Archive of SID

تولید اگزوپلی ساکارید از لاکتوباسیل‌های جدا شده از کشک منطقه لیقوان

مریم خدابخش*
مریم تاج آبادی ابراهیمی**
مریم هاشمی***

چکیده

بیان مسئله: اگزوپلی ساکاریدها پلیمرهایی با وزن مولکولی بالا هستند که از واحدهای قندی تشکیل شده اند. و توسط میکرو.ارگانیسم‌ها به محیط اطراف ترشح می‌شوند. از طرف دیگر، اگزوپلی ساکاریدهای حاصل از باکتری های اسید لاکتیک اثرات ضد توموری دارند؛ همچنین، این ترکیبات، سیستم ایمنی را تحریک کرده و کلسترول خون را کاهش می‌دهند؛ بنابراین، اگزوپلی ساکاریدهای حاصل از باکتری های اسید لاکتیک، این پتانسیل را دارند تا به عنوان افزودنی غذایی با اثرات سلامتی بخش مورد استفاده قرار گیرند. کشک یکی از فرآورده‌های فرعی شیر است که به روش سنتی از جوشاندن، تغلیظ و یا خشک کردن دوغی که پس از کره گیری باقی می ماند، تهیه می شود. در این مطالعه ما سعی کردیم باکتری های اسید لاکتیک تولید کننده اگزوپلی ساکارید را شناسایی کنیم. مواد و روشها: ۲۳ سویه

* دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی.
** دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، دانشکده علوم پایه، *m.tajabadi@iauctb.ac.ir*
***پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

www.SID.ir

Archive of SID

لاکتوباسیلوس جدا شده از کشک روی محیط ام آر اس آگار[1] کشت و در شرایط بی هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در مدت ۲٤-٤۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از بررسی خصوصیات میکروسکوپی و ماکروسکوپی ایزوله‌ها مثل قوام کلنی‌ها روی محیط کشت، تولید اگزوپلی ساکارید (به دو شکل باند شده[2] و رها شده در محیط کشت[3]) با روش فنل/ سولفوریک اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی کمّی تولید اگزوپلی ساکارید، نتایج به دست آمده با منحنی استاندارد گلوکز مقایسه و میزان تولید برحسب میلی گرم بر لیتر تعیین شد. نتایج: از بین ۲۳ سویه لاکتوباسیل، ۲ سویه توانایی تولید اگزوپلی ساکارید باند شده (٦٦,٦-۲۵,۱۵۷ g/l) داشتند. از سوی دیگر از ۲۳سویه لاکتوباسیل انتخاب شده، ۲ سویه توانایی تولید اگزوپلی ساکارید رها شده در محیط کشت(۳٦۷ g/ l- ۱۱۳٤) را دارا بودند. نتیجه‌گیری: لاکتوباسیلهای تولید کننده اگزوپلی ساکارید در صنعت غذا به عنوان قوام دهنده، ویسکوز کننده، پایدار کننده، امولسیون کننده یا بافت دهنده به کار می‌روند.

واژه های کلیدی: اگزوپلی ساکارید، باکتری های اسید لاکتیک، کشک، پری بیوتیک.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

باکتری های اسید لاکتیک مزوفیل، در شیرهای تخمیر شده سنتی، فرایندهای صنعتی، و در صنایع لبنی به عنوان استارتر کالچر استفاده می شوند. برخی از آن ها اسید لاکتیک، ترکیبات طعم‌دار و باکتریوسین تولید می کنند و چندین سویه هم توانایی ترشح اگزوپلی ساکاریدها را دارند (بیهارا[1] و همکاران ۲۰۰۹). این باکتری ها ممکن است منبع عالی پلی‌ساکاریدهای غذا باشند. اکثر سویه ها، از محصولات لبنی ایزوله شده اند؛ اما، گوشت تخمیر شده هم می‌تواند منبع باکتری های اسید لاکتیک تولید کننده اگزوپلی ساکارید باشد (واندنبرگ[2] و همکاران ۱۹۹۵). دلایل گستردگی باکتری های اسید لاکتیک، پایدار و ایمن ساختن غذا و بهبود عطر و طعم، ظاهر و بافت آن است؛ علاوه بر آن، سلولهای زیست پذیر و متابولیت های با ارزش تولیدی باکتری های اسید لاکتیک، ارزش فیزیولوژیکی و بهداشتی غذا را بالا می برند؛ از طرف دیگر، تقاضا برای غذاهای عملگرا که دارای اثرات سلامتی بخش هستند، رو به افزایش است.

