مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم شماره سی و یکم - تابستان ۱۳۹۷

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط *Bacillus pasteuri* و بررسی خواص ضدباکتریایی و ضداکسیدانی آن

لایق کریمی، مجتبی تاران*، مهدی ذبیحی

دانشکده علوم پایه، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

چکیده

سابقه و هدف: اگزوپلی‌ساکاریدها بیوپلی‌مرهایی هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها به محیط اطراف ترشح می‌شوند. هدف از این تحقیق تعیین شرایط برای تولید حداکثری اگزوپلی ساکارید توسط باکتری *Bacillus pasteuri* و بررسی خواص ضدباکتریایی و ضداکسیدانی آن بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه بر اساس روش تاگوچی و توسط نرم‌افزار Qulitek-4 برای تولید اگزوپلی‌ساکارید آزمایش طراحی شد. سپس از اگزوپلی‌ساکارید تولید شده غلظت‌های مختلفی تهیه و به‌منظور بررسی خواص ضدباکتریایی به اثر آن بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس و اشریشیاکلی پرداخته شد. به‌منظور بررسی فعالیت ضداکسیدانی ۴ غلظت از اگزوپلی‌ساکارید تهیه و توسط سه روش مهار فعالیت رادیکالی DPPH، رادیکالی سوپراکسیدانی و رادیکال هیدروکسیل اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بهترین شرایط برای بیش‌ترین میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید پس از گذشتن ۴۸ ساعت از کشت باکتری با میزان غلظت نمک ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ساکارز ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حاصل از فعالیت ضدباکتریایی نشان داد که بیش‌ترین هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۴۰۰µg/ml بود. نتایج فعالیت ضداکسیدانی در هر سه روش به‌کار گرفته شده در این مطالعه نشان داد که در غلظت ۱۰۰۰µg/ml از اگزوپلی‌ساکارید بیش‌ترین فعالیت مهار وجود دارد.

نتیجه‌گیری: با تعیین چند عامل کلیدی می‌توان بیش‌ترین میزان اگزوپلی‌ساکارید توسط باکتری باسیلوس پاستوری را تولید و به‌منظور فعالیت ضدباکتریایی و ضداکسیدانی از آن استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اگزوپلی‌ساکارید، *Bacillus pasteuri*، ضدباکتریایی، ضداکسیدانی

مقدمه

پلی‌ساکاریدها مولکول‌هایی با وزن مولکولی بالا هستند که از واحدهای قندی کوچک‌تری به نام مونوساکاریدها ساخته می‌شوند و از طریق پیوند گلیکوزیدی بهم متصل هستند (۹). نقش پلی‌ساکاریدها در سلول‌های باکتریایی می‌تواند به‌صورت یک لایه لزج خارجی که سبب چسبندگی به دیگر سلول‌ها، تعامل‌های سلول- سلول (یکی از ویژگی‌های گونه‌های بیماری‌زا)، به شکل یک کپسول یا گلیکوکالیکس متصل به دیواره سلولی که سبب محافظت در برابر شرایط نامطلوب گردد و یا سبب پایداری مکانیکی دیواره سلولی، کنترل انتشار مولکول‌ها به سلول و خروج سایر متابولیت‌ها، تشکیل یک ماده ذخیره کننده انرژی و یا در برخی از میکروارگانیسم‌ها، پلی-ساکاریدها، نقشی آنزیمی پیدا می‌کنند (لیزازهای پلی-ساکاریدی) که سبب تجزیه پلی‌مرهای قندی به مونومرها شوند (۶). مهم‌ترین پلی‌ساکاریدهای تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها شامل: زانتان، ژلان، آلژینات، کوردلان، پلولان و بیوپولی‌مرهای کم‌تر صنعتی یا کم‌تر مورد مطالعه نظیر لوان، آلترنان، دکستران میکروبی، پلی‌ساکاریدهای

نویسنده مسئول :
دانشگاه رازی، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی
پست الکترونیکی: Mehdi.zabihi.1368@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱/۲۹

Archive of SID
www.SID.ir

باکتری‌های اسید لاکتیک پلی‌ساکاریدهای قارچی مانند زایموزان و... هستند که از نظر خصوصیت‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی با هم متفاوت بوده و در برنامه‌های کاربردی تجاری و صنعتی مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در مقایسه با پلی‌ساکاریدهای جدا شده از منابع گیاهی که برای اهداف مشابه نیز استفاده می‌شوند، پلی‌ساکاریدهای میکروبی دارای مزایای بهتری مانند: پروسه‌های تولید در مقیاس بزرگ یا در فضا و زمان تولید نسبتا محدود، به خوبی قابل کنترل است، ویژگی‌های شیمیایی پایداری دارند و میزان در دسترس بودن منابع در بازار زیاد است (۱۷).

