مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره دوازدهم، پاییز ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

تولید اگزوپلی ساکارید از لاکتوباسیل های جداشده از دو محصول لبنی ماست و پنیر سنتی ایران

مریم تاج آبادی ابراهیمی [2] , مریم خدابخش[1*] ، انوشه شریفان[3]، مریم هاشمی[4]، ابراهیم حسینی[5]، هدی بهرامی[6]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذائی
[2] استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
[3] استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذائی
[4] استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
[5] استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذائی
[6] دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذائی

چکیده

سابقه و هدف : اگزوپلی ساکاریدهای تولیدی توسط باکتری های اسید لاکتیک در بهبود خواص حسّی و بافتی محصولات شیری تخمیری مثل ماست نقش مهمی ایفا می کنند. از سوی دیگر خواص پروبیوتیکی این باکتریها و ویژگیهای پری بیوتیکی بیوپلیمر های تولیدی آنها سبب ارتقاء سلامت مصرف کننده می شوند. هدف این تحقیق، بررسی میزان تولید اگزوپلی ساکاریدهای باند شده و آزاد در ۱۶ جدایه لاکتوباسیل جدا شده از ماست و پنیر سنتی ایران است.

مواد و روش ها : به این منظور، ۱۶ سویه لاکتوباسیلوس جدا شده از محصولات لبنی سنتی ایران شامل ماست و پنیر در محیط MRS Agar کشت و در شرایط بی هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از بررسی خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی جدایه ها مانند قوام پرگنه ها در محیط کشت، تولید اگزوپلی ساکارید (به دو شکل باند شده[1] و رها شده در محیط[2]) با روش فنل/ سولفوریک اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی کمی تولید اگزوپلی ساکارید، نتایج به دست آمده با منحنی استاندارد گلوکز مقایسه و میزان تولید برحسب میلی گرم بر لیتر تعیین شد.

یافته ها : نتایج بدست آمده نشان می دهد که از ۱۶ سویه لاکتوباسیلوس مورد بررسی برای تولید اگزوپلی ساکارید (اعم از باند شده و رها شده در محیط)، ۹ سویه، اگزوپلی ساکارید باند شده تولید کردند که بیشینه تولید، ۳۶۴ میلی گرم بر لیتر و کمینه تولید، ۴ میلی گرم بر لیتر بوده است. همچنین، ۹ سویه از ۱۶ سویه مورد بررسی، اگزوپلی ساکارید رها شده در محیط تولید کردند که در مورد آنها، بیشینه تولید ۱۵۱۹,۵۶میلی گرم بر لیتر و کمینه تولید، ۸۷/۲۵ میلی گرم بر لیتر بوده است.

نتیجه گیری : نتایج این تحقیق نشان داد که پتانسیل تولید ترکیبات اگزوپلی ساکارید توسط گونه های بومی ایران وجود دارد.

واژه های کلیدی: اگزوپلی ساکارید، باکتری های اسید لاکتیک، محصولات لبنی سنتی ایران، پروبیوتیک، پری بیوتی‌ک

مقدمه

امروزه تولید فراورده های پروبیوتیک با منشاء لبنی و غیر لبنی گسترش یافته است. کشت های آغازگر لاکتوباسیل به طور گسترده در تولید محصولات تخمیری شیر، گوشت و سبزیجات بکار می روند. در تمام دنیا محصولات بسیار متنوع از نظر طعم، عطر، بافت و خصوصیات سلامت بخش با استفاده از تکنیک ها، کشت های آغازگر (Starter Culture) و کشت های آغازگر همراه (Co-culture) تولید می شوند. محصولات لبنی تولیدی به روش صنعتی طعم محصولات سنتی را ندارند یا برخی از ویژگی های حسی آنها بسیار ضعیف است که این امر با پاستوریزاسیون شیر و استفاده از استارترهای تجاری مشخص در ساخت محصولات لبنی صنعتی مرتبط است. محصولات لبنی سنتی، پروفیل های طعمی گسترده تر و محسوس تری

آدرس نویسنده مسئول : تهران- خیابان توانیر(شهید عباشپور)، پلاک ۱۵ ،واحد ۵
Email : khodabakhsh_maryam@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۶/۲۶
تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۹/۲۶

