Archive of SID

بررسی امکان ایجاد شرایط بهینه رشد لاکتوباسیل پلانتازوم برای تولید بیشتر باکتریوسین آن

دکتر جمیله نوروزی

چکیده

سابقه و هدف: باکتریهای لاکتیک آغازگر تولید تعداد زیادی از غذاهای تخمیری انسان و حیوان هستند. این باکتری ها در بهبود بافت طعم فرآورده‌های غذایی دخالت کرده و نقش عمده‌ای را نیز در جلوگیری از رشد ارگانیزم های فاسدکننده غذا به عهده دارند. باکتریوسین، یکی از مهمترین مواد بازدارنده طبیعی است که توسط لاکتوباسیل پلانتاروم تولید می‌شود. هدف از این بررسی، تعیین بهترین شرایط رشد لاکتوباسیل پلانتاروم برای تولید بیشتر باکتریوسین آن بوده است.

مواد و روش‌ها: تحقیق به روش exploratory انجام شد. مقداری سوسیس و کالباس به طور تصادفی از کارخانه‌های مختلف خریداری شد. یک گرم از آن را در سرم فیزیولوژی سائیده و پس از رقت در محیط MRS کشت داده شد. باکتریها با تست های کاتالاز، اکسیداز و تست تخمیر قندها شناسایی شدند. رشد این باکتریها در حرارتها، pHها و محیط کشت های مختلف بررسی شد. بیشترین اثر بازدارندگی مایع سطحی کشت این باکتریها بر روی تعدادی از باکتریهای گرم‌مثبت و گرم‌منفی در حرارتها، pHها و محیط های مختلف به روش بلانک دیسک و نقطه‌گذاری نیز تعیین گردید.

یافته‌ها: از ۱۵ نمونه سوسیس و کالباس، در۴مورد لاکتوباسیل پلانتاروم جدا شد. حرارت مناسب رشد آنها ۲۵ درجه سانتیگراد در pHها حدود ۴/۸ تا ۶/۴ در محیط کشت پایه (MRS) همراه با گلوکز ۲٪ بود. خاصیت ضدمیکروبی آنها در حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه پایدار بود و به وسیله آلفا آمیلاز و لیزوزیم تغییر نکرد. این باکتریها در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد، بیشترین اثر بازدارندگی را در برابر استافیلوکوک (۲۰ میلی‌متر) و لیستریا (۱۴٪ میلی‌متر) داشتند. بهترین شرایط برای تولید هاله عدم رشد، محیط کشت پایه (MRS) همراه با گلوکز ۲٪ در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد و pH حدود ۴/۸ تا ۶/۴ بود. اثر بازدارندگی باکتریوسین (پلانتاریسین) این باکتریها، پس از حرارت دادن مایع سطحی به مدت ۱۰ دقیقه پایدار بود و حتی اثر آن کمی بیش از حالت قبل از حرارت بود.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: پایداری خاصیت ضدمیکروبی آنها در برابر حرارت بسیار سودمند است. زیرا در بسیاری از مراحل تهیه غذا به حرارت نیاز می‌باشد. از کشت های آغازگر مناسب برای تولید مواد ضدمیکروبی قوی در غذاهای تخمیری توصیه می‌شود. با ایجاد تغییرات ژنتیکی می‌توان لاکتوباسیل‌هایی به دست آورد که باکتریوسین بیشتری تولید کنند.

