

بهینه سازی شرایط تولید ترکیبات پروتئینی با خاصیت ضد میکروبی در سه جدایه پروبیوتیک و اثر آن بر *Listeria monocytogenes*

مهرناز اسماعیل زاده^{a*}، آیتاخنفری^b، عباس اخوان سپهپی^b

^a کارشناس ارشد پژوهشکده بیوتکنولوژی جهاد دانشگاهی، واحد تهران، گروه میکروبیولوژی کاربردی، تهران، ایران
^b استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی کاربردی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۳/۸

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۰/۱۵

چکیده

مقدمه: باکتریوسین‌های حاصل از *Lactobacillus spp* دارای فعالیت مهارکنندگی وسیعی علیه میکروارگانیسم‌های پاتوژن مواد غذایی‌اند. هدف از این مطالعه بهینه‌سازی شرایط تولید ترکیبات پروتئینی در سه جدایه پروبیوتیک و بررسی اثر باکتریوسین استخراج شده بر *L. monocytogenes* بود.

مواد و روش‌ها: از ۲۰ نمونه ماست محلی جدایه‌های لاکتوباسیل بدست آمد و به منظور بهینه‌سازی شرایط تولید ترکیبات پروتئینی، جدایه‌های بومی و استاندارد در ۴ دمای مختلف نگهداری شدند، همچنین تاثیر اکسیژن و دی‌اکسیدکربن و ترکیب محیط کشت در سه محیط MRS، Skim milk و MRS به همراه عصاره مخمر بر روی لاکتوباسیل‌ها ارزیابی شد و با اضافه کردن ترکیبات معدنی توان تولید باکتریوسین در جدایه‌ها بررسی گشت. با استفاده از روش لوری، میزان پروتئین محلول تعیین گردید و توسط سولفات آمونیوم، دیالیز و SDS-PAGE باکتریوسین‌ها استخراج، خالص‌سازی، وزن مولکولی آنها تعیین و اثر باکتریوسین استخراج شده بر *L. monocytogenes* ارزیابی شد.

یافته‌ها: در مجموع سه جدایه لاکتوباسیل با فعالیت بالای مهارکنندگی بدست آمد. بیشترین فعالیت باکتریوسین در دمای ۳۰°C بعد از گذشت ۲۳ ساعت در محیط MRS به همراه عصاره مخمر تعیین گردید. نتایج حاصل از تلقیح لاکتوباسیل‌ها در جو ۵٪ CO₂ و انکوباتور معمولی یکسان بود. ترکیبات معدنی هیچ تاثیری در تولید باکتریوسین نداشتند. بهترین سویه *Ln10* گزارش شد که هاله عدم رشد آن ۳۰ میلی متر تعیین گردید. نتایج SDS-PAGE ایجاد تک باند پروتئینی با وزن ۵۰ تا ۵۸ کیلودالتون را نشان داد.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق، حداکثر تولید باکتریوسین در فاز لگاریتمی رشد حاصل شد در حالی که تولید این ترکیبات در سه سویه استاندارد در ابتدای فاز رکود مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: باکتریوسین، بهینه‌سازی، پروبیوتیک، لاکتوباسیل، *Listeria monocytogenes*

مقدمه

بین انسان و میکروبها ارتباط حیاتی بسیار نزدیکی وجود دارد که این ارتباط می‌تواند مفید یا مضر باشد. در دو دهه اخیر، کاربرد پروبیوتیک‌ها برای جلوگیری و بررسی بی‌نظمی‌های گوارشی - روده‌ای مورد توجه قرار گرفته است. پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده‌ای تعریف شده‌اند، که در مقادیر کافی، باعث سلامتی میزبان می‌شوند (FAO/WHO, 2001). اثرات مفید پروبیوتیک‌ها در میزبان حیوانی از طریق حفظ تعادل میکروب‌های روده‌ای ثابت شده است. در گذشته پروبیوتیک‌ها، به عنوان مکمل غذایی، در غذای حیوانات به کار برده می‌شد اما امروزه برای میزبان انسانی نیز کاربرد دارد. منبع اصلی پروبیوتیک‌ها برای انسان، لبنیات است. اگرچه اطلاعات کمی در مورد اثرات سودمند پروبیوتیک‌ها وجود دارد (Devuyst et al., 1994)، ولی آنها می‌توانند به عنوان سدهای میکروبی در مقابل پاتوژن‌های گوارشی - روده‌ای با جلوگیری از اتصال پاتوژن، تغییر سیستم ایمنی و تولید ترکیبات ضد میکروبی عمل نمایند (FAO/WHO, 2001). دو گروه بزرگ از میکروارگانیسم‌ها که به عنوان پروبیوتیک از آنها استفاده می‌گردد، لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها می‌باشند (Servin, 2004). مهمترین گونه‌های لاکتوباسیل که به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند، عبارتند از:

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus sellobiosus*, *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus corovatus*, *Lactobacillus delbrukii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus gaseri*, *Lactobacillus berevis*, *Lactobacillus rhamnosus* و *Lactobacillus plantarum* .

