Archive of SID

بررسی نقش غلظت‌های مختلف اسید فولیک بر فعالیت آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، تغییرات دما و pH و میزان تولید ویتامین B12 در *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی*

سحر پرچی‌زاده[۱]، محمد فضیلتی[۱]، حسین صلواتی[۲]، **بهروز صالحی اسکندری**[۳*]، حبیب‌اله ناظم[۱]

[۱] گروه بیوشیمی دانشگاه پیام نور استان اصفهان مرکز اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] گروه شیمی دانشگاه پیام نور استان اصفهان مرکز اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور استان اصفهان مرکز اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۳

چکیده

پروپیونی باکتریوم، یک باکتری گرم مثبت، بی هوازی تا میکروائروفیل و میله‌ای شکل از خانواده ی پروپیونی باکتریاسه است. *پروپیونی باکتریوم‌ها* در تولید ویتامین B12 دخالت دارند. هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر پارامترهای فیزیکوشیمیایی (دما و pH) و همچنین اندازه‌گیری غلظت آنزیم اسکوربات پراکسیداز و کاتالاز وبررسی تغییرات میزان تولید ویتامین B12، در غلظت‌های متفاوت اسیدفولیک در *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی*[۱] است. *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی* در محیط تخمیر حاوی ذرت خیس شده و غلظت‌های مختلف اسید فولیک کشت داده شد. سپس میزان جذب آن در ۶۰۰nm با تغییرات دما و pH بررسی شد. نتایج نشان داد که pH مطلوب برای رشد باکتری ۶/۶ و رشد بهینه باکتری در دمای ۲۵-۴۰C° است. افزودن اسید فولیک در غلظت‌های پایین به محیط کشت *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی*، جذب UV را در ۶۰۰nm افزایش داد. غلظت بالای اسید فولیک میزان رشد باکتری را کاهش داد که نشان دهنده تأثیر منفی اسید فولیک بر رشد باکتری‌ها بود. فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز نیز بر اساس مصرف H_2O_2 در ۲۴۰nm و ۲۹۰ تعیین شد. با افزایش غلظت اسید فولیک، در این باکتری، فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز به طور قابل توجهی کاهش یافت. نتایج حاصل از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) برای بررسی میزان تولید ویتامین B12 در وزن خشک باکتری در شرایط بی‌هوازی و هوازی نشان داد که حداکثر تولید ویتامین B12 در غلظت ۷۵۰ mg/l اسید فولیک و تحت شرایط هوازی بود و با افزایش غلظت اسیدفولیک تا ۱۰۰۰mg/l تولید ویتامین B12 کاهش یافت.

کلیدواژگان: آسکوربات پراکسیداز، اسیدفولیک، *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی*، کاتالاز، ویتامین B12

* behsalehi@pnu.ac.ir

1. *Propionibacterium freudenreichii*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پروپیونی باکتریوم فرودنریچی یک باکتری گرم مثبت و غیرمتحرک است. از ویژگی‌های قابل توجه آن این است که قادر به تولید مقادیر زیادی اسید پروپیونیک و اسید استیک است. این باکتری‌ها میتوانند قندها و الکل‌های پلی هیدروکسی را تخمیر کنند(۱). مهم‌ترین گونه‌های جنس *پروپیونی باکتریوم* واریته‌های *شرمانی*[1] و *فرودنریچی*[2] هستند. گونه‌هایی نظیر *پروپیونی باکتریوم تونر*[3] و *پروپیونی باکتریوم پروبیونیسی*[4] نیز از فراورده‌های لبنی جداسازی شده اند(۲). اعضای جنس *پروپیونی باکتریوم* انگل‌های مخرب بدن انسان و سایر حیوانات هستند که در غدد عرق، غدد سباسه و سایر قسمت‌های پوست یافت می‌شوند. آن‌ها تقریبا همه‌گیر هستند و معمولا برای اکثر مردم مشکلی ایجاد نمی‌کنند. ولی می‌توانند باعث آکنه و سایر مشکلات پوستی شوند(۳). تحقیقات نشان داد که، *پروپیونی باکتریوم* رایج ترین جنس مرتبط با پوست انسان در میان میکروارگانیسم‌ها می‌باشد(۴). *پروپیونی باکتریوم اکنیس*[5] می‌تواند در فولیکول‌های مو ایجاد التهاب و عفونت کند. پروپیونی باکتری‌ها که معمولا از نژاد *پروپیونی باکتریو م فرودنریچی* می‌باشند در تکنولوژی ساخت پنیرهای سوییسی به کار می‌روند(۵). این باکتری‌ها معمولاً برای تولید ویتامین B12، تتراپیرول و اسیدپروپیونیک استفاده می‌شوند(۶). ویتامین B12 وفولات در برخی از واکنش‌های بیوشیمیایی نقش دارند و بر تولید و حمل و نقل گروه متیل تأثیر می‌گذارند. ویتامین B12 یک کوفاکتور متیونین سنتاز است که به عنوان یک کاتالیزور در تبدیل هموسیستئین به متیونین عمل می‌کند. متیونین می‌تواند به عنوان یک دهنده متیل عمومی برا ی متیلاسیون DNA وRNA با تبدیل (SAM)[6]عمل کند(۷). میکروب‌های فلور روده بزرگ انسان، ویتامین K (مونوکینین‌ها) و بیشتر ویتامین‌های محلول در آب مانند ویتامین‌های گروه B شامل بیوتین، اسید نیکوتین، فولات، ریبوفلاوین، تیامین، پیریدوکسین، اسید پانتوتنیک و کوبالامین را تولید می‌کنند (۸). ویتامین‌های رژیم غذایی به طور عمده در روده کوچک جذب می‌شوند. با این حال، ویتامین‌های میکروبی به طور عمده در روده بزرگ جذب می‌شوند (۹). به نظر می‌رسد کولونوسیت ها قادر به جذب بیوتین، تیامین، فولات، ریبوفلاوین، اسیدپانتوتنیک ومنوکینون ها هستند واین نشان می‌دهد که ویتامین‌های تولید شده توسطم یکروب‌ها می‌توانند در سطح ویتامین سیستمیک و به ویژه در هموستاز ویتامین‌ها در سلول‌های اپیتلیال موضعی نقش داشته باشند(۱۰و۹). در حقیقت، علاقه فعلی به جایگزینی پروتئین حیوانی با پروتئین گیاهی ممکن است باعث کاهش مصرف B12 در آینده شود(۱۱)، بنابراین، کمبود ویتامین B12 را می‌توان با غنی سازی محصولات گیاهی با استفاده از روش‌های طبیعی مانند تخمیر و تولید ویتامین B12 توسط میکروارگانیسم‌های غذایی جبران کرد (۱۲). *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی* یک باکتری شناخته شده است که می‌تواند ویتامین B12 را به راحتی سنتز کند(۱۳). استفاده از *پروپیونی باکتریو م فرودنریچی* در محصولات مبتنی بر غلات (مانند نان) به بهبود ماندگاری محصول کمک می‌کند(۱۵و۱۴). مطالعه اخیر به منظور بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف اسید فولیک بر پارامترهای فیزیکوشیمیایی دما و pH و همچنین اندازه‌گیری غلظت آنزیم‌های کاتالاز واسکوربات پراکسیداز *درپروپیونی باکتریوم فرودنریچی* به منظور تولید بهتر و بیشتر ویتامین B12 و همچنین بررسی میزان تولید ویتامین B12 با توجه به وزن خشک باکتری انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