اکثر باکتری های اسید لاکتیک تولید کننده اگزوپلی ساکارید، متعلق به گونه‌های استرپتوکوکوس، لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس، لکونوستک، و پدیوکوکوس هستند. بعضی از سویه های بیفیدوباکتر نیز توانایی تولید این بیوپلیمر ها را از خود نشان داده اند (مادیودو[3] و همکاران ۲۰۰۵). اگزوپلی ساکاریدها را می توان به دو گروه تقسیم کرد: الف–هموپلی ساکاریدها: هموپلی ساکاریدها ترکیباتی هستند که در ساختار پلیمری آن ها واحدهای منومری مشابه دارند. وزن مولکولی هموپلی ساکارید بین $10^4 \times 4$ و $10^6 \times 6$ دالتون است. هموپلی ساکارید ها نسبت به هتروپلی ساکاریدها در غلظت بیشتری تولید می شوند. هموپلی ساکاریدهای تولید شده توسط لاکتوباسیل ها در دو گروه گلوکان‌ها و فروکتان ها طبقه‌بندی می‌شوند. ب–هتروپلی ساکاریدها: هتروپلی ساکاریدها از انواع مختلف منوساکاریدها پدید می‌آیند و گاه در زنجیره پلی ساکاریدی، ترکیبات غیر کربوهیدراتی مانند سولفات‌ها و یا استات‌ها یافت می‌شوند (وویست[4] و همکاران ۱۹۹۹). برای تهیه ماست، نوشیدنی های ماستی،

1 Behare
2 VAN DEN BERG
3 Madiedo
4 Vuyst

www.SID.ir

Archive of SID

پنیر، خامه تخمیر شده، و دسرهای بر پایه شیر باکتری های اسید لاکتیک تولید کننده اگزوپلی ساکارید دارای اهمیت زیادی هستند. اگزوپلی ساکاریدها بـه بافـت، احـساس دهـانی، درک مـزه و پایـداری محصول نهایی کمک می کنند. اگزوپلی ساکاریدهای تولید شده توسط سویه‌هـای لاکتوباسـیلوس بـا قدرت پروبیوتیکی، کلسترول خون را کاهش می دهند، سیستم ایمنی را تحریـک مـی کننـد و ضـمناً عامل ضد توموری و ضد زخم هـستند. اثـر پـری بیـوتیکی اگزوپلـی سـاکارید تولیـد شـده توسـط لاکتوباسیل ها و بیفیدوباکتری ها، بررسی شده و این اثر به اسـیدهای چـرب تولیـد شـده مثـل اسـید استیک، اسید پروپیونیک، اسید بوتیریک که توسط باکتری هـای اسـیدلاکتیک تولیـد کننـده اگزوپلـی ساکارید ترشح می شود، نسبت داده می شود (بادیل و همکاران ۲۰۱۰). کشک یکی از فـرآورده‌هـای فرعی شیر است که به روش سنتی از جوشاندن، تغلیظ و یا خشک کردن دوغی که پس از کره گیری باقی می ماند، به دست می آید و یا از ماست بدون چربی تهیه می شود. ماده اولیه کشک عبارت است از شیر میش، بز، گاو و یا مخلوطی از آن ها. در صنایع غذایی، تولید کشک با فرآیندهای صنعتی و بـه صورت کشک مایع، مستقیما از شیر صورت می گیرد. کشک هـای سـنتی مـایع، از سـاییدن و رقیـق کردن کشک خشک که معمولا به صورت غیر پاستوریزه تهیه می گردد، تولید می شوند. با توجـه بـه مطالعـات محـدودی کـه در زمینـه جداسـازی و شناسـایی لاکتوباسـیل‌هـای بـومی تولیـد کننـده اگزو پلی ساکارید در کشور ما انجام شده است، این تحقیق منجر به شناسایی لاکتوباسـیل‌هـای تولیـد کننده اگزو پلی ساکارید در کشک گردید و امید است که در آینده بتوان از آن ها نه تنهـا بـه صـورت پایدار کننده محصولات غذایی، بلکه به عنوان محرک سیستم ایمنـی جهـت افـزایش سـطح سـلامت (پری‌بیوتیک) در مصرف کننده استفاده کرد.

مواد و روش ها

سویه های مورد استفاده

در این تحقیق، کلکسیون لاکتوباسیل های جدا شده ازمحصول کشک تهیه شده توسط تاج‌آبـادی و همکاران از نظر تولید اگزوپلی‌ساکارید، مورد استفاده قرار گرفته است (تاج آبادی و همکاران ۲۰۰۸ و ۲۰۰۹). این نمونه‌ها بر اساس نوع محصول، ناحیه و کارگاه نمونه گیری شده کدبندی شده بودنـد. کدبندی در بخش نتایج در جدول ۳-۱ قید شده است (ابراهیمی و همکاران ۱۳۸٦).

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین فعالیت اسیدی سویه ها

سویه های باکتری های جدا شده که ۲٤ ساعت قبل از آزمون در محیط ام.آر.اس.براث کشت شده بودند به میزان ۱٪ به محیط شیر بدون چربی ٪ ۱۰ (Skim milk) استریل تلقیح شده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. تغییرات pH بعد از ٦ و ۲٤ ساعت برای هر سویه اندازه گیری شد.

