بررسی فعالیت آنزیمی سویه های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازیی و باسیلوس سوبتیلیس

مهسا محمدی[1]، ناصر قائمی[1]

[1]گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران، ایمیل: mahsaa_mo@yahoo.com

چکیده

باکتریهای اسید لاکتیکی که نیمی از محصولات نهایی تخمیر گلوکز در آنها اسید لاکتیک می باشد به عنوان لاکتوباسیل نامگذاری شده اند. این باکتری ها از اجزای اصلی فلور میکروبی محصولات لبنی تخمیری شناسایی شده اند. طی این پژوهش فعالیت آنزیمی باکتری های پروبیوتیکی باسیلوس سوبتیلیس و لاکتوباسیلوس کازئی مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام آزمایش باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر روی محیط کشت های نوترینت براث، MRS براث، MRS براث + گلوکز، MRS براث + لاکتوز، لاکتوز براث و TSB کشت داده شد. نتایج این پژوهش مبین آن است که باکتری باسیلوس سوبتیلیس از قابلیت بالایی در تولید آنزیم آلفا آمیلاز برخوردار میباشد؛ محیط کشت اختصاصی باکتری باسیلوس سوبتیلیس تریپتیک سوی براث و تریپتیک سوی آگار است با این حال این باکتری در اغلب محیط کشت های مورد بررسی به خوبی رشد نموده است. محیط کشت اختصاصی برای باکتری لاکتوباسیلوس کازئی ام آر اس است و طی این تحقیق، بهترین رشد این باکتری در محیط کشت ام آر اس حاوی قند لاکتوز مشاهده شده است. با اعمال شرایط استرس میزان ترشح آنزیم های این باکتری درون محیط کشت افزایش یافت. لاکتوباسیلوس کازئی هیچ رشدی بر روی محیط کشت مک کانکی آگار نشان نداد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، بتاگالاکتوزیداز، آلفا آمیلاز، باسیلوس سوبتیلیس، لاکتوباسیلوس کازئی

۱. مقدمه

پروبیوتیک ها باکتری های سودمندی هستند که به تعادل فلور میکروبی روده میزبان کمک میکنند. لاکتوباسیلوس ها و بیفیدوباکتر ها از مهم ترین پروبیوتیک ها میباشند. باید در نظر داشت این بدان معنا نیست که تمام گونه های لاکنوباسیلوس پروبیوتیک هستند بلکه در این جنس گونه هایی از باکتری های غیر پروبیوتیک و بیماریزا وجود دارد. اثر بخشی غذاهای پروبیوتیکی در این است که این باکتری ها در زمان مصرف مواد غذایی حامل و پس از هضم از بقای مناسبی برخوردار بوده و بتوانند پس از تحمل شرایط نامطلوب معده و صفرا به روده برسند و آنزیم های مورد نیاز بدن میزبان را ترشح کنند (۱). پروبیوتیک ها علاوه بر کمک به گوارش، مولکولهای پیچیده و ترکیباتی مانند ویتامینها و آنتی بیوتیکها و آنزیم های مختلف را تولید می‌کنند که برای بدن مفید می‌باشد. منبع باکتری‌های پروبیوتیک لبنیات و میوه‌ها میباشد (۲). باکتری های پروبیوتیک بر کارکرد سیستم ایمنی، بهبود سرطان، اسهال ناشی از آنتی بیوتیک، اسهال مسافرتی، آلرژی ها، بهبود فشار خون، کلسترول افزایش یافته خون و تولید ویتامین در بدن و همچنین عدم تحمل لاکتوز اثر مثبت می گذارند (۳). همان طور که ذکر شد یکی از خواص باکتری‌های پروبیوتیک درمان نارسایی لاکتاز می‌باشد، این بیماری به علت فقدان آنزیم لاکتاز در دستگاه گوارش، جهت شکستن پیوندهای لاکتوز بروز میکند. مطالعات نشان میدهد باکتریهای پروبیوتیک میتوانند با تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز دی ساکارید لاکتوز را به قندهای ساده گلوکوز و گالاکتوز شکسته و به هضم لاکتوز کمک کنند (۴). لاکتو باسیلوس ها باکتری های گرم مثبت، غیر اسپوردار، کاتالاز منفی و متعلق به خانواده لاکتوباسیلاسه میباشند تا کنون در حدود

www.SID.ir

Archive of SID

۵۶ گونه از این باکتری شناسایی شده است. محدوده رشد این باکتری ها ۳۵-۴۵ درجه سانتیگراد است و در محدوده PH 6/5 – 4/5 رشد می نمایند (۵). باکتریهای اسید لاکتیکی که نیمی از محصولات نهایی تخمیر گلوکز در آنها اسید لاکتیک می باشد به عنوان لاکتوباسیل نامگذاری شده اند. این باکتری ها از اجزای اصلی فلور میکروبی محصولات لبنی تخمیری شناسایی شده اند. این باکتری ها در طعم فرآورده های غذایی دخالت داشته و به صورت پروبیوتیک های غذایی مورد استفاده قرار می گیرند (۶). بتاگالاکتوزیداز یک آنزیم درون سلولی است که توسط اکثر باکتری های لاکتوباسیل تولید میشود (۷). سوبسترای این آنزیم قند لاکتوز (قند اصلی موجود در شیر و برخی از فرآورده های لبنی) است که آن را به گلوکز و گالاکتوز تبدیل می کند و به آسانی توسط سلولهای اپیتلیال روده جذب می شوند (۸). آنزیم مشابه بتاگالاکتوزیداز باکتری ها در بدن انسان، لاکتاز فلوریزین هیدرولاز است. فعالیت کم لاکتاز فلوریزین هیدرولاز سبب ایجاد اختلال در عمل گوارش و عدم تحمل لاکتوز میشود (۹). یکی دیگر از مشکلات گوارشی ناشی از تولید یا عملکرد نامطلوب آنزیم های بدن جانوران عدم توانی در هضم نشاسته میباشد. این بیماری در افراد موجب بروز مشکلات گوارشی و درد شکمی و نفخ میشود، باکتری‌های پروبیوتیک با تولید آنزیم آلفا آمیلاز توانایی هضم نشاسته مقاوم (موجود در جوو و جوی دوسر و اغلب غلات کامل) را به بیمار اعطا می‌نمایند. آلفا آمیلاز ها امروزه دارای اهمیت بسیاری میباشند. سوبسترای این آنزیم از واحد های گلوکوزی تشکیل شده اند که با پیوند α(1→4) به هم متصل شده اند. زنجیره های نشاسته تحت تاثیر آنزیم آلفا آمیلاز به ترکیبات کوچکتر و قند های ساده تر تقسیم میشوند (۱۰). امروزه از این آنزیم کاربرد های فراوانی در زمینه های پزشکی بالینی، شیمی تجزیه، صنایع داروسازی، صنایع غذایی و. . . میشود . در میان پروبیوتیک‌ها جنس باسیلوس بیشترین توانایی تولید آنزیم آلفا آمیلاز را دارا می‌باشد (۱۱). باسیلوس ها باکتری های میله ای شکل گرم مثبت و یک عضو از شاخهء فیرمیکوتها هستند. این باکتری ها میتوانند هوازی اجباری و یا بی هوازی اختیاری باشند (۱۱). باسیلوس سوبتیلیس یکی از اعضای جنس باسیلوس است. باسیلوس سوبتیلیس را میتوان از خاک و دستگاه گوارش انسان و نوشخوارکنندگان جدا کرد. این باکتری معمولا میله ای شکل بوده و در حدود ۴-۱۰ میکرون طول و ۰. ۲۵-۱ میکرون قطر دارد با حجم سلولی در حدود ۴. ۶ در فاز ثابت (۱۱). مانند دیگر اعضا از این جنس بی هوازی اختیاری بوده و میتواند برای تحمل شرایط بد محیطی مانند خشکی و حرارت اندوسپور تشکیل دهد که در واقع یک اسپور حقیقی نیست و باکتری از طریق آن خود را در مقابل شرایط بد محیطی محافظت میکند و از این طریق میتواند برای مدت طولانی به خواب رود (۱۲). هدف از این بررسی، جداسازی لاکتوباسیلوس کازئی موجود در شیر و بررسی ظرفیت بتاگالاکتوزیدازی این باکتری در شرایط نزدیک به بدن انسان و شرایط نزدیک به استرس های محیطی بوده است. از این لاکتوباسیل به عنوان پروبیوتیک برای بهبود هضم لاکتوز فراورده های لبنی می توان استفاده کرد. آگاهی از میزان رشد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و باکتری باسیلوس سوبتیلیس و میزان تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز و آلفا آمیلاز توسط این دو باکتری در شرایط آزمایشگاهی و پس از قرار گرفتن در شرایط استرس و شرایط اسیدی معده میتواند در ارتقاء کیفیت محصولات لبنیاتی پروبیوتیکی پرکاربرد باشد.