Archive of SID
www.SID.ir

را نشان می دهند. خصوصیات ویژه این محصولات نتیجه ی تنوع جنس ها و گونه های محلی و فلور میکروبی بومی ویژه است (۵). توانایی تولید اگزو پلی ساکارید ها توسط باکتری های اسید لاکتیک به طور گسترده در سالهای اخیر مورد مطالعه قرار گرفته است. اگزوپلی ساکاریدها، پلی ساکاریدهای زنجیره بلندی هستند که از واحدهای قندی تشکیل شده اند. این واحدهای قندی عمدتا گلوکز، گالاکتوز و رامنوز در نسبت های مختلف هستند. این ترکیبات در طی مراحل رشد میکربی در محیط رها می شوند و از آنجا که متصل به سطح سلول میکروبی نیستند، می توان آنها را از پلی ساکاریدهای کپسوله شده که متصل به سطح سلول هستند متمایز کرد. اگزوپلی ساکاریدهای میکروبی در دو گروه هموپلی ساکارید ها (سلولز، دکستران، موتان، آلترنان، پولولان، لوان، کوردلان) و هتروپلی ساکاریدها (ژلان و زانتان) قرار می گیرند (۱۶). هموپلی ساکاریدها از واحدهای تکراری یک نوع منوساکارید (D- گلوکز یا D- فروکتوز) تشکیل شده اند و می توان آنها را به دو گروه عمده تقسیم کرد: گلوکان و فروکتان. در مقابل هتروپلی ساکاریدها واحدهای تکراری دارند که شباهت ساختاری این واحدها به همدیگر کمتر است. هتروپلی ساکاریدها از واحدهای متعددی از الیگوساکاریدها ساخته شده اند که حاوی سه تا هشت باقیمانده هست (۱۶). اگزوپلی ساکاریدها در بهبود رئولوژی، بافت و احساس دهانی محصولات لبنی تخمیری مثل ماست اهمیت ویژه ای دارند(۷). اگزوپلی ساکاریدها در آب حل شده و خواص ژله ای و قوام دهندگی ایجاد می کنند؛ همچنین در مواد غذایی به عنوان امولسیون کننده، پایدارکننده، سوسپانسیون ذرات، کنترل کریستالیزاسیون و تشکیل فیلم به کار می روند(۱۷). جداسازی و شناسایی لاکتوباسیل های گیای محصولات لبنی سنتی ایران امکان معرفی باکتری های مناسب جهت تهیه کشت آغازگر یا کشت همراه فراهم می آورد. لذا هدف از این مطالعه غربال لاکتو باسیلهای جدا شده از فراورده های لبنی تخمیری ایران از نظر تولید اگزوپلی ساکارید و خصوصیات تکنولوژیکی است. این باکتری ها می توانند در بهبود بافت، طعم، آروما و همچنین اثرات سلامت بخش محصولات لبنی نقش موثری داشته باشند.

مواد و روش ها

باکتری‌ها و شرایط رشد:در این تحقیق از ۱۶ سویه لاکتوباسیل جدا شده از محصولات لبنی تخمیری سنتی ایران مانند ماست و پنیر استفاده شد. این باکتری‌ها توسط تاج آبادی و همکاران جداسازی و درگنجینه میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی در دمای $C^{o}۸۰$- و زیر ۲۵٪ گلیسرول نگهداری می‌شوند. سویه‌ها بر اساس نوع محصول لبنی، منطقه تهیه نمونه و مورفولوژی کلنی کد گذاری شدند. قبل از انجام هر آزمون این باکتری‌ها در محیط (de Man Rogosa and Sharp) MRS-Broth در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸-۲۴ ساعت کشت داده شدند. اندازه گیری pH : دستگاه pH متر(نوع الترابیسیک) با محلول های بافر تنظیم و سپس pH نمونه ها اندازه گیری شد(۱). کشت خطی نمونه ها در محیط کشت MRS-Agar برای تشخیص خالص بودن سویه ها انجام شد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور در حضور CO_2 ٪10 در دمای C ۳۷ گرمخانه گذاری شد. بعد از این مدت سویه ها از نظر مورفولوژی، خالص یا ناخالص بودن مورد بررسی قرار گرفتند(۸). مشاهدات میکروسکوپی: از کلنی‌های خالص تشکیل شده بر روی محیط کشت، لام میکروسکوپی به روش رنگ آمیزی گرم تهیه شد. رنگ آمیزی گرم طبق استاندارد شماره ۲۳۲۵ انجام گرفت. سپس از لام رنگ آمیزی شده توسط میکروسکوپ دوربین‌دار عکس تهیه گردید. عکس های مذکور در بخش نتایج درج شده است.

کاتالاز : طبق استاندارد شماره ۲۳۲۵ انجام شد. تولید گاز: پس از تهیه محیط کشت MRS broth آن را به مقادیر مناسب در لوله های فالکون توزیع و به هر لوله یک لوله دورهام به صورت وارانه اضافه گردید. پس از اتوکلاو محیط های کشت از عدم وجود حباب در لوله های دورهام اطمینان حاصل شد. به هر لوله ۱٪ از کشت یک شبه لاکتوباسیل های مورد بررسی تلقیح شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری شد تا تخمیر گلوکز همراه با تولید گاز لاکتوباسیل ها بررسی شود. در صورتی که لاکتوباسیل مورد بررسی ناجور تخمیر باشد از تخمیر گلوکز گاز$CO2$ تولید می شود که مقداری از آن در لوله دورهام به صورت حباب جمع می شود (استاندارد ۲۳۲۵). بررسی تولید اگزو پلی ساکارید: در این بررسی اگزوپلی ساکارید متصل به سلول و اگزوپلی ساکارید ترشح شده در محیط کشت بطور جداگانه استخراج و در مقایسه