باکتری *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی* PTCC (1647)، از مرکز قارچ و باکتری‌های سازمان تحقیقات علمی ایران خریداری شد. باکتری‌ها در شرایط بی هوازی بر روی محیط کشت لاکتات سدیم (Smachme Chemical)حاوی ۱۰g/l کازئین پپتون-تریپتیک (Merck,

1. shermanii
2. freudenreichii
3. *Propionibacterium Tunner*
4. *Propionibacterium Probionici*
5. *Propionibacterium Acnes*
6. S-adenosyl metionion

www.SID.ir

Archive of SID

(Germany)، عصاره مخمر ۵g/l (Merck, Germany)، ۱۰g/l لاکتات (Sigma-Aldrich) و ۱۰۰۰ ml آب دیونیزه شده در۳۰C° به مدت ۳ روز انکوبه شدند. سپس باکتری به محیط کشت پیش کشت حاوی ۲۰۰ g/l آب گوجه فرنگی فیلترشده، ۱۰g/l عصاره مخمر، ۱۰۰ g/l تریپتون (Biolife) منتقل شد و به مدت ۲ روز در دمای ۳۰C° نگهداری شد(۱۷و۱۶). در مرحله بعد باکتری به محیط پیش کشت ۲ حاوی ۲۰ g/l ذرت خیس شده و ۹۰ g/l گلوکز(جهت افزایش سرعت رشد باکتری) منتقل شد. پس از تلقیح باکتری، ظروف در دمای ۳۰C° به مدت۲۴h بدون هوادهی انکوبه شدند. پس از آن اسید فولیک باغلظت‌های مختلف (۳۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ mg/l) به محیط تخمیر اضافه شد و به مدت ۴ روز در دمای۳۰C° در شرایط بی هوازی نگهداری شد.

تعیین pH بهینه در غلظت‌های مختلف اسید فولیک

باکتری‌ها در محیط لاکتات سدیم با pHهای مختلف (۵، ۶/۶ و۹) کشت داده شدند. سپس جذب نوری محیط حاوی باکتری‌ها در۶۰۰nm بررسی شد(UV-spectrophotometer .Shimadzu-Japan- model: UV-2550) (۱۹ و۱۸). غلظت ۰ اسید فولیک به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

تعیین دمای مطلوب در غلظت‌های مختلف اسید فولیک

برای مطالعه تنش حرارتی، لوله‌های حاوی محیط کشت به مدت ۷۲h در دمای ۲۵ C°، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ انکوبه شدند و جذب نوری آن‌ها در۶۰۰ nm بررسی شد. غلظت ۰ اسید فولیک به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری فعالیت آسکوربات پراکسیداز

محلول واکنش آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX-EC 1.11.1.1) شامل ۵۰m/mol بافر فسفات (pH ۷ =) حاوی ۰/۲ m/mol EDTA و ۵۰ µl از محلول ۲۰۰m/mol پراکسید هیدروژن بود. ۹۰۰µl از محلول واکنش با ۵۰µl عصاره آنزیم مخلوط شد و میزان جذب UVدر۲۹۰nmدر زمان۶۰S بررسی شد. یک واحد از فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بر اساس سرعت اکسیداسیون ۱ µM/min آسکوربیک اسید در دمای ۲۵ C° بیان شد. فعالیت آنزیم با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۲۱ و۲۰).

$$(\Delta OD/\Delta t) \times V) / (\varepsilon \times v \times p)$$

در رابطه بالا ΔOD اختلاف جذبUV، Δt اختلاف دما، V حجم عصاره آنزیمی،v حجم بافر، p غلظت پروتئین و ε ضریب خاموشی (۲/۸Mm/cm) است.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT-Ec 1.11.1.6)

مقدار ۹۵۰µl از مخلوط واکنش حاوی ۹۰۰µl بافر فسفات ۵۰µl (pH = ۷) و H_2O_2 ۵۰µl (۲۰۰m/mol) با ۵۰µl عصاره آنزیم باکتریایی مخلوط شد. تعیین فعالیت کاتالاز براساس میزان مصرف H_2O_2 (ضریب خاموشی، Mm/cm ۴/۳۹) در۲۴۰nm، (فواصل بیش از ۶۰ S در دمای C° ۲۵) و براساس منحنی استاندارد جذب ۰ تا ۱۱ m/mol H_2O_2 انجام شد(۲۲-۲۴).