واژگان کلیدی: لاکتوباسیل پلانتاروم، باکتریوسین، باکتریهای لاکتیک

۱- عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تولید مواد آنتاگونیستی توسط باکتریهای لاکتیک، مدتهاست که شناخته شده است. اولین مورد به وسیله **Rogers** در سال ۱۹۲۸ گزارش شد که فعالیت آنتاگونیستی لاکتوباسیل لاکتیس را در برابر لاکتوباسیل بولگاریکوس نشان داد (۱). بعدها مشخص شد که این ماده از جنس پلی پپتید بوده و نیسین (**Nisin**) نامیده شد (۲). طیف ضدباکتری نیسین به صورت اثر بازدارندگی آن بر روی استرپتوکوک، استافیلوکوک، گونه‌های مختلف باسیلوس، کلوستریدیوم و لاکتوبسیل بوده است (۳). امروزه، نیسین به عنوان محافظت کننده غذا و اثر بازدارندگی آن بر روی رشد اسپور مجاز شناخته شده است (٤). ماده بازدارنده دیگری به نام دیپلوکوکسین در لاکتوباسیل لاکتیس زیرگونه **Cremoris** شرح داده شده است. فعالیت این ماده، طیف اثر باریکی داشته و فقط اثر بازدارندگی در برابر لاکتوباسیل‌های لاکتیس دارد (۵).

خصوصیاتی مانند فعالیت ضدتوموری و ضدکلسترول، واکنشهای شیمیایی احیای نیترات، بهبودی ایمنی فرد و کاهش اختلالات گوارشی را به مصرف فرآورده‌های تخمیری لبنیات نسبت داده‌اند (٦و۷). **Gillilan** و **Yap** در سال ۲۰۰۰، نوعی لاکتوباسیل (لاکتوباسیل لاکتیس نژاد (**RM25**) را به عنوان عامل نگهدارنده بیولوژیکی برای غذاهایی که در یخچال نگهداری می‌شوند گزارش کردند (۸). **Shah** در سال ۲۰۰۰، گزارش داد که برخی از باکتریهای پروبیوتیک مانند لاکتوباسیل کازه‌ای، لاکتوباسیل اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم برای سلامت انسان مفید هستند. این باکتریها به مقدار فراوان در لبنیات وجود دارند (۹). یکی از گونه‌های باکتریهای لاکتیک، لاکتوباسیل پلانتاروم است؛ ساپروفیتی که اغلب در ارتباط با گیاه و مواد تخمیری شده می‌باشد (۱۰). این باکتری در محافظت فرآورده‌های غذاهای تخمیری مانند سبزیجات (۱۱)، گوشت و فرآورده‌های گوشتی (۱۲)، شراب قرمز (۱۳)، سوسیس (۱٤و۱۵)، خمیر ترش (۱٦)، شیر (۱۷)، پنیر (۱۸)، خیار تخمیر شده (۱۹)، زیتون (۲۰). آناناس و عصاره گریپ فوروت (۲۱)، علوفه (۲۲و۲۳) و غیره، نقش عمده‌ای دارد. در برخی از موارد، لاکتوباسیل پلانتاروم به عنوان آغازگر کشت در طی تهیه غذا مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲٤). حال سئوال این است که بهترین شرایط رشد باکتریهای لاکتیک کدام است!؟ به منظور تعیین بهترین شرایط رشد لاکتوباسیل پلانتاروم برای تولید بیشتر باکتریوسین این تحقیق انجام شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق به روش اکسپلوراتوری انجام گرفت. جداسازی لاکتوباسیل با استفاده از روش **Rekhif** و همکارانش(۲۵) انجام شد. در این بررسی ، مقداری سوسیس و کالباس به طور تصادفی از کارخانه‌های مختلف خریداری شد. ابتدا یک گرم از نمونه در داخل هاون همراه با یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل سائیده شد. سپس ٤ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به آن اضافه گردید، به طوری که حجم کل آن، ۵ میلی‌لیتر شد و به مدت ۱۸ ساعت در حرارت اتاق نگهداری گردید. سپس از مایع سطحی آن رقتهای ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ تهیه گردید و یک میلی‌لیتر از هر کدام در محیط **MRS** حاوی آگار، کشت داده شد. شناسایی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدماتی لاکتوباسیل با انجام تست کاتالاز و اکسیداز انجام گرفت. سپس، با استفاده از تست تخمیر قندهای مختلف مانند گلوکز، لاکتوز، ساکارز، رایبوز، گالاکتوز، گزیلوز، آرابینوز، رافینوز، مانیتول و تستهای دیگری نظیر حرکت لاکتوباسیل پلانتاروم شناسایی گردید.