Archive of SID

www.SID.ir

با استاندارد گلوکز تعیین مقدار شدند (۱۵). به این منظور از کشت یک شبه هر سویه به میزان ۱٪ به محیط MRS-Broth تلقیح و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری شد. سپس محیط های کشت در دمای ۴ درجه سانتیگراد و به مدت ۳۰ دقیقه سانتزیفو ژ (۱۵×۱۰۰۰ g) شدند. مایع رویی برای جداسازی اگزوپلی ساکارید رها شده در محیط کشت و ته نشست برای جداسازی اگزوپلی ساکارید باند شده استفاده شد(۱۵). جداسازی اگزوپلی ساکاریدهای باند شده به سلول: به ته نشست حاوی سلولهای باکتریایی ml۵ محلول سرم فیزیولوژی برای شستشو اضافه شد سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ (g ×۱۵۰۰۰) شد. ته نشست ۲ بار در ml۵ EDTA (۰،۰۵ مولار) سوسپانس ، و ۴ ساعت در انکوباتور شیکردار گرمخانه گذاری شد. و سپس بمنظور جدا کردن مواد نامحلول سوسپانسیون درg ۶۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. سپس به منظور رسوب اگزوپلی ساکارید باند شده به مایع شفاف رویی حاصل از سانتریفوژ اتانل سرد اضافه شد. عمل رسوب سازی اگزوپلی ساکارید باند شده به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام شد. برای جداسازی اگزوپلی ساکارید رسوب یافته از سانتریفوژ با دور g ۶۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد و زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد. دراین مرحله مایع شفاف رویی دور ریخته شد و ته نشست حاوی اگزوپلی ساکارید باندشده در محیط آزمایشگاه خشک شد . به منظور اطمینان از نتایج تمام آزمایشات ۳ بار تکرار شد(۱۵).

سنجش اگزوپلی ساکارید باند شده با اسپکتروفتومتری:

رسوب حاصل در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و مقدار کربوهیدرات کل از طریق روش فنل/اسید سولفوریک و روش گلوکز به عنوان استاندارد تعیین شد. در این روش رویml ۰/۵ته نشست حاوی اگزوپلی ساکارید محلول در آب مقطر ، ml۰،۵ فنل ۵ درصد.و ml۲،۵ اسید سولفوریک غلیظ ریخته شد محلول وورتکس، و پس از اینکه دمای آن به دمای اتاق رسید با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ جذب آنها خوانده شد(۱۵) . با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز انتخاب برترین سویه تولید کننده اگزوپلی ساکارید باند شده انجام گرفت. در این روش جهت تهیه محلول استوک گلوکز mg۱۰ آلفا – د گلوکز در ml۸۰ آب مقطر حل و ml۱۰۰ محلول استوک گلوکز تهیه گردید. پس از افزودن غلظتهای ۱، ۲، ۳، ۴ ، ۸ ، ۱۰ ، و ml ۲۰ از محلول استوک گلوکز به بشرهای مختلف ، سپس با آب مقطر حجم محلول نهایی بهml ۲۰ رسید از هر بشر ml۰،۵ محلول با سمپلر برداشته و داخل لوله آزمایش ریخته و به هر لوله ml۰،۵ فنل و ml۲،۵ اسید سولفوریک غلیظ اضافه کردیم و پس از وورتکس و رسیدن محلول به دمای محیط با اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ جذب نمونه ها خوانده شد.

جداسازی و شناسایی اگزوپلی ساکارید رها شده در محیط: برای جداسازی اگزوپلی ساکاریدها آزاد شده در محیط کشت مایع رویی به دست آمده از ۱۰ میلی لیتر نمونه سانتریفوژ و سپس با تری کلرو استیک اسید با غلظت ۲۰ درصد عمل آوری شد و در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ ساعت در انکوباتور شیکدارگرمخانه گذاری شد . پروتئین های ته نشین شده پس از و در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ ساعت گرمخانه گذاری می شود که در طی این مدت با یک همزن به آرامی هم زده می شود . پروتئین های ته نشین شده پس از ۲۰ دقیقه از طریق سانتریفوژ (g ۲۵۰۰۰)برای جدا گردید سپس به منظور رسوب اگزوپلی ساکارید باند شده به مایع شفاف رویی حاصل از سانتریفوژ اتانل سرد اضافه شد. عمل رسوب سازی اگزوپلی ساکارید باند شده به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام شد عمل رسوب سازی اگزوپلی ساکارید باند شده به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام شد. برای جداسازی اگزوپلی ساکارید رسوب یافته از سانتریفوژ با دور g ۶۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد و زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد و ته نشست حاوی اگزوپلی ساکارید رها شده در محیط، پس از خشک شدن در محیط ازمایشگاهی برای سنجش با روش فنل / اسید سولفوریک در آب مقطر حل شد . به منظور اطمینان از نتایج تمام آزمایشات ۳ بار تکرار شد(۱۵). اگزوپلی ساکارید های رها شده در محیط طبق روشی که در بالا برای اگزوپلی ساکارید باندشده توضیح داده شد سنجش شد. در این تحقیق تجزیه و تحلیل اطلاعات و رسم نمودارها با کمک نرم افزارهای SPSS و EXEL انجام شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

لاکتوباسیل ها بر اساس منشاء نمونه و مورفولوژی کلنی کدگذاری شدند. نتایج کدگزاری سویه ها در جدول ۱ گزارش شده است(۱۲).