بررسی اثر غلظت‌های متفاوت اسید فولیک بر تولید ویتامین B12 در شرایط بی هوازی

باکتری‌ها در محیط کشت تخمیر با pH=۷ به مدت ۸۰h در دمای ۳۰ C° در جار بی هوازی انکوبه شدند. سپس اسید فولیک در غلظت‌های(۰mg/l، ۲۵۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰) به محیط‌های کشت اضافه شد و به مدت ۴ روز در دمای۳۰C° نگهداری شدند.

بررسی اثر غلظت‌های متفاوت اسید فولیک بر تولید ویتامین B12 در شرایط هوازی

پروپیونی باکتریوم فرودنریچی ابتدا در شرایط بی هوازی کشت داده شد سپس به منظور ایجاد فاز هوازی، محیط‌های کشت از جار بی هوازی خارج، و بدون در پوش، به مدت ۷۲h بر روی شیکر با دور ۱۳۲rpm قرار داده شد.

اندازه‌گیری وزن خشک باکتری

محیط‌های کشت باکتری حاوی غلظت‌های مختلف اسیدفولیک (۰،۲۵۰،۷۵۰mg/l و ۱۰۰۰)، در۶۰۰۰rpm و در دمای۴C° به مدت۱۰minسانتریفوژ شدند. رسوب حاصل

www.SID.ir

Archive of SID

دوبار با آب مقطر شستشو داده شد و سپس در آون و تحت دمای ۷۰C° به مدت ۴۸ h خشک شدند. وزن نهائی آن‌ها توسط ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد (۲۵).

جداسازی و خالص‌سازی ویتامین B12

محیط‌های کشت در دمای ۱۲۰C° به مدت ۲۰min اتوکلاو شدند تا سلول‌های باکتری از بین بروند، سپس سیانید پتاسیم به صورت(v/w) ۱درصد درصد به آن‌ها اضافه شد. پس از هم زدن، ۲/۵ ml اسید استیک گلاسیال ونیترات سدیم (v/w) ۸درصد درصد به عصاره‌ها اضافه شد و به مدت ۳۰min جوشانده شدند. سپس عصاره‌ها، با ۲۰µl سیانید سدیم ۱۰ درصد مخلوط، و از فیلتر میلی پور۰۴۵m/µ عبورداده شدند (۲۶ و۱۹). میزان ویتامین تولیدی به وسیله دستگاهHPLC باستون C۱۸ به طول cm ۲۵ ودرطول موج ۲۵۴ nm اندازه‌گیری شد. فاز متحرک از (۰/۰۲M) KH_2PO_4 و متانول با نسبت (v/v)۷۰:۳۰ تهیه شد (۲۷). از ویتامین B12خریداری شده از شرکت مرک به عنوان استاندارد استفاده شد.

تحلیل آماری

میانگین مقادیر بر اساس اندازه گیری سه تکرار بدست آمد و کلیه اندازه گیری‌ها بر اساس آزمون‌های دامنه چندگانه دانکن (SPSS19) انجام شد و مرز معنی دارد درسطح $p \leq ۰/۰۵$ قرار داده شد.

نتایج

بررسی‌ها در pH=(۶،۹/۵،۶) انجام شد. هیچ جذب UVدرpH:۵ و pH: ۹ وجود نداشت و نتایج نشان داد که pH بهینه برای رشد باکتری برابر با ۶/۶ در غلظت ۲۵۰mg/l اسید فولیک بود. با افزایش غلظت اسید فولیک، میزان جذب کاهش یافته و کمترین میزان جذب در ۱۰۰۰mg/lاسید فولیک بود. در جدول ۱، رشد باکتری در غلظت‌های مختلف اسید فولیک در pH های(۵، ۶/۶، ۹) نشان داده شده است.

همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده، در دمای C° ۲۵، بهترین رشد باکتری در غلظت ۲۵۰mg/lاسیدفولیک بود و از نظر آماری در سطح P≤۰/۰۵ بالاتر از گروه کنترل بود، اما بقیه غلظت‌ها با شاهد تفاوت معنی داری در سطح ≤۰/۰۵ Pنداشتند. در دمای ۳۰C°، میزان رشد باکتری در همه‌ی غلظت‌های اسید فولیک تفاوت معنی داری در سطح ≤۰/۰۵ Pنداشتند و بالاتر از گروه کنترل بودند. در غلظت‌های ۳۰، ۲۵۰ و ۱۰۰۰mg/l اسید فولیک در C° ۴۰ ، باکتری ها بیشترین سرعت رشد ر اداشتند و از نظر آماری تفاوت معنی داری در سطح p≤۰/۰۵ نداشتند. در دمای ۵۰C°، رشد باکتری‌ها در همه غلظت‌ها به جز /۱۰۰۰mg بالاتر از گروه کنترل بود. بنابراین بهترین دما برای رشد باکتری‌ها ۴۰C° و بهترین غلظت۲۵۰mg/l اسید فولیک بود.

فعالیت آسکوربات پراکسیداز با کاهش غلظت اسید فولیک افزایش، و با افزایش غلظت اسید فولیک کاهش یافت. همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، فعالیت آنزیم در غلظت ۰ و ۲۵۰ mg/l اسید فولیک به طور معنی داری افزایش یافته در حالی که فعالیت آسکوربات پراکسیداز با افزایش غلظت اسید فولیک در ۷۵۰ mg/l و ۱۰۰۰ اسید فولیک به طور قابل توجهی کاهش یافته است(p≤۰/۰۵).