پلی‌ساکاریدهای میکروبی به دو شکل تولید می‌شوند، پلی‌ساکاریدهای کپسولی[1] و اگزوپلی‌ساکاریدها[2] اگزوپلی‌ساکاریدهای (EPS) میکروبی پلی‌مرهای محلول و نامحلولی هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها به محیط اطراف ترشح می‌شوند (۱۹). اگزوپلی‌ساکاریدها در بخش‌های مختلفی نظیر مواد غذایی و دارویی به‌کار برده می‌شوند. به‌علت ویژگی‌های فیزیکی و رئولوژیکی موجود در ساختار اگزوپلی‌ساکاریدها، به‌طور گسترده‌ای در صنایع غذایی به‌عنوان یک ماده دارای ویسکوزیته، پایدار کننده، ژله‌ایی و یا عامل امولسیونی کاربرد دارد (۴-۱۰). براساس مطالعه‌های جدید اگزوپلی‌ساکاریدی‌های تولید شده توسط باکتری‌ها، به‌عنوان فلوکولانت‌های زیستی، جذب کننده‌های زیستی، عامل حذف فلزات سنگین، عامل دارویی و... شناخته می‌شود (۲۱). در سال‌های اخیر توجه به کاربردهای بیولوژیکی اگزوپلی‌ساکاریدی‌های به‌دلیل فعالیت ضدتوموری، ضدویروسی، ضدالتهابی و تحریک کننده سیستم ایمنی بسار زیاد شده است (۲). درسال‌های اخیر پلی‌ساکاریدها از باکتری‌ها، مخمرها، قارچ‌ها و گیاهان گزارش شده‌اند که دارای فعالیت‌های ضداکسیدانی‌اند و می‌توانند به‌عنوان ضداکسیدان‌های طبیعی مورد استفاده قرار گیرند (۲۳). باسیلوس‌ها یک گروه مهم از باکتری‌ها است که مزایای متعددی نسبت به سایر باکتری‌ها دارد که شامل رشد آسان، حفظ و نگه‌داری بهتر است که آن را برای کارهای تولیدات صنعتی مناسب نموده است. تعداد زیادی از سویه‌های باسیلوس نشان داده‌اند که به‌هیچ‌وجه بیماری‌زا نیستند و علاوه بر این اگزوپلی‌ساکاریدهای تولید شده توسط این باکتری‌ها دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی و ویژگی‌های تکنیکی نیز هستند (۸). گونه باسیلوس و سویه‌های آن اگزوپلی‌ساکاریدی‌های نوع لاوان β-1,3-Glucan و هتروپلی‌مرهای قندی خنثی، اورونیک اسید، قندهای غیر معمول یا ترکیب‌های قند - پروتئین را تولید می‌کنند. برخی از اگزوپلی‌ساکاریدی‌های تولید شده توسط باسیلوس دارای فعالیت‌های امولسیونی، فلوکولانت‌های زیستی، توانایی حذف فلزات سنگین و یا فعالیت‌های دارویی هستند (۱۳). هدف از این مطالعه تعیین چند عامل کلیدی برای تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط سویه *B.pasteuri* و بررسی اثرهای زیستی از جمله فعالیت ضدباکتریایی و ضداکسیدانی آن بود.

مواد و روش‌ها:

تهیه سویه باکتری و محیط کشت

به‌منظور تولید اگزوپلی‌ساکاریدها، سویه باکتری *Bacillus pasteuri* PTCC 1645 از سازمان پژوهش‌های علمی-صنعتی ایران خریداری و تهیه گردید. باکتری پس از تهیه، بر روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۲۰٪ اوره کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. محیط کشت بر اساس روش لیو (Liu) و همکاران با اندکی تغییرهایی که شامل ۰/۰۵ گرم عصاره گوشت، ۰/۱۲۵گرم $K_2HPO_4.3H_2O$، ۰/۱۲۵ گرم KH_2PO_4، ۰/۱۲۵ گرم $Na_2HPO_4.3H_2O$، ۰/۰۱ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۲۵ گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۱۰-۵* ۵ گرم $FeSO_4.7H_2O$ در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، تهیه شد (pH=۷) (۱۳).

تولید اگزوپلی ساکارید و طراحی آزمایش

برای تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط سویه باکتری *باسیلوس پاستوری* آزمایش‌های مختلفی توسط نرم‌افزار Qualitek-4 و با استفاده از روش تاگوچی طراحی شد. تاگوچی مجموعه‌ایی از جداول را به‌عنوان جدول آرایه‌های متعامد تهیه می‌کند که بر اساس مراحل و وضعیت‌های مختلف آزمایش‌ها است. در این تحقیق برای ۳ عامل در ۳ سطح، تاگوچی ۹ مرحله آزمایش را در قالب جدول (جدول شماره ۲) پیشنهاد می‌کند که در ستون به نوع عامل موردنظر و ردیف‌ها به سطوح هر یک از عوامل اشاره دارد. در این تحقیق ۳ عامل زمان (در سه سطح ۲۴-۴۸-۷۲ ساعت)، غلظت ساکارز (در سه سطح ۱ گرم –۱/۵ گرم –۲ گرم) و غلظت نمک (در سه سطح ۰/۰۵ گرم –۰/۱ گرم –۰/۱۵ گرم) به‌عنوان متغیر جهت بررسی بهترین شرایط برای تولید اگزوپلی‌ساکارید از باکتری *B.pasteuri* تعیین شد (جدول شماره ۱). محیط کشت تهیه

[1] Capsule polysaccharides
[2] Exopolysaccharides

www.SID.ir

شده و به ۹ ارلن ml ۲۵۰ اضافه و سپس در دمای ^{o}C ۱۲۱ و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید، سپس ۲۰٪ اوره به‌وسیله فیلترهای ۰/۲ میکرونی به محیط کشت اضافه شد. پس از اتوکلاو کردن، در شرایط به‌طور کامل استریل، به هر کدام از ارلن‌ها به‌وسیله لوپ، باکتری‌ها اضافه و سپس ارلن‌ها در انکوباتور شیکردار، در دمای ^{o}C ۳۰ و چرخش rpm ۱۲۰ گرمخانه‌گذاری شدند. نمونه‌برداری از ارلن‌ها پس از گذشتن زمان‌های ۲۴ – ۴۸ – ۷۲ ساعت انجام و نتایج گزارش گردید (۱۸).