بهترین شرایط رشد این باکتری در pHهای ۲ تا ۱۲، ٤ تا ٤٥، محیط پایه (MRS) حاوی قندهای گوناگون شامل گلوکز، لاکتوز، ساکارز، رایبوز، گالاکتوز، گزیلوز، آرابینوز، رافینوز، مانیتول، برخی از محیطهای موجود در آزمایشگاه مانند نوترینت آگار، BHI و غیره مورد بررسی قرار گرفت. تولید بیشتر باکتریوسین در حرارتهای مختلف pHهای ۲ تا ۸ و محیط حاوی قندهای فوق ارزیابی شد. اثر آن بر روی باکتریهای لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوک اورئوس، اشریشیاکلی، سالمونلاتایفی، و باسیلوس سرئوس به روش بلانک دیسک و نقطه‌گذاری، قبل و بعد از حرارت تعیین گردید. فعالیت ضدمیکروبی باکتریهای به دست آمده پس از افزودن آلفا آمیلاز و لیزوزیم نیز مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی لاکتوباسیل پلانتاروم بر اساس کتاب برجی در سال ۱۹۸۹ انجام گرفت (۲) و خصوصیات مورفولوژی مطابق استاندارد و با سوش استاندارد موسسه واکسن و سرم سازی رازی مقایسه گردید و میزان بازدارندگی آن در برابر میکروارگانیسم موجود تعیین گردید.

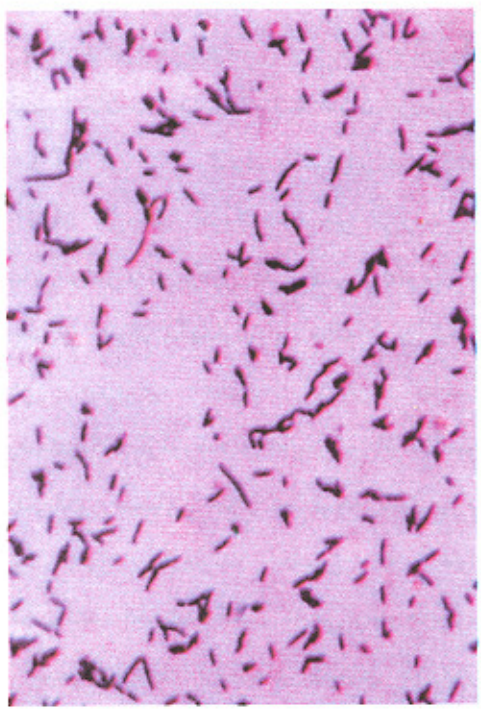
یافته‌ها

از تمام نمونه‌های مورد بررسی، لاکتوباسیل به دست آمد اما فقط ٤ تا از آنها، لاکتوباسیل پلانتاروم بودند. از لاکتوباسیل پلانتاروم‌های رشد کرده لام تهیه شد و به روش گرام رنگ‌آمیزی گردید. باکتریها به شکل میله‌ای گرم مثبت و به اشکال مختلف به صورت تک تک، دوتایی، چندتایی و گاهی زنجیره‌ای فاقد اسپور بودند (شکل۱). این باکتریها در هنگام جداسازی اولیه، باریک و کاملا کشیده بودند اما پس از مدتی در کشت آزمایشگاهی به صورت کوتاه و ضخیم درآمدند. تست کاتالاز با ۳٪ آب اکسیژنه و تست اکسیداز با دیسک اکسیداز، منفی بود. هیدرولیز اسکولین در محیط کشت صفرا – اسکولین، پس از ۲٤ ساعت (و حتی بعد از ۲ ساعت) منفی بود. کلنی این باکتریها در شکل (۲) نشان داده است.