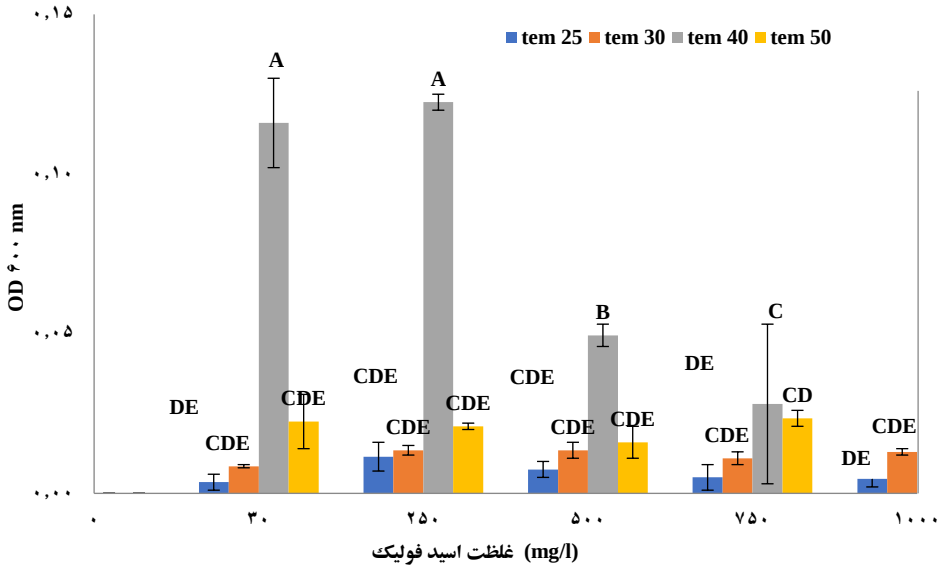
در مطالعه فعالیت کاتالاز در غلظت‌های مختلف اسید فولیک (۰، ۲۵۰، ۷۵۰ و۱۰۰۰ mg/l) در *پروپیونی باکتریوم*

جدول ۱. نمودار رشد باکتری ها در غلظت‌های مختلف اسید فولیک در **pH** های مختلف میانگین سه تکرار با احتساب خطای استاندارد (حروف غیر مشترک بیانگر اختلاف معنی دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن (**P≤۰/۰۵**) است) و از غلظت ۰ اسید فولیک به عنوان گروه کنترل استفاده شد.

فولیک اسید (mg/mL) pH	۰	۳۰	۲۵	۵۰۰	۷۵۰	۱۰۰۰
۵	۰^{aA}	۰^{aC}	۰^{aB}	۰^{aB}	۰^{aB}	۰^{aB}
۶/۶	۰^{bA}	۰/۰۰۲^{abA}	۰/۰۰۴۵^{aA}	۰/۰۰۳۰^{abA}	۰/۰۰۳۰^{abA}	۰/۰۰۱^{bA}
۹	۰^{aA}	۰/۰۰۱^{aB}	۰^{aB}	۰^{aB}	۰^{ab}	۰^{aB}

www.SID.ir

Archive of SID



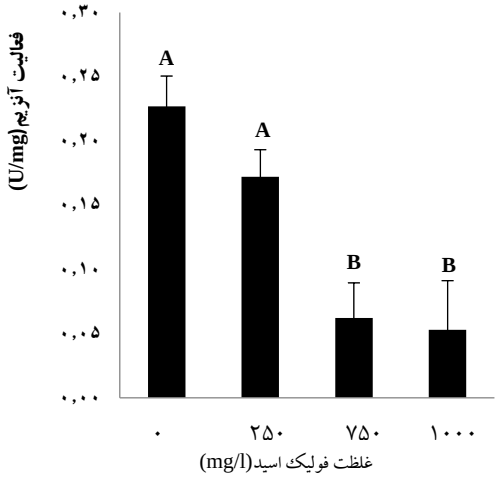
شکل ۱. نمودار رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف اسیدفولیک در دماهای C°۲۵،۳۰،۴۰،۵۰. میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد (حروف غیر مشترک بیانگر اختلاف معنی دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن ($p\leq ۰/۰۵$) است) و از غلظت ۰ اسید فولیک به عنوان گروه کنترل استفاده شد.

فرودنریچی، در شرایط هوازی، فعالیت کاتالاز با افزایش غلظت اسید فولیک کاهش یافت. این کاهش فعالیت در ۷۵۰ mg/l اسید فولیک معنی‌دار نبود ($p\leq ۰/۰۵$)، اما در غلظت ۱۰۰۰ mg/l قابل توجه بود. فعالیت آنزیم در گروه کنترل نسبت به غلظت۱۰۰۰ mg/l اسید فولیک تقریباً دو برابر افزایش داشت و در غلظت ۰ و ۲۵۰mg/l، فعالیت ۶/ ۲برابر بیشتر از غلظت ۱۰۰۰mg/l بود. بنابراین، مشخص شد که غلظت بالای اسید فولیک باعث مهار فعالیت آنزیم کاتالاز و کاهش رشد باکتری‌ها می‌شود. تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدفولیک بر فعالیت کاتالاز در شکل ۳نشان داده شده است.

نتایج حاصل از HPLC (شکل۴) برای بررسی میزان تولید ویتامین B12 در وزن خشک باکتری در شرایط بی هوازی نشان داد که غلظت ۷۵۰mg/l از اسید فولیک بالاترین میزان (۰/۰۰۶۵mg/l) را داشت و غلظت‌های ۷۵۰mg/l و ۱۰۰۰ از اسید فولیک اختلاف معنی داری به لحاظ آماری در سطح $p\leq ۰/۰۵$ نداشتند. اختلاف غلظت‌های ۷۵۰ mg/l و ۲۵۰ از اسید فولیک و گروه کنترل از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p\leq ۰/۰۵$).