اندازه گیری pH

دستگاه pH متر(نوع الترابیسیک) با محلول های بافر تنظیم و سپس pH نمونه‌ها اندازه‌گیری شد.برای تشخیص خالص بودن سویه‌ها از محیط ام.آر.اس.براث که در آن ها کدورت ایجاد شده بود در شرایط استریل کشت خطی نمونه ها در محیط کشت ام.آر.اس.آگار انجام شد و به مدت ٤۸ ساعت در انکوباتور در حضور 10٪ CO2 در دمای C. ۳۷ گرمخانه گذاری شد. بعد از این مدت سویه ها از نظر مورفولوژی، خالص یا ناخالص بودن مورد بررسی قرار گرفتند(کاندیلر[1] و همکاران ۱۹۸۹). تهیه اسلاید و رنگ‌آمیزی گرم و تهیه عکس میکروسکوپی برای بررسی خالص بودن از سویه های که روی محیط کشت ام.آر.اس.آگار رشد کرده بودند لام تهیه کرده و رنگ آمیزی گرم انجام شد. از تمام سویه ها عکس میکروسکوپی تهیه شد. رنگ آمیزی گرم طبق استاندارد شماره ۲۳۲۵ انجام گرفت.

تست کاتالاز

طبق استاندارد شماره ۲۳۲۵ انجام شد.

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 با استاندارد گلوکز تعیین کمیت شدند(تالون[2] و همکاران ۲۰۰۳). به این منظور از کشت یک شبه هر سویه به میزان ۱٪ به محیط ام.آر.اس.براث تلقیح و ٤۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری شد. سپس محیط های کشت در دمای ٤ درجه سانتیگراد و به مدت ۳۰ دقیقه سانتزیفو

1 Vuyst
2 Tallon

www.SID.ir

Archive of SID

ژ (۱۵g'×۱۰۰۰) شدند. مایع رویی برای جداسازی اگزوپلی ساکارید رها شده در محیط کشت و ته نشست برای جداسازی اگزوپلی ساکارید باند شده استفاده شد.

ایزولاسیون اگزوپلی ساکاریدهای باند شده به سلول

به ته نشست حاوی سلولهای باکتریایی ۵ml محلول سرم فیزیولوژی برای شستشو اضافه شد سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفوژ (g ×۱۵۰۰۰) شد. ته نشست ۲ بار در EDTA ۵ml (۰,۰۵ مولار) سوسپانس، و ٤ ساعت در انکوباتور شیکردار گرمخانه گذاری شد. و سپس بمنظور جدا کردن مواد نامحلول سوسپانسیون درg ٦۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه و دمای ٤ 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 ۲٤ ساعت و در دمای ٤ درجه سانتیگراد انجام شد. برای جداسازی اگزوپلی ساکارید رسوب یافته از سانتریفوژ با دورg ٦۰۰۰ در دمای ٤ 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 (تالون و همکاران ۲۰۰۳) .

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، ۰,۵ml فنل ۵ درصد.و ۲,۵ml اسید سولفوریک غلیظ ریخته شد محلول وورتکس، و پس از اینکه دمای آن به دمای اتاق رسید با اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۹۰ جذب آن ها خوانده شد. (تالون و همکاران ۲۰۰۳).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 ۱۰mg آلفا– د گلوکز در ۸۰ml آب مقطر حل و ۱۰۰ml محلول استوک گلوکز تهیه گردید. پس از افزودن غلظتهای ۱, ۲, ۳ , ٤ , ۸ , ۱۰ , و ۲۰ ml از محلول استوک گلوکز به بشرهای مختلف، سپس با آب مقطر حجم محلول نهایی به ۲۰ ml رسید از هر بشر ۰,۵ml محلول با سمپلر برداشته و داخل لوله آزمایش

www.SID.ir

Archive of SID

ریخته و به هر لوله ۰,۵ml فنل و ۲,۵ml اسید سولفوریک غلیظ اضافه کردیم و پس از وورتکس و رسیدن محلول به دمای محیط با اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۹۰ جذب نمونه ها خوانده شد.

ایزولاسیون 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 ٤ درجه سانتیگراد به مدت ٤ ساعت در انکوباتور شیکردارگرمخانه گذاری شد. پروتئین های ته‌نشین شده پس از و در دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدت ٤ ساعت گرمخانه گذاری می شود که در طی این مدت با یک همرن 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 ۲٤ ساعت و در دمای ٤ درجه سانتیگراد انجام شد عمل رسوب سازی اگزوپلی ساکارید باند شده به مدت ۲٤ ساعت و در دمای ٤ درجه سانتیگراد انجام شد. برای جداسازی اگزوپلی ساکارید رسوب یافته از سانتریفوژ با دور g ٦۰۰۰ در دمای ٤ 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. (تالون و همکاران ۲۰۰۳). 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 EXCEL انجام شده است.

