Archive of SID

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره دوم، شماره هفتم، تابستان ۱۳۹۱

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

غربال تولید اگزوپلی‌ساکاریدهای متصل به سلول و رهاشده به محیط در باسیلوس‌های جداشده از مرغ داری‌های اراک

سرور مبینی[۱]، مریم تاج آبادی ابراهیمی*[۲]، مریم هاشمی[۳]، پروانه جعفری[۴]

[۱] کارشناس ارشد،گروه میکروبیولوژی ،دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران.

[۲] استادیار ،گروه زیست شناسی ،دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، ، تهران، ایران.

[۳] استادیار، موسسه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (Aabrii).کرج ،ایران

[۴] استادیار، گروه میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک ،اراک، ایران

چکیده

سابقه و هدف: اگزوپلی‌ساکاریدها پلی‌مرهای طبیعی هستند که بوسیله باکتری‌های مختلف مانند باکتری‌های اسیدلاکتیک، بیفیدوباکتریوم‌ها و باسیلوس‌ها تولید می‌شوند. به علت خواص فیزیکی وشیمیایی آن‌ها، به‌طور گسترده در صنایع غذایی به عنوان عوامل ویسکوزیته‌کننده، ژله‌ای‌کننده و قوام دهنده استفاده می‌شوند. از آن جائی‌که اگزوپلی ساکاریدهای تولیدی به‌وسیله سویه‌های باسیلوس ویسکوزیته و خواص سود و پلاستیک بالایی دارند، امروزه مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند. هدف این تحقیق، بررسی میزان تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی و اگزوپلی‌ساکارید متصل به‌سلول در ۱۰جدایه باسیلوس جدا شده از مرغداری‌ها و تعیین جدایه برتر بر اساس تولید اگزوپلی‌ساکارید می‌باشد.

مواد و روش ها: ۱۰جدایه باسیلوس در محیط MRS جامد به‌همراه ۲٪ (w/v) گلوکز کشت داده شده، در شرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرم خانه‌گذاری شدند. سپس تولید اگزوپلی‌ساکارید در آن‌ها (به صورت متصل شده [۱]و رها شده در محیط [۲]) با روش فنل/سولفوریک اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی کمی تولید اگزوپلی‌ساکارید، با مقایسه منحنی استاندارد گلوکز و نتایج به دست آمده، میزان تولید آن برحسب میلی‌گرم بر لیتر تعیین شد.

یافته ها: از بین ۱۰ جدایه باسیلوس، ۲سویه بیشترین توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید متصل‌شده را داشتند، که بیشینه تولید،۴۳ میلی‌گرم برلیتر (B۵) و کمینه تولید،۲/ میلی‌گرم بر لیتر (, B۴ و B۱۰ و B۹ و B۱ وB۸) بود. تمامی جدایه‌های مورد بررسی، اگزوپلی‌ساکارید رها شده در محیط تولید می‌کردند که در مورد آن‌ها بیشینه تولید ۲۲۹ میلی‌گرم بر لیتر (B۷) و کمینه تولید ۴۵ میلی‌گرم بر لیتر (B۸) بود. هم‌چنین کینتیک رشد و کینتیک تولید اگزوپلی‌ساکارید جدایه منتخب (B۷)، در زمان‌های مختلف تعیین‌گردید. با مقایسه هر دو منحنی رشد باکتری و تولید اگزوپلی‌ساکارید رها شده و متصل شده، می‌توان نتیجه‌گرفت که جدایه B۷ بیشترین تولید اگزوپلی‌ساکارید رها شده و متصل شده را در اواسط فاز لگاریتمی نشان می‌داد و پس از آن میزان تولید ثابت می‌ماند.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که پتانسیل تولید ترکیبات اگزوپلی‌ساکارید توسط گونه‌های باسیلوس بومی ایران وجود دارد.