اثر حفاظتی باکتری‌های اسیدلاکتیک در نگهداری غذاهای تخمیری بطور عمده به دلیل شرایط اسیدی است که در زمان رشد باکتری‌ها در غذا به وجود می‌آید. به تدریج کربوهیدرات‌ها به اسیدهای آلی (اسید استیک و اسید لاکتیک) تبدیل شده به همراه کاهش pH، باعث افزایش نیمه عمر و کیفیت خوب فرآورده‌های غذایی می‌شوند. این بازدارنده‌های طبیعی می‌توانند جایگزین مواد نگهدارنده

شیمیایی نظیر نیترات‌ها و نیتريت‌ها که اکثراً عوارض جانبی به دنبال دارند، گردند. در دهه‌های اخیر مشخص گردیده که فعالیت بازدارندگی باکتری‌های اسیدلاکتیک، به سیستم‌های پیچیده آنتاگونیستی تولید شده توسط کشت‌های آغاز گر بستگی دارد. باکتری‌های اسید لاکتیک قادر به تولید و ترشح انواع مواد باز دارنده به غیر از اسیدلاکتیک و اسیداستیک هستند (Kandler et al., 1989)، لذا می‌توانند دارای قدرت نگهدارندگی باشند، این مواد به مقدار کمتری نسبت به اسیدلاکتیک و اسیداستیک تولید می‌شوند. برخی از این مواد در مقابل برخی از میکروارگانیسم‌های پاتوژن غذایی و میکروارگانیسم‌های فاسدکننده غذا مانند *Listeria sp*, *Clostridium sp* و *Enterococcus sp* برخی از *Bacillus sp* و *Staphylococcus sp* (Ennahar et al., 2000) و غیره اثر بازدارندگی رشد دارند. آزمایشات متعددی بر روی آنتاگونیسم لاکتوباسیلوس‌های مختلف در مقابل *Clostridium difficile*، *Helicobacter pylori*، *Campylobacter jejuni* و *E. coli* صورت گرفته است و مشاهده شد همه سویه‌های لاکتوباسیل انسانی قادر به جلوگیری از پاتوژن‌های گوارشی - روده‌ای می‌باشند (Strus et al., 2001). همچنین لاکتوباسیل‌ها با تولید باکتریوسین دارای فعالیت‌های ضد تومور، ضد کلسترول، واکنش‌های شیمیایی وابسته به احیای نیترات و جذب گروه‌های ویتامین B می‌باشند (Elmafa et al., 2001)، فعالیت آنتی‌اکسیداتیوی نیز در باکتری‌های اسید لاکتیک گزارش شده است (Terhara, 2001).

با توجه به مطالب ذکر شده و اهمیت سویه‌های بومی پروبیوتیکی در صنایع غذایی، هدف از انجام این تحقیق بهینه‌سازی شرایط تولید ترکیبات پروتئینی با خاصیت ضد میکروبی در سه جدایه پروبیوتیک و اثر آن بر *L. monocytogenes* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

از محیط MRS broth و MRS agar، Skim milk، عصاره مخمر، سولفات منیزوم، استات سدیم، سولفات منگنز، فسفات پتاسیم، سولفات آمونیوم ساخت شرکت Merck استفاده شد.

جمع‌آوری نمونه و جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک

جهت جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک در سال ۱۳۸۷ از ۲۰ نمونه ماست محلی در سرعین اردبیل، محلات، دماوند و شاهدشت شمال با روش پورپلیت در محیط کشت MRS Agar استفاده شد. از مخلوط همگن شده با نسبت مساوی از آب مقطر و ماست، یک میلی لیتر جهت تهیه رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-9} در لوله‌ها ریخته شد. با روش دوبیلیکیت محیط کشت با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به آن اضافه شد و سپس در جهت عقربه‌های ساعت پللیت‌ها حرکت داده شدند. در روش دیگر رقت‌های تهیه شده بصورت سطحی (Spread) بر روی محیط کشت MRS Agar پخش شد. در نهایت تمامی پللیت‌ها به انکوباتور CO_2 دار با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند (Baron et al., 1990).

بررسی آزمایش‌های بیوشیمیایی و خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌ها

مشخصات ظاهری جدایه‌ها مانند رنگ، شکل، قوام، اندازه و مشخصات میکروسکوپی با رنگ‌آمیزی گرم بررسی شد. بعد از خالص‌سازی، پرگنه‌ها توسط آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، تخمیر قندهای گلوکز، گالاکتوز، مانیتول، لاکتوز، رافینوز طبق Bergy's Manual مورد بررسی و شناسایی قرار گرفتند. با تلقیح ایزوله‌های حاصل به محیط‌های کشت فوق، نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با اتمسفر ۵٪ CO_2 به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و سپس نتایج مورد بررسی قرار گرفت (Sneath et al., 1986).