۲. مواد و روش کار

جهت انجام آزمایش مواد و وسایل مختلف و روش کارهای مجزایی مورد استفاده قرار گرفتند که برخی در همه آزمایشات عمومیت داشت و برخی به صورت اختصاصی برای انجام یک آزمایش بکار برده شد که در ادامه به تفکیک بیان می گردند. ابتدا محیط کشت نوترینت براث تهیه گشت. از باکتری باسیلوس سوبتیلیس در محیط نوترینت براث رقت نیم مک فارلند تهیه نمودیم. سپس به کمک استوانه مدرج استریل ۷۵ میلی لیتر از محیط کشت مایع داخل ۵ ارلن ۱۰۰ که قبلا توسط فور استریل شده بودند انتقال داده شد. ارلن ها به مدت بیست دقیقه در دمای °C 121 داخل دستگاه اتوکلاو قرار داده شدند. پس از استریل محیط کشت ها و پایین آمدن دمای آنها، توسط سمپلر، ۳۰۰ لاندا از غلظت نیم مک فارلند از باکتری باسیلوس سوبتیلیس را داخل چهار ارلن حاوی محیط کشت تلقیح کردیم. در یک ارلن حاوی محیط کشت باکتری تلقیح نشد تا از آن به عنوان شاهد و برای بلانک کردن دستگاه اسپکتروفتومتر(عدم دخالت رنگ محیط کشت در جذب نوری) استفاده شود هر ۵ ارلن را در داخل انکوباتور شیکر دار در دمای °C 37 وبا دور حدود rpm۱۲۰ گذاشته شدند. چون باکتری باسیلوس سوبتیلیس بی هوازی اختیاری است در خصوص این باکتری از انکوباتور شیکردار استفاده نمودیم. رسم منحنی رشد باکتری به روش اسپکتروفتومتری انجام شده است. ثبت جذب ارلن ها پس از زمان صفر(بلافاصله پس از تلقیح ۳۰۰ لاندا باکتری به هر