کلمات کلیدی: اگزوپلی‌ساکارید، باکتری‌های اسیدلاکتیک، باسیلوس، کینتیک‌رشد

مقدمه

پلی‌ساکاریدها گروه‌های پلی‌مری بسیار متغیری هستند. مشخصات ساختاری آن‌ها مانند وزن‌مولکولی، تعداد و اتصالات ساکاریدی، نقش مهمی در کاربرد وسیع آن‌ها در صنایع مختلف دارد. بسیاری از پلی‌ساکاریدهای مشتق از گیاهان مانند نشاسته

نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی ،دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران.
Email: m.tajabadi@iauctb.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۹۰/۱۲/۱۴
تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۲/۰۳

1- EPS-b: Bounded EPS
2- EPS-r: Released EPS

www.SID.ir

Archive of SID

پکتین و صمغ به‌عنوان عوامل قوام‌دهنده، ژله‌ای کننده، مورد استفاده قرار می‌گیرند، در دهه‌های اخیر اگزوپلی‌ساکاریدهای میکروبی جایگزین پلی‌ساکاریدهای گیاهی شده‌اند که از خواص فوق برخوردار بوده و به مقدار فراوان و با درجه خلوص بالاتری به‌دست می‌آیند. اگزوپلی‌ساکاریدها در هنگام رشد باکتری‌ها به وسیله باکتری‌های مختلف مانند باکتری‌های اسیدلاکتیک، بیفیدوباکتریوم‌ها و باسیلوس‌ها تولید می‌شوند. پلی‌ساکاریدهای میکروبی بسته به موقعیت قرارگیریشان به دو گروه تقسیم می‌شوند (۶)

۱- پلی‌ساکاریدهای کپسولی[1] که در سطح سلول قرار می‌گیرند و نقش مهمی در حفاظت میکروب‌ها در برابر حمله‌ی فاژها، فاگوسیتوز، ترکیبات سمی و آنتی‌بیوتیک‌ها دارند.

۲- پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی[2] که به خارج سلول ترشح می‌شوند. توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید در میان باکتری‌ها بیشتر از قارچ‌ها و مخمرها می‌باشد. اگزوپلی‌ساکاریدها خود به دو گروه (متصل شده و رها شده در محیط) تقسیم می‌شوند. (۶).

هر کدام از اگزوپلی‌ساکاریدهای متصل شده و رها شده در محیط دارای مزایای منحصر به فردی هستند، به طور مثال اگزوپلی‌ساکاریدهای رها شده ،از سلول‌ها در مقابل نیسین و مس محافظت می‌کنند (۷). به علت خواص فیزیک و شیمیایی، اگزوپلی‌ساکاریدها به طور گسترده در صنایع غذایی به عنوان عوامل ویسکوزیته‌کننده، ژله‌ای کننده و قوام دهنده استفاده می‌شوند. از دیگر موارد استفاده اگزوپلی‌ساکاریدها به‌عنوان عوامل حذف فلزات سنگین، در صنایع داروسازی به عنوان عوامل انتقال دارو استفاده می‌شوند. از اثرات بیولوژیکی آن‌ها می‌توان به خواص ضد سرطانی، ضد ویروسی، ضد التهابی، کاهش‌دهنده کلسترول خون، کاهش دهنده‌ی قند خون اشاره کرد، هم چنین می‌توانند در دستگاه گوارش پایدار مانده و اثر پری بیوتیکی داشته باشند (۳). هدف از این تحقیق بررسی میزان تولید پلی‌ساکارید خارج‌سلولی و اگزوپلی‌ساکارید متصل به سلول در ۱۰جدایه باسیلوس بالقوه پروبیوتیک جدا شده از مرغداری‌های اراک است (۱). از آن جا که تولید اگزوپلی‌ساکاریدها در جدایه‌های مختلف باسیلوس متغیر می‌باشند، لذا انتخاب جدایه‌ای که بیشترین میزان تولید را دارد، از نظر تکنولوژی تولید و خواص عملکردی حائز اهمیت است.

مواد و روش‌ها

باکتری‌ها و شرایط رشد

در این تحقیق از ۱۰ جدایه باسیلوس جدا شده از مرغداری‌ها استفاده شد. این باکتری‌ها در کلکسیون میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد و زیر ۲۵٪ گلیسرول نگه‌داری می‌شوند. قبل از انجام هر آزمون این باکتری‌ها در محیط، MRS[3] مایع به همراه ۲٪ (وزنی-حجمی) گلوکز در شرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس برای تهیه عکس میکروسکوپی بر روی محیط MRS جامد کشت داده شدند.

تست‌های بیوشیمیایی

تست‌های بیو شیمیایی تولید کاتالاز، تست وژ- پروسکوئر و متیل رد، تخمیر قند، تست حرکت، احیاء نیتریت به نیترات، هیدرولیز نشاسته و تجزیه کازئین بر اساس کتاب برجی انجام گرفت (۲).