سویه‌های استاندارد

به منظور مقایسه توان ضد میکروبی پروبیوتیک‌های جدا شده از نمونه ماست‌های محلی با نمونه شاهد، کشت‌های لیوفیلیزه لاکتوباسیلوس رئوتری (PTCC ۱۶۵۵)، لاکتوباسیلوس کازئی (PTCC ۱۶۰۸) و لاکتوباسیلوس رامنوسوس (PTCC ۱۶۳۷) 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 میلی‌لیتر محیط کشت

MRS broth انتقال داده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر ۵٪ CO_2 به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. همچنین به منظور بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری‌های اسیدلاکتیک بدست آمده، از پاتوژن غذایی *L. monocytogenes PTCC 1301* از مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران استفاده شد (Kandler et al., 1989).

ارزیابی قابلیت بازدارندگی باکتری‌های اسیدلاکتیک

به منظور ارزیابی قابلیت بازدارندگی جدایه‌های حاصل و انتخاب بهترین سویه‌ها از روش ایجاد چاهک در محیط MRS agar یا Well diffusion agar استفاده شد. برای مشخص نمودن اینکه اثر ضد میکروبی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از نمونه‌های ماست محلی و سویه‌های استاندارد مربوط به باکتریوسین است نه آب اکسیژنه، حساسیت عوامل بازدارنده این باکتری‌ها بر رشد باکتری‌های شاخص در حضور آنزیم کاتالاز مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار مایع رویی عاری از سلول توسط کاتالاز (Catalase) با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر مجاور گردید و پس از گذشت یک ساعت فعالیت باکتریوسین بررسی شد. در ابتدا از کشت ۲۴ ساعته سویه استاندارد *L. monocytogenes* سوسپانسیونی معادل با ۰/۵ مک فارلند در سرم فیزیولوژی تهیه شد. سوآپ‌ها به مدت نیم ساعت در سوسپانسیون قرار داده شد و بعد به صورت متراکم در سطح پللیت مولر هینتون آگار با چاهک کشت شدند. از کشت تلقیح ۴۸ ساعته لاکتوباسیل‌های جدا شده و سه سویه استاندارد لاکتوباسیل پس از مقایسه با شاهد یک مک فارلند (معادل با 3×10^8 cfu/mL) به نسبت ۵٪ به محیط کشت MRS broth تلقیح شد. نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با اتمسفر ۵٪ CO_2 به مدت ۸، ۱۵، ۲۳ و ۳۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس از هر نمونه به میزان ۱ ml به میکروپلیت استریل انتقال داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در $13000 \times g$ سانتریفیوژ و ۵۰ میکرولیتر از بخش‌های جدا شده جهت بررسی خاصیت آنتاگونیستی به چاهک‌ها منتقل شد. جهت انتشار بهتر عصاره‌های لاکتوباسیلی، پللیت‌ها به مدت یک

انکوباسیون، pH آن توسط دستگاه pH متر خوانده و ثبت گردید و سپس توسط افزودن مقدار کافی محلول NaOH ۴ نرمال، pH آن به محدوده ۶/۵ تا ۷ رسانده شد. سوسپانسیون میکروبی محیط کشت، بعد از خنثی سازی، در شرایط استریل به مدت ۱۵ دقیقه در $5000 \times g$ سانتریفوژ گردید تا توده سلولی تولید شده جداسازی شود. سپس مایع رویی به آرامی به لوله های استریل دیگر منتقل شدند. نمونه ها یک شب (over night) در یخچال ۴ درجه سانتی گراد به همراه ۷۰ گرم سولفات آمونیوم نگهداری شد تا انحلال سولفات آمونیوم و رسوب باکتریوسین به خوبی صورت گیرد. محتویات ارلن شامل رسوبات حاصله و محلول حاوی رسوب به لوله های استریل منتقل و در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ دقیقه در $7000 \times g$ توسط سانتریفوژ یخچال دار سانتریفوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله در یک میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار، pH: 7 حل گردید و فراکسیون های حاصله از نظر فعالیت باکتریوسینی مورد سنجش قرار گرفتند. بخشی از فراکسیون ها نیز برای انجام دیالیز کنار گذاشته شدند. در این تحقیق برای اندازه گیری پروتئین محلول از روش Lowry استفاده شد. نمونه ها به منظور تعیین وزن مولکولی باکتریوسین استخراج شده توسط SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفتند (Padmanabha et al., 2006).

محاسبات با استفاده از فرمول های زیر صورت گرفت
درصد بازیافت = پروتئین کل (mg/ml) / پروتئین کل خام استخراج شده (mg/ml) $\times 100$
پروتئین کل = حجم نهایی (ml) \times غلظت پروتئین (mg/ml)
واحد کل (فعالیت کل) = حجم کل (ml) \times فعالیت (واحد در میلی لیتر)
فعالیت اختصاصی = فعالیت باکتریوسینی (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 $\times 100$

ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی گراد، سرماگذاری شدند. بعد از گذشت مدت زمان های ذکر شده، قطر هاله عدم رشد با خط کش میلی متری، اندازه گیری و در جداول مربوطه ثبت گردید (Devuyst et al., 1994; Padmanabha et al., 2006).