تولید ویتامین B12 در وزن خشک باکتری تحت شرایط هوازی

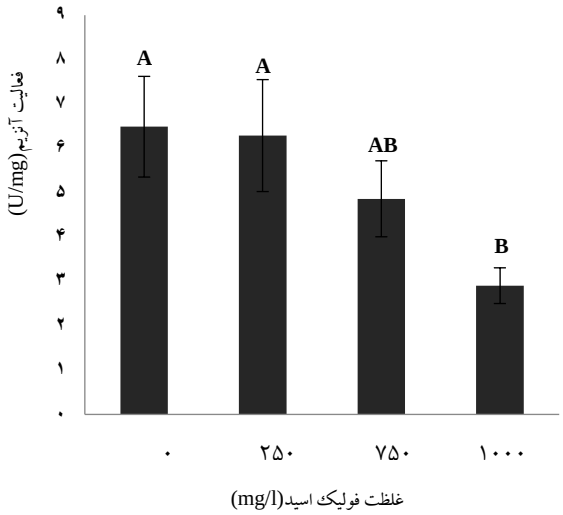
نتایج حاصل از HPLC (شکل۵) نشان داد میزان تولید ویتامین B12 در وزن خشک باکتری و د رشرایط هوازی، در غلظت ۷۵۰ mg/l از اسید فولیک، ۰/۰۲۷ درصد افزایش



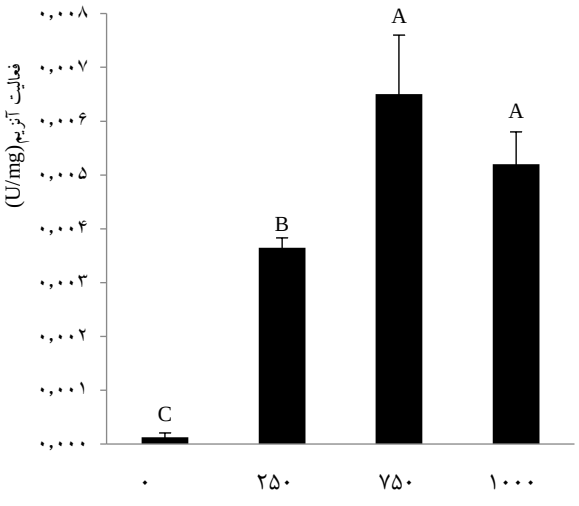
شکل ۲. نمودار فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در غلظت‌های مختلف اسیدفولیک. میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد (حروف غیر مشترک بیانگر اختلاف معنی دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن($p\leq ۰/۰۵$) است) و از غلظت ۰ اسید فولیک به عنوان گروه کنترل استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

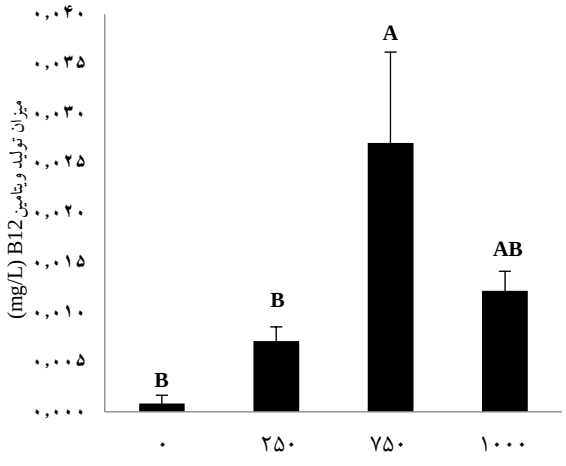


شکل ۳. نمودار فعالیت کاتالاز در غلظت‌های مختلف اسیدفولیک. میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد (حروف غیر مشترک بیانگر اختلاف معنی دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن ($p\leq ۰/۰۵$) است) و از غلظت ۰ اسید فولیک به عنوان گروه کنترل استفاده شد.



شکل۴. مقایسه اثر غلظت‌های متفاوت اسیدفولیک بر میزان تولید ویتامین B12 در وزن خشک باکتری تح تشرایط بی هوازی میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد حروف غیر مشترک بیانگر اختلاف معنی دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن ($p\leq ۰/۰۵$) است و از غلظت ۰ اسید فولیک به عنوان گروه کنترل استفاده شد.

داشت. این افزایش در غلظت‌های ۷۵۰ mg/l و ۱۰۰۰ از اسید فولیک به لحاظ آماری در سطح $p\leq ۰/۰۵$ معنی دار نبود در



شکل۵. مقایسه اثر غلظت‌های متفاوت اسید فولیک بر میزان تولید ویتامین B12 در وزن خشک باکتری تحت شرایط هوازی میانگین سه تکرار ± خطای استاندارد (حروف غیر مشترک بیانگر اختلاف معنی دار بین تیمارها بر اساس آزمون دانکن ($p\leq ۰/۰۵$).است و از غلظت ۰ اسید فولیک به عنوان گروه کنترل استفاده شد.