جدول ۱- عوامل و سطوح مورد بررسی

عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
زمان (ساعت)	۲۴	۴۸	۷۲
ساکارز	۱	۱/۵	۲
غلظت نمک	۰/۰۵	۰/۱	۰/۱۵

جدول ۲- نه آزمایش طراحی شده مطابق روش تاگوچی

غلظت نمک	غلظت ساکارز	زمان(ساعت)	شماره ارلن (۲۵۰ ml)
۰/۱ ۰/۱۵ ۰/۰۵	۲ ۱/۵ ۱	۷۲ ۴۸ ۲۴	
۰/۱۵	۱	۲۴	۱
۰/۱	۱/۵	۲۴	۲
۰/۰۵	۲	۲۴	۳
۰/۰۵	۱	۴۸	۴
۰/۱۵	۱/۵	۴۸	۵
۰/۱	۲	۴۸	۶
۰/۱	۱	۷۲	۷
۰/۱۵	۱/۵	۷۲	۸
۰/۰۵	۲	۷۲	۹

استخراج و خالص سازی اگزوپلی‌ساکاریدی‌های متصل به سلول و اگزوپلی‌ساکاریدی‌های که توسط باکتری به محیط کشت ترشح می‌شوند

برای جداسازی اگزوپلی‌ساکاریدی‌های متصل به باکتری بر اساس روش Garcîagaribay and Marshall با اندکی تغییر، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا از باکتری جدا گردند. سپس به‌منظور خالص‌سازی هر دو نمونه اگزوپلی‌ساکاریدی‌های متصل به سلول و ترشح شده به داخل محیط کشت نمونه‌ها در دستگاه سانتریفیوژ ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰دقیقه و در دور rpm ۱۰۰۰۰، سانتریفیوز شدند (۷). مایع رویی جداسازی شده و رسوب دور ریخته شد. جهت رسوب اگزوپلی‌ساکاریدی به هر کدام از نمونه‌ها ۱ حجم اتانول ۹۶٪ اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه نگه‌داری شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و با دور rpm ۶۰۰۰ سانتریفیوژ گردید، مایع رویی دور ریخته شده و رسوب پس از خشک شدن وزن گردید (۲۲).

آنالیز FT-IR

Fourier transform infrared spectroscopy روشی است که اطلاعاتی در مورد نحوه ارتعاش و حرکت مولکول‌ها به ما می‌دهد، از این رو به‌عنوان یک تکنیک مهم برای شناسایی خصوصیت‌های یک ماده به کار می‌رود. در این پژوهش عمده‌ترین گروه‌های ساختاری و عاملی اگزوپلی‌ساکاریدی به‌وسیله اسپکتروسکوپی با استفاده از روش KBr آنالیز شد. نمونه‌های اگزوپلی‌ساکاریدی در داخل پلیت‌های KBr با نسبت ۱:۱۰۰ قرار داده شدند. نمونه‌ها در *دستگاه* FT-IR (Bruker Tensor 27 ساخت کشور آلمان در ناحیه فرکانس $۴۰۰cm^{-1}$ تا ۴۰۰۰ قرار داده شدند و نتایج به‌صورت نمودار و پیک مورد بررسی قرار گرفت (۲۰).

بررسی فعالیت ضد باکتریایی

برای بررسی فعالیت ضدمیکروبی و باکتریایی، ۴ غلظت مختلف (۱۰۰-۲۰۰-۳۰۰-۴۰۰µg/ml) از اگزوپلی‌ساکارید تهیه شد و بعد از استریل کردن به‌مدت ۲۴ ساعت به دیسک‌های خالی منتقل شدند، سپس این دیسک‌ها به پلیت‌هایی که باکتری‌های اشریشیاکلی (*E. coli* ATCC 25922) از گرم منفی‌ها و استافیلوکوکوس‌ارئوس (*S. aureus* ATCC 43300) از گرم مثبت‌ها به‌صورت چمنی کشت داده و اضافه شدند. با کمک محلول نیم مک‌فارلند رقت مناسب از کشت ۲۴ ساعته از باکتری‌ها تهیه و سپس بر روی محیط کشت مولر- هینتون آگار کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند، سپس هاله عدم رشد باکتری‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج حاصله، با

Archive of SID

www.SID.ir

آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و وانکومایسین با غلظت (µ g ۳۰۰) مقایسه و ارزیابی شد (۱۲).

بررسی فعالیت ضداکسیدانی

به‌منظور بررسی فعالیت ضداکسیدانی ۴ غلظت از اگزوپلی-ساکارید (µg/ml ۱۰۰۰-۸۰۰-۴۰۰-۲۰۰) تهیه گردید و بر اساس روش Fang و همکاران مهار فعالیت رادیکالی DPPH، مهار فعالیت رادیکالی سوپراکسیدانی و مهار فعالیت رادیکال هیدروکسیل اندازه‌گیری و نتایج با آسکوربیک اسید (ویتامین C) مقایسه شد.

مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH به‌وسیله اگزوپلی‌ساکاریدی بر اساس روش فانگ Fang و همکاران انجام شد که به‌طور مختصر به‌صورت زیر است. ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف اگزوپلی‌ساکارید (µ۲۰۰-۴۰۰-۸۰۰-۱۰۰۰g/ml) با ۰/۵ میلی‌لیتر محلول اتانولی DPPH اضافه و به‌طور کامل مخلوط شدند، سپس در لوله‌های آزمایشی که با فویل آلومینیومی پوشیده شده بود ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس در طول موج ۵۱۷ نانومتر جذب آن گرفته شد. مهار فعالیت‌های رادیکالی DPPH (RSA) با توجه به فرمول زیر محاسبه گردید:

DPPH RSA % = [(A0-A1)/A0] *100

A_1. جذب نوری محلول با غلظت‌های مختلف نمونه است. A_0. جذب نوری محلول DPPH بدون نمونه است (۵).