- تاثیر دما، CO₂، هوادهی، ترکیب محیط کشت در تولید باکتریوسین

جهت ارزیابی تاثیر دما در تولید باکتریوسین از چهار دمای ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد برای گرمخانه گذاری استفاده شد و نمونه ها پس از ۸، ۱۵، ۲۳ و ۳۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. تاثیر هوادهی با قرار دادن نمونه ها در سه شرایط متفاوت انکوباتور معمولی، انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ rpm و انکوباتور CO₂ دار با جو ۵٪ CO₂ ارزیابی شد. همچنین به منظور بررسی تاثیر ترکیب محیط کشت در تولید باکتریوسین توسط لاکتوباسیل ها از سه محیط MRS broth، Skim milk، MRS broth به همراه عصاره مخمر و ترکیبات معدنی از جمله سولفات منیزیم، استات سدیم، سولفات منگنز و فسفات پتاسیم استفاده گردید و فعالیت ضد میکروبی عصاره محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. تمام آزمایشات ۱۲ بار در شرایط کاملا مشابه تکرار شدند و میانگین هاله های عدم رشد در نمودارها آورده شده است.

- استخراج باکتریوسین و تأیید عملکرد ضد میکروبی آن

در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط MRS broth استریل مقدار یک لوپ از لاکتوباسیل های مولد، کشت گردید. ارلن ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. به منظور حداقل ساختن تبادل هوایی درب ارلن ها با فویل آلومینیوم مسدود گردید. هنگامی که OD نمونه ها به ۱ مک فارلند رسید به میزان ۵٪ به ارلن های حاوی ۵۰۰ میلی لیتر MRS broth تلقیح گردیدند. و در شرایط ایتیم حاصل از نتایج بهینه سازی تولید ترکیبات باکتریوسینی که در مراحل قبل بدست آمده بود، یعنی دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، انکوباتور با جو ۵٪ CO₂، تلقیح اولیه از محیط Skim milk، به محیط MRS broth به همراه عصاره مخمر، صورت گرفت. بعد از طی زمان

یافته‌ها

از ۱۲۰ نمونه ماست محلی مجموعاً ۲۱ جدایه لاکتوباسیل حاصل شد. بررسی‌های ماکروسکوپی گویای تشکیل پرگنه‌های سوزنی و دوکی شکل در روش پورپلیت و کلنی‌های کوچک سفید، نوک سوزنی و مخاطی در سطح پلیت MRS agar بود. در زیر میکروسکوپ باسیل‌های کشیده، رشته‌ای، فاقد اسپور، گرم مثبت با آرایش زنجیری دیده شد. کلیه سویه‌ها فاقد حرکت بوده و توانایی تولید سولفید هیدروژن را نداشتند، از نظر آنزیم‌های کاتالاز، اکسیداز و هیدرولیز مانیتول منفی گزارش شدند ولی تماماً

قادر به تخمیر گلوکز بودند. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی در جدول ۱ آورده شده است. در بررسی اولیه جدایه‌های حاصل از عصاره تخمیری محیط کشت و روش چاهک‌گذاری در آگار، همان طور که در جدول ۲ آورده شده، فعالیت ضد میکروبی عصاره تخمیری محیط کشت بعد از خنثی‌سازی H_2O_2 علیه پاتوژن غذایی *L. monocytogenes* در چهار زمان ۸، ۱۵، ۲۳ و ۳۲ ساعت گویای برتری سه جدایه *Ln10*، *Ln11* و *Ln17* در مقایسه با سه سویه استاندارد لاکتوباسیل بود.

جدول ۱- آزمون‌های بیوشیمیایی در تشخیص جدایه‌ها

Chemical test strain	Arginin hydrolysis	G*	suger				Oxydase	Catalase	Motility	H ₂ S
			Gal	M	L	R				
<i>Ld₁</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₂</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₃</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₄</i>	-	+	پپتونه*	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₅</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₆</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₇</i>	-	+	-	-	+	پپتونه	-	-	-	-
<i>Ld₈</i>	-	+	پپتونه	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₉</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₁₀</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₁₁</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Ld₁₂</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₁₃</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₁₄</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₁₅</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ld₁₆</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₁₇</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₁₈</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₁₉</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₂₀</i>	-	+	پپتونه	-	+	-	-	-	-	-
<i>Ld₂₁</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. casei</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. reuteri</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-

*پپتونه: نوعی واکنش بیوشیمیایی که به جای هیدرولیز قند مورد نظر، پپتون (پروتئین هیدرولیز شده) موجود در محیط کشت تجزیه و قلیا تولید می‌شود.