بررسی تولید اگزوپلی‌ساکارید

در این بررسی اگزوپلی‌ساکارید متصل به سلول و اگزوپلی‌ساکارید ترشح شده در محیط کشت به‌طور جداگانه استخراج شد و در مقایسه با استاندارد گلوکز تعیین کمیت گردید. به‌این منظور از کشت ۲۴ ساعته هر جدایه به‌میزان ۱٪ به محیط MRS مایع تلقیح و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط هوازی گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس محیط‌های کشت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ (۱۵۰۰۰g) شدند. مایع رویی برای جدا سازی اگزوپلی‌ساکارید رها شده در محیط کشت و ته‌نشست برای جدا سازی اگزوپلی‌ساکارید متصل شده استفاده شد (۱۰).

جداسازی اگزوپلی‌ساکاریدهای متصل‌شده به سلول

به ته‌نشست حاوی سلول‌های باکتریایی ۵ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی برای شستشو اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (۱۵۰۰۰g) شد. به ته‌نشست ۲ بار EDTA ۰/۰۵مولار اضافه کرده و ۴ ساعت در

1- Capsular poly saccharide(CPS)
2- Exopolysacharide(EPS)
3- Man Rogosa and Sharp3-

www.SID.ir

Archive of SID

دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر قرار داده شد. به منظور جدا کردن مواد نامحلول سوسپانسیون به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد (۶۰۰۰ g). به منظور رسوب اگزوپلی‌ساکارید متصل شده به مایع شفاف رویی حاصل از سانتریفوژ، اتانل سرد اضافه شد. عمل رسوب‌سازی اگزوپلی‌ساکارید متصل شده به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای جداسازی اگزوپلی‌ساکارید رسوب‌یافته از سانتریفوژ (۶۰۰۰ g) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد. در این مرحله مایع شفاف رویی دور ریخته شد و ته نشست حاوی اگزوپلی‌ساکارید متصل شده در محیط آزمایشگاه خشک گردید. به منظور اطمینان از نتایج تمام آزمایشات ۳ بار تکرار شد (۱۰).

جداسازی اگزوپلی‌ساکارید رها شده در محیط

برای جداسازی اگزوپلی‌ساکاریدهای آزاد شده در محیط کشت، مایع رویی به دست آمده از ۱۰ میلی‌لیتر نمونه سانتریفوژ و سپس با تری‌کلرواستیک اسید با غلظت ۲۰ درصد عمل‌آوری شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. پروتئین‌های ته‌نشین شده پس از ۲۰ دقیقه از طریق سانتریفوژ (۲۵۰۰۰g) جداگردید. سپس به منظور رسوب اگزوپلی‌ساکارید رها شده به مایع شفاف رویی حاصل از سانتریفوژ اتانل‌سرد اضافه شد. عمل رسوب‌سازی اگزوپلی‌ساکارید رها شده به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. برای جداسازی اگزوپلی‌ساکارید رسوب یافته از سانتریفوژ (۶۰۰۰g) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد و ته نشست حاوی اگزوپلی‌ساکارید رها شده در محیط آزمایشگاه خشک شد. به منظور اطمینان از نتایج تمام آزمایشات ۳ بار تکرار شدند (۱۰)..

سنجش کمی اگزوپلی‌ساکارید متصل‌شده با روش فنل/ اسیدسولفوریک، اسپکتروفتومتری

مقدار کلی کربوهیدرات، از طریق روش فنل/اسید سولفوریک و روش گلوکز به عنوان استاندارد تعیین‌شد. بدین ترتیب که رسوب اگزوپلی‌ساکارید در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه حل شد. سپس ۰/۵میلی‌لیتر ته نشین حاوی اگزوپلی‌ساکارید محلول در آب مقطر، ۰/۵میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ اضافه گردید، سپس محلول به خوبی مخلوط شده و پس از این‌که دمای آن به دمای اتاق رسید با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر میزان جذب نمونه‌ها خوانده شد (۱۰). با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز، انتخاب برترین جدایه تولیدکننده اگزوپلی‌ساکارید در دو حالت متصل‌شده و رها شده انجام‌گرفت. در این روش جهت تهیه محلول استوک گلوکز ۱۰ میلی‌گرم آلفا- -D گلوکز در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول استوک گلوکز تهیه گردید. پس از افزودن غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۸، ۱۰و ۲۰ میلی‌لیتر از محلول استوک گلوکز به بشرهای مختلف حجم نهایی محلول به ۲۰ میلی‌لیتر رسید. از هر بشر ۰/۵میلی‌لیتر محلول داخل لوله آزمایش ریخته و به هر لوله ۰/۵میلی‌لیتر فنل و ۲/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ اضافه‌کردیم و پس از مخلوط کردن و هم دما شدن با دمای محیط با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ جذب نمونه‌ها خوانده شد و منحنی استاندارد گلوکز در نرم‌افزار Excell رسم گردید. مقدار کلی کربوهیدرات به‌کمک منحنی استاندارد گلوکز برحسب میلی‌گرم گلوکز در هر لیتر از محیط کشت بیان شد (۵).