جدول ۱- کد سویه های لاکتوباسیلهای جدا شده

محل نمونه گیری	کد جدایه	منبع جداسازی
منطقه لیقوان-گارگاه ۱	C1	پنیر لیقوان دو ماهه
منطقه لیقوان-گارگاه ۴	C4	پنیر لیقوان سه ماهه
منطقه سبلان کارگاه ۱	C5	پنیر سبلان
منطقه لیقوان-گارگاه ۱	C6	پنیر لیقوان تازه
منطقه لیقوان-گارگاه ۱	Y1	ماست لیقوان
منطقه لیقوان-گارگاه ۳	Y2	ماست خیک

لاکتوباسیلها جدا شده از پنیر (جدول ۲) و ماست (جدول ۳) از نظر واکنش گرم ، تست کاتالاز ، تولید گاز و pH مورد بررسی قرار گرفتند. لاکتوباسیلها ، گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند. نتایج در جدول۲ و ۳ گزارش شده است.

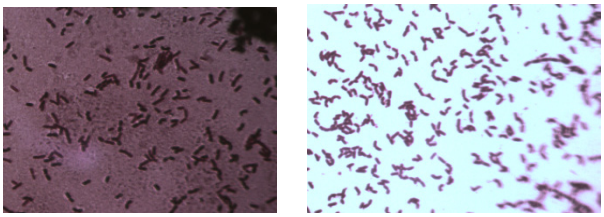
جدول ۲ - ارزیابی تست کاتالاز ، واکنش گرم و pH لاکتوباسیلهای پنیر

نام نمونه	کاتالاز	pH
C_6l_2	-	4.28
C_4i_2	-	4.29
C_5i_4	-	4.56
C_2h_1	-	4.18
C_1d_2	-	4.20
C_6m_3	-	4.72
C_6m_1	-	4.76

جدول ۳ - ارزیابی تست کاتالاز ، واکنش گرم وpH لاکتوباسیلهای ماست

نام نمونه	کاتالاز	pH
Y_1m_4	-	4.14
Y_1l_4	-	4.07
Y_2b_{10}	-	4.06
Y_2n_2	-	4.13
Y_2f_3	-	4.28
Y_2c_4	-	4.76
Y_2l_6	-	4.3
Y_2p_3	-	4.8

رنگ آمیزی گرم لاکتوباسیلها طبق استاندارد انجام شد و در شکل ۱ آورده شده است.



شکل ۱- به ترتیب از راست به چپ y2b4 ، Y2a13

شناسایی بیوشیمیایی سویه‌های برتر باکتریایی: ۱۶ سویه مقاوم به اسید و املاح صفراوی انتخاب شده از مرحله قبل بر اساس صفات بیوشیمیایی مثل رشد در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد، تولید اسید و گاز از تخمیر گلوکز، تولید NH3 از آرژنین و در نهایت توانایی تخمیر قندهای مختلف بر اساس دستورالعمل کتاب برگی شناسایی شدند.

جدول ۴- بررسی بیوشیمیایی سویه های برتر

کد سویه	رشد در ۱۵ C°	تولید اسید و گاز از تخمیر گلوکز	تولید آمونیاک از آرژنین
C4i2	+	-	+
C6m3	+	-	+
C1d2	-	-	+
C2h1	+	-	-
Y1m4	+	-	-
Y1l4	+	+	-
Y2n2	+	-	+
Y2f3	+	-	-
Y2b9	-	-	-
Y2b10	+	-	-
Y2c4	-	-	-
C5i4	+	-	-
C6m1	-	+	-
Y2p3	+	-	-
Y2l6	+	-	+
C6l2	-	-	-

نتایج حاصل با داده‌های کتاب برگی مقایسه و سویه‌های برتر بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی به قرار زیر شناسایی شدند.