G: آزمون تخمیر گلوکز

Gal: آزمون تخمیر گالاکتوز

M: آزمون تخمیر مانوز

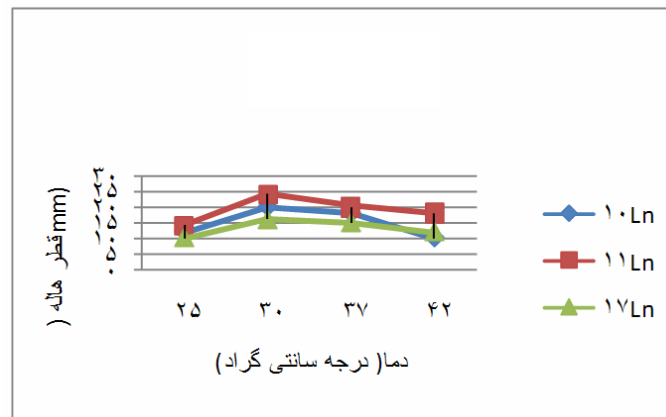
L: آزمون تخمیر لاکتوز

R: آزمون تخمیر رافینوز

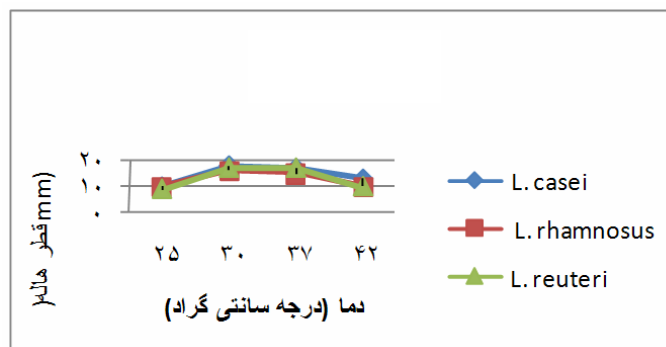
بهینه سازی شرایط تولید ترکیبات پروتئینی با خاصیت ضد میکروبی در سه جدایه پروبیوتیک

جدول ۲- ارزیابی اثر ضد میکروبی عصاره تخمیری جدایه های منتخب علیه *L. monocytogenes*

قطر هاله عدم رشد باکتری (mm)	زمان (ساعت)			
	۸	۱۵	۲۳	۳۲
<i>Ln10</i>	-	۱۲	۲۰	۳۰
<i>Ln11</i>	-	۱۸	۲۴	۲۸
<i>Ln17</i>	-	۱۰	۱۶	۲۵
<i>L. casei</i>	-	۱۰	۱۸	۲۸
<i>L. rhamnosus</i>	-	۱۰	۱۶	۱۸
<i>L. reuteri</i>	-	۱۰	۱۷	۲۶



نمودار ۱- تاثیر دما بر فعالیت ضد میکروبی جدایه های *Ln10*، *Ln11* و *Ln17*



نمودار ۲- تاثیر دما بر فعالیت ضد میکروبی سه سویه استاندارد لاکتوباسیلوس

ترکیب محیط کشت در توانایی تولید باکتریوسین موثر است، همانطور که در نمودار ۴ مشاهده می شود، با استفاده از عصاره مخمر در محیط کشت قطر هاله های عدم رشد پاتوژن غذایی به میزان بیشتری افزایش یافت.

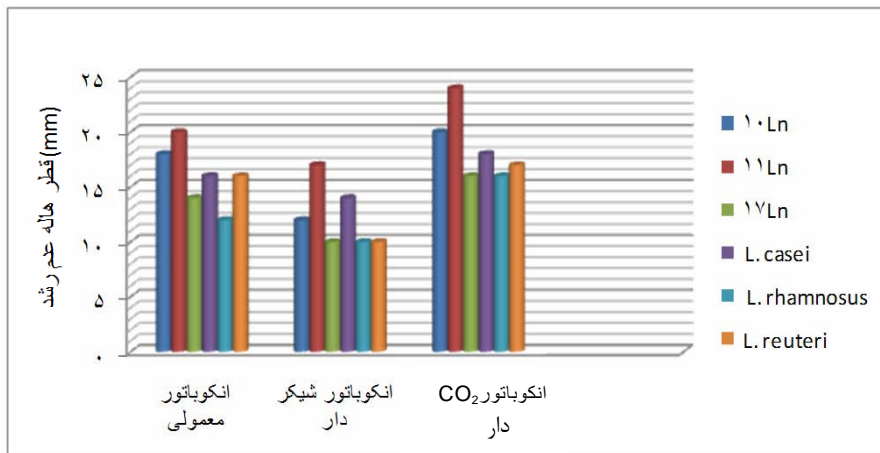
نتایج خالص سازی باکتریوسین های تولید شده پس از تیمار با سولفات آمونیوم، تشکیل سه فاز بود، شامل: فاز سبک رویی حاوی ترکیبات لیپیدی و سایر مواد سبک موجود در محیط، فاز آبی حاوی پروتئین های رسوب داده شده و فاز رسوبی حاوی پروتئین ها. فاز رویی و فاز میانی عصاره محیط کشت هر سه جدایه روی باکتری گرم منفی

نمودار ۱ نشان دهنده اثر دما بر تولید باکتریوسین است. در ۴ دمای ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی گراد بیشترین هاله عدم رشد علیه *L. monocytogenes* در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گزارش شد.