مهار فعالیت رادیکالی سوپراکسیدانی با کمی تغییر به‌صورت زیر انجام شد. بر انجام این روش ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات (50 mM, pH 8.34) با ۰/۴ میلی‌لیتر از رقت‌های مختلف اگزوپلی‌ساکارید (µ۲۰۰-۴۰۰-۸۰۰-۱۰۰۰g/ml) مخلوط و به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر پیروکالول (۳ mM) از پیش گرم شده را در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اضافه و محلول مخلوط را سپس در جذب ۳۲۵ نانومتر به‌مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. مهار فعالیت رادیکال آنیون سوپراکسید با توجه به فرمول زیر محاسبه گردید.

Superoxide anion RSA % = [(ΔA0-ΔA1)/ ΔA0] *100

ΔA_1 تفاوت مقدار جذب در هر ۳۰ ثانیه برای غلظت‌های مختلف نمونه است. ΔA_0 تفاوت مقدار جذب در هر ۳۰ ثانیه بدون نمونه است (۵).

انجام مهار فعالیت رادیکال هیدروکسیل نیز بر اساس روش Fang و همکاران انجام شد که یک مخلوط واکنش حاوی ۰/۲ میلی‌لیتر brilliant green (۰/۴۵ mM)، ۰/۵ میلی‌لیتر $FeSO_4$(0.5 mM)، ۰/۵ میلی‌لیتر H_2O_2 (3.0%w/v) و ۰/۵ میلی‌لیتر از رقت‌های مختلف اگزوپلی‌ساکارید (µ۲۰۰-g/ml ۱۰۰۰-۸۰۰-۴۰۰) در لوله‌های آزمایش پوشیده شده در فویل آلومینیومی قرار داده شدند و در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفوژ شد و جذب در ۶۲۴ نانومتر اندازه‌گیری گردید. مهار فعالیت رادیکال هیدروکسیل توسط معادله زیر تعیین شد

Hydroxyl RSA % = [(A0-A1)/ (A-A1)] *100

A_0 جذب نوری محلول با غلظت های مختلف نمونه است. A_1 جذب نوری محلول در غیاب نمونه است. A جذب نوری محلول در غیاب سیستم نمونه‌ها و H_2O_2 است (۵).

آنالیز آماری

به‌منظور دست‌یابی به نتایج آماری دقیق‌تر داده‌ها به‌صورت میانگین± انحراف معیار بیان شدند. در صورتی‌که آنالیز یک طرفه واریانس (آنووا) از مدل خطی عمومی یک تفاوت معنادار داشته باشد سطح معنادار $p < ۰/۰۵$ مورد توجه است و همه آنالیزهای آماری با استفاده نرم‌افزار آماری SPSS ورژن ۱۶ انجام شدند.

یافته‌ها

نتایج نهایی تولید اگزوپلی‌ساکارید

پس از نمونه‌برداری از ارلن‌ها، میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید تولید شده مورد آزمایش، مورد بررسی قرار گرفت و در جدول شماره یک به نمایش در آمده است. بر اساس این نتایج، ارلن شماره ۴ پس از گذشت ۴۸ ساعت بیش‌ترین مقدار اگزوپلی-ساکاریدی را تولید نمود که میزان آن ۳۰/۶۶ گرم / لیتر بود.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- نتایج نهایی تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط باکتری *B. pasteuri*

شماره آزمایش	میزان تولید (g/ml)
۱	۱۲/۶۶
۲	۱۷/۳۳
۳	۱۳/۳۳
۴	۳۰/۶۶
۵	۱۲
۶	۱۰/۶۶
۷	۶/۶۶
۸	۵/۳۳
۹	۶/۶۶

تأثیر هریک از عوامل و سطوح آن‌ها برای تولید اگزوپلی‌ساکارید

تأثیر هر یک از سطوح و عامل‌های مختلف بر تولید اگزوپلی-ساکارید در جدول شماره ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴- اثر سطوح مختلف عوامل بر تولید اگزوپلی‌ساکارید

سطح / عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۱ – سطح ۲
زمان	۱۴/۴۳۹	۱۷/۷۷۳	۶/۲۱۶	۳/۳۳۳
ساکارز	۱۶/۶۵۹	۱۱/۵۵۳	۱۰/۲۱۶	-۵/۱۰۶
غلظت نمک	۱۸/۲۱۶	۹/۵۵	۱۰/۶۶۳	-۸/۶۶۶

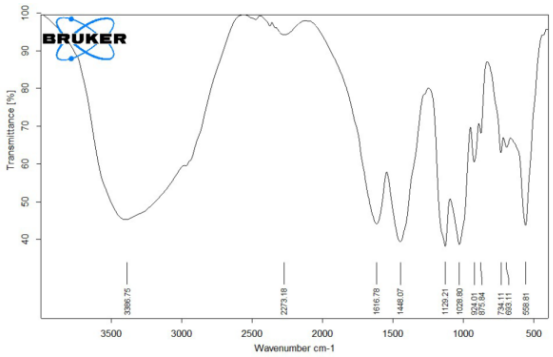
بر اساس نتایج به‌دست آمده از جدول شماره ۴ بهترین سطوح مناسب برای تولید اگزوپلی‌ساکارید در جدول شماره ۵ نشان داده شده است. بر اساس این جدول بیش‌ترین سهم مربوط به عامل غلظت نمک با مقدار ۵/۴۰۶ که در سطح ۱ قرار دارد. هم‌چنین کم‌ترین سهم مربوط به عامل ساکارز با میزان ۳/۸۴۹ می‌باشد که در سطح ۱ قرار گرفته است. مطابق این جدول برای عامل زمان با سهم ۴/۹۶۳ بهترین حالت سطح ۲ هست.

