مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال چهارم، شماره۱، بهار ۱۳۸۸ ، صفحات ۷۸-۶۷

ارزیابی توان تولید لاکتوسین‌ها توسط سویه‌های پروبیوتیکی در نمونه ماست‌های محلی

آنیتا خنافری[۱]، مهرناز اسماعیل زاده[۲]، عباس اخوان سپهی[۳]

۱- نویسنده مسئول: دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، پست الکترونیکی: khanafari_a@yahoo.com
۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی
۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، داتشگاه آزاد اسلامی

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۸/۳/۵

چکیده

سابقه و هدف: باکتری‌های اسید لاکتیک، میکروارگانیسم‌هایی با توانایی تولید طیف وسیعی از ترکیبات با خاصیت ماندگاری ماده غذایی تخمیری هستند. هدف از تحقیق حاضر، بررسی توان تولید لاکتوسین توسط سویه‌های پروبیوتیکی نمونه ماست‌های محلی به منظور ارزیابی عملکرد ضدمیکروبی آنها در منبع غذایی طبیعی فوق بود.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری از بیست نوع ماست محلی (اراک، سرعین، شاهاندشت و دماوند) به منظور جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های اسید لاکتیک در محیط کشت MRS agar و مقایسه با سه سویه پروبیوتیک شاهد لاکتوباسیلوس کازئی (*L. casei* PTCC 1608)، لاکتوباسیلوس رئوتری (*L. reuteri* PTCC 1655) و لاکتوباسیلوس رامنوسوس (*L. rhamnosus* PTCC 1637)انجام شد. اثر ممانعت کنندگی رشد به روش انتشار در آگار بر ۵ سویه استاندارد منتخب گرم مثبت و منفی، مورد بررسی قرار گرفت. حداکثر میزان تولید ماده ضدمیکروبی برحسب نمودار رشد و استخراج و خالص سازی لاکتوسین توسط سویه‌های بهینه به روش دیالیز تعیین شد. در هر مرحله، میزان پروتئین استخراج شده به روش لوری و نیز واحد فعالیت، راندمان، ضریب تخلیص، درصد بازیافت و فعالیت اختصاصی محاسبه شد. وزن مولکولی پروتئین استخراج شده به روش SDS-PAGE تعیین شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این تحقیق به ترتیب جداسازی ۲۱ سویه باکتری اسید لاکتیک را نشان داد. تولید ترکیبات ضدمیکروبی توسط سویه‌های فوق در فاز لگاریتمی رشد مشاهده شد که حداکثر آن مربوط به عصاره محیط کشت و فاز رویی دو سویه Ln_{11} و Ln_{17} بود. نتایج حاصل از SDS-PAGE وجود لاکتوسین‌هایی با وزن مولکولی ۴۸ تا ۵۷ کیلو دالتون را در این دو سویه مشخص کرد.

نتیجه‌گیری: با توجه به خاصیت ضدمیکروبی باکتری‌های جدا شده از ماست‌های محلی در مقایسه با سه سوش استاندارد، می‌توان از آنها به عنوان سوش‌های پروبیوتیکی بومی با توان ضد میکروبی در منابع غذایی تخمیری استفاده کرد.

واژگان کلیدی: لاکتوسین، پروبیوتیک، خاصیت ضدمیکروبی، ماست

Archive of SID

• مقدمه

پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده مؤثر در سلامت، از طریق حفظ تعادل میکروب‌های روده‌ای در میزبان حیوانی و انسانی معرفی می‌شوند(۱). دو گروه عمده از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی، *لاکتوباسیلوس‌ها* (*Lactobacillus* spp) و *بیفیدوباکتریوم‌ها* (*Bifidobactrium* spp) هستند (۲) . مهم‌ترین گونه‌های لاکتوباسیلوس عبارتند از: *اسیدوفیلوس* (*L.acidophilus*)، *سلوبیوز*(*L. cellobiose*)، *کازئی* (*L. casei*)، *کوروانتوس*(*L. curvatus*)، دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس(*L. delbrueckii, SS.* bulgaricus)، *فرمنتوم* (*L. fermentum*)، *بورویس* (*L. brevis*)، *رئوتری* (*L. reuteri*)، *رامنوسوس* (*L. rhamnosus*) و *پلنتاروم* (*Lplantarum*). بیفیدوباکتریوم لانگوم (*Bifidobacterium longum*) و بیفیدوباکتریوم بروه (*Bifidobacterium breve*) مهم‌ترین گونه‌های بیفیدوباکتریوم هستند که به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳).

www.SID.ir

لاکتوباسیل‌ها در طبیعت پراکنده بوده و به طور طبیعی در دهان، روده، واژن انسان و حیوانات خونگرم، شیر و فراورده‌های آن، سبزیجات، گوشت و مواد غذایی فاسد شده، روی نباتات زنده یا در حال تجزیه به وفور یافت می‌شوند . فعالیت بازدارندگی باکتری‌های اسید لاکتیک، به سیستم‌های پیچیده آنتاگونیستی تولید شده توسط کشت‌های آغازگر بستگی دارد. در توانایی تولید و ترشح انواع مواد بازدارنده رشد بسیاری از میکروارگانیسم‌ها و قدرت نگهدارندگی وجود دارد (۴). این مواد عبارتند از: کاتابولیت‌های قندی مثل اسیدهای آلی (اسید استیک، اسید لاکتیک و اسید فرمیک)، کاتابولیت‌های اکسیژن‌دار نظیر پراکسید هیدروژن، ترکیبات پروتئینی مانند باکتریوسین‌ها ، پپتیدهایی با وزن مولکولی کم، پپتیدها و پروتئین‌های ضد قارچی، متابولیت‌های چربی، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب، فنیل لاکتیک اسید و هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید و دیگر ترکیبات مانند دی استیل، آمونیاک، اتانل، دی آمین استوئین، استالدئید، بنزوات، لانتی بیوتیک‌ها، آنتی بیوتیک‌ها، رئوترین، رئوتریساکلین (Reutericyclin) (۶، ۵، ۲).

اثر بازدارندگی رشد توسط برخی از این مواد بر پاتوژن‌های مواد غذایی و میکروارگانیسم‌های فاسد کننده نظیر *لیستریاها* (۷) *کلستریدیوم‌ها* و *انتروکوکوس‌ها* (۸)، برخی از *باسیلوس‌ها* و *استافیلوکوکوس‌ها* (۷) به اثبات رسیده است. لاکتوباسیل‌ها با منشاء انسانی اثر آنتاگونیستی بر پاتوژن‌های گوارشی- روده‌ای مختلف نظیر *هلیکوباکتر پیلوری* (*Helicobacter pylori*)، *کلستریدیوم دیفیسل* (*Clostridium difficile*)، *کمپیلو باکتر ژژونی* (*Campylobacter jejuni*) و *اشریشیاکلی* (*E. coli*) دارند (۸).