www.SID.ir

Archive of SID

یک از آنها (بجز به ارلن شاهد آغاز شد و سپس در فواصل زمانی یک ساعت تکرار گردید. به این صورت که پس از خارج نمودن باکتری ها از انکوباتور، محیط شاهد را به یک کووت انتقال دادیم و توسط آن دستگاه را روی ۶۰۰ نانومتر بلانک نمودیم. محیط ها به کووت دیگر انتقال داده شد و در جایگاه دوم تا چهارم دستگاه قرار داده شد. نتیجهء حاصله یادداشت گردید و از آن برای رسم منحنی رشد استفاده گردید. در ادامه جهت اندازه گیری روند رشد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی ابتدا محیط کشت ام آر اس براث تهیه گشته و سپس از باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در محیط ام آر اس براث رقت نیم مک فارلند تهیه نمودیم. سپس ۷۵ میلی لیتر از محیط کشت مایع داخل ۵ ارلن ۱۰۰ توسط پیپت انتقال داده شد. ارلن ها به مدت یک ساعت در دمای C 178 ° داخل دستگاه اتوکلاو قرار داده شدند. پس از استریل محیط کشت ها و پایین آمدن دمای آنها، توسط سمپلر، ۳۰۰ لاندا از غلظت نیم مک فارلند از باکتری لاکتوباسیلوس کازئی را داخل چهار ارلن حاوی محیط کشت تلقیح کردیم. در یک ارلن حاوی محیط کشت باکتری تلقیح نشد تا از آن به عنوان شاهد و برای بلانک کردن دستگاه اسپکتروفتومتر(عدم دخالت رنگ محیط کشت در جذب نوری) استفاده شود هر ۵ ارلن را در داخل انکوباتور در دمای C °37 گذاشته شدند. رسم منحنی رشد باکتری به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر انجام شده است. ثبت جذب ارلن ها به دلیل دیر رشد بودن این باکتری اولین بار پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تلقیح انجام گرفت. سپس در فواصل زمانی دو ساعت تکرار گشت. پس از سه بار اندازه گیری جذب نمونه ها مجددا داخل انکوباتور گذاشته شدند و پس از گذشت ۴۸ و ۵۰ ساعت از انجام تلقیح مجددا مقدار جذب نمونه ها مورد اندازه گیری قرار گرفت. از نتایج بدست آمده برای رسم منحنی رشد باکتری استفاده شد. در ادامه نیز جهت بررسی فعالیت آلفا آمیلازی باکتری باسیلوس سوبتیلیس در داخل ۴ لوله آزمایش بوسیله پیپت استریل مقدار ۵ میلی لیتر از محیط کشت نوترینت براث انتقال داده شد. همچنین در داخل ۱۲ لوله استریل محیط MRS انتقال یافت و در داخل ۴ لوله استریل محیط لاکتوز براث انتقال داده شد. و در داخل ۱۰ لوله استریل محیط TSB که محیط کشت اختصاصی باکتری های باسیلوس سوبتیلیس است انتقال داده شد. به منظور اطمینان از عدم آلودگی، لوله های آزمایش مجددا داخل اتوکلاو قرار گرفتند. رقت نیم مک فارلند از محیط های نوترینت براث، MRS براث، لاکتوز براث و TSB به طور جداگانه تهیه گردید. در داخل سه لوله حاوی محیط کشت ام آر اس قند لاکتوز و به داخل سه لوله حاوی ام آر اس براث قند گلوکز انتقال داده شد. به منظور جلوگیری از آلودگی احتمالی و حل شدن قند ها در محیط کشت، شش لوله حاوی قند به مدت ۱۵ minدر داخل دستگاه بن ماری قرار داده شد. بوسیلهء دستگاه سمپلر، مقدار ۳۰۰ لاندا از محیط نیم مک فارلند لاکتوز براث به سه لوله حاوی محیط لاکتوز براث انتقال داده شد و یک لوله به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. مقدار ۳۰۰ لاندا از محیط نیم مک فارلند نوترینت براث حاوی باکتری سوبتیلیس به ۳ لوله حاوی محیط کشت نوترینت براث انتقال داده شد. به منظور استفاده به عنوان شاهد و بلانک در یک محیط باکتری تلقیح نگردید. به منظور استفاده به عنوان شاهد و بلانک در یک محیط باکتری تلقیح نگردید. مقدار ۳۰۰ لاندا از محیط نیم مک فارلند MRS حاوی باکتری سوبتیلیس به ۳ لوله حاوی محیط کشت MRS انتقال داده شد. به منظور استفاده به عنوان شاهد و بلانک در یک محیط باکتری تلقیح نگردید. مقدار ۳۰۰ لاندا از محیط نیم مک فارلند MRS حاوی باکتری سوبتیلیس و گلوکز به ۳ لوله حاوی محیط کشت MRS حاوی گلوکز انتقال داده شد. به منظور استفاده به عنوان شاهد و بلانک در یک محیط باکتری تلقیح نگردید. مقدار ۳۰۰ لاندا از محیط نیم مک فارلند MRS حاوی باکتری سوبتیلیس و لاکتوز به ۳ لوله حاوی محیط کشت MRS و لاکتوز انتقال داده شد. مقدار ۳۰۰ لاندا از محیط نیم مک فارلند TSB حاوی باکتری سوبتیلیس به ۳ لوله حاوی محیط کشت TSB انتقال داده شد. به منظور استفاده به عنوان شاهد و بلانک در یک محیط باکتری تلقیح نگردید. به منظور استفاده به عنوان شاهد و بلانک در یک محیط باکتری تلقیح نگردید. مقدار ۶۰۰ لاندا از محیط نیم مک فارلند TSB حاوی باکتری سوبتیلیس به ۳ لوله حاوی محیط کشت TSB انتقال داده شد. به منظور استفاده به عنوان شاهد و بلانک در یک محیط باکتری تلقیح نگردید. به منظور استفاده به عنوان شاهد و بلانک در یک محیط باکتری تلقیح نگردید. مقدار ۹۰۰ لاندا از محیط نیم مک فارلند TSB حاوی باکتری سوبتیلیس به ۳ لوله حاوی محیط کشت TSB انتقال داده شد. به منظور استفاده به عنوان شاهد و بلانک در یک محیط باکتری تلقیح نگردید. به منظور استفاده به عنوان شاهد و بلانک در یک محیط باکتری تلقیح نگردید. لوله ها به مدت پنج ساعت داخل دستگاه انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با دور حدود ۱۲۰ rpm قرار داده شدند. پس از این زمان، لوله ها به صورت بالانس داخل دستگاه سانتریفیوژ قرار گرفت. به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۷۰۰۰ سانتریفیوژ انجام شد.

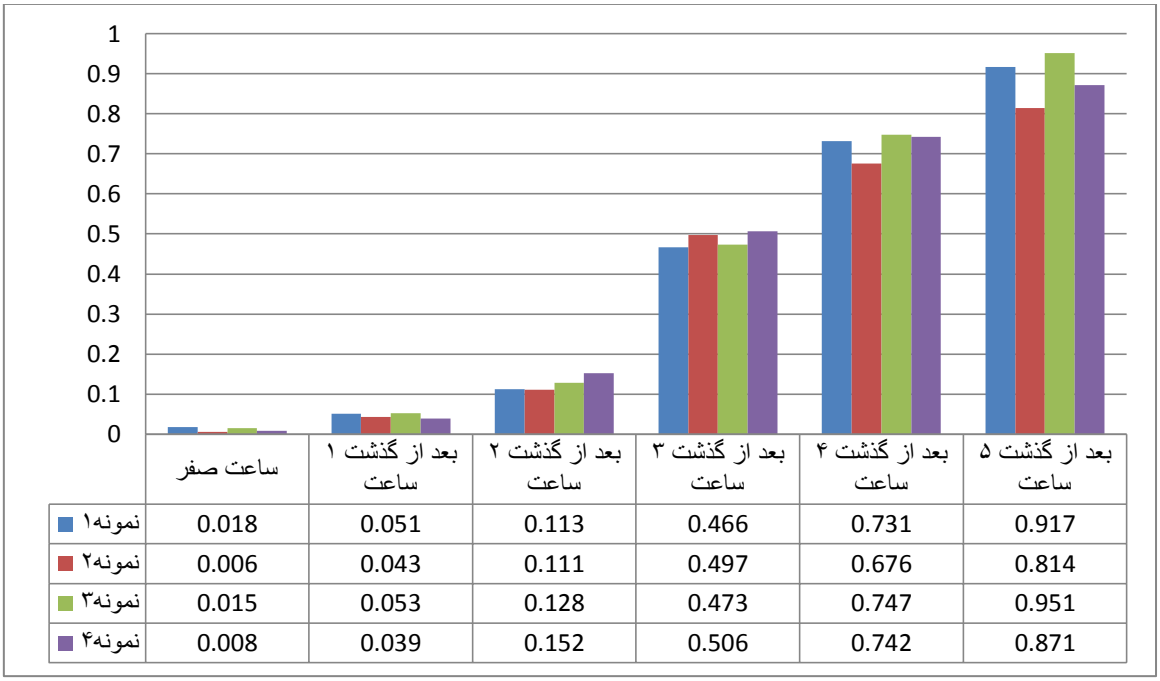
www.SID.ir

Archive of SID

سپس بوسیلهء سمپلر یک میکرولیتر ازمایع رویی جدا شده و به لوله های استریل که قبلا به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۵ درجه سانتیگراد قرار گرفته بودند، انتقال داده شد. به تمام لوله های حاوی سوپرناتانت و لوله های بلانک یک میلی لیتر محلول نشاسته ۱٪ و ۲ میلی لیتر بافر PBS اضافه گشت. لوله ها به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس ۱ میلی لیتر محلول DNS بوسیلهء سمپلر ۱۰۰۰ به لوله های حاوی باکتری و لوله های شاهد اضافه گردید، لوله ها به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار گرفتند. سپس تغییر رنگ در طول موج ۵۴۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور لوله شاهد هر محیط کشت را جداگانه به کووت انتقال داده شد و دستگاه اسپکتروفتومتر توسط آن بلانک گشت و سپس محیط کشت حاوی انزیم های باکتریایی در جایگاه بعدی دستگاه قرار گرفت و طول موج نمونه خوانده شد. در جای تمام مراحل این آزمایش در زیر هود و کنار شعله انجام گرفت.