جدول ۵- تعیین سطوح مناسب برای تولید اگزوپلی‌ساکارید

عامل	سطح	سهم
زمان	۲	۴/۹۶۳
ساکاروز	۱	۳/۸۴۹
غلظت نمک	۱	۵/۴۰۶

نتایج حاصل از آنالیز FT-IR

شکل شماره ۱ نتیجه FT-IR برای نمونه سنتز شده را که از فرکانس cm^{-1} ۴۰۰ -۴۰۰۰ در بر می‌گیرد نشان می‌دهد، وجود پیک‌ها نشان دهنده پلی‌ساکاریدی بودن و خالص بودن ماده سنتز شده هست. وجود پیک پهن ناحیه cm^{-1} ۳۳۹۶/۷۵ نشان دهنده گروه‌های هیدروکسل O–H است. هم‌چنین وجود پیک در ناحیه cm^{-1} ۲۲۷۳/۱۸ مربوط به گروه‌های C-H است . وجود پیک در ناحیه cm^{-1} ۱۶۱۶/۷۸ نشان دهنده وجود C = O و گروه‌های کربوکسیل در این ترکیب است. پیک در ناحیه cm^{-1} ۱۴۴۹/۰۷نشان دهنده وجود گروه‌های - COO^{-} است و هم‌چنین پیک در ناحیه cm^{-1} ۹۰۰ تا cm^{-1} ۱۲۰۰ نشان‌دهنده وجود گروه‌های C-O و C-O-C است (۲۰).



شکل ۱- آنالیز FT-IR پلی ساکارید تولید شده

بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی

به‌منظور بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی ۴ غلظت مختلف (۱۰۰-۲۰۰-۳۰۰-۴۰۰µg/ml) از اگزوپلی‌ساکارید تهیه شد و میزان تأثیر آنتی باکتریال آن بر دو سویه از باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس و اشریشیاکلی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن با آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و وانکومایسین با غلظت (۳۰۰µg/ml) مقایسه و در جدول شماره ۶ به نمایش در آمد. در هر دو باکتری بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۴۰۰µg/ml بود. برای باکتری اشریشیاکلی بیش-ترین قطر هاله عدم رشد تشکیل شده ۱۶ میلی‌متر بود که کمابیش برابر با آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (۱۷ میلی‌متر) است. برای باکتری استافیلوکوکوس ارئوس بیش‌ترین هاله عدم رشد تشکیل شده ۱۸ میلی‌متر بود که برابر با هاله عدم رشد تشکیل شده در اثر آنتی‌بیوتیک وانکومایسین (۱۸ میلی‌متر) است. به‌طور کلی با افزایش غلظت اگزوپلی‌ساکارید میزان تأثیر فعالیت آنتی‌باکتریال آن نیز افزایش پیدا کرده است. در این مطالعه میزان تأثیر غلظت اگزوپلی‌ساکارید در مقدار ۱۰۰µg/ml کم‌تر از بقیه غلظت‌ها است ولی در سایر غلظت‌ها تفاوت معناداری وجود ندارد ($P< ۰/۰۵$).

Archive of SID

www.SID.ir

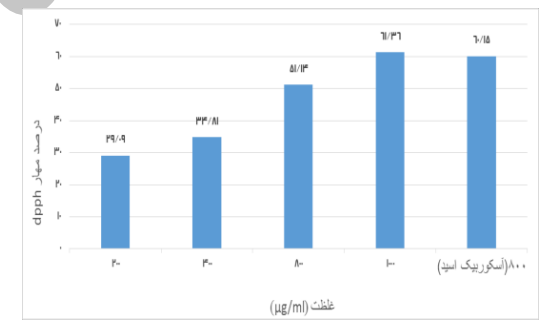
جدول ۶- تأثیر غلظت‌های مختلف بر عدم رشد باکتری‌ها

غلظت اگزوپلی-ساکاریدµg/ml	*E. coli* ATCC 25922 قطر هاله عدم رشد(میلی‌متر)	*S. aureus* ATCC 43300 قطر هاله عدم رشد(میلی‌متر)
۱۰۰	۱۰/۸ ± ۰/۳	۱۱/۲ ± ۰/۳
۲۰۰	۱۴/۱ ± ۰/۴	۱۵/۷ ± ۰/۳
۳۰۰	۱۵/۵ ± ۰/۵	۱۶/۲ ۰±/۸
۴۰۰	۱۶/۵ ± ۰/۶	۱۸/۵ ± ۰/۱
تتراسایکلین	۱۷/۷ ± ۰/۳	-
وانکومایسین	-	۱۸/۷ ± ۰/۵

مقادیر به صورت میانگین ± انحراف از معیار بوده و تفاوت میانگین ها در سطح معنی P< ۰/۰۵ دار در نظر گرفته شده است.