باکتریوسین‌های تولید شده توسط لاکتوباسیل‌ها ، پپتیدها یا پروتئین‌های ضدمیکروبی هستند که معمولا از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری می‌کنند (۵) درحالی که ترکیبات تولید شده با جرم مولکولی کم، مثل اسید لاکتیک، رشد پاتوژن‌های گرم منفی را مهار می‌کنند (۹). فعالیت ضدمیکروبی اکثر لاکتوباسیل‌ها به علت تولید اسید لاکتیک است، اما مواد ضدمیکروبی دیگر نظیر ترکیبات آروماتیک و مولکول‌های هتروسیکلیک و موالونولاکتون نیز به وسیله لاکتوباسیل‌ها تولید می‌شود که در pH اسیدی و در حضور اسید لاکتیک بر باکتری‌های گرم منفی، مؤثر است (۱۰).

پروبیوتیک‌ها نه تنها به عنوان مکمل‌های غذایی و دارویی بلکه در تهیه فراورده‌های لبنی، آب میوه ها، شکلات‌ها و حتی فراورده‌های گوشتی نیز به کار می‌روند. میکروارگانیسم‌هایی به عنوان پروبیوتیک مورد توجه قرار می‌گیرند که بتوانند از معده و روده عبور کنند، در مجرای گوارشی تکثیر شوند و با تولید متابولیت‌های آنتاگونیستی با میکروفلور ساپروفیت رقابت کنند. این توانایی در بین باکتری‌های اسید لاکتیک مانند لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکترها وجود دارد (۱۱). اثرات مثبت در استفاده خوراکی از این باکتری‌ها به صورت بهبود عدم تحمل لاکتوز و تقویت سیستم ایمنی، کاهش خطر اسهال ناشی از روتاویروس و سرطان روده بزرگ، اتصال به آلفا توکسین موجود در مواد غذایی و تجزیه آن، فعالیت ضدکلسترولی و آنتی اکسیداتیو گزارش شده است (۱۵-۱۲).

با توجه به اهمیت سویه‌های بومی پروبیوتیکی و استفاده از آنها در صنایع غذایی، هدف از انجام این تحقیق، جداسازی سویه‌های پروبیوتیکی از نمونه ماست‌های محلی و بررسی توان تولید باکتریوسین (لاکتوسین) توسط آنها به منظور ارزیابی نوع عملکرد ضدمیکروبی این منبع غذایی طبیعی بود.

• مواد و روش‌ها

نمونه‌ها و سویه‌های میکروبی: به منظور جداسازی سویه‌های پروبیوتیکی بومی، بیست نمونه ماست محلی از چهار منطقه سرعین اردبیل، اراک، دماوند و شاهاندشت تهیه شد. ابتدا ml ۵ از هر نمونه با ml ۵ آب مقطر همگن و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $25^{\circ}C$ گرمخانه‌گذاری شد. سپس از مایع شناور رویی، رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-9} در سرم فیزیولوژی سترون تهیه شد و به روش دوبلیکیت با محیط کشت جامد و سترون MRS agar (ساخت شرکت Merck آلمان) (دمای کمتر از$^{\circ}C$ ۴۵) کشت پورپلیت تهیه

Archive of SID

www.SID.ir

شد. نمونه‌ها در دمای ۳۰°C با اتمسفر ۵٪ CO_2 به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند (۱۶).

کشت‌های آغازگر: به منظور مقایسه توان ضدمیکروبی پروبیوتیک‌های جدا شده از نمونه ماست‌های محلی با نمونه شاهد، کشت‌های لیوفیلیزه *لاکتوباسیلوس کازئی* (PTCC 1608)، *لاکتوباسیلوس رئوتری*(PTCC 1655) و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (PTCC 1637) از مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های *سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران* تهیه شد. به منظور تهیه کشت فعال باکتریایی، پودرهای لیوفیلیزه به لوله‌های حاوی ۵ ml محیط کشت MRS broth (ساخت شرکت Merck آلمان) انتقال داده شد و در دمای ۳۰°C و اتمسفر ۵٪ CO_2 به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد (۴).

شناسایی ماکروسکپی و میکروسکپی نمونه‌های جداسازی شده: مشخصات ماکروسکپی پرگنه‌های تشکیل شده در عمق محیط کشت از قبیل رنگ، شکل، قوام و اندازه و مشخصات میکروسکپی پس از رنگ‌آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفت (۱۶).

خالص‌سازی پرگنه‌ها: به منظور خالص سازی نمونه‌ها، از کلنی‌های دوکی تشکیل شده در عمق محیط کشت برداشت کرده و به لوله حاوی محیط کشت skim milk broth انتقال داده شد. نمونه‌ها در دمای ۳۰°C با اتمسفر ۵٪ CO_2 به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سپس از محیط فوق روی محیط کشت Skim milk agar کشت خطی تهیه شد و دوباره نمونه‌ها در شرایط ذکر شده، گرمخانه‌گذاری شدند (۴).

تأیید جنس لاکتوباسیلوس‌های جدا شده به وسیله آزمون‌های بیوشیمیایی: برای این منظور از آزمون‌های بیوشیمیایی نظیر هیدرولیز آرژینین، اکسیداز، کاتالاز و توانایی استفاده از قندهای گلوکز، گالاکتوز، مانیتول، لاکتوز و رافینوز استفاده شد. پس از تلقیح نمونه‌های باکتریایی به محیط‌های کشت فوق، نمونه‌ها در دمای ۳۰°C با اتمسفر ۵٪ CO_2 به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند و سپس نتایج مورد بررسی قرار گرفت (۴).

ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های جداشده: برای این منظور از کشت تلقیح ۴۸ ساعته لاکتوباسیل‌های جدا شده و سه سویه شاهد پس از مقایسه با شاهد یک مک فارلند (معادل با 3×10^8 CFU/ml) به نسبت ۵٪ به محیط کشت MRS broth انتقال داده شد. نمونه‌ها در دمای ۳۰°C با اتمسفر ۵٪ CO_2 به مدت ۸ ، ۱۵ ، ۲۳ و ۳۲ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سپس از هر نمونه ، میزان یک میلی لیتر به لوله‌های اپندرف استریل انتقال داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ×g ۱۳۲۲۶ سانتریفوژ شدند. ۵۰ میکرولیتر از بخش‌های جدا شده جهت بررسی خاصیت آنتاگونیستی جداسازی شد. برای بررسی اثر ممانعت کنندگی رشد، از آزمون انتشار در آگار توسط تهیه چاهک (Well Diffusion Agar) استفاده شد و اثر آنتاگونیستی باکتری‌های جدا شده بر ۵ سویه استاندارد مورد بررسی قرار گرفت، شامل: *کلبسیلا پنمونیه* (*Klebsiella pneumoniae* PTCC 1053)، *میکروکوکوس لوتئوس* (*Micrococcus luteus* PTCC 1110)، *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis* PTCC 1015)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus* TCC 1112) و *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes* PTCC 1301).