نتایج و بحث

کدبندی نمونه ها

نمونه ها بر اساس نوع محصول کدبندی شده اند. همچنین منطقه و کارگاه تهیه نمونه در نظر گرفته شده است. این کدبندی ها در جدول ۳–۱ آورده شده است.از طرف دیگر باسیل‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی و میکروارگانیسم ها از جنس لاکتوباسیلوس شناسایی و بر اساس

www.SID.ir

Archive of SID

منشاء نمونه و مورفولوژی کلنی کدگذاری گردیده اند(تاج آبادی و همکاران ۲۰۱۱).

جدول۱: کد سویه های لاکتوباسیل های جدا شده از کشک

کد ایزوله	منبع جداسازی	منطقه نمونه گیری	کد مورفولوژی کلنی	کد شناسایی
K1	کشک	منطقه لیقوان-گارگاه۱	L	K1l4
K1	کشک	منطقه لیقوان-گارگاه۱	L	K1l3
K1	کشک	منطقه لیقوان-گارگاه۱	A	K1a11

تعیین pH سویه ها

سویه ها پس از اینکه از فریزر خارج شدند به میزان ۱ درصد به محیط کشت ام آر اس براث منتقل شدند، پس از ٢٤ ساعت pH تمام سویه ها اندازه گیری شد. نتایج در جدول ۳-۲ گزارش شده است.

جدول۲: نتایج آنالیز PH سویه های جدا شده از کشک

نام نمونه	pH	نام نمونه	pH
K1l2	٤,٥٣	K3l7	٥,٣٦
K1m1	٤,٩٤	K4a2	٥,٢٨
K1n2	٥,٣١	K4b2	٥,٢٩
K1i2	٥,٣٢	K4c2	٥,٣٣
K2l3	٤,٠٨	K4d2	٤,٩٤
K2l4	٤,١٢	K4l2	٥,٣٤
K2i4	٤,٣٢	K4n1	٤,٨٩
K3l1	٤,٢١	K4m1	٥,٣٦
K3a2	٤,١١	K4i1	٥,٢٨
K3l5	٤,٥٦	K4h1	٤,١٣
K3l6	٤,٩٥	K4h	٥,٣٩

نتایج تست کاتالاز و گاز در جدول ۳ آورده شده است. ٤ سویه از ۲۳ سویه توانایی تولید گاز را داشتند.(جدول۳).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: نتایج تست کاتا لاز و گاز سویه های جدا شده از نمونه های کشک

نام نمونه	گاز	کاتالاز	نام نمونه	گاز	کاتالاز
K1l2	-	−	K4a2	-	+
K1m1	-	+	K4b2	-	-
K1n2	-	-	K4c2	-	-
K1i2	-	-	K4d2	-	-
K2l3	-	-	K4l2	-	-
K2l4	-	_	K4n1	-	-
K2i4	-	+	K4m1	-	+
K3l1	-	-	K4i1	-	-
K3a2	-	-	K4h1	-	-
K3l5	-	_	K4h	-	-
K3l6	-	-	K4c	-	-
K3l7	-	-			

رنگ آمیزی گرم لاکتوباسیل ها طبق استاندارد ۲۳۲۵ انجام شـد و در شـکل (۱) دو نمونـه آورده شده است.

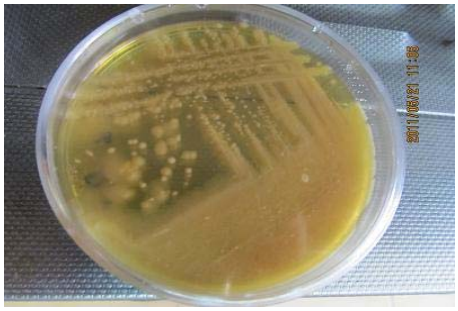
شکل ۱: عکسهای میکروسکوپی از برخی نمونه ها (چپ: K_2L_3 راست:k_1l4)

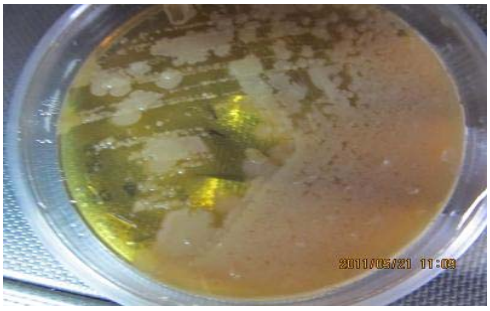
www.SID.ir

Archive of SID

بررسی و انتخاب سویه‌های دارای کلنی‌های موکوئیدی

برخی از سویه های لاکتوباسیل تولید کننده اگزوپلی ساکارید بر اساس ویژگی آن ها در محیط ام.آر.اث.آگار انتخاب شدند. سویه هایی که در این محیط، اگزوپلی ساکارید تولید می‌کردند، بعد از انتخاب، از نظر تولید اگزوپلی ساکارید مورد مطالعه قرار گرفتند(شکل ۳–۲).