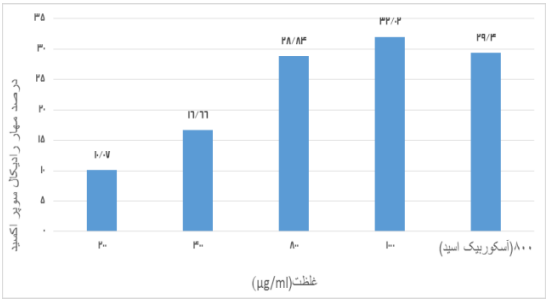
بررسی فعالیت ضداکسیدانی

رادیکال DPPH روشی برای سنجش فعالیت ضداکسیدانی، ضداکسیدان‌ها است (۲۴). به‌طور خلاصه فعالیت ضداکسیدانی اگزوپلی‌ساکاریدی جدا شده از باکتری *B.pasteuri* به‌صورت نمودار ۲ است. بیش‌ترین میزان مهار فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت ۱۰۰۰g/ml µ (۶۱/۳۶ ٪) بود که کمابیش برابر با غلظت ۸۰۰g/ml µ از آسکوربیک اسید (۶۰/۱۵ ٪) است.



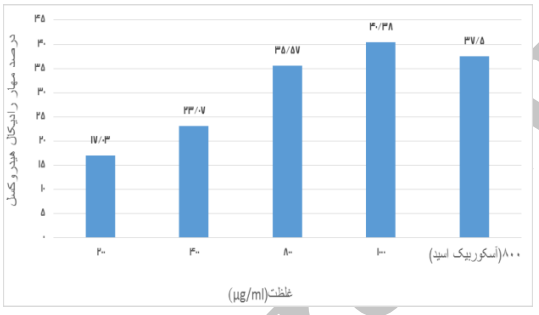
شکل ۲- درصد مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH اگزوپلی‌ساکارید تولید شده توسط سویه *B. pasteuri*. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف از معیار بوده و تفاوت میانگین ها در سطح معنی P< ۰/۰۵ دار در نظر گرفته شده است.

در بین تمام رادیکال‌های آزاد موجود برای ترکیب‌های زیستی، رادیکال آزاد سوپراکسید خطرناک‌ترین نوع است (۳). بیش-ترین میزان فعالیت مهاری رادیکال سوپراکسید توسط اگزوپلی‌ساکارید جدا شده از سویه باکتری *B.pasteuri* مربوط به غلظت ۱۰۰۰g/ml µ (۳۲/۰۲ ٪) است (نمودار ۳) که در مقایسه با میزان فعالیت مهاری غلظت ۸۰۰g/ml µ آسکوربیک اسید (۲۹/۴۰ ٪) اندکی بیش‌تر است.



شکل ۳: درصد مهار رادیکال سوپراکسید اگزوپلی‌ساکارید تولید شده توسط سویه *B. pasteuri* مقادیر به صورت میانگین ± انحراف از معیار بوده و تفاوت میانگین ها در سطح معنی P< ۰/۰۵ دار در نظر گرفته شده است.

رادیکال هیدورکسیل اکسیدانی قویی است و کمابیش می‌تواند با تمام مولکول‌های زیستی واکنش نشان دهد (۳). مهار فعالیت رادیکال هیدروکسیل به‌وسیله اگزوپلی‌ساکاریدی جدا شده از باکتری *B.pasteuri* بر اساس نمودار ۴ است که در آن درصد مهار فعالیت این رادیکال در غلظت ۱۰۰۰g/ml µ (۴۰/۳۸ ٪) از غلظت ۸۰۰g/ml µ آسکوربیک اسید (۳۷/۵ ٪) اندکی بیش‌تر بود.



شکل ۴- درصد مهار رادیکال هیدورکسیل اگزوپلی‌ساکارید تولید شده توسط سویه *B. pasteuri* مقادیر به‌صورت میانگین ± انحراف از معیار بوده و تفاوت میانگین ها در سطح معنی P< ۰/۰۵ دار در نظر گرفته شده است.

بحث

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های بسیاری در زمینه استفاده از مواد پلی‌مری حاصل شده است. در میان انواع پلی‌مرها، اگزوپلی‌ساکاریدها به‌دلیل ویژگی‌های مطلوبی که دارند از اهمیت بالایی برخوردار هستند. به‌تازگی استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای تولید اگزوپلی‌ساکاریدها به‌دلیل کارایی بهتر هم‌چون خواص ضدسرطانی و ضدمیکروبی در مقایسه با اگزوپلی‌ساکاریدهای جانداران و گیاهان در حال افزایش است (۱۴). به‌همین منظور در این تحقیق برای حداکثری اگزوپلی-