حالی که در گروه کنترل و غلظت‌های ۲۵۰ mg/l و ۷۵۰ از اسید فولیک به لحاظ آماری معنی داربود. همچنین اختلاف معنی داری به لحاظ آماری در غلظت گروه کنترل غلظت ۲۵۰mg/l از اسید فولیک مشاهده نشد($p\leq ۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات نشان داده‌اند که میکروب‌ها اقدامات محافظه کارانه‌ای برای جلوگیری از سمیت ایجاد شده توسط گونه‌های اکسیژن فعال درونزا (ROS)[1] به دست آورده‌اند(۲۸). افزایش سطح د[2]اخل سلولی این اکسیدآن‌ها، به ویژه سوپراکسید (O_2^-) و پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) آنزیمی را ایجاد می‌کند که از آسیب رسیدن به رشد سلول و DNA جلوگیری می‌کند. گلوتاتیون، آسکوربات و ویتامین E اغلب برای از بین بردن ROS به کشت‌های باکتریایی اضافه می‌شوند. این ترکیبات آنتی اکسیدان‌های طبیعی در سیستم‌های پستانداران هستند. گلوتاتیون کاهش دهنده گلوتاتیون پراکسیداز است و پاک کننده‌های H_2O_2و

[1]. Reactive oxygen species

www.SID.ir

Archive of SID

آسکوربات پراکسیداز کاهش دهنده آسکوربات هستند(۲۹). سوپر اکسید دیسموتاز بخشی از سیستم دفاعی موجودات هوازی است که از آن‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند(۳۱ و ۳۰) و بعنوان کاتالیزور برای تبدیل آنیون سوپر اکسید(O_2^-) به O_2 و H_2O_2 عمل می‌کند و سپس توسط کاتالاز، H_2O_2 به H_2O کاهش می یابد (۳۲). بنابراین به نظر می رسد که سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز تجمع گونه‌های اکسیژن فعال را محدود می‌کنند. باکتری‌های محیطی از منابع مختلف درگیر استرس اکسیداتیو هستند. گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در طول رشد هوازی میکروبی و همچنین در شرایط استرس در سلول‌ها تولید می‌شوند و به عنوان یک محصول فرعی متابولیسم سلولی طبیعی هستند(۳۳). آسکوربات پراکسیداز میل بیشتری به H_2O_2 نسبت به کاتالاز دارد و H_2O_2 را به H_2O با استفاده از آسکوربات، به عنوان یک دهنده الکترونی خاص، تبدیل می‌کند(۳۴).

به طور کلی، مطالعه شرایط محیطی برای رشد باکتری‌ها و میزان تولید موادی مانند ویتامین B12، مهم به نظر می رسد. B12 یا کوبالامین یک ویتامین محلول در آب است که بر عملکرد طبیعی مغز و سیستم عصبی تأثیر می‌گذارد و همچنین در شکل‌گیری خون و در متابولیسم سلول‌های بدن انسان بویژه در سنتز DNA نقش دارد. B12 بزرگترین و پیچیده ترین ویتامین موجود از نظر ساختار ی است و تنها راه تولید صنعتی می تواند از طریق تخمیر باکتری‌ها باشد (۳۵). تحمل استرس یک ویژگی مهم عملکردی باکتری‌های پروبیوتیکی است. یک مطالعه نشان داد که پروپیونی باکتریوم فرودنریچی منبع کربن و pH خنثی را در محیط‌های حاوی همه فاکتورهای رشد ترجیح می دهد(۳۶). مطالعات قبلی نشان می‌دهد که پیش درمانی می‌تواند تحمل در *پروپیونی باکتریو م فرودنریچی* را افزایش دهد(۳۷-۴۰). در یک مطالعه مشابه، گونه‌های مختلف *سودوموناس آئروژینوزا*[1] در معرض pH و دماهای مختلف قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بیشترین سرعت رشد در دمای ۳۰C° و pH:۷/۵ بود(۴۱).

این مطالعه با هدف بررسی تأثیر پارامترهای دما و pH و سنجش آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز با حضور غلظت‌های (۰ mg/l، ۲۵۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰) اسید فولیک بر *پروپیونی باکتریوم فرودنریچی* برای تولید بیشتر و بهتر ویتامین B12 انجام شد. افزودن ذرت به محیط کشت باکتری می تواند باعث افزایش تولید ویتامین B12 و فولات موجود در باکتری و بهبود روند تخمیر شود. بررسی پارامترهای دما و pH به همراه افزودن غلظت‌های مختلف فولات به محیط کشت باکتریایی نشان داد که pH بهینه برای رشد باکتری و تولید ویتامین B12 برابر ۶/۶ و دمای مطلوب ۴۰C°-۲۵ است و در غلظت‌های بالای فولات رشد باکتری کاهش می یابد. این مطالعه همچنین نشان داد که با افزایش غلظت اسید فولیک، فعالیت آسکوربات پراکسیداز کاهش می‌یابد. فعالیت آنزیم در غلظت ۰ و ۲۵۰ mg/l اسید فولیک افزایش داشت، در حالی که فعالیت آسکوربات پراکسیداز با افزایش غلظت اسید فولیک در ۷۵۰ mg/l و ۱۰۰۰ کاهش داشت. فعالیت کاتالاز در *پروپیونی باکتریوم*، در شرایط هوازی با افزایش غلظت اسید فولیک به طور قابل توجهی کاهش یافت. بنابراین، غلظت بالای اسید فولیک فعالیت کاتالاز را مهار می‌کند. نتایج حاصل از HPLC نشان داد که هم در شرایط هوازی و هم در شرایط بی هوازی بالاترین میزان تولید ویتامین B12 در وزن خشک باکتری در غلظت ۷۵۰ mg/l از اسید فولیک بود. با افزایش غلظت اسید فولیک (۱۰۰۰mg/l) تولید ویتامین B12 در وزن خشک باکتری کاهش یافت. به نظرمی رسد اسید فولیک در غلظت بالاتر (>۷۵۰) در نقش توکسین در تولید ویتامین B12 عملکرده است. در شرایط هوازی در مقایسه با شرایط بی هوازی مقدار تولید ویتامین B12 در وزن خشک حدود ۴/۵ برابر افزایش داشته که نشان دهنده‌ی اثر مثبت حضور اکسیژن در مقایسه با عدم حضور اکسیژن در تولید ویتامین B12 در وزن خشک باکتری می‌باشد. نتایج تقویت کننده این فرضیه است که اکسیژن به عنوان یک ترکیب ضروری در تولید ساختار

[1] Pseudomonas aeruginosa

www.SID.ir

Archive of SID

حلقوی دی متیل بنزایمیدازول د *رپروپیونی باکتریوم* عمل می‌کند. به نظر می‌رسد حضور اکسیژن سنتز دی متیل بنز ایمیدازول که یک ترکیب ضروری در تولید ویتامین B12 است را تقویت کند (۴۳ و۴۲).