۳. نتایج و بحث روی نتایج

نتایج رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس نمونه ها در ساعت صفر و بعد از گذشت ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت در نمودار ۱ ارائه شـده است.



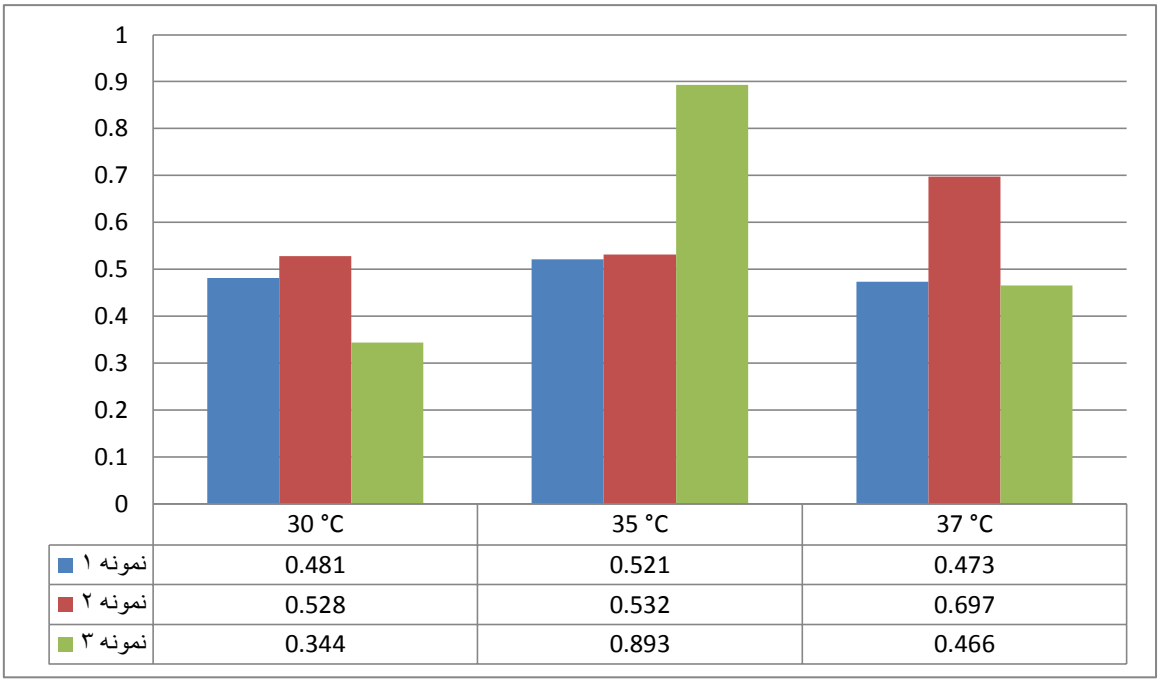
	ساعت صفر	بعد از گذشت ۱ ساعت	بعد از گذشت ۲ ساعت	بعد از گذشت ۳ ساعت	بعد از گذشت ۴ ساعت	بعد از گذشت ۵ ساعت
نمونه۱	0.018	0.051	0.113	0.466	0.731	0.917
نمونه۲	0.006	0.043	0.111	0.497	0.676	0.814
نمونه۳	0.015	0.053	0.128	0.473	0.747	0.951
نمونه۴	0.008	0.039	0.152	0.506	0.742	0.871

نمودار ۱. نتایج رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس نمونه ها در زمان های مختلف

نتایج رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس نمونه ها در دماهای مختلف پس از ۲۴ ساعت در نمودار ۲ ارائه شده است. بر اساس نمودار ۲، بیشترین و کمترین رشد پس از ۲۴ ساعت در نمونه ۳ و به ترتیب در دماهای ۳۵ و ۳۰ درجه سانتی گراد مشاهده شد.

www.SID.ir

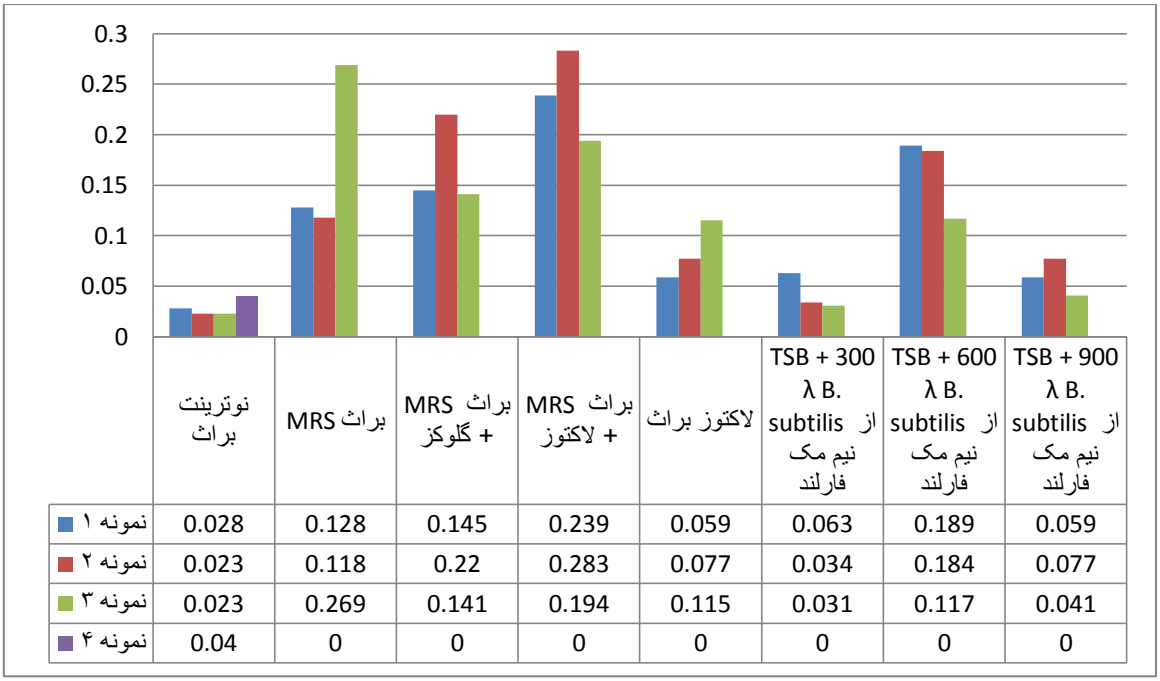
Archive of SID



	30 °C	35 °C	37 °C
نمونه ۱	0.481	0.521	0.473
نمونه ۲	0.528	0.532	0.697
نمونه ۳	0.344	0.893	0.466