تعیین کینتیک رشد جدایه‌ی منتخب (B7)

برای تعیین کینتیک رشد جدایه‌ی منتخب (B7)، همانند قبل به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت در ارلن کشت داده شد. در فواصل زمانی معین هر۱ ساعت نمونه برداری صورت‌گرفت و جذب نوری (A۶۰۰) اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب الگوی رشدی جدایه‌های مورد تحقیق در زمان‌های مختلف تعیین گردید. (۴).

تعیین کینتیک تولید اگزوپلی‌ساکارید

برای تعیین کینتیک تولید اگزوپلی ساکارید هم زمان با تعیین کینتیک رشد باکتری مورد نظر در ساعت‌های متوالی، ۲میلی‌لیتر از نمونه‌ها را در هر ساعت جمع آوری نموده و سپس با روش فنل سولفوریک مقدار اگزوپلی‌ساکارید تولید شده در هر ساعت تعیین و به کمک منحنی استاندارد گلوکز میزان کربوهیدرات تولید شده در هر ساعت اندازه‌گیری شده و به کمک نرم افزار Excell منحنی مربوط به کینتیک تولید اگزوپلی‌ساکارید رسم گردید (۴).

www.SID.ir

Archive of SID

یافته ها

تمامی ۱۰ جدایه‌ی باسیلوس از نظر وجود کاتالاز، مثبت بودند و بررسی لام گرم زیر میکروسکوپ نشان دهنده‌ی باسیل‌های گرم مثبت بود. نتایج تست‌های بیوشیمیایی در جدول۱ ذکر شده‌است.

جداسازی اگزوپلی‌ساکاریدهای متصل‌شده به سلول

از ۱۰ جدایه باسیلوس مورد تحقیق ۲جدایه توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید متصل شده بیشتری نسبت به بقیه جدایه‌ها داشتند، بیشترین میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید متصل شده به جدایهB۵ (۴۳میلی‌گرم برلیتر) و کمترین میزان به جدایه‌های B۱، B۸، B۹وB۱۰ (۰/۲میلی‌گرم‌برلیتر)تعلق‌داشت (نمودار۱) (جدول۲).

جداسازی اگزوپلی‌ساکاریدهای رها شده در محیط

از ۱۰جدایه باسیلوس مورد آزمایش همه جدایه‌ها قادر به تولید اگزوپلی‌ساکارید رهاشده در محیط بودند که از بین آن‌ها، بیشترین میزان تولید مربوط به نمونه B۷ (۲۲۹ میلی‌گرم بر لیتر) و کمترین میزان تولید مربوط به نمونه B۸ (۴۵ میلی‌گرم بر لیتر) گزارش شد (نمودار ۱) (جدول ۲).

از فرمول حاصل از رسم منحنی استاندارد گلوکز برای محاسبه میزان اگزوپلی‌ساکارید تولیدی (متصل‌شده و رهاشده در محیط) استفاده شد (نمودار ۲). شد. منحنی رشد جدایه منتخب در نمودار۳ آورده شده‌است.

تعیین کینتیک رشد جدایه‌ی منتخب ($B_۷$)

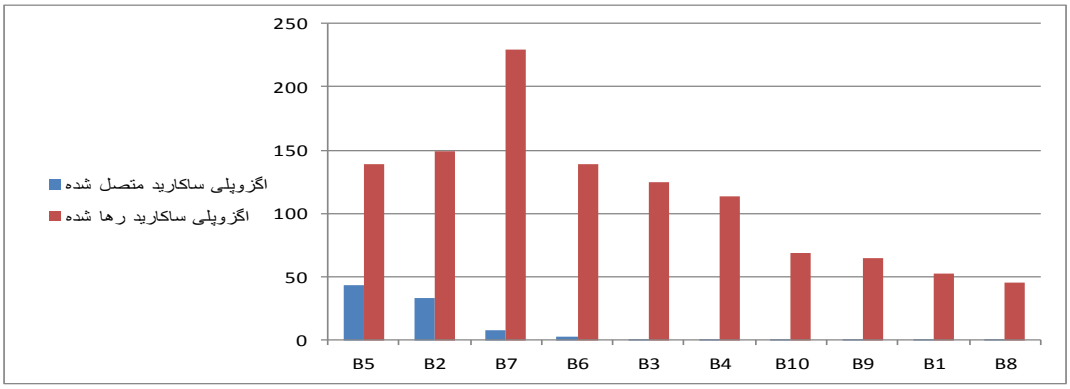
آگاهی از روند کینتیک رشد باکتری و مقایسه آن با روند تولید اگزوپلی‌ساکارید، جهت بهینه‌سازی و انجام آزمون‌های تکمیلی ضروری است. در این مطالعه کینتیک رشد جدایه $B_۷$ که با بیشترین میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید بررسی شد. منحنی رشد جدایه منتخب در نمودار ۳ آروده شده است.