از نمونه‌های باکتری‌های استاندارد، کشت تلقیح ۲۴ ساعته تهیه و کدورت آن با شاهد یک مک فارلند مقایسه شد. میزان ۰/۱ml از کشت تلقیح فوق به محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده شد و با سواپ استریل، کشت یکنواخت و متراکم تهیه شد. بعد از ایجاد چاهک، ۵۰ میکرولیتر از بخش‌های جدا شده لاکتوباسیلی به هر چاهک افزوده شد. به منظور انتشار بهتر بخش‌های فوق در محیط کشت، پلیت‌ها به مدت یک ساعت در یخچال ۴°C، سرماگذاری شد. سپس پلیت‌ها به انکوباتور ۳۷ °C انتقال داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، قطر هاله عدم رشد مربوط به هر یک از بخش‌ها توسط خط کش میلی‌متری، اندازه گیری و در جداول مربوطه ثبت شد (۱۰).

ارزیابی نمودار رشد: به منظور بررسی نمودار رشد باکتری‌های جداسازی شده از کشت ۴۸ ساعته، پس از

Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه با شاهد یک مک فارلند (کدورت معادل با $3/10^8$ CFU/ml باکتری) به عنوان کشت تلقیح استفاده شد و به نسبت ۵٪ به محیط حاوی MRS broth افزوده شد. نمونه‌ها در انکوباتور ۳۷ °C و اتمسفر ۵٪ CO_2 گرمخانه‌گذاری شدند. میزان جذب (OD) نمونه‌ها توسط طیف نورسنج در طول موج ۶۰۰nm هر ۲ ساعت یک بار تعیین و نمودار رشد باکتری‌ها رسم شد (۱۶).

استخراج لاکتوسین‌ها: از بین نمونه‌های جدا شده، سه سویه از لاکتوباسیل‌ها که نسبت به سایر سویه‌ها رشد سریع‌تر و اثر ضدمیکروبی وسیع‌تری داشتند، جهت استخراج لاکتوسین‌ها در نظر گرفته شدند. به عنوان نمونه شاهد از سه سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس رئوتری* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* استفاده شد. از سویه‌ها کشت تلقیح مطابق با شاهد یک مک فارلند تهیه شد و به نسبت ۵٪ به محیط کشت MRS broth انتقال داده شد. مطابق با منحنی رشد، هر سویه تا زمان رسیدن به فاز لگاریتمی رشد، در دمای ۳۰°C گرمخانه گذاری شد. سپس، pH محیط کشت توسط دستگاه pH سنج و با افزودن محلول ۴ نرمال NaOH در محدوده ۶/۵ تا ۷ تنظیم شد. پس از خنثی‌سازی، سوسپانسیون میکروبی محیط کشت، در شرایط استریل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۹۵۷ ×g سانتریفوژ شد و توده سلولی تولید شده جداسازی شد. فاز مایع حاصله به آرامی به ارلن‌های استریل انتقال داده شد. ارلن‌ها به ظروف حاوی یخ روی همزن مغناطیسی انتقال داده شدند. به نسبت ۵۰٪ حجم موجود در هر ارلن سولفات آمونیوم اضافه شد. نمونه‌ها به مدت یک شب در یخچال ۴ °C قرار داده شدند تا سولفات آمونیوم به خوبی حل شود. محتویات ارلن‌ها شامل رسوبات حاصله و محلول حاوی رسوب به لوله‌های استریل، منتقل و در دمای ۴°C به مدت ۴۰ دقیقه در ۳۸۳۵ ×g سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا شد و رسوب حاصله در 1 ml بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار و pH=۷ حل شد. بخش‌های حاصله از نظر فعالیت لاکتوسینی (ضدمیکروبی) مورد سنجش قرار گرفتند. بخشی نیز برای انجام دیالیز کنار گذاشته شد (۱۷).

خالص‌سازی لاکتوسین‌های استخراج شده به روش دیالیز: برای این منظور از کیسه دیالیز با سایز KD ۱۲۰۰۰ استفاده شد. برای آماده سازی آن برای استفاده و زدودن مواد محافظ پوشاننده از روی کیسه، بشر به مدت چهار ساعت در زیر جریان شیر آب قرار گرفت. کیسه دیالیز به قطعات ۸ سانتی‌متری برای هر یک از نمونه ها، بریده شد و درون یک بشر یک لیتری حاوی آب قرار داده شد. رسوبات پروتئینی رسوب داده شده با سولفات آمونیوم، در 8ml بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار و pH = ۷ حل شد. محتویات فوق به درون کیسه دیالیز انتقال داده شد و "در" آن توسط چسب مسدود شد . سپس در یک ارلن ۵ لیتری، مقدار ۴ لیتر بافر پتاسیم فسفات ریخته و در یخچال ۴°C قرار داده شد. نمونه‌های درون کیسه ها، در بافر قرار داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در آن شناور شدند. هر ۱۸ ساعت یک بار، بافر تعویض و دوباره کیسه‌ها در بافر تازه، غوطه‌ور می‌شدند. بعد از سه بار تعویض بافر و استفاده از معرف نسلر به منظور اطمینان از خروج سولفات آمونیوم، محتویات به لوله‌های استریل منتقل شدند و جهت بررسی ویژگی‌های لاکتوسینی، مورد سنجش قرار گرفتند. حجم نمونه‌ها قبل و بعد از دیالیز، به دقت اندازه‌گیری و یادداشت شد. از همه نمونه‌ها مقادیر یکسانی برای انجام تست لوری و اندازه‌گیری مقدار پروتئین کنار گذاشته شد (۱۷).

محاسبه میزان پروتئین‌های استخراج شده: در هر مرحله برای هر بخش، این موارد محاسبه شد: حجم نهایی (total volume)، غلظت پروتئین (protein concentration)، واحد فعالیت (activity unit)، راندمان (yeild)، ضریب تخلیص (purification factor)، درصد بازیافت (recovery %)، فعالیت اختصاصی (specific activity) و میزان کل پروتئین (total protein). تیتر بخش‌های فوق به عنوان معکوس بیشترین رقتی که قادر به مهار قطعی سویه شاهد بود، برحسب واحد فعالیت/میلی‌لیتر (Activity Unit/ml)، بیان شد (۱۷).

