثر منفی در جذب کلسیم و ویتامین D در کودکان و سالمندان خواهد داشت (۳)، بنابراین مصرف پنیر و شیرهای تخمیری برای افراد فاقد تحمل لاکتوز توصیه می‌شود. مناسب‌ترین PH برای رشد لاکتوباسیل‌ها در محدودهٔ ۶-۵ می‌باشد. در این بررسی، رشد لاکتوباسیل‌ها در PHهای اسیدی ۲، ۳، ۴ و ۵ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که تمام باکتری‌ها در PH اسیدی ۲، قادر به رشد نبودند و در سایر PHهای اسیدی نیز با کاهش PH محیط، رشد باکتری به‌تدریج کاهش پیدا کرد. سیتوپلاسم باکتری‌های اسید لاکتیک قلیایی‌تر از محیط کشت‌شان است ولی محیط کشت در طول رشد به‌تدریج با ترشح اسید لاکتیک اسیدی می‌گردد که PH سیتوپلاسمی را نیز متأثر می‌سازد. درمطالعه‌ای که توسط Vinderola و Reinheimer (۲۰۰۳) انجام گرفت نشان داد که چنان‌چه PH سیتوپلاسمی از حد معینی کاهش یابد فعالیت‌های سلولی مهار گشته و آنزیم‌های درون سلولی نیز غیرفعال می‌شوند (۸). در مطالعهٔ حاضر نیز کاهش رشد لاکتوباسیل‌ها با کاهش PH محیط کشت مشاهده گردید که با نتایج مطالعات قبلی هم‌خوانی دارد. به‌منظور شناسایی وجود آنزیم بتاگالاکتوزیداز، سوبستراهای رنگی X-gal و ONPG به‌کار رفت. Favier و همکارانش جهت شناسایی باکتری‌های دارای آنزیم بتاگالاکتوزیداز از روش X-gal استفاده کردند. کلنی‌های سبز رنگ به‌عنوان باکتری‌های دارای آنزیم بتاگالاکتوزیداز در نظر گرفته شدند (۱۵). در مطالعهٔ دیگری نیز از روش کلنی بر روی فیلتر (Colony-Lift Filter Method) به‌همراه X-gal برای بررسی آنزیم بتاگالاکتوزیداز در مخمر و باکتری‌های مدفوعی استفاده شد که نتایج آن نشان دهنده این بودند که کلنی‌های سبز رنگ تولید کننده آنزیم بتاگالاکتوزیداز می‌باشند (۱۷،۱۶). نتایج حاصل از این بررسی مبنی بر استفاده از روش X-gal در شناسایی تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز با نتایج مطالعات قبلی مشابه است. در این بررسی از نمونه‌های شیر و پنیر مورد آزمایش، ۴۱ لاکتوباسیل جدا گردید. تمام لاکتوباسیل‌های جدا شده در آزمایش اندازه‌گیری مقدار آنزیم بتاگالاکتوزیداز با سوبسترای ONPG دارای این آنزیم بودند. از بین این ۴۱ لاکتوباسیل، ۱۵ لاکتوباسیل (۳۷٪) دارای مقدار بالای آنزیم بودند. از بین آن‌ها نیز بیشترین مقدار آنزیم در ۵ لاکتوباسیل متعلق به یک گونهٔ لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونهٔ بولگاریکوس، ۲ گونه لاکتوباسیلوس کازئی زیرگونهٔ کازئی، یک گونه لاکتوباسیلوس کازئی زیرگونهٔ تولرانس و ۱ گونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم مشاهده شد. بیشترین مقدار آنزیم در لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونهٔ بولگاریکوس جدا شده از پنیر محلی بود (۱۹۶۶ واحد میلر بر میلی‌لیتر). در مطالعه‌ای مشابه نیز که در سال ۲۰۰۳ توسط Vinderola و همکارانش انجام گرفت، بیشترین مقدار آنزیم بتاگالاکتوزیداز در بین سویه‌های تجاری لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونهٔ بولگاریکوس تهیه شده از صنایع لبنی محلی بود، که با سوبسترای ONPG اندازه‌گیری شد. مقدار آنزیم در محدودهٔ ۲۰۵۳-۵۱۸ واحد میلر بر میلی‌لیتر می‌باشد که با نتایج مطالعهٔ حاضر هم‌خوانی دارد (۸). از آن‌جایی‌که در مطالعات قبلی نشان داده شده آنزیم بتا گالاکتوزیداز یک آنزیم تترامری متشکل از ۴ زیر واحد یکسان با وزن مولکولی ۱۱۶ کیلودالتون است (۱۸). در این مطالعه