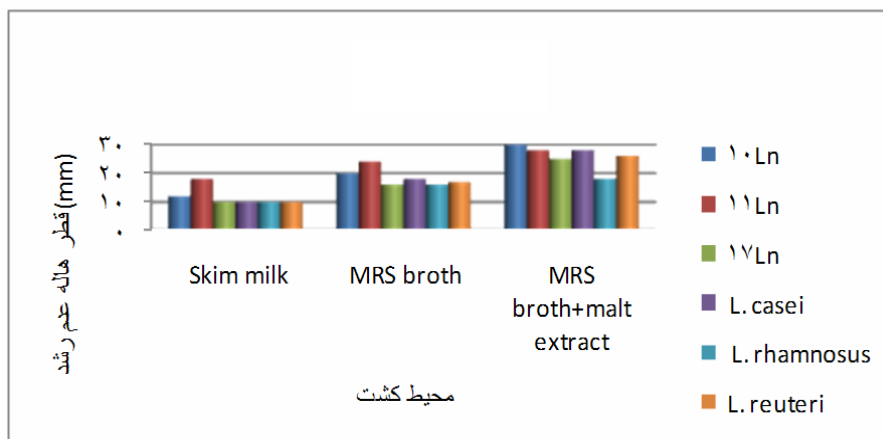
نتایج استفاده از انکوباتور معمولی و انکوباتور CO₂ در نزدیک به هم بود و با توجه به میکروآنروبی بودن لاکتوباسیل ها استفاده از شیکر انکوباتور نتایج مطلوبی را به همراه نداشت. در نمودار ۳ هر سه شرایط با هم مقایسه شده است.

روش SDS-PAGE ایجاد تک باند پروتئینی با وزن مولکولی ۴۸ تا ۵۷ کیلودالتون را نشان داد که نشان دهنده خلوص ماده پروتئینی به دست آمده است.

L. monocytogenes اثر ضد میکروبی داشت که حداکثر آن مربوط به عصاره Ln10 بود. میزان باکتریوسین‌های استخراج شده در مایع تخمیر، قبل و بعد از دیالیز در جدول ۳ آورده شده است. نتایج الکتروفورز به



نمودار ۳- تاثیر هوادهی و جو CO₂ در فعالیت ضد میکروبی سه جدایه برتر و سه سویه استاندارد لاکتوباسیلوس



نمودار ۴- تاثیر محیط کشت در فعالیت ضد میکروبی سه جدایه برتر و سه سویه استاندارد لاکتوباسیلوس

جدول ۳- میزان پروتئین و فعالیت باکتریوسین استخراج شده در مایع تخمیر قبل و بعد از دیالیز

Ln10		مایع تخمیر	فاکتورها
قبل از دیالیز	بعد از دیالیز		
۴۶	۴۳	۱۳۱	حجم نمونه (ml)
۱۰۰	۵۰	۵۰	واحد فعالیت (Unit/ml)
۳۶۰۰	۲۱۰۰	۶۶۰۰	فعالیت کل
-	۰/۴۱	۲/۳۹	غلظت پروتئین (mg/ml)
-	۱۷/۲۲	۳۰۲/۲۸	میزان کل پروتئین (mg)
-	۱۲۱/۹۵	۲۱/۸۳	فعالیت اختصاصی (U/mg)
۵۴/۵۴	۳۱/۸۱	۱۰۰	راندمان
-	۵/۷	۱۰۰	درصد بازیافت
-	۵/۵۸	۱	ضریب تخلیص

بحث

باکتریوسین‌ها و مولکول‌های شبه باکتریوسین، مستقیماً به صورت پلی پپتید یا پیش پلی پپتید ساخته می‌شوند و اثر ضد میکروبی آنها به شرایط محیطی (مانند pH، حرارت و ترکیب محیط کشت) بستگی دارد. نتایج حاصل از این تحقیق، جداسازی ۲۱ لاکتوباسیل از ۱۲۰ نمونه ماست محلی با توان ضد میکروبی بر *L. monocytogenes* بعنوان پاتوژن مواد غذایی بود. حداکثر اثر ضد میکروبی عصاره محیط کشت پس از خنثی کردن آب اکسیژنه مربوط به سویه *Ln10* بود. بسیاری از محققین اثر ضد میکروبی لاکتوباسیل‌ها را بر سایر میکروارگانیسم‌ها در طی سالیان طولانی مورد بررسی قرار داده‌اند. تحقیقات آنان نشان داد هنگامیکه نمونه‌های لاکتوباسیل بر روی محیط‌های انتخابی و یا اختصاصی کشت داده شوند، قادر به تولید ترکیبات ضد میکروبی می‌باشند (Alakomi et al., 2000).