جدول ۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی در ۱۰جدایه باسیلوس

کد ایزوله‌ها	گلوکز	آرابینوز	نشاسته	گزیلوز	تولید گاز H2S	حرکت	سیترات	VP	MR
B1	+	+	+	+	-	+	+	+	-
B2	+	-	+	-	-	+	+	+	-
B3	+	+	+	+	+	+	+	+	-
B4	+	+	+	+	-	+	+	+	-
B5	+	+	+	+	-	+	+	+	-
B6	+	-	+	-	-	+	-	+	+
B7	+	+	+	+	-	+	+	+	-
B8	+	+	+	+	-	+	+	+	-
B9	+	+	+	+	-	+	+	+	+
B10	+	+	+	+	-	+	+	+	-

www.SID.ir

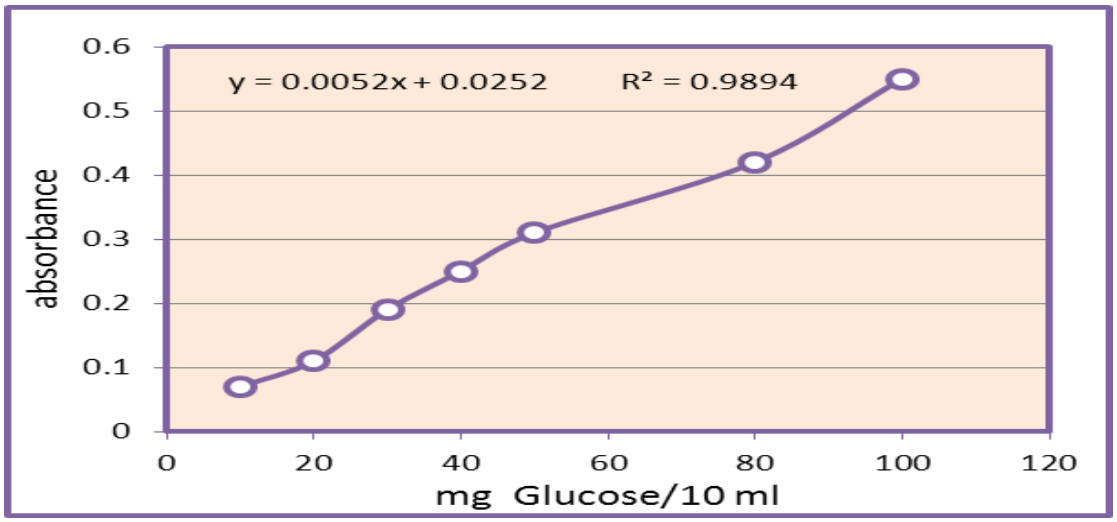
Archive of SID



نمودار ۱- میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید متصل‌شده و رها شده در ۱۰جدایه باسیلوس

جدول ۲- میزان اگزوپلی‌ساکارید متصل‌شده و اگزوپلی‌ساکارید رها شده بر حسب mg/l در ۱۰جدایه باسیلوس

ردیف	کد جدایه	اگزوپلی‌ساکارید متصل شده mg/l	اگزوپلی‌ساکارید رها شده mg/l
۱	B۷	۷/۴	۲۲۹
۲	B۲	۳۳	۱۴۹
۳	B۵	۴۳	۱۳۹
۴	B۶	۲/۸	۱۳۹
۵	B۳	۱	۱۲۵
۶	B۴	۰/۴	۱۱۳
۷	B۱۰	۰/۲	۶۹
۸	B۹	۰/۲	۶۵
۹	B۱	۰/۲	۵۲
۱۰	B۸	۰/۲	۴۵



نمودار۲- منحنی استاندارد گلوکز.