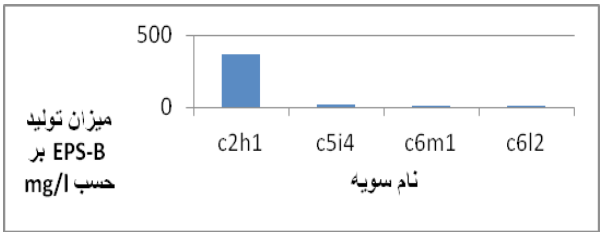
Archive of SID

www.SID.ir

جدول۶-نتایج شناسایی بیوشیمیایی سویه های برتر

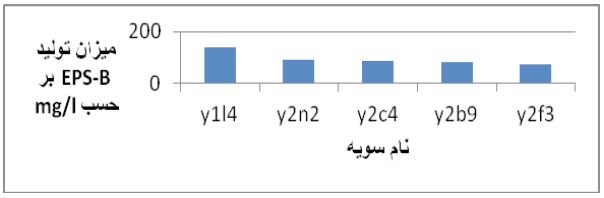
منبع جداسازی	گونه	کد جدایه
پنیر لیقوان	*L. farieminis*	C4i2
پنیر لیقوان	*L. lactis*	C1d2
پنیر سبلان	*L. jenseuii*	C6m1
پنیر لیقوان	*L. planetarium*	C6m3
ماست تازه	*L. casei*	Y1m4
ماست تازه	*L. alimentarium*	Y1l4
پنیر لیقوان	*L. rhumnosus*	C6l2
پنیر لیقوان	*L. farieminis*	C4i2
پنیر لیقوان	*L. lactis*	C1d2
پنیر سبلان	*L. jenseuii*	C6m1
پنیر لیقوان	*L. planetarium*	C6m3
ماست تازه	*L. casei*	Y1m4
ماست تازه	*L. alimentarium*	Y1l4
پنیر لیقوان	*L. rhumnosus*	C6l2
پنیر لیقوان	*L. lactis*	C2h1
ماست کهنه	*L. casei*	y2c4
ماست کهنه	*L. casei*	Y2l6
ماست کهنه	*L. casei*	Y3f3
ماست کهنه	*L. acidophilus*	Y2b9
ماست کهنه	*L. casei*	Y2p3
ماست کهنه	*L. salivarus*	Y2b10
ماست کهنه	*L. casei*	Y2n2
پنیر لیقوان	*L.paraplantarium*	C5i4

جداسازی وشناسایی اگزوپلی ساکاریدهای باند شده به سلول: از ۱۶ سویه لاکتوباسیلوس جدا شده از پنیر و ماست ۹ سویه توانایی تولید EPS باند شده را داشتند که از بین آنها ۶ سویه قادر به تولید بیشتر از۵۰ mg/l EPS باند شده بودند (جدول ۴ و ۵). در بین سویه جدا شده از پنیرهای محلی مختلف ، بیشترین میزان تولید EPS باند شده به c_2h_1 ۳۶۴ (mg/l) وکمترین میزان به c_6l_2(۱۴mg/l) تعلق داشت (نمودار۱).



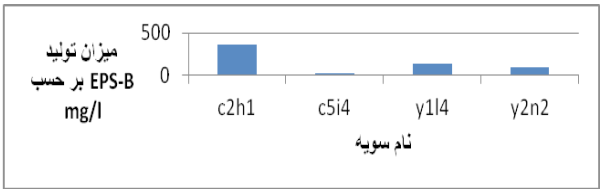
نمودار ۱ - میزان تولید اگزوپلی ساکارید باند شده در نمونه های پنیر

در بین ۵ سویه جدا شده از ماستهای محلی میزان تولید



نمودار۲- میزان تولید اگزوپلی ساکارید باند شده از ماستهای محلی

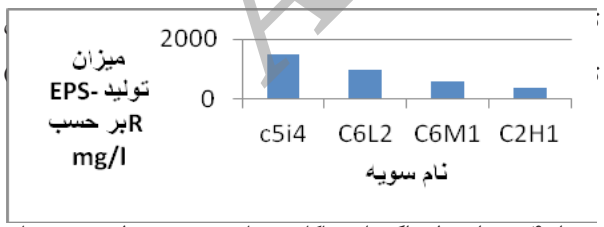
در این مطالعه از هر محصول، برای شناسایی ساختار اگزوپلی ساکارید دو سویه که بالاترین میزان تولید اگزوپلی ساکارید باند شده را داشت انتخاب شد به این ترتیب که از نمونه های پنیر به ترتیب سویه c_2h_1 (۳۶۴ mg/l) ، c_5i_4 (۱۷۳ mg/l) انتخاب شد و از سویه های جدا شده از ماست



نمودار ۳ -برترین سویه های تولید کننده اگزوپلی ساکارید باند شده در نمونه های ماست و پنیر

شناسایی و جدا کردن اگزوپلی ساکاریدهای رها شده در محیط: از ۱۶ سویه لاکتوباسیل مورد آزمایش ۹ سویه قادر به تولید EPS رها شده در محیط بودند که از بین آنها ، ۴ سویه بیشتر از Mg/l۵۰۰ اگزوپلی ساکارید رها شده در محیط را تولید کردند. (نمودار ۱ و ۲)

در بین سویه ها جدا شده از پنیرهای محلی بیشترین میزان

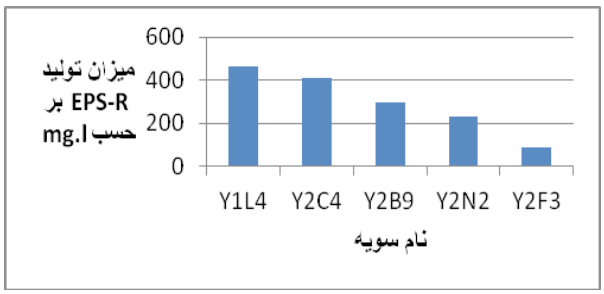


نمودار ۴ - میزان تولید اگزوپلی ساکارید رها شده در محیط در نمونه های پنیر

در نمونه های ماستی این میزان در دامنه ۲۵ mg/l ۸۷- ۱۱۸۶/۱۶۲(بیشترین y_1l_4 و کمترین y_2f_3) بود. (نمودار۵)