منابع

1. Patrick, Sheila, and Andrew McDowell. Propionibacterium. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.2015; 1-29.

2. Hesari, J., M. R. Ehsani, and P. L. H. McSweeney. The influence of whey proteins on peptidase activities of Lactococcus lactis spp. cremoris AM1.Milchwissenschaft.2006; 316-318.

3. Bojar, Richard A., and Keith T. Holland. Acne and Propionibacterium acnes. Clinics in dermatology.2004; 375-379.

4.Rust, Susanne. UC Berkeley Bacteria Study: Research Shows Humans a Major Source of Germs. Huffington Post. San Francisco. 2012.

5. Mantere-Alhonen, S. Propionibacteria used as probiotics-A review. Le Lait.1995; 447-452.

6.Kiatpapan, Pornpimon, and Yoshikatsu Murooka. Genetic manipulation system in propionibacteria. Journal of bioscience and bioengineering.2002; 1-8.

7. Selhub, Jacob. Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism. The journal of nutrition, health& aging.2002; 39-42.

8. Hill, M. J. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation.1997; S43-5.

9. Said, Hamid M., and Zainab M. Mohammed. Intestinal absorption of water-soluble vitamins: an update. Current opinion in gastroenterology.2006; 140-146.

10. Ichihashi, Teruhisa, Yasushi Takagishi, Kiyohisa Uchida, and Hideo Yamada. Colonic absorption of menaquinone-4 and menaquinone-9 in rats. The Journal of nutrition.1992; 506-512.

11. Elmadfa, Ibrahim, and Ingrid Singer. Vitamin B-12 and homocysteine status among vegetarians: a global perspective. The American journal of clinical nutrition.2009; 1693S-1698S.

12. Chamlagain, Bhawani, Tessa A. Sugito, Paulina Deptula, Minnamari Edelmann, Susanna Kariluoto, Pekka Varmanen, and Vieno Piironen. In situ production of active vitamin B12 in cereal matrices using Propionibacterium freudenreichii. Food science & nutrition.2018; 67-76.

13. Thierry, Anne, Stéphanie-Marie Deutsch, Hélène Falentin, Marion Dalmasso, Fabien J. Cousin, and Gwenael Jan. New insights into physiology and metabolism of Propionibacterium freudenreichii. International journal of food microbiology.2011; 19-27.

14. Suomalainen, T. H., & Mäyrä-Makinen, A. M. Propionic acid bacteria as protective cultures infermented milks and breads. Le Lait. 1999;165–174.

15. Tinzl-Malang, Saskia Katharina, Peter Rast, Franck Grattepanche, Janice Sych, and Christophe Lacroix. Exopolysaccharides from co-cultures of Weissella confusa 11GU-1 and Propionibacterium freudenreichii JS15 act synergistically on wheat dough and bread texture. International journal of food microbiology.2015; 91-101.

16. Li, Kun-Tai, Dong-Hong Liu, Yong-Liang Li, Ju Chu, Yong-Hong Wang, Ying-Ping Zhuang, and Si-Liang Zhang. Improved large-scale production of vitamin B12 by Pseudomonas denitrificans with betaine feeding. Bioresource technology.2008; 8516-8520.

17. Khan, M. Mazharuddin, Naiman Ali Mir, and M. Munawer Khan. Production of vitamin B12 by improved strains of Propionibacterium freudenreichii. Biotechnol Bioinf Bioeng. 2011;19-24.

18. Gardner, N., and C. P. Champagne. Production of Propionibacterium shermanii biomass and vitamin B12 on spent media. Journal of applied microbiology. 2005; 1236-1245.

19. Hettinga, D. H., and G. W. Reinbold. THE PROPIONIC-ACID BACTERIA–A REVIEW: II. METABOLISM.Journal of Milk and Food Technology.1972; 358-372.

20. Kyle, D. J. The biochemical basis for photoinhibition of photosystem II. In. Photoinhibition (Edited by DJ Kyle, CB Osmond and CJ Arntzen). 1987; 197-226.

21. Welinder, Karen G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. Current Opinion in Structural Biology.1992; 388-393.

22. Aebi, H. I. Methods of enzymatic analysis. Catalase.1983; 673-686.

www.SID.ir

Archive of SID

Thangavel, Gurumayum Devmanjuri Devi, Palanisamy Vasudhevan, Adriano Sofo, Nafees A. Khan, Amarendra Narayan Misra, Alexander S. Lukatkin, Harminder Pal Singh, Eduarda Pereira1, Narendra Tuteja11, Catalase and ascorbate peroxidase—representative H2O2-detoxifying hemeenzymes in plants. Environ Sci Pollut Res.2016;23, 19, 19002–19029.

35. Anil Batta, Vitamin B12 and its Importance for Survival.JARIIE.2015; 1(5): 816

36. Jardin, Julien, Houem Rabah, Valérie Briard-Bion, and Gwénaël Jan. "Emmental cheese environment enhances Propionibacterium freudenreichii stress tolerance. Plos One. 2015.

37. Leverrier, Pauline, Diliana Dimova, Vianney Pichereau, Yanick Auffray, Patrick Boyaval, and Gwénaël Jan. Susceptibility and adaptive response to bile salts in Propionibacterium freudenreichii: physiological and proteomic analysis. Environ. Microbiol.2003; 3809-3818.

38. Jan, Gwénaël, Pauline Leverrier, Vianney Pichereau, and Patrick Boyaval. Changes in protein synthesis and morphology during acid adaptation of Propionibacterium freudenreichii. Appl. Environ. Microbiol.2001; 2029-2036.