www.SID.ir

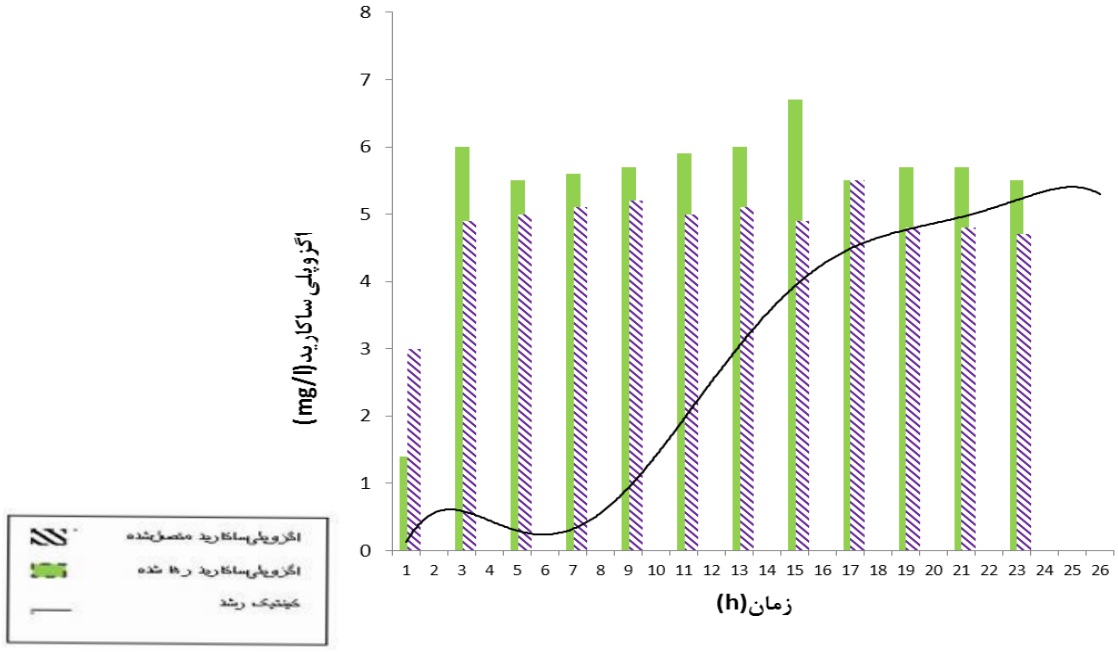
Archive of SID

تعیین کینتیک تولید اگزوپلی‌ساکارید رهاشده در جدایه B_7

برای تعیین کینتیک تولید اگزوپلی‌ساکارید در فازهای مختلف رشدی، آگاهی از کینتیک رشد الزامی است. تعیین کینتیک تولید اگزوپلی‌ساکارید هم زمان با کینتیک رشد جدایه انجام گرفت. با مقایسه هر دو منحنی رشد باکتری و تولید اگزوپلی‌ساکارید رهاشده می‌توان نتیجه‌گرفت که این جدایه بیشترین تولید اگزوپلی‌ساکارید رها شده را در اواسط فاز لگاریتمی داشته است (۶/۷ میلی‌گرم بر لیتر) که پس از آن میزان تولید ثابت مانده است. میزان رشد باکتری، غلظت اگزوپلی‌ساکارید را تحت تاثیر قرار نداده است (نمودار ۳).

تعیین کینتیک تولید اگزوپلی‌ساکارید متصل شده در جدایه B_7

تعیین کینتیک تولید اگزوپلی‌ساکارید متصل‌شده هم زمان با کینتیک تولید اگزوپلی‌ساکارید رها شده جدایه منتخب انجام گرفت. با مقایسه هر دو منحنی رشد باکتری و تولید اگزوپلی‌ساکارید متصل‌شده می‌توان نتیجه گرفت که این جدایه بیشترین تولید اگزوپلی‌ساکارید متصل شده را در



نمودار۳- نمودار کینتیک رشد و کینتیک تولید اگزوپلی‌ساکارید متصل‌شده و رها شده جدایه B_7

اواسط فازلگاریتمی داشته است (۵/ ۵ میلی‌گرم برلیتر) که پس از آن میزان تولید ثابت مانده است (نمودار ۳).