Archive of SID
www.SID.ir

لاکتوباسیل‌هایی که آنزیم بتاگالاکتوزیداز بیشتری در مدت زمان کوتاه تولید کردند، باند ۱۱۶ کیلودالتونی پررنگ و ضخیم در بررسی SDS-PAGE تشکیل دادند که مشابه وزن مولکولی به‌دست آمده توسط سایر محققان بود، اما باند ۱۱۶ کیلودالتونی بسیار ضعیف توسط لاکتوباسیل‌هایی که این آنزیم را کم و آهسته تولید می‌کردند مشاهده گردید. لذا روش SDS-PAGE فقط در مواردی که باکتری آنزیم بتاگالاکتوزیداز قوی تولید می‌کند قابل استفاده است. چون لاکتوباسیل‌هایی که آنزیم کم یا ضعیف تولید می‌کنند توسط روش X-gal و یا ONPG به‌خوبی دیده می‌شوند و نیازی به دستگاه و مواد مولکولی گران قیمت نیز نمی‌باشد، بنابراین توصیه می‌گردد که از روش X-gal و یا ONPG که روش‌هایی ساده، ارزان و سریع برای شناسایی وجود آنزیم بتاگالاکتوزیداز هستند، استفاده شود.

نتیجه‌گیری

تمام لاکتوباسیل‌های موجود در شیر و پنیر در این مطالعه دارای آنزیم بتاگالاکتوزیداز بودند که می‌توان از آن‌ها به‌عنوان پروبیوتیک مناسب در فرآورده‌های لبنی به‌منظور درمان عدم تحمل لاکتوز استفاده نمود. در این مطالعه لاکتوباسیل‌ها به‌جز یک مورد از شیر پاستوریزه جدا نشد، به‌نظر می‌رسد که برخی از لاکتوباسیل‌ها به حرارت پاستوریزاسیون حساس هستند بنابراین توصیه می‌شود که از لاکتوباسیل‌های مقاوم به حرارت در فرآورده‌های پروبیوتیکی که گاهی نیاز به حرارت بالا دارند استفاده گردد. تشخیص وجود آنزیم بتاگالاکتوزیداز در لاکتوباسیل‌ها به‌منظور کاربرد پروبیوتیکی این ارگانیسم‌ها با استفاده از روش‌هایی نظیر X-gal و ONPG به‌راحتی امکان‌پذیر است و به مدت زمان کمتری نیاز دارند، از طرفی نسبت به روش‌های مولکولی نظیر SDS-PAGE کم هزینه‌تر و با صرفه‌تر می‌باشند لذا توصیه می‌شود که از روش‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص وجود آنزیم استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با استفاده از حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی ایران در قالب طرح تحقیقاتی (شماره ثبت ۳۹۷ پ) انجام گردیده است، که بدین‌وسیله، نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین آن دانشگاه ابراز می‌دارند. از اساتید گروه میکروب‌شناسی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران کمال سپاسگزاری را داریم.

Archive of SID

www.SID.ir

References:

1. Chammas GI, Saliba R, Corrieu G, Beal C. Characterisation of Lactic Acid Bacteria Isolated From Fermented Milk "Laban". International Journal of Food Microbiology 2006;110:52-61.
2. Karasova P, Spiwok V, Mala S, Kralova B, Russell NJ. Beta-Galactosidase Activity in Psychrophic Microorganisms and Their Potential Use in Food Industry. Czech J Food Sci 2002;20:43-47.
3. Troelsen JT. Adult-Type Hypolactasia and Regulation of Lactase Expression. Biochimica. Et. BioPHysica. Acta 2005;1723:19-32.
4. Vasiljevic T, Jelen P. Production of β-Galactosidase for Lactose Hydrolysis in Milk and Products Using Thermophilic Lactic Acid Bacteria. Innovative Food Science & Energing Technologies 2001;2:75-85.
5. Heyman MB. The Committee on Nutrition. Lactose Intolerance in Infants, Children, and Adolescents. Pediatrics 2006;118:1297-1286.
6. Fernandez M, Margolles A, Suarez JE, Mayo B. Duplication of the β-Galactosidase Gene in Some Lactobacillus Plantarum Strains. International Journal of Food Microbiology 1999;48:113-123.
7. Xanthopoulos V, Ztaliou I, Gaier W, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E. Differentiation of Lactobacillus Isolates From Infant Faeces by SDS-PAGE and rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes. Journal of Applied Microbiology 1999;87:743-749.
8. Vinderola CG, Reinheimer JA. Lactic Acid Starter and Probiotic Bacteria, a Comparative "In Vitro" Study of Probiotic Characteristics and Biological Barrier Resistance. Food Research International 2003;36:895-904.
9. Nowroozi J. Molecular Biological Methods in Bacteria. Tehran: Andishe Rafie; 2004. p. 108-115.[Persian]
10. Miller JH. Assay of β-Galactosidase. In: Miller JH, editor. Experiments In Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1972. p. 352-355.
11. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.
12. Kashket ER. Bioenergetics of Lactic Acid Bacteria: Cytoplasmic PH and Osmotolerance. FEMS Microbiology Reviews 1987;46:233-244.
13. Gaudreau H, Champagne CP, Jelen P. The Use of Crude Cellular Extracts of Lactobacillus Delbrueckii ssp. Bulgaricus 11842 to Stimulate Growth of a Probiotic Lactobacillus Rhamnosus Culture in Milk. Enzyme and Microbial Technology 2005;36:83-90.
14. Aquilanti L, Dell'Aquila L, Zannini E, Zocchetti A and Clementi F. Resident Lactic Acid Bacteria in Raw Milk Canestrato Pugliese Cheese. Letters in Applied Microbiology 2006;43:161-167.
15. Favier C, Neut C, Mizon C, Cortot A, Clombel JF, Mizon J. Faecal β-D-Galactosidase Production and Bifidobacteria Are Decreased in Crohn's Disease. Dig Dis Sci 1997;42:817-822.
16. He T, priebe MG, Vonk RJ, Welling GW. Identification of Bacteria with β-Galactosidase Activity in Faeces from Lactase Non-Persistent Subjects. FEMS Microbiology Ecology 2005;54:463-469.
17. Serebriiskii IG, Golemis EA. Uses of lacZ to Sudy Gene Function: Evaluation of Beta-Galactosidase Assays Employed in the Yeast two-Hybrid Systems. Anal Biochem J 2000;285:1-15.
18. Nichtl A, Buchner J, Jaenicke R, Rudolph R, Scheibel T. Folding and Association of β-Galactosidase. J Mol Biol 1998;282:1083-1091.

Archive of SID

www.SID.ir

Study of β-Galactosidase Enzyme Activity Produced by Lactobacilli in Milk and Cheese

J. Nowroozi PhD[*] N. Rahbar Roshandel PhD[**] E. Gheytanchi MSc[***]
[*] Professor of Medical Microbiology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[**] Associate Professor of Pharmacology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[***] Master of Science of Microbiology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Background and objective
Lactose intolerance is a discomfort state that occurs in some people after ingestion of milk and it is due to insufficient amount of beta galactosidase in the human gut to digest lactose. The aim of this study was to observe the presence of beta galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese.

Methods
In this descriptive study, milk and cheese samples with different brand were bought from different shops. Lactobacilli were identified by plating samples on MRS medium, Gram staining and standard biochemical methods. β-galactosidase production by bacteria was assessed by X-Gal and ONPG methods. β-galactosidase was also detected by SDS-PAGE.

Results
Fourteen genus of lactobacillus were isolated From 50 samples. All of the bacteria produced green color colonies on X-Gal plates (but in different times) that indicated the presence of enzyme in the bacteria. All isolated lactobacilli were shown β-galactosidase activity in ONPG test. The highest enzymatic activity was seen in one strain of Lactobacillus Delbrueckii (1966 Miller unit /ml). In some bacteria (37%) a strong β-galactosidase band(116-kDa) was seen by SDS-PAGE.

Conclusion
Addition of beta galactosidase containing lactobacilli as a probiotic agent to milk, cheese, and other dairy products could ameliorate lactose intolerance. Meanwhile X-gal and ONPG methods which are simple, rapid and cheap can be used instead of SDS-PAGE.
Keywords: Lactobacillus, Beta-Galactosidase, Nitrophenylgalactosids

Corresponding Autor: Professor of Medical Microbiology, Iran University of Medical Sciences
Email: J_Nowroozi @hotmail.com

www.SID.ir