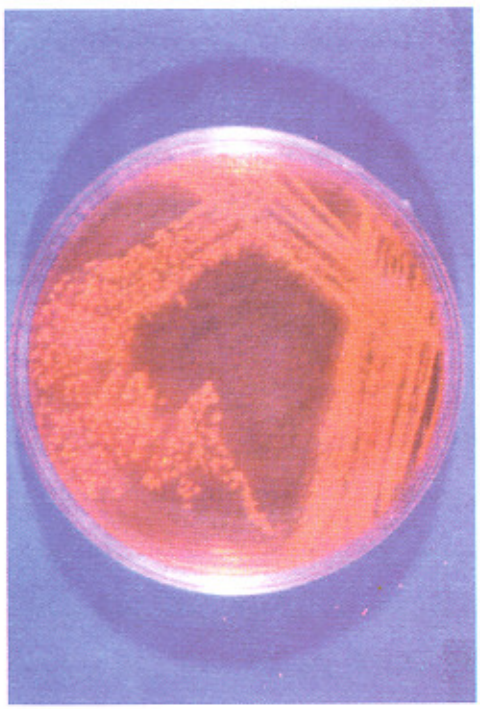
از روی خصوصیات مورفولوژی، باسیل گرم مثبت کشیده، تستهای بیوشیمیایی مانند تست اکسیداز منفی، کاتالاز منفی، تخمیر قندها (مانیتول، گلوکز، رافینوز، گزیلوز، گالاکتوز، رابینوز، ساکارز، لاکتوز) این باسیل شناسایی شد. این باکتریها، ژلاتین را ذوب کردند و در حرارت ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیگراد رشد کردند، اما حرارت مناسب رشد آنها، ۲۵ درجه سانتیگراد بود. بیشترین اثر بازدارندگی در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد بود، به طوری که اثر بازدارندگی آن حدود ۲۰ میلی‌متر در برابر استافیلوکوک و حدود ١٤ میلی‌متر در برابر لیستریا در pH حدود ٤/۸ تا ٦/۲ در محیط پایه (MRS) حاوی گلوکز ۲٪ بود. در حرارت ۱۰ درجه سانتیگراد، عدم ممانعت از رشد مشاهده نگردید. در حرارت ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه پایدار بود و به وسیله آلفا آمیلاز و لیزوزیم غیرفعال نگردید. بنابراین به نظر می‌رسد که جنس آن پلی پپتید مقاوم به حرارت باشد. اثر بازدارندگی باکتریهای به دست آمده به روش بلانک و نقطه‌گذاری در شکل ۳ و ٤ نشان داده شده است.