بحث

در تحقیق حاضر، ۱۰ جدایه باسیلوس بالقوه پروبیوتیک (۱)، جدا شده از مرغ داری‌های اراک، از نظر تولید اگزوپلی‌ساکارید متصل‌شده و رها شده در محیط بررسی شدند. تولید اگزوپلی‌ساکارید از یک سو موجب افزایش مقاومت سلول و از سوی دیگر در اتصال باکتری به سلول‌های اپیتلیال کمک می‌کند. این بررسی به ما اجازه داد که بتوانیم جدایه برتر را از نظر تولید اگزوپلی‌ساکارید شناسایی نماییم. تمام جدایه‌ها توانایی تولید هر دو نوع اگزوپلی‌ساکارید را داشتند. اگزوپلی‌ساکارید متصل‌شده می تواند قابل مقایسه با پلی ساکاریدهای کپسولی که، ویدفیلد و همکارانش در سال ۱۹۹۸تعریف کردند باشد. زیرا با کمترین میزان امواج صوتی از سلول جدا می‌شدند (۱۱). افزودن EDTA به رسوب حاصل از سانتریفوژ سبب جداشدن اگزوپلی‌ساکارید متصل‌شده می‌شود. این مسئله نشان دهنده وجود اتصال ضعیف (به‌جای اتصال کووالانت) پلی‌ساکارید به سلول می‌باشد (مانند پیوندهای یونی و یا هیدروژنی) که ای جی ویکن و

www.SID.ir

Archive of SID

همکارانش در سال ۱۹۸۳ متذکر شدند (۱۲). در این تحقیق نیز افزودن EDTA سبب جدا شدن اگزوپلی‌ساکارید متصل شده گردید که می‌تواند دلیل بر اتصالات ضعیف آن با سلول باشد. مطالعاتی که لوی جستن و همکارانش در سال۲۰۰۱ برروی سویه‌لاکتوکوکوس لاکتیس انجام دادند، نشان داد که این سویه هر دو پلی‌ساکارید متصل شده و رها شده را تولید می‌کند که پلی‌ساکارید متصل شده سلول‌ها را در مقابل باکتریوفاژها و لیزوزیم حفاظت‌کرده و پلی‌ساکارید رها شده سلول‌ها را در مقابل مس و نیسین حفاظت‌می‌کند (۷). لذا در این بررسی تولید هر دو نوع اگزوپلی‌ساکارید متصل و رها شده در محیط بررسی شد. میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید بسته به شرایط محیط کشت و کربوهیدرات موجود در محیط کشت متفاوت می‌باشد. به عنوان مثال در تحقیقی که آی وای لی و همکارانش در سال ۱۹۹۷ انجام دادند با بهینه‌سازی شرایط توانستند از سویه باسیلوس پلی‌میکسا بیشترین میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید (۵۴g/l) را داشته باشند. آن‌ها در تحقیق خود در یافتند که افزایش غلظت ساکارز به عنوان منبع کربن و نیترات پتاسیم به عنوان منبع نیتروژن بیشترین تولید اگزوپلی‌ساکارید را خواهد داشت. از سوی دیگرجی اف بورجیو و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در یافتند که بیشترین تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط سویه باسیلوس در محیط فاقد نیتروژن می‌باشد (۸). در تحقیقی که سندرا لارپین و همکارانش در سال ۲۰۰۲ انجام دادند ۲٪ گلوکز به محیط افزودند (۶). دراین نیز تحقیق با افزودن ۲٪ گلوکز به محیط کشت، میزان گلوکز محیط (به عنوان منبع کربن)را افزایش دادیم. مورنو و همکارانش در سال ۱۹۹۹ دریافتند که تولید اگزوپلی‌ساکارید در بیشتر باکتری‌ها بعد از توقف رشد افزایش می‌یابد (۹). از سوی دیگر ماریاسی و همکارانش در سال ۱۹۹۶ دریافتند که بیشترین تولید اگزوپلی‌ساکارید در فازسکون بوده، زمانی‌که پارامترهای فیزیولوژیکی مانند (اکسیژن،PH) برای تولید بیومس در بالاترین مقدار خود بوده است (۸). در این تحقیق با توجه به شرایط ایجاد شده حداکثر تولید اگزوپلی‌ساکارید رهاشده درانتهای فازلگاریتمی بوده و حداکثر تولید اگزوپلی‌ساکارید متصل‌شده نیز در انتهای فاز لگاریتمی بوده است. در تحقیقی که ریچارد تالون و همکارانش در سال ۲۰۰۳ انجام‌دادند دریافتند که سویه لاکتوباسیل پلانتارم ۵۶EP هر دو اگزوپلی‌ساکارید را تولید می‌کند، بیشترین مقدار اگزوپلی‌ساکارید متصل ۷۳/۶ میلی‌گرم برلیتر در ابتدای فاز لگاریتمی بوده است و بیشترین مقدار اگزوپلی‌ساکارید رها شده در همان ساعت (ساعت۲۵) ۳۶/۸ میلی‌گرم برلیتر رسیده است (۱۰). در این تحقیق مقدار اگزوپلی‌ساکارید متصل شده از ساعت۱۶- ۱ افزایش یافته و به بیشترین مقدار خود (۵/۵ میلی‌گرم بر لیتر) در انتهای فاز لگاریتمی رسیده است، در حالی‌که در اگزوپلی‌ساکارید رها شده از ساعت۱۴- ۱ افزایش یافته و به بیشترین مقدار خود (۶/۷ میلی‌گرم بر لیتر) در انتهای فاز لگاریتمی رسیده است. مقدار اگزوپلی‌ساکارید متصل‌شده از ساعت۱۶-۱۴ کاهش یافته در حالی‌که مقدار اگزوپلی‌ساکارید رها شده در همان ساعت افزایش یافته و به حداکثر مقدار خود رسیده است و بعد از آن مقدار هر دو، تا ساعت۲۴ ثابت مانده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعات نشان داد که باسیلوس‌های بالقوه پروبیوتیک جدا شده از مرغداری‌ها در این تحقیق توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید به صورت آزاد و متصل‌شده را دارند. جدایه برتر ($B_{۷}$) بیشترین میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید را داشته که حداکثر تولید در انتهای فاز لگاریتمی بوده است. نتایج این تحقیق نشان داد که پتانسیل تولید ترکیبات اگزوپلی‌ساکارید توسط گونه‌های باسیلوس بومی ایران وجود دارد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان انجام شده است که بدین وسیله از مسئولین و همکاران محترم این حوزه تشکر و قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