Archive of SID

www.SID.ir

ساکارید با استفاده از باکتری *B.pasteuri* PTCC 1645 آزمایش طراحی شد و سپس ویژگی‌های زیستی این بیوپلی‌مر بررسی گردید. میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید بسته شرایط و ترکیب محیط کشت و هم‌چنین شرایط گرما گذاری می‌تواند متفاوت باشد. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق افزودن ساکارز به محیط کشت با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی-لیتر و نمک ۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و پس از گذشت مدت زمان ۴۸ ساعت باعث تولید ۳۰/۶۶ g/L اگزوپلی‌ساکارید شد. با توجه به این‌که باکتری‌ها از مواد آلی مانند ساکارز به-عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند افزودن آن باعث افزایش تولید حداکثری در میزان اگزوپلی‌ساکارید می‌گردد. در نتایج مشابهی که در سال ۱۹۹۷ توسط Li و همکارانش جهت بهینه سازی تولید اگزوپلی‌ساکاریدی از باکتری *Bacillus polymyxa* صورت گرفت بیش‌ترین میزان تولید اگزوپلی-ساکارید g/L ۵۴ تولید شد و آن‌ها در تحقیق خود دریافتند که افزایش غلظت ساکارز بیش‌ترین میزان تولید اگزوپلی-ساکارید را در پی دارد (۱۵). با توجه به این‌که باکتری‌ها برای فعالیت حداکثری خود به مقداری نمک نیاز دارند افزودن مقدار کمی نمک به محیط کشت باعث افزایش تولید اگزوپلی-ساکارید می‌گردد البته باید این نکته را در نظر گرفت که افزایش بیش از حد نمک باعث از بین رفتن باکتری می-شود(۱۳). باکتری‌ها تولید خود را به طور معمول در انتهای فاز لگاریتمی و مراحل آخر رشد خود تکمیل می‌کنند بر همین اساس بعد از گذشت ۴۸ ساعت و نزدیک به انتهای فاز لگاریتمی باکتری حداکثر تولید اگزوپلی‌ساکارید را داشته است. در مطالعه‌های مشابهی که توسط Moreno و همکارانش در سال ۱۹۹۹ صورت گرفته است نشان داده شده که تولید اگزوپلی‌ساکاریدی در بیش‌تر باکتری‌ها پس از توقف رشد، افزایش می‌یابد (۱۶). این مسئله تأیید می‌نماید که تولید اگزوپلی‌ساکاریدی بعد از فاز لگاریتمی صورت می‌گیرد، زمانی که باکتری وارد فاز سکون (۴۸ ساعت بعد از کشت) می‌شود. در این تحقیق میزان هاله عدم رشد ایجاد شده مطابق نتایج به‌دست آمده که برای غلظت‌های مختلف نشان‌داده شده است بیش‌ترین هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۴۰۰µg/ml هست که برای استافیلوکوکوس‌ارئوس ۱۸ میلی‌متر و برای اشریشیاکلی ۱۶ میلی‌متر بود. در این تحقیق از آنتی‌بیوتیک-های تتراسایکلین و وانکومایسین (µ ۳۰۰g) به‌عنوان شاهد استفاده شد که میزان هاله عدم رشد تشکیل شده برای اشریشیاکلی ۱۷ میلی‌متر است که برابر غلظت ۴۰۰µg/ml است و برای استافیلوکوکوس‌ارئوس ۱۸ میلی‌متر بود.

Shengjie و همکارانش در سال ۲۰۱۴ با بررسی فعالیت ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف اگزوپلی‌ساکاریدهای جداشده از باکتری‌های *Bifidobacterium* و *Lactobacillus* بر روی باکتری‌های بیماری‌زای اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس‌ارئوس اثر مهاری این اگزوپلی‌ساکاریدها را بررسی نمودند و نشان دادند که بیش‌ترین هاله عدم تشکیل شده برای غلظت ۳۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر است که برابر ۱۵/۶۷ میلی‌متر برای اشریشیاکلی و ۱۶ میلی‌متر برای استافیلوکوکوس‌ارئوس بود (۱۱).

میزان فعالیت مهاری که برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط سه روش مهار فعالیت رادیکالی DPPH، مهار فعالیت رادیکالی سوپراکسید و مهار فعالیت رادیکال هیدروکسیل اگزوپلی‌ساکارید تولید شده در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت نشان داد که با افزایش میزان غلظت فعالیت مهاری افزایش یافته است به‌طوری‌که برای غلظت ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر میزان فعالیت مهاری بسیار پایین بوده و با افزایش غلظت اگزوپلی‌ساکارید به ۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر میزان فعالیت مهاری نیز افزایش یافته است. در مطالعه‌های مشابهی که توسط آقای Wang و همکارانش انجام داده‌اند ثابت کردند که با افزایش غلظت‌های مختلف اگزوپلی‌ساکارید درصد مهار فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش می‌یابد که این نتایج با این مطالعه به‌طور کامل هم‌خوانی دارد (۲۰). Shengjie و همکارانش در سال ۲۰۱۴ با بررسی فعالیت مهاری غلظت‌های مختلف اگزوپلی‌ساکارید جداشده از باکتری‌های *Bifidobacterium* و *Lactobacillus* نشان دادند که با افزایش غلظت اگزوپلی‌ساکارید میزان فعالیت مهاری نیز افزایش می‌یابد هم‌چنین نشان داده شد که نوع اگزوپلی-ساکارید تولید شده توسط گونه‌های مختلف باکتریایی میزان فعالیت مهاری متفاوتی را از خود نشان می‌دهند (۱۱). هم-چنین طی تحقیقی که توسط Abdhul در سال ۲۰۱۴ بر روی اگزوپلی‌ساکارید تولید شده توسط باکتری انتروکوکوس صورت گرفت نشان داده شد که با افزایش میزان غلظت اگزوپلی‌ساکارید میزان مهار رادیکالی نیز افزایش می‌یابد (۱). فعالیت ضداکسیدانی اگزوپلی‌ساکاریدها ممکن است تحت تأثیر ترکیب‌های مونوساکاریدها، وزن مولکولی یا روش‌های خالص‌سازی آن‌ها باشد برای مثال تحقیق‌ها ثابت کرده است که اگزوپلی‌ساکاریدهای با وزن مولکولی پایین‌تر اثر ضداکسیدانی بالاتری نسبت با اگزوپلی‌ساکاریدهای با وزن مولکولی بالا دارند (۲۰).

