بهینه سازی محیط کشت برای تولید اگزوپلی ساکارید توسط سویه های بومی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و سویه تجاری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

مریم انتشاری نجف آبادی[1]، لیلا روزبه نصیرایی[1]، عبدالله قاسمی پیربلوطی[2*]، حمیدرضا نوری[3]

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نور، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نور، مازندران، ایران.
۲. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳. گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، مازندران، ایران.

***نویسنده مسئول:** *ghasemi@qodsiau.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۰

چکیده

اگزوپلی ساکاریدها، ترکیبات حاصل از متابولیت باکتری‌های پروبیوتیک نقش مهمی در تنظیم سیستم ایمنی بدن دارند. با توجه به نقش محیط کشت در کارآیی تولید اگزوپلی ساکاریدها، هدف از این مطالعه بهینه‌سازی محیط کشت برای تولید اگزوپلی ساکاریدها توسط سویه‌های بومی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و سویه تجاری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* است. در این مطالعه، ابتدا اثر دکستروز و ساکارز بر تولید اگزوپلی ساکارید با استفاده از دیسک‌های کاغذی آغشته به محیط کشت پروبیوتیک بررسی شد. سپس، بازده تولید و قدرت بازدارندگی رادیکال‌های آزاد اگزوپلی ساکارید با دو منبع کربن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ساکارز بعنوان منبع کربن محیط کشت بهینه برای تولید اگزوپلی ساکارید مناسب تر از دکستروز است. در روش تولید اگزوپلی ساکارید راندمان تولید و مهار رادیکال های آزاد توسط اگزوپلی ساکاریدهای سویه های پروبیوتیک بومی در همه محیط کشت‌ها به طور معنی داری بالاتر از سویه‌های تجاری بود که می‌تواند به دلیل مکانیسم‌های مختلف آنزیم‌ها در دیواره سلولی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در تجزیه قندها باشدکه نقش مهمی در شکل‌گیری ساختار نهایی اگزوپلی ساکارید دارد. بنابراین پیشنهاد می‌شود برای باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* از محیط کشت YS با راندمان تولید بالا استفاده شود و برای باکتری ATCC هم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. برای کاربرد دارویی برای باکتری NIMBB003 محیط کشت YD، برای باکتری NIMBB014 محیط کشت SS و برای باکتری ATCC محیط کشت SD که خاصیت آنتی اکسیدانی و راندمان بهتری دارد توصیه می‌شود.

کلید واژه ها: سیستم ایمنی، اگزوپلی ساکارید، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*.

مقدمه

اصطلاح پست بیوتیک (Postbiotic) به سلول‌های غیر زنده و یا اجزای سلولی و متابولیت‌هایی اطلاق می‌شود که در صورت مصرف در مقادیر کافی، خواص سلامتی بخشی را در میزبان ایجاد می‌کند. اثربخشی پروبیوتیک‌ها در حد بسیار زیادی به نوع سویه میکروبی و پست بیوتیک‌های مشتق شده از آن‌ها، تعداد سلول‌های پروبیوتیکی و نوع حامل پروبیوتیک بستگی دارد؛ لذا، ارتقاء سلامت میکروبیای مفید روده می‌تواند هم مرتبط با سلول های زنده و هم غیر زنده و هم‌چنین مرتبط با متابولیت ها و یا فرآورده‌های جانبی آن‌ها یا همان پست بیوتیک‌ها باشد. متابولیت‌های پست بیوتیکی متنوع با اصطلاح چتر مانند شامل اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، سلول‌های

میکروبی، پروتئین‌های عملکردی، پلی ساکاریدهای خارج سلولی (Exopolysaccarides (EPS، مواد لیز سلولی، اسید تئیکوئیک، پپتیدهای مشتق شده از پپتیدوگلیکان هستند. ساختارهای مختلف، پلانتاریسین، اسیدلاکتیک، اسیداستیک، اسید-γ آمینوبوتیریک، توسط باکتری‌های پروبیوتیک تولید می‌شوند. لاکتوباسیل‌ها، پلی ساکاریدهای خارج سلولی ترشح می‌کنند که نقش مهمی در بهبود رئولوژی، بافت و احساس خوراکی غذاهای تخمیر شده دارند. همچنین اثرات فیزیولوژیکی آن‌ها بر روی سلامتی انسان مانند خواص ضدسرطانی، کاهش سطح کلسترول خون، آنتی‌اکسیدان‌ها و تقویت سیستم ایمنی میزبان از طریق فعال سازی ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها گزارش شده است (Tallon et al., 2003).

پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی باکتریایی به دلیل خاصیت اتصال با آب در اطراف سلول‌ها از خشک شدن سلول جلوگیری می‌کنند (Shirzad et al., 2018). سایر نقش-های فیزیولوژیکی اگزوپلی‌ساکارید شامل تشکیل فیلم بیولوژیکی، تجزیه و تحلیل عناصر اساسی، شناسایی سلول، مقاومت در برابر شرایط شدید معده و قرار گرفتن در معرض اسیدهای صفراوی و مهار فاگوسیتوز است.

اگرچه تولید اگزوپلی ساکارید ممکن است یک مسیر درون سلولی با انرژی بالا باشد، اما به دلیل رشد و بقای میکروارگانیسم‌های ارائه شده توسط اگزوپلی ساکارید تحت فشار، مزایای آن بسیار بیشتر از هزینه‌های آن است(Adebayo-Tayo et al., 2018). اگزوپلی ساکارید باکتری‌های پروبیوتیک دارای خواص عملکردی فعالیت ضدباکتریایی و فعالیت ضدویروسی در برابر ویروس‌های مختلف انسانی و حیوانی است. مهار قابل توجه ویروس هرپس تناسلی نوع ۲ (HSV-2) ، HIV، H_1N_1، ویروس کرونا (TGEV) ، روتاویروس(RV) در شرایط *in vitro*، *in vivo*و بالینی با افزایش قابل توجه سطح اینترفرون و سایر عوامل ضدویروسی ثابت شده است (Zhong and Wang, 2010; Zhong et al., 2010). در برخی از بیماران مبتلا به بیماری ویروس‌های مختلف فعالیت میکروبی روده، با کاهش پروبیوتیک‌ها مانند *لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم*ها مشاهده شده است (Zhong and Wang, 2010) . برای تنظیم تعادل میکروبیوتای روده و کاهش خطر عفونت ثانویه به دلیل جابجایی باکتری‌ها، استفاده از پروبیوتیک‌ها پیشنهاد شده است، به طوری که در درمان بیماری ویروسی خطرناک ۲ سال اخیر یعنی COVID-19که در برخی از بیماران علائم اسهال دارند پروبیوتیک‌ها به طور گسترده برای بیماران مفید گزارش شده است (Xu et al., 2020). یکی از دلایل تاثیرگذاری پروبیوتیک‌ها بر ویروس‌ها مربوط به پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی مترشحه آن‌ها می باشد که باعث اتصال مستقیم باکتری‌های پروبیوتیک به ویروس شده و اتصال ویروس به گیرنده سلول میزبان را مهار می‌کنند (Thambiraj et al., 2015; Wang et al., 2015b). اگزوپلی ساکارید ها به طور قابل‌توجهی می‌توانند سلول‌های اینترلوکین- IL 10و سلول‌های لنفوسیت T تنظیمی (Treg) را در گره‌های لنفاوی افزایش دهند و سطح ایمنی بدن را در برابر انواع ویروس و بیماری افزایش دهند و بیماری‌های گوارشی را بهبود و درمان کنند (Nasiraii et al., 2011). این فعالیت‌های زیستی اگزوپلی ساکاریدها با ترکیب محیط کشت، مونوساکارید، وزن مولکولی و پیوند گلیکوزیدی آن‌ها مرتبط می‌باشد (Huang et al., 2019). اگزوپلی ساکاریدها با ساختار مارپیچ و جرم مولکولی بالاتر فعالیت ضدالتهابی بالاتری دارند که مربوط به ساختار اگزوپلی ساکارید دیواره سلولی آن‌ها می‌باشد در واقع میزان تولید اگزوپلی ساکارید و خواص اکسیدانی آن بسته به نوع محیط کشت و منبع قند آن می‌تواند متفاوت باشد (Thambiraj et al., 2015). با توجه به نقش محیط کشت بر راندمان تولید و خصوصیات اگزوپلی ساکاریدها، هدف از این مطالعه بهینه سازی محیط کشت برای تولید اگزوپلی ساکاریدها توسط سویه‌های بومی

لاکتوباسیلوس فرمنتوم، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و سویه تجاری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* می‌باشد.

مواد و روش کار

تهیه سویه ها

سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* NIMBB003 ایزوله شده از شیر شتر با کد ثبتی MT012188 و سویه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*NIMBB014 با کد ثبتی MT994667 در سایت NCBI/BLAST از شرکت دانش بنیان شمس باوران سلامت نور تهیه شد. سویه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* تجاری (ATCC 4356) از مرکز سوش‌های صنعتی ایران (IROST) تهیه شد. این سویه‌ها درمحیط کشت مایع MRS در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ ساعت قبل از استفاده فعال شدند.