محاسبات با استفاده از فرمول‌های زیر انجام شد:

Archive of SID

www.SID.ir

درصد بازیافت = پروتئین کل(mg/ml)/ پروتئین کل خام استخراج شده (mg/ml) × ۱۰۰

پروتئین کل= حجم نهایی(ml) × غلظت پروتئین (mg/ml)

واحد کل= فعالیت کل = حجم کل(ml) ×فعالیت(واحد در میلی لیتر)

فعالیت اختصاصی= فعالیت باکتریوسین(واحد در میلی لیتر)/ غلظت پروتئین(mg/ml)

میزان خلوص= فعالیت اختصاصی بخش خالص شده/ فعالیت اختصاصی بخش خام استخراج شده

میزان باکتریوسین= واحد کل در بخش خالص شده/ واحد کل در بخش خام استخراج شده × ۱۰۰

ارزیابی و سنجش پروتئین استخراج شده: جهت اندازه‌گیری پروتئین محلول از روش لوری (Lowry assay) استفاده شد (۱۰). برای غلظت‌های ۰ ، ۰/۰۵ ، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲ و ۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتئین آلبومین سرم گاوی (bovine serum albumin)، در آب مقطر، پس از افزودن محلول رنگی کوماسی برلیانت بلو (Coomassie Brilliant Blue) منحنی استاندارد در طول موج ۵۹۵ نانومتر رسم شد . میزان پروتئین موجود در نمونه پس از خواندن OD در طول موج ۵۹۵ نانومتر و مقایسه با منحنی استاندارد تعیین شد (۹).

تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های استخراج شده به روش الکتروفورز: به منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های حاصل، از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE با تکنیک رنگ آمیزی کوماسی بلو استفاده شد (۹).

• یافته‌ها

در این تحقیق ۲۱ سویه لاکتوباسیل از بیست نمونه ماست محلی جداسازی شد (ماست شاهاندشت ۴ سویه، دماوند ۶ سویه، اردبیل ۲ سویه و اراک ۹ سویه). بررسی‌های ماکروسکپی نشان داد که پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت در عمق محیط کشت MRS agar تشکیل پرگنه‌های سوزنی و دوکی شکل به ترتیب حاصل از رقت‌های 10^{-4} - 10^{-5} و 10^{-4} تا 10^{-8} تشکیل شد. بررسی‌های میکروسکپی نیز حضور باسیل‌های کشیده، رشته‌ای، فاقد اسپور، گرم مثبت با آرایش زنجیری را نشان داد. کلیه سویه ها فاقدحرکت بوده و توانایی تولید سولفید هیدروژن، آنزیم‌های کاتالاز، اکسیداز و هیدرولیز مانیتول را نداشته ولی تماماً از گلوکز استفاده نمودند. تمایز سویه‌ها از نظر هیدرولیز رافینوز، لاکتوز، گلاکتوز و آرژینین در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- آزمون‌های شیمیایی تمایز سویه‌های لاکتوباسیل

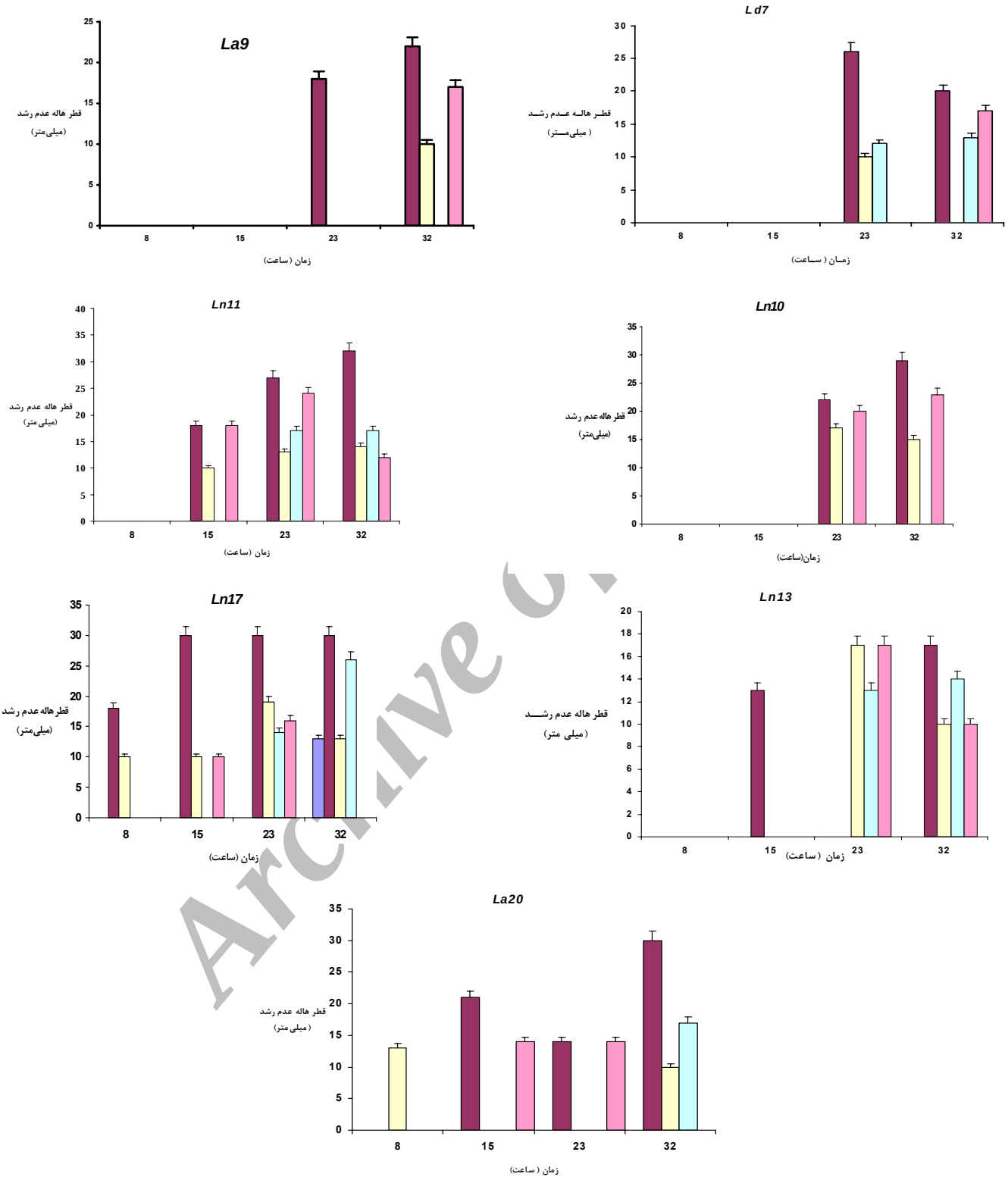
تست شیمیایی	هیدرولیز قندها			
سویه ها	رافینوز	لاکتوز	گالاکتوز	آرژینین
Ld_1	–	+	–	–
Ld_2	–	+	–	+
Ld_3	–	+	–	–
Ld_4	–	+	پپتونه[1]	–
La_5	–	+	–	+
La_6	–	+	–	–
Ld_7	پپتونه	+	–	–
La_8	–	+	پپتونه	–
$La9$	–	+	–	+
Ln_{10}	–	+	+	+
Ln_{11}	+	+	+	+
Ld_{12}	–	+	–	–
Ln_{13}	–	+	–	+
Ls_{14}	–	+	–	+
Ls_{15}	–	–	+	+
La_{16}	–	+	–	–
Ln_{17}	–	+	–	+
La_{18}	–	+	–	–
La_{19}	–	+	–	+
La_{20}	–	+	پپتونه	–
La_{21}	–	+	–	–
لاکتوباسیلوس کازئی	–	–	–	+
لاکتوباسیلوس رامنوسوس	–	+	–	+
لاکتوباسیلوس رئوتری	–	+	–	–