39. Leverrier, Pauline, Johannes PC Vissers, Annette Rouault, Patrick Boyaval, and Gwénaël Jan. "Mass spectrometry proteomic analysis of stress adaptation reveals both common and distinct response pathways in Propionibacterium freudenreichii. Archives of microbiology.2004; 215-230.

40. Anastasiou, Rania, Pauline Leverrier, Ioannis Krestas, Annette Rouault, George Kalantzopoulos, Patrick Boyaval, Effie Tsakalidou, and Gwénaël Jan. Changes in protein synthesis during thermal adaptation of Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii. International journal of food microbiology.2006; 301-314.

41. Safdarian, M., H Askari, MS Najafabadi, G Nematzadeh.Identification of halophile bacteria from salt deserts of Iran and study some of their physiological traits", journals.ui.ac.ir. 2017;45-57

42. Rehm S, Gross G, Pierce A. Early bacterial clearance from murine lungs. Species-dependent phagocyte response. The J Clin Invest.1980; 66:194-199.

43.Arasu MV, Sarkar R, Sekar BS, Kumar V, Rathnasingh C, Song H, Park S. " Isolation of a novel Pseudomonas species SP2 producing vitamin B12under aerobic condition". Biotechnol Bioproc E 18.2013; 43-51.

23. Lück, Hans. "Catalase.In Methods of enzymatic analysis. Academic Press.1965; 885-894.

24. Bauerfeind, P., R. Garner, B. E. Dunn, and H. L. Mobley. Synthesis and activity of Helicobacter pylori urease and catalase at low pH. Gut.1997; 25-30.

25. Hirao T, Nakano T, Azuma T, Sugimoto M, Nakanishi T. L-Lysine production in continuous culture of an L-lysine hyperproducing mutant of Corynebacterium glutamicum. Applied microbioloand biotechnol.1989; 269-73.

26. Li KT, Liu DH, Li YL, Chu J, Wang, YH, Zhuang, YP, Zhang SL. Improved large-scale production of vitamin B12 by Pseudomonas denitrificans with betaine feeding. Bioresource technol. 2008;8516-8520.

27.Kacperzak MM, Lewadowska I, Matthews RG, Paszewski A. Transcriptional regulation ofmethionine synthase by homocysteine and cholinein Aspergillus nidulans. Bioche. 2008; 376:517-524

28. Imlay, James A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. Nature Reviews Microbiology.2013; 443.

29. Imlay, James A. "Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think." Current opinion in microbiology. 2015;124-131.

30. Lehmann, Yvan, Leo Meile, and Michael Teuber. Rubrerythrin from Clostridium perfringens: cloning of the gene, purification of the protein, and characterization of its superoxide dismutase function. Journal of bacteriology.1996; 7152-7158.

31. Gerlach, Dieter, Werner Reichardt, and Stefan Vettermann. Extracellular superoxide dismutase from Streptococcus pyogenes type 12 strain is manganese-dependent. FEMS microbiology letters.1998; 217-224.

32. Jung, S. "Expression level of specific isozymes of maize catalase mutants influences other antioxidants on norflurazon-induced oxidative stress." Pesticide biochemistry and physiology.2003; 9-17.

33. Yao, Xiao-Hua, Hang Min, and Zhen-Mei Lv. Response of superoxide dismutase, catalase, and ATPase activity in bacteria exposed to acetamiprid. Biomedical and Environmental Sciences.2006; 309.

34. Naser A. Anjum, Pallavi Sharma, Sarvajeet S. Gill, Mirza Hasanuzzaman, EkhlaqueA. Khan, KiranKachhap, Amal A. Mohamed, Palaniswamy

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of the role of different concentrations of folic acid on ascorbate peroxidase activity, catalase, temperature and pH variations and vitamin B12 production in *Propionibacterium freudenreichii*

Sahar Parchizadeh[1], Mohammad Fazilati[1], Hossein Salavati[1], **Behrooz Salehi Eskandari**[*2], Habibollah Nazem[1]

[1] Department of Chemistry, Payame Noor University of Isfahan, Isfahan, Iran
[2] Department of Biology, Payame Noor University of Isfahan, Iran

Abstract

Propionibacterium, a gram-positive, anaerobic to micro-aerobic and rod-shaped bacterium, belongs to the propionic bacterial family. *Propionibacteria* are involved in the production of vitamin B12. The aim of this study was to evaluate the effect of physicochemical parameters (temperature and pH) as well as measurement of ascorbate peroxidase and catalase enzyme concentrations and to investigate changes in vitamin B12 production at different concentrations of folic acid in *Propionibacterium freudenreichii*. *Propionibacterium freudenreichii*was cultured in fermented medium containing corn and various concentrations of folic acid. The results showed that the optimum pH for the bacterial growth was 6.6 and the optimum bacterial growth at 25-40 °C. Addition of folic acid at low concentrations to the media of *Propionibacterium freudenreichii*increased UV absorption at 600 nm. High folic acid concentrations were found to decrease growth rate, indicating a negative effect of folic acid on bacterial growth. Catalase and ascorbate peroxidase activity was also determined based on H_2O_2 consumption at 240 and 290 nm. Due to the increase in folic acid concentration, the activity of catalase and ascorbate peroxidase was significantly reduced in this bacterium. Also in the study of vitamin B12 production, considering the bacterial dry weight, using HPLC in anaerobic and aerobic conditions, it was found that the maximum production of vitamin B12 in 750 mg/l folic acid under aerobic conditions. As the concentration of folic acid increased by up to 1000 mg/L, vitamin B12 production decreased.

Keywords: Ascorbate peroxidase, Catalase, Folic acid, *Propionibacterium freudenreichii*, Vitamin B12

* behsalehi@pnu.ac.ir

www.SID.ir