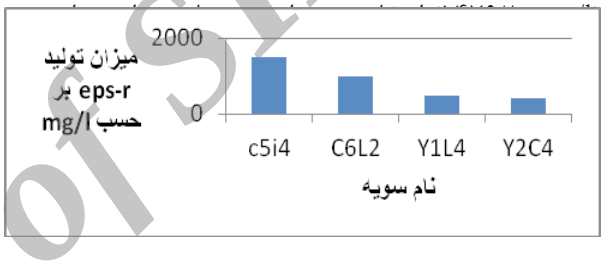
Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۵ - میزان تولید اگزوپلی ساکارید رها شده در محیط در نمونه های ماست

در این مطالعه از هر محصول، برای شناسایی ساختار اگزوپلی ساکارید، دوسویه که بالاترین میزان تولید اگزوپلی ساکارید رها شده در محیط را داشت انتخاب شد به این ترتیب از نمونه های انواع پنیر، c_6i_4 (۵۱۹/۳۵ mg/l) و c_5i_3



نمودار ۶ - برترین سویه های تولید کننده اگزوپلی ساکارید رها شده در محیط در نمونه های ماست وپنیر

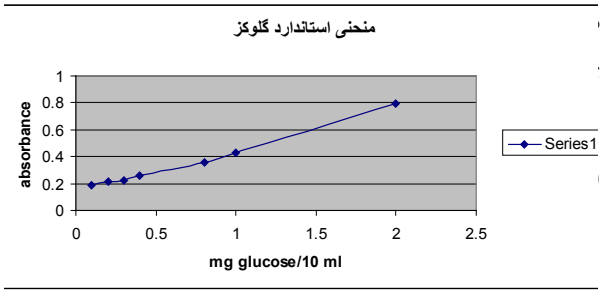
جدول ۷- میزان تولید EPS-B و EPS-R بر حسب Mg/l در نمونه های ماست

نام عصاره	EPS-B mg/l	EPS-R mg/l
Y_1l_4	۱۳۹/۱	۱۱۸۶/۶۲
Y_2n_2	۹۰/۳۷	۲۹۹/۳۹
Y_2f_3	۷۴/۳۳	۸۷/۲۵
Y_2c_4	۸۶/۶۱	۴۰۹/۲۹
Y_2b_9	۸۰/۴۵	۲۹۷/۸۰

جدول ۸- میزان تولیدEPS-B و EPS-R بر حسب mg/l در نمونه های پنیر

نام عصاره	EPS-B(mg/l)	EPS-R(mg/l)
C_6l_2	۴	۹۹۱/۳۹
C_5i_4	۱۹/۵۲	۱۵۱۹/۳۶
C_2h_1	۳۶۴	۳۹۶
C_6m_1	۱۵.۶۵	۵۹۱.۵۵

از فرمول حاصله از رسم منحنی استاندارد گلوکز برای محاسبه

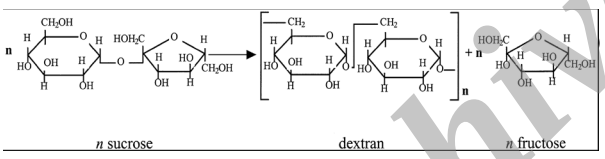


نمودار۷ - منحنی استاندارد گلوکز برای تعیین میزان کلی کربوهیدرات

بحث

مکانیسم تولید اگزوپلی ساکارید: اگزوپلی ساکارید های تولید شده توسط لاکتوباسیلها بر حسب وضعیت خارج سلولی یا داخل سلولی به دو روش سنتز می شوند.

فرایند بیوسنتز تعداد کمی از هموپلی ساکاریدها مثل دکستران ، موتان ، آلترنان و لوان خارج سلولی است و نیازمند سوبسترای ساکارز می باشد و آنزیم های گلیکوزیل ترانسفراز (مثل دکستران سوکراز برای بیوسنتز دکستران و لوان سوکراز برای بیوسنتز لوان)در واکنش پلیمریزاسیون درگیرند. انرژی موردنیاز برای پلیمریزاسیون از هیدرولیز ساکارز تامین می شوداین



شکل ۲: بیوسنتز هموپلی ساکارید دکستران(۳).

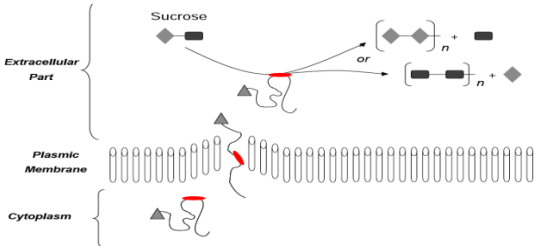
هموپلی ساکاریدها در خارج از سلول توسط گلیکان سوکراز خارج سلولی متعلق به رده گلیکوترانسفرازها(GTF) سنتز می شود.

آنزیمهای متعلق به گروه گلیکوزیل ترانسفرازها(GTF) بر حسب محصولات تولیدی شان یا ترانس گلوکوزیداز هستندو یا ترانس فروکتوزیداز هستند.دکستران سوکراز، موتان سوکراز و روتران سوکراز متعلق به گروه ترانس گلوکوزیدازها هستند. آنها پروتئینهای خارج سلولی با وزن مولکولی بالا هستند که منحصرا توسط ژن *gft* رمزگذاری می شوند. (شکل ۳) آنها دو واکنش را کاتالیز می کنند : (۱) هیدرولیز ساکارز ، که در آنجا گلوکز به عنوان سوبسترای جدید است و انتقال گلیکوزیل روی ترکیب

Archive of SID

www.SID.ir

کربوهیدراتی و غیر کربوهیدراتی(۳) .