مهمترین خاصیت باکتریوسین تولید شده در این تحقیق در مقایسه با باکتریوسین لاکتوباسیل‌های استاندارد، فعالیت ضد میکروبی بیشتر آن‌ها بود. همچنین جدایه‌های بدست آمده در مقایسه با سویه‌های استاندارد خریداری شده در مدت زمان کوتاه تر به فاز لگاریتمی رشد رسیدند و ترکیبات با خاصیت مهار کنندگی رشد *L. monocytogenes* به مقدار بیشتری تولید شد. ماکزیم تولید باکتریوسین توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک، ممکن است در فازهای مختلف چرخه رشد، اتفاق افتد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که لاکتوباسیل‌ها در زمان ۲۴ تا ۴۸ ساعت در مرحله رشد لگاریتمی می‌باشند، Sahl و Brandis مشاهده کردند که تولید استرپتوکوکسین STH، بیشتر طی فاز اولیه رشد سلول می‌باشد و اغلب قبل از شروع فاز سکون (stationary) ایجاد می‌شود (Sahl et al., 1986)، که مشابه تولید باکتریوسین استرپتوکوکسین A-FF22 و استافیلوکوکسین C55 در استارترهای مربوطه است. لذا در این پژوهش بررسی میزان تولید باکتریوسین در مرحله فاز لگاریتمی برنامه‌ریزی گردید. در اینجا افزایش تراکم باکتری‌ها در برات تخمیری در ۳۰ درجه سانتی گراد و زمان ۲۳ ساعت حاصل شد. باکتریوسین‌ها اکثراً متابولیت اولیه بوده و در فاز رشد تولید می‌گردند (Charlotta et al., 1993).

بیشترین هاله عدم رشد علیه *L. monocytogenes* در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، انکوباتور CO₂ دار و در محیط کشت حاوی عصاره مخمر مشاهده شد. ترکیبات معدنی و نمک‌ها تأثیری در تولید بیشتر ترکیبات پروتئینی و باکتریوسینی نداشت. از آنجا که جدایه *Ln10* در مقایسه با سه سویه استاندارد فعالیت باکتریوسینی بیشتری را در مدت زمان کوتاه نشان داد، می‌توان از آن در شرایط مناسب ذکر شده به عنوان استارتری با توان تولید ترکیبات ضد میکروبی در صنایع لبنی استفاده کرد.

همانطور که می‌دانیم مراحل زندگی باکتری‌ها شامل مراحل تاخیر، رشد لگاریتمی، سکون و مرگ است. اینکه پروبیوتیک‌ها در کدام مرحله از رشد به محیط افزوده شوند اهمیت دارد. به عبارت دیگر شرایط فیزیولوژیکی آنها اهمیت بسیاری دارد. فاکتورهای محیطی که سبب انتقال باکتری از فاز رشد لگاریتمی به فاز سکون می‌شوند در بقا باکتری در این فاز تأثیر بسزایی دارند. با عرضه محصولات پروبیوتیک در بازار، مصرف‌کنندگان انتظار دارند تا با مصرف این محصولات به اثرات مفید ادعا شده در مورد آنها دست یابند برای این کار در ابتدا باکتری‌ها بایستی تا پایان تاریخ انقضای محصول در آن زنده بمانند و در ضمن پس از مصرف با عبور از روده به تعداد کافی به قسمت انتهایی روده بزرگ رسیده و در آنجا مستقر شوند. Piard و همکاران بیان کردند که بیوسنتز باکتریوسین‌ها در انتهای مرحله رشد لگاریتمی باکتری‌ها رخ می‌دهد و سپس این مولکول‌ها وارد محیط کشت می‌شوند. همچنین Mortvedt و همکاران فعالیت بالای باکتریوسین را در آغاز مرحله سکون رشد مشاهده کردند و مطابق با نظریه Tagg و همکاران میکروارگانیسم‌های پاتوژن نسبت به باکتریوسین‌های تولید شده در فاز لگاریتمی باکتری‌های اسیدلاکتیک مانند Lactacin 481، Lactostrepcin Nicin (Piard et al., 1990)، Mohamed et al. (Zajdel et al., 1985)، و Diplococin 3466 (Davey, 1981) بیشتر حساس هستند.

نتیجه گیری

یکی از موارد مهم در جهت ارزشمند نمودن پروسه تولید یک محصول بیولوژیک، مدت زمان بهینه و کوتاه

relative to other bacteriocins. *The Pharmaceutical Journal*, 88 (3), 449-457.

FAO/WHO. (2001). Evaluation 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*.