نمودار ۲. نتایج رشد باکتری باسیلوس سوبتیلیس نمونه ها در دماهای مختلف پس از ۲۴ ساعت

نتایج میزان آنزیم تولید شده از باکتری باسیلوس سوبتیلیس در محیط کشت های مختلف در نمودار ۳ ارائه شده است. بیشترین میزان آنزیم در محیط کشت MRS براث + لاکتوز و کمترین میزان نیز در محیط کشت نوترینت براث مشاهده شده است.



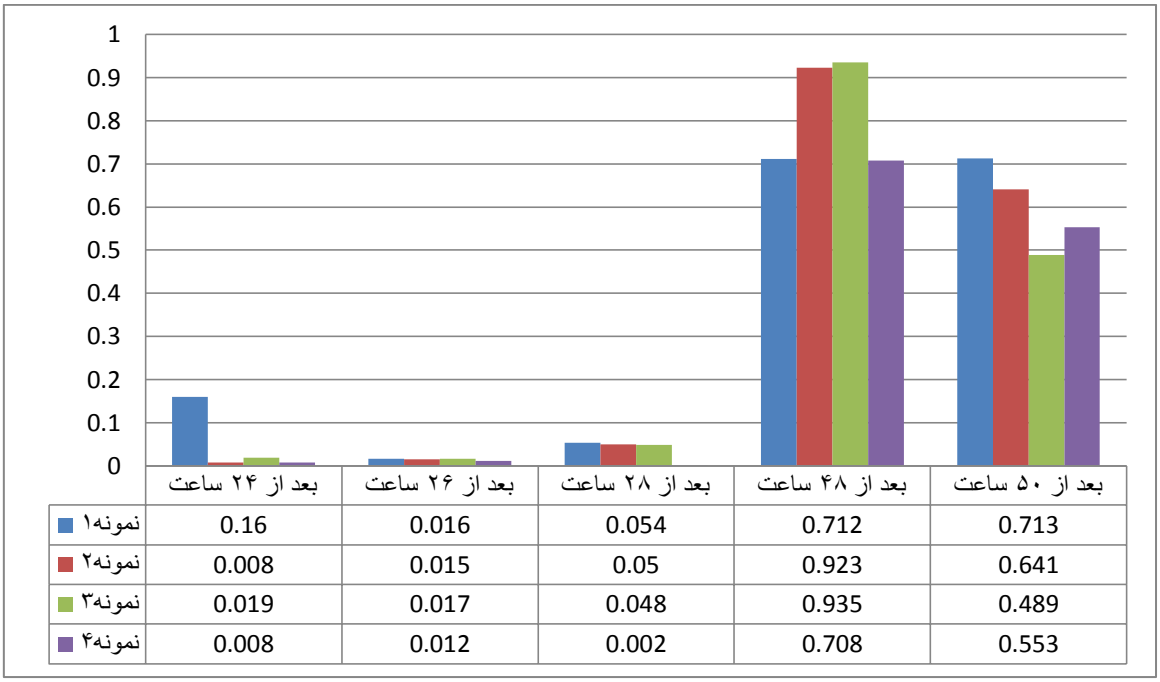
	نوترینت براث	MRS براث	MRS براث + گلوکز	MRS براث + لاکتوز	لاکتوز براث	TSB + 300 λ B. subtilis از نیم مک فارلند	TSB + 600 λ B. subtilis از نیم مک فارلند	TSB + 900 λ B. subtilis از نیم مک فارلند
نمونه ۱	0.028	0.128	0.145	0.239	0.059	0.063	0.189	0.059
نمونه ۲	0.023	0.118	0.22	0.283	0.077	0.034	0.184	0.077
نمونه ۳	0.023	0.269	0.141	0.194	0.115	0.031	0.117	0.041
نمونه ۴	0.04	0	0	0	0	0	0	0

تمودار ۳. میزان آنزیم آلفا آمیلاز نمونه ها در محیط کشت های مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

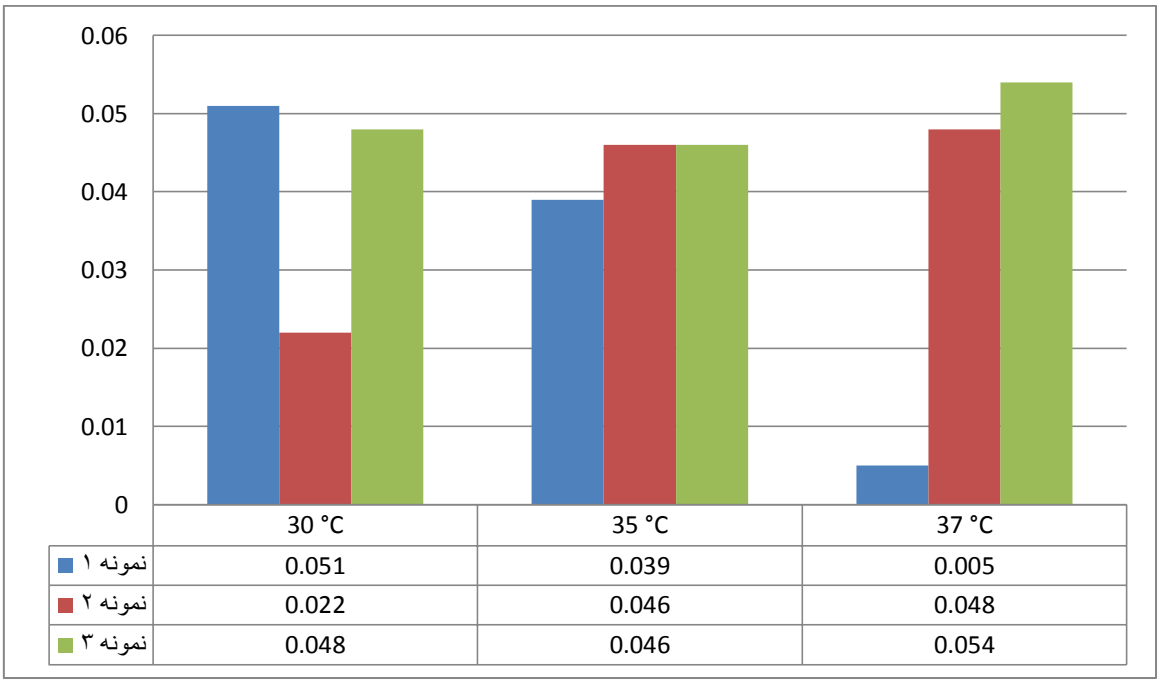
همچنین نتیجه بررسی رشد همزمان باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر روی محیط کشت های مک کانکی TSB وMRS آگار نشان داد که بیشترین رشد باکتری مورد نظر بر روی محیط کشت TSB و پس از آن MRS آگار بوده است. این باکتری همچنین بر روی محیط کشت مک کانگی آگار نیز رشد نمود. نتایج رشد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی نمونه ها بعد از گذشت ۲۴، ۲۶، ۲۸، ۴۸ و ۵۰ ساعت در نمودار ۴ ارائه شده است.