شکل ۲: سویه‌های دارای کلنی‌های موکوئیدی

جداسازی و خالص سازی برای شناسایی اگزوپلی ساکاریدها

با استفاده از روش تالون و همکاران، ۲۳ سویه لاکتوباسیلوس جدا شده از کشک جهت بررسی توانایی تولید اگزوپلی ساکارید استفاده شد. از میان ۲۳ سویه لاکتوباسیل جدا شده، ۲سویه تولید کننده اگزوپلی ساکارید (اعم از باند شده و رها شده در محیط) شناسایی شد. (جدول ۳–٤ و ۳– ۵)

www.SID.ir

Archive of SID

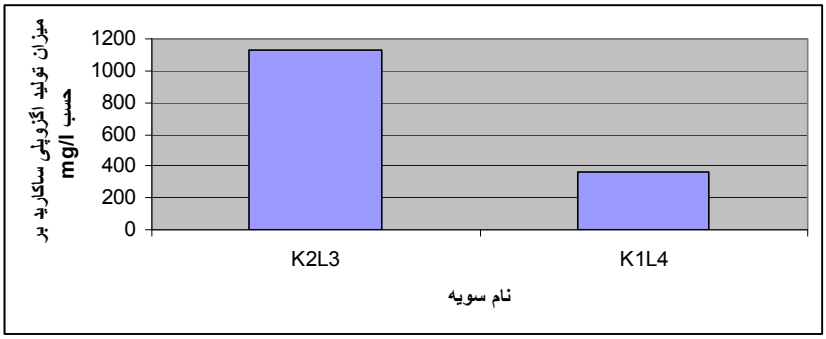
جدول ۳ – ٤: میزان تولید اگزوپلی ساکارید باند شده در محصول کشک

نام سویه	EPS-B (mg/l)
K1L4	٦٦/٦
K2L3	۲٥/۱٥۷

جدول ۳– ٥ میزان تولید اگزوپلی ساکارید رها شده درمحیط در محصول کشک

نام سویه	EPS-R (mg/l)
K1L4	۳٦۷
K2L3	۱۱۳٤/٤

میزان تولید اگزوپلی ساکارید باند شده در سویه های جدا شده از کشک، بین دو عـدد ٦/٦ و ۲٥/۱ میلی گرم در هر لیتر بود که بیشترین میزان بهK_2L_3 و کمتـرین میـزان بـه K1L4 تعلق داشت. (نمودار ۳–۱)

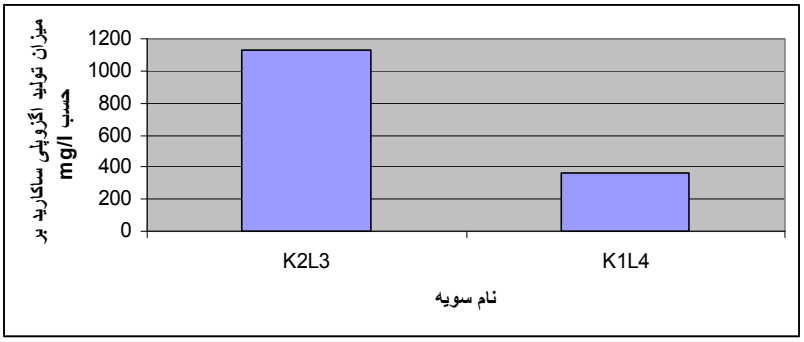


نمودار ۱: میزان تولید اگزوپلی ساکارید باند شده در نمونه های کشک

در بررسی هایی که بر روی سویه های جدا سازی شده از کشک انجام شد، دو سویه توانـایی تولیـد اگزوپلی ساکارید رها شده در محیط را داشت که سویه K_2L_3 دارای بیشترین میـزان تولیـد (۳٦۷ میلـی گرم بر لیتر) و سویهK_1L_4 دارای کمترین میزان تولید (۱۱۳٤میلی گرم بر لیتر) بودند. (نمودار ۳–۲)