[1] - پپتونه: نوعی واکنش بیوشیمیایی است که بجای هیدرولیز قند مورد نظر، پپتون (پروتئین هیدرولیز شده) موجود در محیط کشت تجزیه و قلیا تولید می شود.

تولید ترکیبات ضدمیکروبی در زمان‌های مختلف ۸، ۱۵، ۲۳ و ۳۲ ساعته بر باکتری‌های منتخب در شکل ۱ نشان داده شده است. ارزیابی اثر ضدمیکروبی عصاره محیط کشت لاکتوباسیل‌های جدا شده روی باکتری‌های منتخب، تشکیل هاله عدم رشد را پس از ۲۰ ساعت روی تمامی باکتری‌ها بجز کلبسیلا پنمونیه نشان داد (شکل ۱).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی عصاره کشت سویه‌های لاکتوباسیل در زمان‌های مختلف ۸، ۱۵، ۲۳ و ۳۲ ساعته بر باکتری‌های منتخب

لیستریا مونوسایتوژنز استافیلوکوکوس اورئوس باسیلوس سوبتلیس میکروکوکوس لوتئوس کلبسیلا پنمونیه

Archive of SID
www.SID.ir

با افزایش مدت زمان گرمخانه‌گذاری تا ۳۲ ساعت، تأثیر ضدمیکروبی Ln_{17}روی باکتری‌ها مشاهده شد (جدول ۲). بر اساس حداکثر فعالیت ممانعت کنندگی عصاره محیط کشت لاکتوباسیل‌های جدا شده بر رشد و تنوع باکتری‌های منتخب و سرعت ورود باکتری‌های فوق به فاز لگاریتمی رشد ۷ سویه‌های Ld_7 ، La_9، Ln_{10}، Ln_{11}، Ld_{13} ، Ln_{17} و La_{20} جهت بررسی‌های بیشتر و دو سویه Ln_{11} و Ln_{17}جهت بررسی‌های تکمیلی انتخاب شدند. تولید ترکیبات ضدمیکروبی توسط سویه‌های فوق در فاز لگاریتمی رشد مشاهده شد (شکل ۲).

نتایج خالص‌سازی لاکتوسین‌های ایجاد شده پس از تیمار با سولفات آمونیوم، تشکیل سه فاز را نشان داد، شامل: فاز سبک رویی (حاوی ترکیبات لیپیدی و سایر مواد سبک موجود در محیط)، فاز آبی (حاوی پروتئین‌های رسوب داده شده) و فاز رسوبی (حاوی پروتئین‌ها). اثر ضدمیکروبی فازهای به دست آمده روی باکتری‌های منتخب در جدول ۳ نشان داده شده است. در باکتری‌های شاهد، عصاره محیط کشت، فاز رویی و فاز میانی هرسه روی باکتری گرم منفی *لیستریا مونوسیتوژنز* اثر ضدمیکروبی داشت که حداکثر آن مربوط به عصاره محیط کشت و فاز رویی بود (جدول ۳).

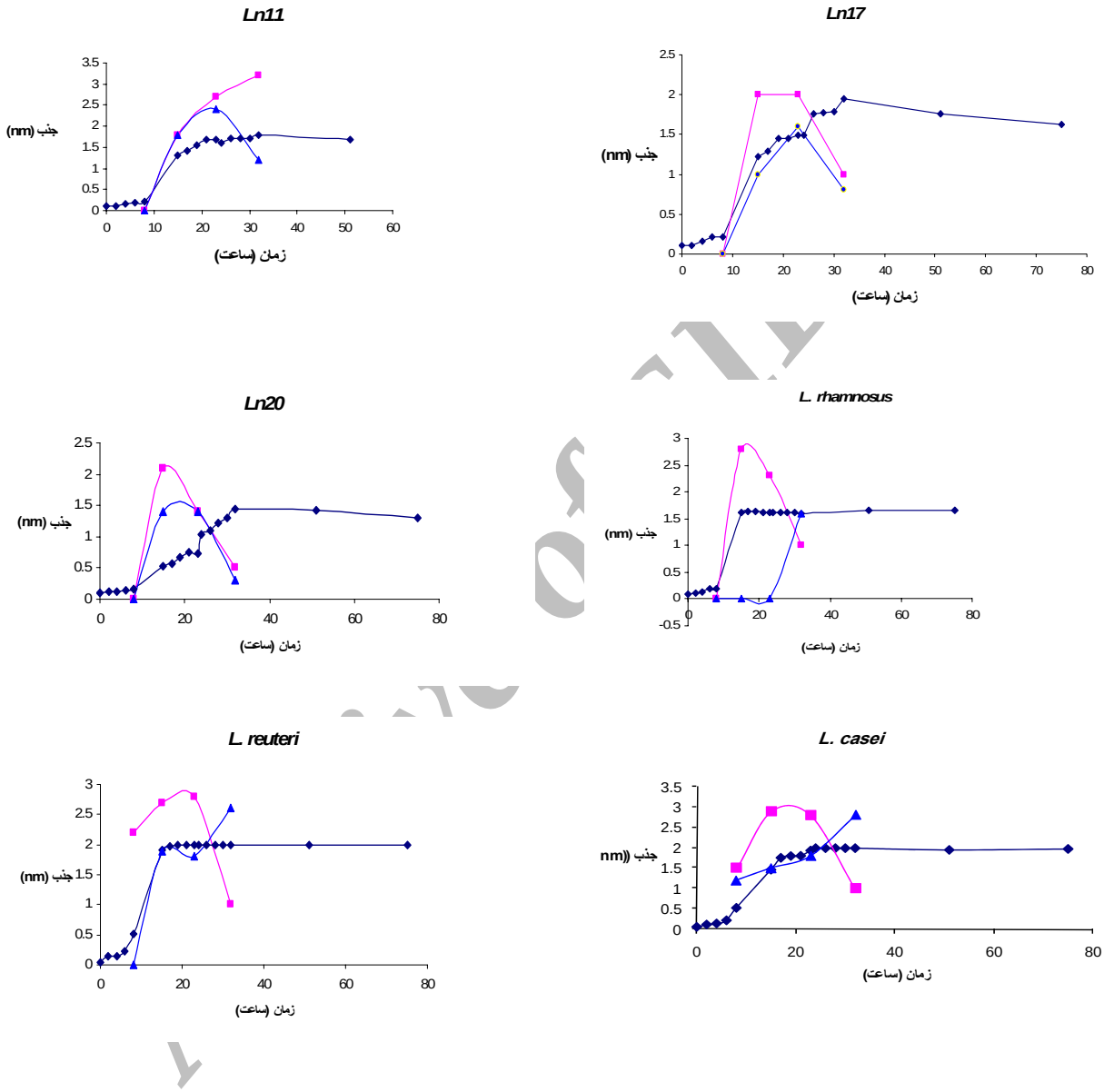
میزان لاکتوسین‌های استخراج شده را در مایع تخمیر، قبل و بعد از دیالیز در جدول ۴ آورده شده است. نتایج الکتروفورز به روش SDS-PAGE ایجاد تک باند پروتئینی با وزن ۴۸ تا ۵۷ کیلودالتون را نشان داد که نشانه خلوص ماده پروتئینی به دست آمده است.