	بعد از ۲۴ ساعت	بعد از ۲۶ ساعت	بعد از ۲۸ ساعت	بعد از ۴۸ ساعت	بعد از ۵۰ ساعت
نمونه۱	0.16	0.016	0.054	0.712	0.713
نمونه۲	0.008	0.015	0.05	0.923	0.641
نمونه۳	0.019	0.017	0.048	0.935	0.489
نمونه۴	0.008	0.012	0.002	0.708	0.553

نمودار ۴. نتایج رشد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی نمونه ها در زمان های مختلف

نتایج رشد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی نمونه ها در دماهای مختلف پس از ۲۴ ساعت در نمودار ۵ ارائه شده است. بر اساس این جدول، بیشترین رشد پس از ۲۴ ساعت در نمونه ۳ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و کمترین نیز در نمونه ۱ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، مشاهده شد.



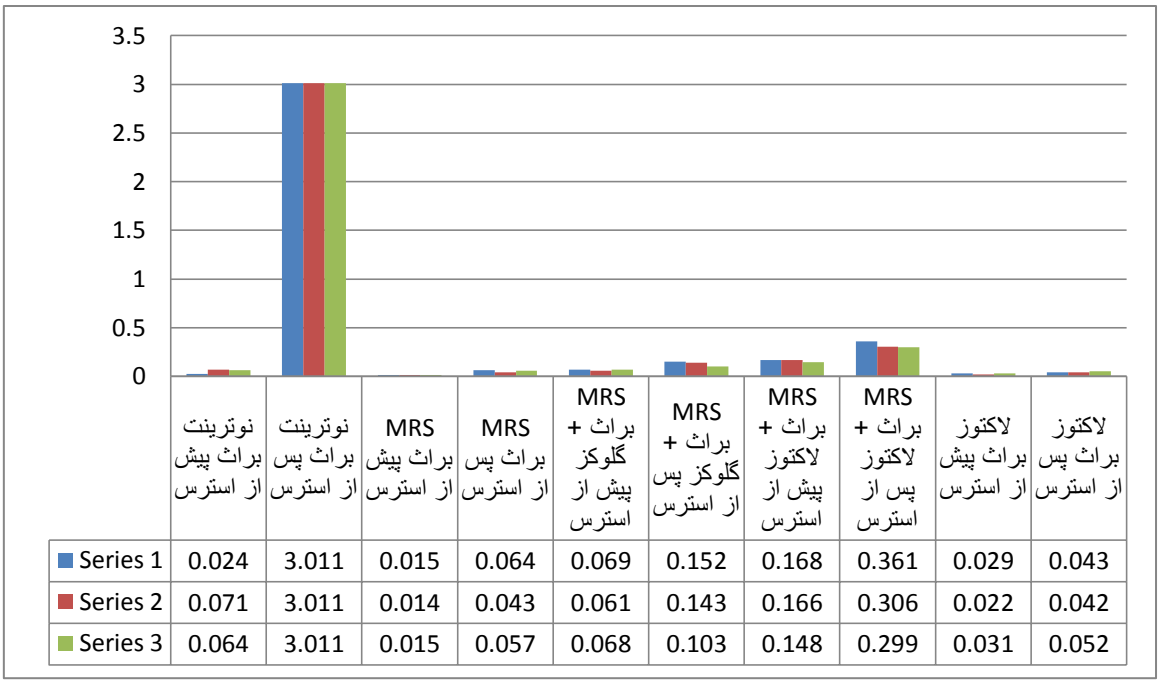
	30 °C	35 °C	37 °C
نمونه ۱	0.051	0.039	0.005
نمونه ۲	0.022	0.046	0.048
نمونه ۳	0.048	0.046	0.054

نمودار ۵. نتایج رشد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی نمونه ها در دماهای مختلف پس از ۲۴ ساعت

www.SID.ir

Archive of SID

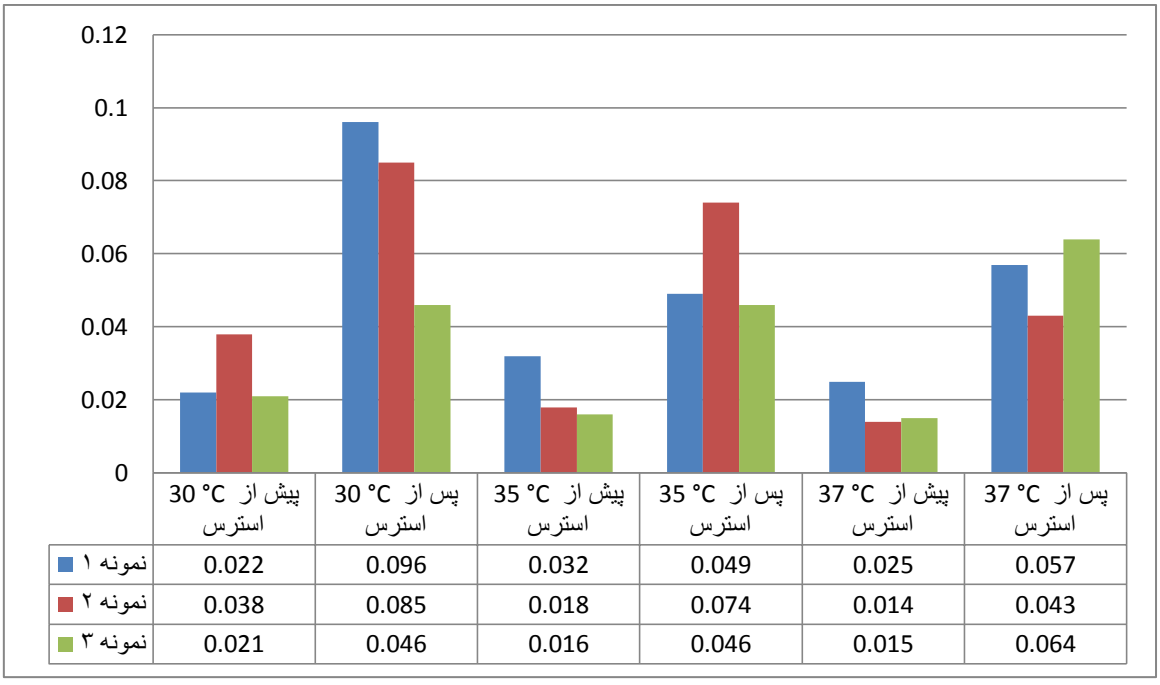
نتایج میزان آنزیم تولید شده از باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در محیط کشت های مختلف در زمان قبل و بعد از استرس در نمودار ۶ ارائه شده است. رشد بهینه این باکتری در محیط کشت MRS براث + لاکتوز و در زمان پس از استرس مشاهده شد.