www.SID.ir

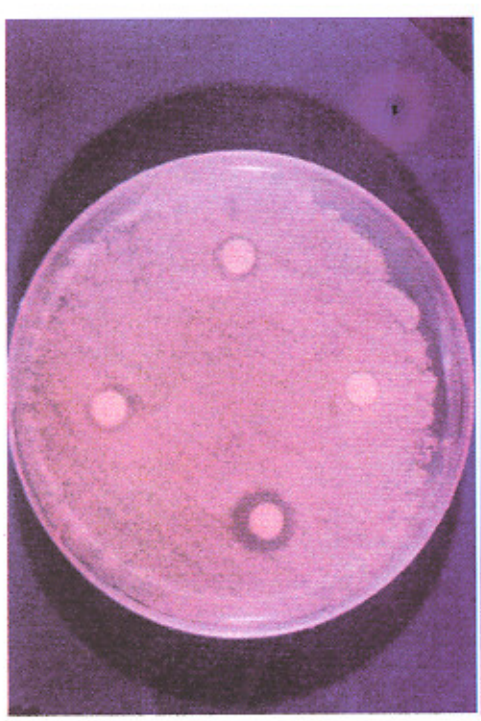
Archive of SID



شکل ۱ ـ شکل ماکروسکوپی لاکتوباسیل پلانتازوم



شکل ۲ ـ کلنی لاکتوباسیل پلانتازوم



شکل ۳ ـ اثر بازدارندگی به روش بلانک دیسک

شکل ٤ ـ اثر بازدارندگی به روش نقطه گذاری

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

از ۱۵ نمونه سوسیس و کالباس، ۱۵ لاکتوباسیل بر اساس رنگ‌آمیزی گرام و تستهای کاتالاز و اکسیداز به دست آمد. شناسایی بیشتر با آزمایشهای تخمیری قندها و تستهای دیگر نشان داد که فقط ٤ باکتری به دست آمده دو باکتری از سوسیس و دو باکتری از کالباس لاکتوباسیل پلانتاروم بوده‌اند. در صنعت گوشت از باکتریهای لاکتیک به طور گسترده ای به عنوان آغازگر برای تخمیر سوسیس استفاده می کنند (۲۷). این باکتریها در بهتر شدن طعم غذا و اثر بازدارندگی میکروبی سوسیس های تخمیر شده دخالت دارند. در هنگام ساختن سوسیس، در حالت طبیعی گاهی آلودگی ماده خام رخ می‌دهد. بنابراین، نقش عمده باکتریهای لاکتیک، رقابت با فلور طبیعی مانند باکتریهای فاسدکننده غذا و گاهی پاتوژنهایی مانند استافیلوکوک اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز است.

نتایج حاصل از مطالعه ما در مورد اثر بازدارندگی و همچنین پایداری باکتریوسین در برابر حرارت با گزارشـــــــــهای موجود مطابقت دارد (۳۰-۲٤). باکتریوسین های شناخته شده لاکتوباسیل پلانتاروم به حرارت پایدار هستند و طیف ضدمیکروبی در برابر باکتریهای مختلف دارند. به نظر می‌رسد که حرارت، فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین ها را پایدار می‌سازد. پایداری باکتریوسین ها در برابر حرارت بسیار سودمند است، زیرا در بسیاری از مراحل تهیه غذا به حرارت نیاز می‌باشد. پس پایداری فعالیت باکتریوسین، یکی از عوامل مهم محسوب می‌شود.

اثر بازدارندگی باکتریوسین بر روی باکتریهای مختلف، امکان مصرف آنها را به عنوان افزودنی به غذا یا آغازگر، برای کنترل باکتریهای فاسدکننده غذا نشان می‌دهد. امروزه به نظر می‌رسد که شناسایی بیشتر باکتریوسین ها و کاربرد تجربی آنها در غذا به عنوان نگهدارنده‌ای سالم و با کیفیت مطمئن ضروری است. افزایش تقاضای مصرف‌کنندگان فرآورده‌های طبیعی و اثرات سوء افزودنی‌های شیمیایی منجر به توجه بیشتری در کاربرد مواد بازدارنده طبیعی به عنوان محافظت‌کننده غذا شده است که می‌تواند جایگزین مواد شیمیایی شود. بررسیهای بیشتری در مورد خصوصیات ژنتیکی و بیوشیمیایی باکتریوسینهای لاکتوباسیل پلانتاروم، به عنوان بازدارنده بیولوژیکی توصیه می شود.

تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم که این فرصت را داده‌اند و افرادی که در آزمایشگاه همکاری کرده‌اند نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

Reference:

1. Rogers La. The inhibiting effect of Streptococcus lactis on Lacobacillus bulgaricus . J Bacterol 1928; 16: 321.

2. Mattick a t R, Hirsch a. Further observations on an inhibitory substances (nisin) from lactic Streptococci. Lancet 1947; 5-7.

www.SID.ir

Archive of SID

3. Hurst a. Nisin and orher inhibitory substances from lactic acid bacteria. In: Branen Al, Davidson Pm (eds). Antimicrobiols in foods. Maecel Dekker, Newyork, USA 1983: 327-51

4. daeschel MA. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technology 1989; 43: 164-97

5. Babel F J. Antibiosis by lactic cultures bacteria J Dairy Sci 1997; 60: 815-21.

6. fermandes cF, Shahani K M, Amer M A. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacilic fermented dairy products. REMS Microbiol 1987; 46: 343-56.

7. Sissons J W. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and prmote digestion in farm animals; A review. J Sci Food agric 1989; 49: 1-13.