جدول ۲- ارزیابی اثر ضدمیکروبی عصاره ۳۲ ساعته محیط کشت روی باکتری‌های منتخب

باکتری / قطر هاله عدم رشد (mm)	کلبسیلا پنمونیه	میکروکوکوس لوتئوس	باسیلوس سوبتیلیس	استافیلوکوکوس اورئوس	لیستریا مونوسیتوژنز
Ld_1	-	۱۷	-	-	-
Ld_2	-	۲۴	-	-	-
Ld_3	-	۱۸	-	-	-
Ld_4	-	۱۷	-	-	-
La_5	-	۲۲	-	-	۱۰
La_6	-	۲۱	-	-	-
Ld_7	-	۲۰	-	۱۳	۱۷
La_8	-	۲۳	-	-	۱۸
$La9$	-	۲۲	۱۰	-	۱۷
Ln_{10}	-	۲۹	۱۵		۲۳
Ln_{11}	-	۳۲	۱۴	۱۷	۱۲
Ld_{12}	-	۲۸	۱۰	-	۱۰
Ln_{13}	-	۱۷	۱۰	۱۴	۱۰
Ls_{14}	-	۱۷	-	-	-
Ls_{15}	-	۱۵	-	-	-
La_{16}	-	۲۲	-	۱۰	-
Ln_{17}	۱۳	-	۱۳	۲۶	-
La_{18}	-	-	-	۱۰	-
La_{19}	-	-	-	۱۶	-
La_{20}	-	-	۱۰	۱۷	-
La_{21}	-	-	-	۱۵	۱۷
لاکتوباسیلوس کازئی	۱۶	-	۲۴	۲۳	۲۸
لاکتوباسیلوس رامنوسوس	-	-	۲۲	۱۷	۱۶
لاکتوباسیلوس رئوتری	۱۷	-	۲۷	۲۳	۲۶

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- تولید ترکیبات ضدمیکروبی توسط سویه‌های لاکتوباسیل برحسب منحنی رشد

منحنی رشد — اثر ضدمیکروبی بر میکروکوکوس لوتئوس — اثر ضدمیکروبی بر لیستریا منوسیتوژنز

www.SID.ir

جدول ۳- بررسی اثر ضدمیکروبی فازهای حاصل از استخراج لاکتوسین در مراحل مختلف روی باکتری‌های منتخب

باکتریهای منتخب	میکروکوکوس لوتئوس					سودوموناس آئروجینوزا					لیستریا مونوسیتوژنز					کلبسیلا پنمونیه					باسیلوس سوبتلیس					استافیلوکوکوس اورئوس				
قطرهاله عدم رشد (mm) / سویه های لاکتوباسیل	۱	۲	۳	۴	۵	۱	۲	۳	۴	۵	۱	۲	۳	۴	۵	۱	۲	۳	۴	۵	۱	۲	۳	۴	۵	۱	۲	۳	۴	۵
Ln11	۱۳	۱۰	-	-	-	۱۷	۱۰	-	-	-	۱۱	-	-	-	-	۱۳	۱۰	-	-	-	۱۶	۱۰	-	-	-	۱۱	-	-	-	-
Ln17	۱۰	-	-	-	-	۱۷	۱۰	-	-	-	۱۲	-	-	-	-	۱۰	-	-	-	-	۱۴	۱۰	-	-	-	-	-	-	-	-
Ln20	۱۰	-	-	-	-	۱۴	۱۰	-	-	-	۱۲	-	-	-	-	۱۰	-	-	-	-	۱۱	-	-	-	-	-	-	-	-	-
لاکتوباسیلوس کازئی(1608)	۳۱	۲۵	۱۰	-	-	۱۸	۱۰	-	-	-	۳۱	۲۵	۱۰	-	-	۱۶	۱۰	-	-	-	۱۶	۱۰	-	-	-	۱۶	۱۰	-	-	-
لاکتوباسیلوس رئوتری(1655)	۲۴	۱۰	-	-	-	۱۷	۱۰	-	-	-	۳۰	۲۳	۱۰	-	-	۱۳	-	-	-	-	۱۴	-	-	-	-	-	-	-	-	-
لاکتوباسیلوس رامنوسوس (1637)	۲۹	۱۷	-	-	-	۱۸	۱۰	-	-	-	۳۰	۲۳	۱۰	-	-	۱۵	-	-	-	-	۱۵	-	-	-	-	-	-	-	-	-

۱* عصاره محیط کشت ۴۸ ساعته خنثی شده با سود ۲ نرمال

۲* مایع حاصل از انحلال فاز سبک رویی در بافر پتاسیم فسفات

۳* فاز مایع بعد از افزودن آمونیوم سولفات

۴* مایع حاصل از انحلال رسوب در بافر پتاسیم فسفات

۵* سولفات آمونیوم اشباع ۵۰٪ به عنوان نمونه شاهد

جدول ۴- میزان پروتئین و فعالیت لاکتوسین استخراج شده در مایع تخمیر، قبل و بعد از دیالیز