www.SID.ir

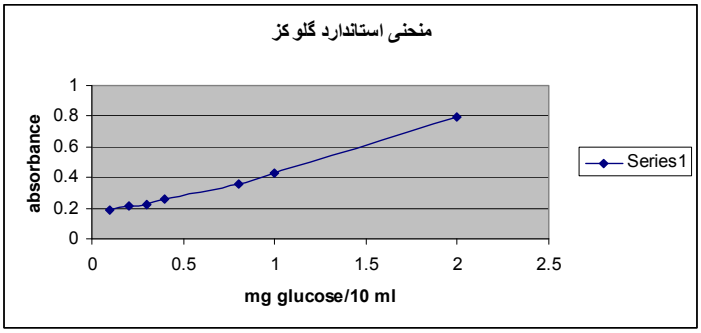
Archive of SID



نمودار۳- ۲: میزان تولید اگزوپلی ساکارید رها شده در محیط در نمونه های کشک

سنجش اگزوپلی ساکارید با اسپکتروفتومتری

از فرمول حاصله از رسم منحنی استاندارد گلوکز برای محاسبه میزان اگزوپلی ساکارید (باند شده و رها شده در محیط) تولیدی استفاده شد. (نمودار ۳-٤)



نمودار ۳-٤- منحنی استاندارد گلوکز

$$Y = 0.321x + 0.131$$
$$R2 = 0.99$$

امروزه مصرف کنندگان، گرایش فراوانی به مصرف فراورده های طبیعی کم قند، کم چرب و بدون افزودن مواد مصنوعی دارند. برای برآورده سازی این نیاز، می توان از باکتری‌های اسیدلاکتیک تولید کننده اگزوپلی ساکارید استفاده کرد. با استفاده ازاگزوپلی ساکارید به عنوان بافت دهنده و پایدار کننده، می توان از مصرف افزودنی‌های غذایی جلوگیری کرد. با استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

از اگزوپلی ساکاریدها در غذاها، محصولاتی با ظاهر خوشایند (شیشه ای)، بافت خامه‌ای و با احساس دهانی خوشایند حاصل می شود؛ از طرف دیگر، با این ترکیبات می توان مانع از سینرسیس شد. هدف ما در این مطالعه جداسازی و شناسایی اگزوپلی ساکاریدها از لاکتوباسیلهای جدا شده از کشک و بررسی میزان تولید اگزوپلی ساکارید توسط هر یک از سویه ها بوده است.

تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از آزمونهای بیوشیمیایی و بررسی کلنی موکوئیدی

لاکتوباسیلها بررسی شده به روش میکروسکوپی غیر متحرک و بدون اسپور و گرم مثبت می‌باشند. در بررسی خصوصیات بیوشیمیایی کاتالاز منفی و عمده سویه ها عدم توانایی در تولید گاز دارند. میشل باکارو همکارانش در سال۲۰۰۷ نشان دادند که لاکتوباسیل ها کاتالاز منفی و گرم مثبت و عدم توانایی در تولید گاز را دارند. در این بررسی ازسویه‌های لاکتوباسیلوس از کشک توسط تاج آبادی و همکاران جداسازی شده بود، استفاده شد. در این پژوهش، برای یافتن لاکتوباسیل‌های تولید کننده اگزوپلی ساکارید، از محیط کشت ام آر اس براث وام آر اس آگار استفاده شده است. در غربالگری اولیه لاکتوباسیل‌های تولیدکننده اگزوپلی ساکارید بر اساس مشخصات فنوتیپ موکوئیدی در محیط کشت ام آر اس آگار شناسایی شدند. شناسایی بر اساس مشخصات فنوتیپ موکوئیدی، طبق روش تالون و همکاران انجام شده است.

مکانیسم تولید اگزوپلی ساکارید

اگزوپلی ساکارید های تولید شده توسط لاکتوباسیل ها 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 می‌باشد و آنزیم‌های گلیکوزیل ترانسفراز (مثل دکستران سوکراز برای بیوسنتز دکستران و لوان سوکراز برای بیوسنتز لوان) در واکنش پلیمریزاسیون درگیرند. انرژی مورد نیاز برای پلیمریزاسیون از هیدرولیز ساکارز تامین می‌شود. در مقایسه با بیوسنتز خارج سلولی هموپلی ساکاریدها، مکانیسم هتروپلی ساکاریدها پیچیده است. همانند دیگر پلیمرهای باکتری ها،گلیکوزیل

www.SID.ir

Archive of SID

ترانسفرازها سنتز هتروپلی ساکاریدها را کاتالیز می‌کنند. این بیوسنتزها چندین مرحله دال سلولی دارند و فقط پلیمریزاسیون واحدهای تکراری خارج سلولی است. هتروپلی ساکاریدها در اثر پلیمریزاسیون پیش سازهای واحدهای تکراری در سیتوپلاسم تشکیل می شوند. چندین نوع آنزیم و پروتئین در بیوسنتز و ترشح اگزوپلی ساکارید نوع هترو درگیرند که برای تشکیل اگزوپلی ساکارید چندان لازم و 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 اگزوپلی ساکارید نقش تعیین کننده ای دارند. (وویست و دیجست ۱۹۹۹)