(۱) جعفری پ، تاج‌آبادی‌ابراهیمی م، رضائی ش. بررسی ضد میکروبی سویه‌های بومی جداشده از مرغداری‌های اراک، فصل نامه علمی پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان. ۱۳۸۹؛ سال سوم، شماره نهم: ۲۶-۲۱.

(2) Breed RS, Murray EGD, Smith NR. Bergey,s Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, 1957;1:613-694.

(3) Chunhui Liu, Juan Lu, Lili Lu, Yuhong Liu, Fengshan Wang, Min Xiao, Isolation, Structural Characterization and Immunological Activity of an Exopolysaccharide Produced by Bacillus licheniformis 8-37-0-1, Bioresource Technology, 2010;101:5528–5533.

(4) Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith V. Calorimetric Method for Determination of Sugars and Related substances. Anal Chem, 1956; 28:350-356.

(5) Konemanw A, Stephan D. Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology, Fifth Philadelfia Newyork, 2002;13:171-241.

(6) Larpin S, Sauvageot Ns, Pichereau V, Laplace JM, Auffray Yk. Biosynthesis of Exopolysaccharide by Bacillus licheniformis Strain Isolated from Ropy Cider. Int J Food Microbiol, 2002; 77:1– 9.

(7) Looijesteijn PL, Trapet L, De Vries E, Abee T, Hugenholtz J. Physiological Function of Exopolysaccharides Produced by Lactococcus lactis. Int J Food Microbiol, 2001; 64:71–80.

(8) Manca MC, Lama L, Improta R, Esposito E, Gambacorta A, Nicolaus B. Chemical Composition of Two Exopolysaccharides from Bacillus thermoantarcticus. Appl Environ Microbiol, 1996; 62(9): 3265–3269.

(9) Moreno J, Vargas-Garcı´a C, Lo´pez MJ, Sa´nchez-Serrano G. Growth and Exopolysaccharide Production by Azotobacter Vinelandii In Media Containing Phenolic Acids. J Appl Microbiol, 1999; 86: 439-445.

(10) Tallon R, Bressollier P, Urdaci MC. Isolation and Characterization of Two Exopolysaccharides Produced by Lactobacillus plantarum EP56. Res Microbiol, 2003; 154:705–712.

(11) Whitfield C. Bacterial Extracellular Polysaccharides, Can J Microbiol, 1998; 34:415-420.

(12) Wicken AJ, Ayres A, Campbell LK, Knox KW. Effect of Growth Conditions on Production of Rhamnose-Containing Cell Wall and Capsular Polysaccharides by Strains of Lactobacillus casei subsp. Rhamnosus. J Bacteriol, 1983; 153: 84–92.

www.SID.ir