فاکتورها / سویه ها	*Ln11*			*Ln17*		
	مایع تخمیر	قبل از دیالیز	بعد از دیالیز	مایع تخمیر	قبل از دیالیز	بعد از دیالیز
حجم نمونه (ml)	۱۳۱	۳۶	۴۲	۱۳۲	۳۶	۴۵
واحد فعالیت (Unit/ml)	۵۰	۱۰۰	۵۰	۵۰	۱۰۰	۵۰
فعالیت کل	۶۶۰۰	۳۶۰۰	۲۱۰۰	۶۶۰۰	۳۶۰۰	۲۳۵۰
غلظت پروتئین (mg/ml)	۲/۲۹	-	۰/۴۱	۳/۴۵	-	۰/۲۳۸
میزان کل پروتئین (mg)	۳۰۲/۲۸	-	۱۷/۲۲	۴۵۵/۴	-	۱۰۷۱
فعالیت اختصاصی(U/mg)	۲۱/۸۳	-	۱۲۱/۹۵	۱۴/۵	-	۲۱۰/۰۸
راندمان	۱۰۰	۵۴/۵۴	۳۱/۸۱	۱۰۰	۵۴/۵۴	۳۵/۶
درصد بازیافت	۱۰۰	-	۵/۷	۱۰۰	-	۲/۳۵
ضریب تخلیص	۱	-	۵/۵۸	۱	-	۱۴/۴۸

Archive of SID

www.SID.ir

• بحث

نتایج حاصل از این تحقیق، جداسازی ۲۱ سویه لاکتوباسیل از بیست نمونه ماست محلی با توان ضدمیکروبی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به ویژه *لیستریا مونوسیتوژنز* به عنوان پاتوژن مواد غذایی را نشان داد.

بسیاری از محققان اثر ضدمیکروبی لاکتوباسیل‌ها را بر سایر میکروارگانیسم‌ها در طی سالیان طولانی مورد بررسی قرار داده‌اند. تحقیقات آنها نشان داد، هنگامی که نمونه‌های لاکتوباسیل روی محیط‌های کشت انتخابی یا اختصاصی کشت داده شوند، قادر به تولید ترکیبات ضدمیکروبی هستند (۲۵-۱۸، ۱۰-۸، ۲).

حداکثر اثر ضدمیکروبی عصاره محیط کشت پس از خنثی کردن مربوط به سویه Ln_{11} بر *سودوموناس آئروجینوزا* (۱۷mm)، *باسیلوس سوبتیلیس* (۱۶mm)، *کلبسیلا پنمونیه* (۱۳mm)، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۱mm) مشاهده شد (جدول ۳). به عبارت دیگر، حداکثر اثر ضدمیکروبی روی باکتری‌های گرم منفی مشاهده شد.

Vincent و همکاران نشان دادند که لاکتوسین تولید شده توسط *L. acidophilus* روی باکتری‌های گرم منفی مؤثرتر از گرم مثبت است. با این حال، تأثیر ترکیبات ضدمیکروبی تولید شده توسط سویه‌های پروبیوتیکی، روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، طیف وسیعی دارد. پپتیدها یا پروتئین‌های ضدمیکروبی تولید شده توسط این باکتری‌ها غالباً رشد باکتری‌های گرم مثبت را مهار می‌کنند (۵)، در حالی که ترکیبات تولید شده با جرم مولکولی کم، نظیر اسید لاکتیک، رشد پاتوژن‌های گرم منفی را مهار می‌کنند (۹).

با این حال، از آنجا که اثر ضدمیکروبی تولید احتمالی اسید لاکتیک توسط سویه‌های فوق در این تحقیق با خنثی نمودن pH حذف شد، ترکیب ضدمیکروبی استخراج شده روی باکتری‌های گرم منفی بیش از گرم مثبت بود.

پس از انحلال توسط بافر پتاسیم فسفات و جداسازی فاز رویی، این اثر به ۱۰ تا ۱۱ میلی‌متر کاهش یافت. چنین اثری روی باکتری‌های شاهد نیز مشاهده شد. احتمالاً پس از انحلال توسط بافر، نقش کلیدی اسید لاکتیک به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی شاخص حذف شد.

در این تحقیق، برای استخراج لاکتوسین‌ها از سویه‌های لاکتوباسیل روش رسوب دادن با سولفات آمونیوم و سپس دیالیز پروتئین‌ها به کار رفت. واحد فعالیت هر دو سویه Ln_{11} و Ln_{17} بعد از دیالیز به میزان ۵۰٪ کاهش یافت، در حالی که فعالیت ویژه سویه‌های Ln_{11} و Ln_{17} U/ml ۱۲۱/۹۵ و ۲۱۰/۰۸ افزایش داشت.

باکتریوسین‌ها در فرم خام، ترکیباتی غیر قابل دیالیز، مقاوم به حرارت، غیر حساس به کاتالاز و حساس به آنزیم‌های پروتئولیتیک، هستند. به همین دلیل، برای استخراج آنها از روش‌های مختلف مانند دیالیز باید از تیمارهایی نظیر رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم استفاده کرد (۱۷). باکتریوسین‌ها و مولکول‌های شبیه باکتریوسین، مستقیماً به صورت پلی‌پپتید یا پیش پلی‌پپتید ساخته می‌شوند و اثر ضدمیکروبی آنها به شرایط محیطی (مانند pH و حرارت) بستگی دارد. بنابراین، استفاده از یک روش حساس برای شناسایی چگونگی پاسخ این سلول‌ها به مواد مهار کننده، دارای اهمیت ویژه‌ای است (۲۶).

در این تحقیق، حداکثر تولید لاکتوسین در فاز لگاریتمی رشد در محیط کشت تخمیری در دمای ۳۷°C و مدت زمان ۳۲ ساعت حاصل شد. درحالی که تولید این ترکیبات در سه سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس رئوتری* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در ابتدای فاز رکود مشاهده شد.

حداکثر تولید باکتریوسین توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، ممکن است در فازهای مختلف چرخه رشد اتفاق بیفتد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که فاز لگاریتمی رشد برای اکثر لاکتوباسیل‌ها ۲۴ تا ۴۸ ساعت است. Sahl و Brandis گزارش کردند که تولید استرپتوکوکسین STH نظیر تولید باکتریوسین استرپتوکوکسین A-FF22 و استافیلوکوکسین C55 بیشتر طی فاز لگاریتمی و قبل از شروع فاز رکود بوده است (۲۷).