جداسازی برای شناسایی اگزوپلی ساکاریدها

در این مطالعه، سویه های موجود از کشک ایزوله شده و متعلق به سویه‌های لاکتوباسیل ها بودند و طبق مطالعاتی که انجام شد، ۲ سویه از ۲۳ سویه ایزوله شده از محصولات مورد مطالعه، توانایی تولید اگزوپلی ساکارید را داشتند. کشک مورد استفاده در آزمایش در منطقه لیقوان از شیر گوسفند تهیه شده است. موقعی که این سویه ها در محیط ام.آر.اس.براث رشد کردند دو جزء اگزوپلی ساکارید تولید شد: یک جزء که از سوپرناتانت ایزوله شده بود و اگزوپلی ساکارید آزاد را تشکیل می داد و جزءدوم از ته نشست حاصل از سانتریفوژ محیط کشت براث ایزوله شده بود و اگزوپلی ساکارید باند شده را تشکیل می داد. تولید اگزوپلی ساکارید از باکتری های اسید لاکتیک برای محصولات تخمیری لبنی یک پارامتر مهم محسوب می شود. بیشتر میکروارگانیسم های ترموفیلیک، اگزوپلی ساکارید تولید می‌کنند و از این جهت دارای اهمیت تکنولوژیکی هستند. تولید اگزوپلی ساکارید سنتز شده توسط سویه‌های باکتری های اسید لاکتیک مختلف زمانی که باکتری ها در شرایط رشد بهینه نیستند بین ۰,۰۴۵ تا ۰/۳۵ گرم بر لیتر است. (دورلو اوزکایا و همکاران ۲۰۰۷). در مطالعه ای که توسط تالون و همکاران در سال ۱۹۹۹صورت گرفت میزان تولید اگزوپلی ساکارید حاصل از لاکتوباسیلوس

www.SID.ir

Archive of SID

پلانتاروم ۱۳۵ – ۱٤۰ میلی گرم در لیتر گزارش شد. در سال ۲۰۰۹ محققین هندی، از داهی ٤۷ باکتری تولید کننده اگزوپلی ساکارید ایزوله کردند که ۲ ایزوله به عنوان سویه لاکتوباسیلوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس شناسایی شد و خواص تکنولوژیکی ویژه ای از خود نشان داد؛ در آن پژوهش، میزان تولید اگزوپلی ساکارید ۱۹۳ میلی گرم بر لیتر بود (بیهارا و همکاران ۲۰۰۹). میزان تولید اگزوپلی ساکارید در ۱۱۵ سویه باکتری های لاکتیکی جدا شده از محصولات لبنی و غیر لبنی در بازه بین ۰,۱ تا ۱۹٦ میلی گرم در لیتر بود. (بوکالو و همکاران). مقایسه نتایج بدست آمده در این بررسی با نتایج گزارش شده نشان می دهد که میزان اگزوپلی ساکارید باند شده در بازه بین ٦٦/٦ –۲۵,۱۵۷ میلی گرم در لیتر بوده است. از طرف دیگر اگزوپلی ساکارید رها شده در بازه بین ۱۱۳٤,٤ – ۳٦۷ میلی گرم در لیتر بوده است. این مقادیر، از مقادیر به دست آمده توسط محققین دیگر بالاتر بود.این نتایج نشان می دهد سویه‌های اسید لاکتیک مقاوم به شرایط اسیدی جدا شده از کشک سنتی ایران می‌تواند گزینه‌های مناسبی جهت کاربرد توام با آغازگرهای تجاری به منظور افزایش سطح سلامت محصولات لبنی و بهبود بافت و مزه و رئولوژی باشند. برخی از مطالعات نشان داده که تولید اگزوپلی ساکارید توسط باکتری های اسید لاکتیک ممکن است تحت تاثیر شرایط محیط کشت (منبع کربن و منبع نیتروژن) و شرایط گرمخانه گذاری (pH، دما، زمان و غیره) قرار داشته باشد (تالون و همکاران ۲۰۰۳). شرایط محیط کشت و ترکیب محیط کشت (نه فقط منبع کربن)، تولید اگزوپلی ساکارید و ویژگی مولکولی بیوپلیمرها را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بنابراین انتخاب محیط کشت مناسب تولید کننده اگزوپلی ساکارید دارای اهمیت زیادی است و بعضی از ترکیبات می‌تواند در آنالیز EPS ها نقش داشته باشد (مادیودو و همکاران ۲۰۰۵). ما در این مطالعه از محیط کشت ام.آر.اس.براث استفاده کردیم تا فنوتیپ های تولید کننده اگزوپلی ساکارید را افزایش دهیم. با توجه به pH های به دست آمده از سویه‌های جدا شده از کشک می‌توان نتیجه گرفت که سویه هایی که میزان pH پایینی دارند، توانایی تولید اگزوپلی ساکارید را دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه گیری