شکل ۳ - مکانیسم سنتز تولید اگزوپلی ساکارید

هتروپلی ساکارید ها در اثر پلیمریزاسیون پیش سازهای واحدهای تکراری در سیتوپلاسم تشکیل می شوند. چندین نوع آنزیم و پروتئین در بیوسنتز و ترشح EPS نوع هترو درگیرند که برای تشکیل EPS چندان ضروری نیستند. نوکلئوتیدهای قندی که از قند- ۱- فسفات مشتق شده اند در بیوسنتز هتروپلی ساکاریدها نقش مهمی دارند که این نقش مهم به دلیل فعالسازی قندهاست که برای پلیمریزاسیون قندها و تبدیل قند (اپیمریزاسیون ، دکربوکسیلاسیون ، دهیدروژناسیون و غیره) ضروری است. فعال سازی قند و تغییر آنزیمها در تشکیل بلوکهای سازنده و در نهایت ترکیب EPS نقش تعیین کننده ای دارند (۱۷) .

در این مطالعه، سویه های موجود، از ماست و پنیر جدا شده و متعلق به سویه های لاکتوباسیلها بودند و طبق مطالعاتی که انجام شد تمام سویه های جدا شده ازاین محصولات مورد مطالعه، توانایی تولید EPS را داشتند. این محصولات در شمال و شمال غرب ایران به صورت محلی تولید می شوند و برای هر یک از این محصولات در طی فرآوری از تکنیک های مختلفی استفاده می شود.

این تحقیق برای اولین بار جداسازی EPS را از دو محصول لبنی ایران (ماست و پنیر) گزارش می دهد. سویه های جدا شده، پلی ساکارید سنتز و ترشح می کنند و روی محیط MRS آگار فنوتیپ موکوئیدی از خود نشان می دهند. زمانی که این سویه ها در محیط MRS-Broth رشد می کنند دو جزءEPS تولید می کنند : یک جزء که از مایع رو جدا شده و EPS آزاد را تشکیل می دهد و جزءدوم که از ته نشست حاصل از سانتریفوژ محیط کشت براث جداشده و EPS باند شده را تشکیل می دهد، گرمخانه گذاری ،ته نشست با EDTA ۰,۱ مولار اجازه جداسازی EPS باند شده را فراهم می آورد.

برخی از مطالعات نشان داده که تولید EPS توسط باکتری های اسید لاکتیک (LAB)ممکن است تحت تاثیر شرایط محیط کشت (منبع کربن و منبع نیتروژن) و شرایط گرمخانه گذاری قرار داشته باشد (۱۵). ما در این مطالعه از محیط کشت MRS-Broth استفاده کردیم تا فنوتیپهای تولید کننده EPS را افزایش دهیم با این حال فنوتیپهای تولید کننده EPS محصولات ماست نسبت به پنیر محدود بود.

بیشتر مطالعات انجام شده در اکثر کشورها فقط در زمینه تولید EPS متمرکز بوده و نوع EPS (باند شده یا آزاد) مشخص نشده به عنوان مثال در نیجریه سویه های LAB را ازبرخی محصولات لبنی تخمیری و غیرلبنی تخمیری برای تولید EPS غربال کردند این محققان بجز لاکتوباسیلها میزان تولید EPS توسط لکونوستوکها را بررسی کردند (۲)، همینطور از dahi (محصول تخمیری لبنی هندی) و شیر تخمیر شده در هند چندین سویه LAB مزوفیل تولید کننده EPS جدا شد که نوع EPS (باند شده و آزاد) مشخص نبود و تماما لاکتوباسیل نبودند بلکه این محققین برخی از سویه های لکونوستک و انتروکوکوس تولید کننده EPS رانیز مشخص کردند(۴) .

در این تحقیق ۹ سویه از نظر تولید EPS باند شده و آزاد مورد بررسی قرار گرفت و مطالعات به دست آمده نشان داد که تمام سویه های مورد مطالعه توانایی تولید EPS (باند شده و آزاد) را داشتند از طرف دیگر تمام سویه های جدا شده از محصولات لبنی ایران، سویه های لاکتوباسیل بودند.

همچنین بیشتر مطالعات انجام شده در زمینه تولید EPS باند شده و آزاد ، بر روی یک سویه مشخص انجام شده بود برای مثال از دانه کفیر فقط یک سویه تولید کننده EPS (کفیران) را جدا کردند(۱۰)و در بررسی دیگر فقط از یک سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۵۶ EP که از سیلاژ ذرت جدا شده بود دو نوع EPS باند شده و آزاد جدا کردند(۱۵).اگزوپلی ساکاریدها در آب حل شده و خواص ژله ای و قوام دهندگی ایجاد می کنند؛ همچنین در مواد غذایی به عنوان امولسیون کننده، پایدارکننده، سوسپانسیون ذرات، کنترل کریستالیزاسیون، تشکیل فیلم و انکپسوله کردن به کار می روند (۱۷).