Archive of SID

www.SID.ir

باکتریوسین‌ها متابولیت اولیه هستند و در فاز لگاریتمی رشد تولید می‌شوند؛ اگر چه برخی گزارشات نشان داده است که در اوایل فاز رکود نیز تولید باکتریوسین ادامه می‌یابد. به عنوان مثال، تولید باکتریوسین در *کلستریدیوم پرفرنجنز* ۱۱۰۵ فقط در شروع فاز رکود مشاهده شده است (۲۲).

ایجاد تک باند بعد از انجام SDS-PAGE نشان دهنده خلوص ماده پروتئینی به دست آمده طی فرایند فوق است. مقایسه باندها با مارکر مشخص کرد که وزن مولکولی باکتریوسین‌های موجود در این سویه‌ها بین ۴۸ تا ۵۷ کیلودالتون است.

برخی از آزمایش‌های اولترا فیلتراسیون نشان داده است که باکتریوسین‌ها قادر به عبور از غشاء هایی با منافذ ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ کیلودالتون نیستند (۳۱-۲۸). درحالی که مطالعات Gwiazdowska و Trojanowska در سال ۲۰۰۶ نشان دهنده استخراج انواعی از باکتریوسین‌ها از سویه‌های پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس* و *پروپیونی باکتریوم* با استفاده از سیستم‌های غشایی با منافذ ۱۲۰۰۰ کیلودالتون است (۳۲).

از آنجا که امروزه، تولید افزودنی‌های طبیعی برای کاربرد در صنایع غذایی، اهمیت فراوانی یافته است و فراورده‌های میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک، نظیر پروتئین‌هایی با خواص ممانعت کنندگی رشد میکروارگانیسم‌ها (به عنوان نگهدارنده) و اگزوپلی‌ساکاریدها (به عنوان قوام دهنده طبیعی) به وفور در تهیه غذاهای مختلف به کار می‌روند(۶) پیشنهاد می‌شود که از سویه‌های بومی استخراج شده با توان ضدمیکروبی در این صنایع استفاده شود.

• References

1. FAO/WHO. Evalution of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health organization Expert consultation Report, Cordoba 2001.
2. Servin AL. Antagonist activities of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* against microbial pathogens. FEMS Microbiol. Rev. 2004; 28: 405-440.
3. Masson P. Containing education nutrition probiotics and prebiotics. The pharm J. 2001; 66(713): 118-121.
4. Kandler O, Nobert W. Bergeys mannual of systematic bacteriology, 2nd ed. New York. Springer; 1989.
5. Lue De Vuyst. Functionality of novel starter cultures in traditional fermentation process. Microbiol 1995; 41: 1-7.
6. Lue De Vuyst. Industrial microbiology and downstream processing. Microbiol 1996; 142: 817-827.
7. Ennahar S, Deachamrs N. Listeria effect of enterocin A produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* relative to other bacteriocins. EFMOI 2000; 88(3): 449-457.
8. Strus M, Pakosz K, Goscinia H, Przondo Mordarska A. Antagonistic activity tract pathogens (Helicobacter pylori, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Closteridium difficle*). Med Diew Microbiol 2001; 53 (2): 133-142.
9. Aroutcheva Alla A, Simoes Jose A, Sebastian Faro. Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerella vaginalis*. Infect Dis Obstet Gynecol 2001; 9: 33–39
10. Padmanabha Reddy V, Christopher MD, Sankara Reddy I. Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus*. Tamilnadu J Vet Animal Sci 2006; 2(4): 142-144
11. Reuter G. Probiotics possibiliter and limitations of their application in food, animal feed and in pharmaceutical preparations for men and animals. Berl Munch Tieraztl Wochenschr. 2001; 114: 11-12
12. Peltonen K, El-Nezami H, Haskard C. Ahokas J, Salminen S. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*, J Dairy Sci 2001; 84(10): 2152-2156
13. Roberford MB. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? Am J Clin Nutr 2000; 71(6): 1692-1697
14. Elmata l, Heinzle C, Majchrzak Foissy H. Influence of probiotic yoghurt on the status of vitmin B_1, B_6 in the healthy adult human. Am Nutr Metab 2001; 45(1): 13-28
15. Terahara M, Kurama S. Takemoto N: Prevention by lactic acid bacteria of the oxidation of human LDL. Bio Sci Biotechnol Biochem. 2001; 65(8): 1864-8
16. Baron Ellen Jo, Finegold Sydney M. Diagnostic microbiology. 8th ed, USA, Bailey & Scott's. 1990.

Archive of SID

www.SID.ir

17. Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. Afr J Biotechnol 2003; 2(8): 219-227.
18. Hamdan I Y, Mikolajcik E M. Acidolin: an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*. J Antibiot 1974; 27:631-636.
19. De Klerk H C, Coetzee J N. Antibiosis among lactobacilli. Nature 1961; 192:340-341.
20. Barefoot S F, Klaenhammer T R, Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. Antimicrob Agents Chemother 1984; 26:328-334.
21. Bhunia AK, Johnson MC, Ray B. Purification characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J Appl Bacteriol. G5 1988; 261-268.
22. Charlotta E. Inhibition of *Enterobacteria* and *Listeria* growth by lactic acid and formic acid. J Applied Bacteriol 1993; 75: 18-24.
23. Vincent J G, Veomett R C, Riley R F. Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. J Bacteriol 1959; 78:477-484.
24. Tagg J R, Dajani A S, Wannamaker L W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev 1976; 40: 722-756.
25. Shahani J R, Kilara A. Natural activity of *Lactobacillus acidophilus* and *L.bulgaricus*. II. isolation of acidophilin from *L. acidophilus*. Cultured Dairy Products J 1977; 2:8-11.
26. Ralph W, Jack John R Tagg, Bibekray. Bacteriocin of gram positive bacteria. Microbio rev 1995; 59 (2):171-200.
27. Sahl HG, Bradis H . Efflux of low Mr substances from the cytoplasm of sensitive cells caused by the staphylococcin like agent Pep5. FEMS Microbiol Lett 1983; 16: 75-79.
28. Bruno M E C, Montville T J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl Environ Microbiol 1993; 59: 3003-3010.
29. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev 1993; 12: 39-86.
30. Daeschel AM. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol 1989; 43:164.
31. Krijgsman J. Product recovery in bioprocess technology. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd; 1992.
32. Gwiazdowska D, Trojanowska K. Antimicrobial activity and stability of partially purified bacteriocins produced by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *freudenreichii* and ssp. *Shermanii*. Dairy Technol 2006; 141-154.

Archive of SID

www.SID.ir