	نوترینت براث پیش از استرس	نوترینت براث پس از استرس	MRS براث پیش از استرس	MRS براث پس از استرس	MRS + براث + گلوکز پیش از استرس	MRS + براث + گلوکز پس از استرس	MRS + براث + لاکتوز پیش از استرس	MRS + براث + لاکتوز پس از استرس	لاکتوز براث پیش از استرس	لاکتوز براث پس از استرس
Series 1	0.024	3.011	0.015	0.064	0.069	0.152	0.168	0.361	0.029	0.043
Series 2	0.071	3.011	0.014	0.043	0.061	0.143	0.166	0.306	0.022	0.042
Series 3	0.064	3.011	0.015	0.057	0.068	0.103	0.148	0.299	0.031	0.052

نمودار ۶. میزان آنزیم بتاگالاکتوزیداز نمونه ها در محیط کشت های مختلف

همچنین نتایج میزان آنزیم تولید شده از باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در دماهای مختلف در زمان قبل و بعد از استرس و پس از ۲۴ ساعت در نمودار ۷ ارائه شده است.



	پیش از 30 °C استرس	پس از 30 °C استرس	پیش از 35 °C استرس	پس از 35 °C استرس	پیش از 37 °C استرس	پس از 37 °C استرس
نمونه ۱	0.022	0.096	0.032	0.049	0.025	0.057
نمونه ۲	0.038	0.085	0.018	0.074	0.014	0.043
نمونه ۳	0.021	0.046	0.016	0.046	0.015	0.064

نمودار ۷. میزان آنزیم بتاگالاکتوزیداز نمونه ها در دماهای مختلف در زمان قبل و بعد از استرس و پس از ۲۴ ساعت

www.SID.ir

Archive of SID

این مطالعه نشان داد که دو باکتری لاکتوباسیلوس کازیی و باسیلوس سوبتیلیس تقریبا نسبت به آنتی بیوتیکهای بتاگالاکتوزیداز مقاوم بودند. بنابراین، در زمان مصرف این دسته از داروها، میزان این باکتری های فلور طبیعی دستگاه گوارش کاهش چشمگیری پیدا نمی کند و طی دوره درمان، این باکتری ها تا حد زیادی قادر به ادامه عملکرد خود هستند (۱۳).

از سوی دیگر، دو سویه لاکتوباسیلوس کازیی و باسیلوس سوبتیلیس مورد آزمایش در شرایط غیر فعال (کازئی و باسیلوس سوبتیلیس) دارای فعالیت ضد باکتریایی محدودی (هاله عدم رشد کمتر از ۱۲ میلی متر) بر علیه باکتریهای اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، پسودوموناس آرئوژینوزا، باسیلوس سابتیلیس و کلبسیلا پنمونیا بودند. این در حالی است که در حالت فعال یعنی زمانی که باکتری توانایی تولید ترکیب هایی نظیر آب اکسیژنه و اسید را داشته و یا تحت چنین شرایطی قرار گیرد، می تواند به طور چشمگیری میزان این دسته از باکتری ها را کاهش دهد (۱۴).

مطالعه ها نشان داده اند که خاصیت ضد میکروبی باکتری های تولید کننده اسید لاکتیک، مربوط به تولید ترکیب هایی مثل اسید لاکتیک و اسید استیک دی استیل، هیدروژن پراکسید، اسیدهای چرب و آلدهیدها و کاهش pH است و او که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (۱۵). طی گزارشهای ارایه شده می توان دریافت که برخی از لاکتوباسیل ها مانند پلانتاروم plantarum. Lو سیک (L . Sake) که از گوشت و محصول های گوشتی جداسازی می شوند، بر علیه بسیاری از باکتریها نقش مهار کنندگی دارند (۱۶). تحقیق گزانتوپولوس بر روی لاکتوباسیلوس پاراکازئی و اسیدوفیلوس جدا شده از مدفوع بچه های زیر ۷ سال نشان داد که این سویه ها فعالیت ضد باکتریایی محدودی نسبت به باکتریهای اشرشیاکلی و پرسینیا انترولیتیکا دارند (۱۷). در تحقیق الکساندر و همکاران بر روی سویه های لاکتوباسیل جدا شده از نوعی پنیر (Artisanal minas cheese) مشخص شد که آنها می توانند رشد باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا منوسیتوژنز، که به طور معمول به عنوان شاخص های آلودگی مطرح هستند، را مهار کنند (۱۷). با توجه به این که تحقیق حاضر بیشتر با هدف تعیین فعالیت ضد باکتریایی سویه هایی از لاکتوباسیل که نقش آنها در کاهش موارد مضری مثل کلسترول به اثبات رسیده است، انجام شد؛ نتایج حاصل می تواند گویای این امر باشد که در صورت استفاده از این دسته از باکتری ها به صورت زنده که قادر به ایجاد ترکیبهای اسیدی و آب اکسیژنه هستند، می توان در امر بهینه سازی محیط بیولوژیکی پاتوژن های عفونی و برخی از عوامل عفونی سیستم گوارشی مثل اشرشیاکلی سود برد (۱۸). برای این که بتوان نتایج حاصل از این مطالعه را به طیف گسترده تری از عملکرد پروبیوتیک ها نسبت داد، توصیه می شود بررسی بر روی گستره وسیع تری از سویه های پروبیوتیک انجام گیرد. همچنین پیشنهاد می شود که این مطالعه بر روی فرآورده های دیگر نیز انجام شود تا ضمن بررسی دیگر سویه های پروبیوتیک بتوان سویه های مؤثرتری از آنها را مورد شناسایی قرار داد. همچنین از آنجا که احتمال کاهش فعالیت ضد باکتریایی محلول لاکتوباسیل ها با حرارت و گذشت زمان وجود دارد، می بایست از محلول های به دست آمده به صورت تازه استفاده شود. با توجه به نتایج مطالعه حاضر می توان محلول را به صورت تغلیظ شده نیز مورد استفاده قرار داد که در این صورت با افزایش ترکیب های مؤثر در محیط، احتمالا فعالیت ضد باکتریای نیز افزایش خواهد یافت (۱۹). همچنین می توان از روش هایی مثل کروماتوگرافی نیز برای شناسایی ترکیب های مؤثر مترشحه از این دسته از باکتری ها استفاده نمود تا در صورت امکان با خالص سازی و تغلیظ آنها، بتوان راه حل زیست شناختی مؤثری نسبت به کاربرد مواد شیمیایی و بروز افزایش مقاومت دارویی در باکتری ها به ویژه سویه های پاتوژن ارایه نمود.