نتایج این مطالعات نشان داد که لاکتوباسیل‌های جدا شده از کشک، دارای توانایی تولید اگزوپلی ساکارد به صورت آزاد و باند شده می‌باشند؛ در نتیجه، امکان استفاده از این باکتری‌ها به عنوان استارتر و یا کشت همراه جهت بهبود خواص رئولوژیکی فراورده های غذایی وجود دارد. اگزوپلی ساکاریدها در آب حل شده و خواص ژله ای و قوام دهندگی ایجاد می‌کنند؛ همچنین، در مواد غذایی به عنوان امولسیون کننده، پایدارکننده، سوسپانسیون ذرات، کنترل کریستالیزاسیون، تشکیل فیلم و انکپسوله کردن به کار می روند(وویست و همکاران ۱۹۹۹). لاکتوباسیل‌های تولید کننده اگزوپلی ساکارید در فرایند تولید ماست، نوشیدنی‌های ماستی، پنیر، خامه تخمیر شده، و دسرهای برپایه شیر اهمیت زیادی دارند. اگزوپلی ساکاریدها به بافت، احساس دهانی، درک مزه و پایداری محصول نهایی کمک می‌کنند. از طرف دیگر، لازم است که برای شناسایی ساختار اگزوپلی ساکاریدهای تولید شده، مطالعات گسترده‌تری انجام شود و همچنین شرایط بهینه برای تولید اگزوپلی ساکارید بررسی شود.

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.(2008). "Screening of lactic acid bacteria strains isolated from some nigerian fermented foods for EPS production". World Applied Sciences Journal، 4(5), 741-747.

3-Badel,S. Bernardi ,T. & Michaud, P. (2010). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. Biotechnology Advances

4-Behare, P., Singh, R.P. & Singh, R. (2009). "Exopolysaccharide-producing mesophilic lactic cultures for preparation of fat-free Dahi-Indian fermented milk". Journal of Dairy Research, 76, 90-97

5- Jung, S.W., Kim، W.J., Lee، K.G., Kim, C.W. & W.S. Noh.(2009) "Isolation and identification of lactic acid bacteria from sourdough with high exopolysaccharides production ability. Food Science and Biotechnology." 18(2), 384-389

www.SID.ir

Archive of SID

6-Kandler O, Nobert W, 1989. Bergeys mannual of systemat bacteriology, 2nd Ed. New York. Springer.

7-Madiedo, P. &R. Reyes-Gavila´n, C.G. (2005). "Methods for the screening، isolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria". Journal of Dairy Science. 88, 843-856.

8- Micheli, L. Uccelletti,D. Palleschi, c. & Crescenzi,V.(1999). "Isolation and characterisation of a ropy Lactobacillus strain producing the exopolysaccharide kefiran". Appled Microbiology and Biotechnology، 53, 69±74

9- PERRY, D. B., MCMAHON,D. J. & OBERG، C. J. (1997). "Effect of Exopolysaccharides-Producing Cultures on Moisture Retention in Low Fat Mozzarella Cheese". Journal of Dairy Science، 80(5)

10-Tajabady, E.M., Ouwehand, A.C., Hejazi,M.A & Jafari، P. (2011)."Traditional Iranian dairy products: A source of potential probiotic lactobacilli." African Journal of Microbiology Research، Vol. 5(1)، pp. 20-27

11- Heydari Nasrabadi, M., Tajabadi Ebrahimi, M., Dehghan Banadaki, Sh., Torabi Kajousangi, M and Zahedi, F. "Study on antagonistic activity of acid and bile tolerance Lactobacillus isolated from traditional dairy products". Journal of Arak University of Medical Sciences، 2009. 12, p. 17-27

12-Tajabady, E.M., Hejazi,M.A. & Noohi، A. (2008)"Study on probiotic properties of Lactobacilluse isolated from traditional dairy products of Lighvan". Quarterly Journal of Science، Tarbiat Moallem University. 7, p. 941-952.

13-Tallon, R.,Bressollier, P. & Urdaci, M.(2003). "Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by lactobacillus plantarum EP56". Research in Microbiology.154, 705-712.

14- Welman, A.D. & Maddox,I. S.(2000). "Exopolysaccharides from lactic acid bacteria, perspectives and challenges". Trends in Biotechnology, 21(6),344-356

www.SID.ir

Archive of SID

15- Van Den Berg, D., Robijn, G., . Janssen,A., Giuseppin,M., Vreeker,R., Kamerling, J., Vliegenthart, J., Ledeboer, A., Verrips, T. 1995. "Production of a Novel Extracellular Polysaccharide by Lactobacillus sake 0-1 and Characterization of the Polysaccharide". Applied And Environmental Microbiology. 22, 2840–2844

16- Vuyst, L.D. & Degeest, B(1999). "Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria". FEMS Microbiology Reviews . 23, 153-177.

www.SID.ir