Kandler, O. & Nobert, W. (1989). *Bergeys manual of systematic bacteriology*, 2nd ed. New York. Springer.

Kandler, O. & Weiss, N. (1989). *Bergeys Manual of systematic Bacteriology*, 2, 14, 1208-1234.

Masson, P. & Morphams, D. (2001). Containing education nutrition probiotics and prebiotics. *The pharmaceutical journal*, 666 (7132), 118-121.

Mohamed, G., Malcolm, A. & Woodbine, M. (1984). Foodantibiotic nisin comparative effects on *Erysipelothrix* and *Listeria*. *Antimicrobial and Agriculture UK*. 435-442.

Mortvedt-Abildgaard, C., Nissen-Meyer, J., Jelle, B., Grenov, B., Skaugen, M. & Nes, I. (1995). Production and pH dependent bactericidal activity of Laction S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 175-179.

Padmanabha, V., Christopher, M. & Sankara, R. (2006). Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Tamilnadu JVet Animal Sci.*, 2 (4), 142-144.

Piard, J., Delome, F., Giraffa, G., Commissaire, J. & Desmazeaud, M. (1990). Evidence for a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. *Netherlands, Milk Dairy Journal*, 44, 143-158.

Sahl, H. G. & Bradis, H. (1983). Efflux of low substances from the cytoplasm of sensitive cells caused by the staphylococin like agent Pep5. *FEMS Microbiol. Lett.* 16, pp.75-79.

Servin, M. (2004). Antagonist activities of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.*, 28, 405-440.

Sneath, P. & Mair, J. (1986). *Bergys manual of systematic bacteriology vol 2 Williama & Wilkins, Baltimore*.

Strus, M., Pakosz, K., Gosciniak, H. & Przondo Mordarska, A. (2001). Antagonistic activity tract pathogens (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Closteridium difficle*). *Med Diew Microbiol.*, 53 (2), 133-142.

برای تولید فرآورده و وجود بستر رشد مناسب برای میکروارگانیسم می باشد. بنابراین یافتن باکتری هایی که دارای توانایی بلقوه در این زمینه می باشد حائز اهمیت و مورد توجه است. این باکتری ها دارای توانایی رقابت با سایر میکروارگانیسم های صنعتی هستند، پس می توان با ادامه تحقیقات، آنها را جایگزین باکتری های استارتر نموده و پروسه تولید را از نظر اقتصادی مقرون به صرفه تر نمود. طی مطالعه و بررسی انجام شده باکتری Ln_{10} از آنجایی که در مدت زمان کمتری به فاز لگاریتمی رشد می رسد، حداکثر توان تولید ترکیبات باکتریوسینی با خواص ضد میکروبی را در این فاز داراست و همچنین میزان این خاصیت ضد میکروبی در مقایسه با لاکتوباسیل های استاندارد بطور چشمگیری در این فاز بیشتر است، می تواند کاندید مناسبی برای استفاده در تولید محصولات لبنی به عنوان استارتر با خواص پروبیوتیکی باشد.

منابع

Alakomi, H., Skytta, E., Saarel, M., Mattila, S. & Holmt, M. (2000). Lactic acid permebilizes Gram-negative Bacteria by disrupting the out membrane. *Appl permebilizes Gram-negative Bacteria by Microbiol.*, 66, 2001-2005.

Baron Ellen, J. & Finegold Sydney, M. (1990). *Diagnostic microbiology*, 8th ed. USA, Bailey & Scotts.

Charlotta, E. (1993). Inhibition of *Enterobacteria* and *Listeria* growth by lactic acid and formic acid. *Applied Bacteriol.*, 75, pp.18-24.

Davey, G. (1981). Mode of action of Diplococin a bacteriocin from *Streptococcus cremosis* 346. *Newzaeland Journal of dairy science and technology*, 16 (2), 187-190.

De Vuyst, L. & Vandamme, E. J. (1994). Nisin a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis sub sp. lactis* properties, biosynthesis, fermentation and application. *Blackic Academic Press, Glasgow*, pp. 151-222.

Elmafa, I., Heinzle, C. & Majichrzuk Foissy, H. (2001). Influence of a probiotic yoghurt on the status of vitamin B (1), B (6) in the healthy adult human. *Am Nutr Metab.*, 45 (1), 13-18.

Ennahar, S. & Deachamrs, N. (2000). *Listeria* effect of enterocin A produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFMOI

Tagg, J., Dajani, A. & Wannamaker, L. (1976). Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Bacteriology Review*, 40, 722-756.

Terhara, M., Kurama, S. & Takemoto, N. (2001). Prevention by lactic acid bacteria of the oxidation of human LDL. *Bio Sci Biotechnol Biochem.*, 65 (8), 1864-1868.

Zajdel, J., Geglowski, P. & Dobrzanski, W. (1985). Mechanism of action of Lactostrepcin 5, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremosis* 202. *Applied Environmental Microbiology*, 49, 969-974.