۳. نتیجه‌گیری

برای این که بتوان نتایج حاصل از این مطالعه را به طیف گسترده تری از عملکرد پروبیوتیک ها نسبت داد، توصیه می شود بررسی بر روی گستره وسیع تری از سویه های پروبیوتیک انجام گیرد. همچنین پیشنهاد می شود که این مطالعه بر روی فرآورده های دیگر نیز انجام شود تا ضمن بررسی دیگر سویه های پروبیوتیک بتوان سویه های مؤثرتری از آنها را مورد شناسایی قرار داد. همچنین از آنجا که احتمال کاهش فعالیت ضد باکتریایی محلول لاکتوباسیل ها با حرارت و گذشت زمان وجود دارد، می بایست از محلول های به دست آمده به صورت تازه استفاده شود. با توجه به نتایج مطالعه حاضر می توان محلول را به صورت تغلیظ شده نیز مورد استفاده قرار داد که در این صورت با افزایش ترکیب های مؤثر در محیط، احتمالا فعالیت ضد باکتریای نیز افزایش خواهد یافت. همچنین می توان از روش هایی مثل کروماتوگرافی نیز برای شناسایی ترکیب های مؤثر مترشحه از این دسته از باکتری ها استفاده نمود تا در صورت امکان با خالص سازی و تغلیظ آنها، بتوان راه حل

www.SID.ir

Archive of SID

زیست شناختی مؤثری نسبت به کاربرد مواد شیمیایی و بروز افزایش مقاومت دارویی در باکتری ها به ویژه سویه هـای پـاتوژن ارایه نمود.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان و پرسنل آزمایشگاه آن واحد به خصوص کارشناسان و اساتید محترم که مرا در ایـن کار یاری نموده اند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

مراجع

1. Hammes WP, Hertel C. Research approaches for pre-and probiotics: challenges and outlook. Food Research International. 2002;35(2-3):165-70.
2. Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, et al. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. Gastroenterology. 2004;126(2):520-8.
3. Kolacek S, Hojsak I, Canani RB, Guarino A, Indrio F, Pot B, et al. Commercial probiotic products: A call for improved quality control. A Position Paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition. 2017;65(1):117-24.
4. Iyer A, Panchal S, Poudyal H, Brown L. Potential health benefits of Indian spices in the symptoms of the metabolic syndrome: a review. 2009.
5. Allen C, Loo JF, Yu S, Kong S, Chan T-F. Monitoring bacterial growth using tunable resistive pulse sensing with a pore-based technique. Applied microbiology and biotechnology. 2014;98(2):855-62.
6. Davies GJ, Brzozowski AM, Dauter Z, Rasmussen MD, Borchert TV, Wilson KS. Structure of a Bacillus halmapalus family 13 α-amylase, BHA, in complex with an acarbose-derived nonasaccharide at 2.1 Å resolution. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 2005;61(2):190-3.
7. Nakano MM, Zuber P. Anaerobic growth of a "strict aerobe"(Bacillus subtilis). Annual Reviews in Microbiology. 1998;52(1):165-90.
8. Aiyer PD. Effect of C: N ratio on alpha amylase production by Bacillus licheniformis SPT 27. African Journal of Biotechnology. 2004;3(10):519-22.
9. Robinson RK, Tamime AY, Wszolek M. Microbiology of fermented milks. Dairy microbiology handbook: the microbiology of milk and milk products. 2002:468.
10. Chammas GI, Saliba R, Corrieu G, Béal C. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk "laban". International Journal of Food Microbiology. 2006;110(1):52-61.
11. Lim SH, Kim JG, Kang HW. Novel SCAR primers for specific and sensitive detection of Agrobacterium vitis strains. Microbiological research. 2009;164(4):451-60.
12. Heller KJ. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. The American journal of clinical nutrition. 2001;73(2):374s-9s.
13. Brown AC, Valiere A. Probiotics and medical nutrition therapy. Nutrition in clinical care: an official publication of Tufts University. 2004;7(2):56.
14. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. The American journal of clinical nutrition. 2001;73(2):361s-4s.
15. A Shihata NS. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. International Dairy Journal. 2000;10(5-6):401-8.
16. Y Rivera-Espinoza YG-N. Non-dairy probiotic products. Food microbiology. 2010;27(1):1-11.
17. M Mirlohi SS-Z, M Sheikh-Zeinodin. Enumeration of lactobacilli in the fecal flora of infant using two different modified de-Man Rogosa Sharpe media under aerobic and anaerobic incubation. Pak J Biol Sci. 2008;11(6):876-81.
18. D Vasić-Rački ZF, AV Presečki. Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development. Applied microbiology and biotechnology. 2011;91(4):845.
19. Corcionivoschi N, Drinceanu, D., Stef, L., Luca, I., & Julean, C. Probiotics-identification and ways of action. Innovative Romanian Food Biotechnology. 2010;6:1.

www.SID.ir

Archive of SID

Investigation of enzymatic activity of probiotic strains Lactobacillus casei and Bacillus subtilis

Mahsa Mohammadi[1], Naser Ghaemi[1]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Lahijan Branch, Islamic Azad University (IAU), Lahijan, E-mail: mahsaa_mo@yahoo.com

Abstract. Lactic acid bacteria, of which half of the final products of glucose fermentation are lactic acid, are named lactobacillus. These bacteria are the main components of the microbial flora of fermented dairy products. In this study, the enzymatic activity of probiotic bacteria Bacillus subtilis and Lactobacillus caesi was studied. Bacillus subtilis bacteria were cultured on Broth Nutrient culture media, MRS broth, MRS broth + glucose, MRS broth + lactose, lactose broth and TSB. The results of this study indicate that Bacillus subtilis bacteria is highly capable of producing α-amylase enzyme. The specific culture medium of Bacillus subtiliis is tryptic brachycea and trybethic agar. However, this bacterium has grown well in most of the culture media studied. The culture medium is specific for Lactobacillus casei MRS, and the best growth of this bacterium was observed in the MRS medium containing lactose glucose. By applying stress conditions, the secretion of the enzymes of this bacterium increased in the medium. Lactobacillus casei did not show any growth on the McCanky Agar culture media.

Keywords: Probiotics, β-galactosidase, α-amylase, Bacillus subtilis, Lactobacillus casei.

www.SID.ir