برای تولید ماست، نوشیدنیهای ماستی، پنیر، خامه تخمیر شده،

Archive of SID
www.SID.ir

دسرهای بر پایه شیر LAB تولید کننده اگزوپلی ساکارید دارای اهمیت زیادی هستند. EPS ها به بافت، احساس دهانی، درک مزه و پایداری محصول نهایی کمک می کنند.

برخی از این اگزوپلی ساکاریدها اثر سلامت بخشی بر انسان دارند؛ به عنوان مثال، کلسترول خون را کاهش می دهند، فعالیت ضد توموری دارند، تحریک کننده سیستم ایمنی هستند، همچنین به مدت طولانی در بخش دستگاه گوارشی باقی می مانند و اثر پری بیوتیکی دارند(۹) . همچنین استارترهای تولید کننده EPS در تولید پنیر موزارلای کم چرب به خاطر حفظ رطوبت استفاده شدند(۱۱).

نتایج این مطالعات نشان داد که لاکتوباسیلهای جدا شده از محصولات لبنی سنتی ایران دارای توانایی تولید EPS به صورت آزاد و باند شده می باشد در نتیجه امکان استفاده از این باکتریها به عنوان استارتر و یا کشت همراه جهت بهبود خواص رئولوژیکی فراورده های غذایی وجود دارد. با استفاده از LAB تولید کننده EPS ، تقاضای مصرف کنند گان برای محصولات لبنی طبیعی با بافت خامه ای و نرم ، قند و چربی کمتر بر آورده می شود. موفقیت در کاربرد EPS از طریق توانایی آن برای اتصال با آب ، واکنش با پروتئینها و افزایش ویسکوزیته فاز سرمی شیر تعیین می شود.با استفاده از EPS به عنوان بافت دهنده و پایدار کننده میتوان مصرف برخی افزودنیهای شیمیایی را کاهش داد.اگر چه مکانیسم واکنشها بین EPS و ترکیبات شیر در محصولات تخمیری آنچنان شناخته شده نیست ویسکوزیته و بار EPS خواص نهایی محصول نهایی را تعیین می کند.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

(۱) اکبری، ع. اعتمادی، ف . دادفرما، ف. آئین، کاربرد روشهای عمومی آزمایشهای میکروبی مواد غذائی. استاندارد شماره ۲۳۲۵ . چاپ ۵.

(2) Adebayo-tayo B, Onilude A. Screening of lactic acid bacteria strains isolated from some nigerian fermented foods for EPS production.World Applied Sciences, 2008; 4(5): 741-747.
(3) Badel S, Bernardi T, Michaud P. New perspectives for Lactobacilli Exopolysaccharides,Biotechnology Advances , 2010.
(4) Behare P, Singh R P, Singh R. Exopolysaccharide-producing mesophilic lactic cultures for preparation of fat-free Dahi-Indian fermented milk. Dairy Research, 2009;76: 90-97
(5)Garabal J I , Rodríguez-Alonso P , Centeno J A. Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cows' milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain), Food Science and Technology, 2008; 41(8): 1452-1458.
(6) Jolly L, Vincent J F, Duboc P, Neeser J R. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 2002; 82: 367–374.
(7) Jung S W , Kim W J , Lee K G, Kim C W. Isolation and identification of lactic acid bacteria from sourdough with high exopolysaccharides production ability. Food Science and Biotechnology, 2009; 18(2): 384-389.
(8) Kandler O, Nobert W. Bergeys mannual of systemat bacteriology. 2nd Ed, 1989.
(9) Madiedo P, Reyes-Gavila´n C G. Methods for the screening, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Dairy Science,2005; 88: 843-856.
(10) Micheli L, Uccelletti D, Palleschi C, Crescenzi V. Isolation and characterisation of a ropy Lactobacillus strain producing the exopolysaccharide kefiran. Appl Microbiol Biotechnol, 1999; 53: 69-74.
(11) Perry D B, Mcmahon D J, Oberg C J. Effect of Exopolysaccharides-Producing Cultures on Moisture Retention in Low Fat Mozzarella Cheese. Dairy Science, 1997; 80(5).
(12) Tajabady E M , Ouwehand A C , Hejazi M A, Jafari P. Traditional Iranian dairy products: A source of potential probiotic lactobacilli. African Journal of Microbiology, 2011; 5(1): 20-27.
(13) Tajabady E M. Study on antagonistic activity of acid and bile tolerance Lactobacillus isolated from traditional dairy products. Arak University of Medical Sciences, 2009; 12: 17-27.
(14) Tajabady E M, Hejazi M A, Noohi A. Study on probiotic properties of Lactobacilluse isolated from traditional dairy products of Lighvan. Quarterly Journal of Science, Tarbiat Moallem University. 2008; 7: 941-952.
(15) Tallon R, Bressollier, P, Urdaci M. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by lactobacillus plantarum EP56. Research in Microbiology, 2003;154: 705-712.
(16) Welman A D, Maddox I S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. Trends in Biotechnology, 2009; 21(6).
(17) Vuyst L D, Degeest B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology, 1999; 23: 153-177.

Archive of SID

www.SID.ir