Archive of SID

www.SID.ir

نتیجه‌گیری

در این مطالعه برای تولید بیش‌ترین میـزان اگزوپلـی‌سـاکارید به‌دست آمده از سویه باکتری *B.pasteuri* چند عامل کلیـدی در نظر گرفته شد و نتایج نشان داد افزایش سـاکارز بـه‌عنـوان منبع کربن و افزودن مقدار کمی نمک باعـث تولیـد اگزوپلـی-ساکارید در انتهای فاز لگاریتمی مـی‌شـود. سـپس بـه بررسـی خواص آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدانی اگزوپلی‌ساکارید پرداخته شد و نتایج به‌دست آمده نشان داد که از این اگزوپلی‌سـاکارید می‌توان به‌عنوان مواد ضدباکتریال و ضداکسیدان در موارد بـه-خصوصـــــــــــی اســـــــــــتفاده نمـــــــــــود.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Abdhul K, Ganesh M, Shanmughapriya S, Kanagavel M, Anbarasu K, Natarajaseenivasan K. Antioxidant activity of exopolysaccharide from probiotic strain Enterococcus faecium (BDU7) from Ngari. Int J Biol Macromol. 2014; 70: 450-454.
2. Arena A, Maugeri TL, Pavone B, Iannello D, Gugliandolo C, Bisignano G. Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant Bacillus licheniformis. Int Immunopharmacol. 2006; 6(1): 8-13.
3. Borgio JF, Bency BJ, Ramesh S, Amuthan M. Exopolysaccharide production by Bacillus subtilis NCIM 2063, Pseudomonas aeruginosa NCIM 2862 and Streptococcus mutans MTCC 1943 using batch culture in different media. Afric J Biotechnol. 2009; 8(20).
4. Degeest B, De Vuyst L. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by Streptococcus thermophilus LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. Appl Environ Microbiol.1999; 65(7): 2863-2870.
5. Fang Y, Liu S, Lu M, Jiao Y, Wang S. A novel method for promoting antioxidant exopolysaccharidess production of Bacillus licheniformis. Carbohydr Polym. 2013; 92(2): 1172-1176.

6. Freitas F, Alves VD, Reis MA. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. Trends Biotechnol. 2011; 29(8): 388-398.
7. Garcia-Garibay M, Marshall VM. Polymer production by Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus. J Appl Microbiol. 1991; 70(4): 325-328.
8. Han Y, Liu E, Liu L, Zhang B, Wang Y, Gui M, Wu R, Li P. Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by Bacillus amyloliquefaciens LPL061. Carbohydr Polym. 2015; 115: 230-237.
9. Hussain A, Zia KM, Tabasum S, Noreen A, Ali M, Iqbal R, Zuber M. Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. Int J Biol Macromol. 2017; 94: 10-27.
10. Laws A, Gu Y, Marshall V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Biotechnol Adv. 2001; 19(8): 597-625.
11. Li S, Huang R, Shah NP, Tao X, Xiong Y, Wei H. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from Bifidobacterium bifidum WBIN03 and Lactobacillus plantarum R315. J dairy Sci. 2014; 97(12): 7334-7343.
12. Li S, Shah NP. Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from Pleurotus eryngii and Streptococcus thermophilus ASCC 1275. Food Chem. 2014; 165: 262-270.
13. Liu C, Lu J, Lu L, Liu Y, Wang F, Xiao M. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by Bacillus licheniformis 8-37-0-1. Bioresour Technol. 2010; 101(14): 5528-5533.
14. Mahdhi A, Leban N, Chakroun I, Chaouch MA, Hafsa J, Fdhila K, Mahdouini K, Majdoub H. Extracellular polysaccharide derived from potential probiotic strain with antioxidant and antibacterial activities as a prebiotic agent to control pathogenic bacterial biofilm formation. Microb Pathogen. 2017.
15. 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.
16. Moreno J, Vargas-García C, Lopez MJ, Sánchez-Serrano G. Growth and exopolysaccharide production by Azotobacter vinelandii in media containing phenolic acids. J appl microbiol. 1999; 86(3): 439-445.
17. Reshetnikov SV, Tan KK. Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. Int J Med Mush. 2001; 3(4): 61–94.
18. Salehghamari E, Amoozegar MA. Optimization of lipase production in Salinivibrio sp. SA2 by Taguchi design. Nova Biol Rep. 2017; 3 (4): 288-294. [Full text in Persian]

www.SID.ir

19. Suresh Kumar A, Mody K, Jha B. Bacterial exopolysaccharides–a perception. J basic Microbiol. 2007; 47(2): 103-117.
20. Wang J, Zhao X, Yang Y, Zhao A, Yang Z. Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by Lactobacillus plantarum YW32. Int J Biol Macromol. 2015; 74: 119-126.
21. Wang Y, Ahmed Z, Feng W, Li C, Song S. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by Lactobacillus kefiranofaciens ZW3 isolated from Tibet kefir. Int J Biol Macromol. 2008; 43(3): 283-288.
22. Xu R, Shen Q, Ding X, Gao W, Li P. Chemical characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide fraction isolated from Bifidobacterium animalis RH. Eur Food Res Technol. 2011; 232(2): 231-240.
23. Yin JY, Nie SP, Zhou C, Wan Y, Xie MY. Chemical characteristics and antioxidant activities of polysaccharide purified from the seeds of Plantago asiatica L. J Sci Food Agric. 2010; 90(2): 210-217.
24. Zheng Y, Ye ZL, Fang XL, Li YH, Cai WM. Production and characteristics of a bioflocculant produced by Bacillus sp. F19. Bioresour Technol. 2008; 99(16): 7686-7691

Archive of SID

www.SID.ir