8. Yap PS, Gililand S.E. Comparison ,of newly isloated strains of Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis for hydrogen peroxide production at 50 C. J Dairy Sci 2000; 83: 628 38

9. . shah NP. Symposium: Probiotic bacteria; Selective enumeration and Survival in dairy foods. J Dairy Sci 2000; 83: 894-907

10. Daeschel MA, Fleming Hp. Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentation Food Microbiol 1984, 303 13

11. Fleming Hp, Etchells Jl , Costilow RL. Microbiol inhibiton by an isolate of pediococcus from cucumber brines. Appl Microbiol 1985; 30: 1040-42

12. Garriga M, Hugas M, Aymerich T, et al. Bacteriocinogenic activity of lactobacili from fermented sausages. J Appl Bacteriology 1993; 75: 142-48

13. Navarro L, Zarazaga m, Saenz J, et al. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. J Appl Microbiol 2000; 88(1) : 44-51.

14. Bacus JN, Brown WL. The lactobacilii : meat products . In: SE Giliand (Ed): Bacterial starter cultures of foods. CRC press, Boca Raton (Florida), 1985: 47-74.
www.SID.ir

Archive of SID

15. Ehmann A, Eijsink VG, et al. Gene cluster encoding plataricin 1.25 beta and other bacteriocin like peptides in Lactobacillus plantarum TMW 1.25 . Biochim Biophys Acta 2000; 1490(3): 355-61.

16. Todorov S, Onno B, Sorokine O, et al. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by Lactobacillus plantarum ST31 isolated from sourdough. Int J Food Microbiol 1999; 48(3): 167-77.

17. Rekhif N, Atrih A, Lefebvre G. Characterization and partial purification of plantaricin LC 74. a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum LC 74 Biotechnilogy Letters 1994: 771-76

18. Gonzalez B, Arca P, Mayo B, et al, detection and partial Characterization of plataricinc, a bacteriocin produced by a Lactobacillus plantarum strain of dairy origin, Appl Environ Microbiol 1994; 60: 2158-63

19. Atrih A Michel Rm Lefebvre G detection of bacteriocins produced by Lactobacillus plantarum strains isolated from different foods. Microbes 1993; 75: 117-23.

20. Jimenez- Diaz R, Rios sanchez Rm, Desmazeaud M, et al plantaricin s and T new bacteriocins produced by Lactobacillus plantarum LOCO 10 isolated from a green olive fermentation appl Environ Micronio1 1993; 59: 1416-24

21. Kelly WJ, Asmundson Rv Huang CM. Characterization of plantaricin Kw30, bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum. J Appl Bacteriol 1996; 81: 657-62.

22. Beck T. The microbiology of silage fermentation. In: Mc Cullough M E, ed Fermentation fo silage-a review National food Ingredients Associaton. West Des Moines, 1978: 61-115

23. West CA, Warmer P J. Plantaricin B, a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum NCDO 1193. FEMS Microbiol Letter 1988; 49: 163-65.

www.SID.ir

Archive of SID

24. Olasupo N A. Bacteriocins of Lactobacillus plantarum strains from fermented foods. Folia Microbiol Praha 1996; 41(2): 130-6.

25. Rekhif N, atrih a Lefebvre G Activity of plantaricin SA6, A bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum SA6 isolated from fermented sausage. J Appl Bacteriol 1995; 78: 349-58

26. Kanlder O, Weiss N. Regular , non-

Manual of systematic bacteriology. 1986: 1208-60

27. Hammes W P starter kulturen in der fleischwirtschaft. Chem Microbiol Technol Lebensm 1986; 9: 131-43

28. daeschel M a Mc Kenny Mc, Mc donald C. Bactericidal activity of Lactobacillus plantarum C-11. food Microbiology 1990; 7: 91-98.

29. Lewus C B, Kaiser a, and Montville t J. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat . Appl Environ Microbiol 1991; 57: 1683-8.

30. Rekhif N, atrih A, Lefebvre G. Selection and properties of spontaneous mutants of Listeria monocytogenes aTCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid strains. Current Microbiology Curr Microbiol 1994; 28: 237-41.

www.SID.ir