مواد شیمیایی

تری کلرواستیک‌اسید TCA، ۲،۲-دی فنین-۱-پیکریل هیدرازیل DPPH، اسید آسکوربیک، اتانول، از شرکت Darmstadt آلمان خریداری شد. محیط کشت‌های MRS BROTH و MRS AGAR برای جداسازی، غنی سازی باکتری‌های پروبیوتیک و برای تولید اگزوپلی ساکارید Exopolyssacaride (EPS) ، شیرخشک بدون چربی، ساکارز، دکستروز، عصاره مخمر، پپتون از شرکت Darmstadt آلمان تهیه شد.

روش دیسک گذاری

دیسک‌های کاغذی استریل (۵ میلی‌متر) در ظروف پتری حاوی محیط کشت MRS AGAR (۸۰ میلی‌متر) قرار داده شدند و با ۵ میکرولیتر از محیط کشت MRS BROTH در شرایط متغیر منبع کربنی (ساکارز و دکستروز هر کدام ۱۰ درصد) ، با سطح ثابت pH (۰/۲±۵/۲) و دما (۰/۲± ۲۸) درجه سلسیوس حاوی باکتری پروبیوتیک که ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوباسیون شده، برای تولید اگزوپلی ساکارید تلقیح شدند و به مدت ۷ روز انکوباسیون شدند. پس از انکوباسیون، میزان تولید اگزوپلی ساکارید بر اساس تشکیل یا عدم تشکیل کلنی موکوئید در اطراف دیسک‌ها ارزیابی شد. تولید اگزوپلی ساکارید توسط باکتری‌های پروبیوتیک با مخلوط کردن بخشی از ماده موکوئید در دو میلی‌لیتر الکل مطلق مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج اگزو پلی ساکارید از باکتری پروبیوتیک

سویه‌های پروبیوتیکی در ۱۰ میلی لیتر MRS BROTH در لوله های ۱۵ میلی لیتری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. جدایه ها به ۱۰۰ میلی لیتر از هر محیط کشت تولید اگزوپلی ساکارید که به صورت ۱۰ درصد شیر بدون چربی و ۱۰ درصد ساکاروز (محیط کشت SS)، ۱۰ درصد شیر بدون چربی و ۱۰ درصد دکستروز (محیط کشت SD)، ۵ درصد شیر بدون چربی، ۰/۳۵درصد عصاره مخمر، ۰/۳۵درصد پپتون و ۵ درصد ساکارز (محیط کشت YS)، ۵ درصد شیر بدون چربی، ۰/۳۵ درصد عصاره مخمر، ۰/۳۵ درصد پپتون و ۵ درصد دکستروز (محیط کشت YD) تهیه شدند، تلقیح شده و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای ۲۴ ساعت انکوباسیون گردیدند. سپس شیرهای تخمیر شده در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ ساعت خنک شدند. ۵۰ میلی‌لیتر از هر شیر تخمیر شده در حمام آب در ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. پس از خنک شدن در ۴ درجه سلسیوس، نمونه ها در (rpm)۶۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ Z 206 A آلمان سانتریفیوژ شدند و ۵ میلی لیتر TCA ۸۵ درصد به سوپرناتانت آن‌ها اضافه شد. نمونه ها تا ۴ درجه سلسیوس سرد شدند و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. رسوب اگزوپلی ساکارید از سوپرناتانت با استفاده از اتانول سرد (۲۰- درجه سلسیوس، ۱: ۲ *v/v*) به مدت ۴۸ ساعت تهیه شد. سپس نمونه ها در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل در آب مقطر دوبار تقطیر شده حل شد و با استفاده از کیسه دیالیز (۱۴-۱۲ کیلو دالتون) در آب مقطردوبار تقطیر شده

در ۴ درجه سلسیوس برای ۴۸ ساعت دیالیز شد. نمونه-های اگزوپلی ساکارید توسط دستگاه فریزدرایر alpha 1-2 ld plus آلمان لیوفیلیزه شدند، در پایان وزن EPS تولیدی از هر باکتری پروبیوتیک با ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ اندازه گیری شد و میزان راندمان تولیدی EPS در هر محیط کشت محاسبه گردید و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس ذخیره شدند (Shirzad et al., 2018; Wang et al., 2015b).

بررسی قدرت مهار کنندگی رادیکال های آزاد

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌ساکاریدها مطابق روش توصیف شده توسط لی و همکاران با اصلاح جزئی انجام شد. ۵۰ میکرولیتر از هر پلی ساکارید با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول (DPPH mM ۰/۱۵ در محلول۸۰ درصد متانول) به هر لوله اضافه شد. این مخلوط به شدت تکان داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی قرار گرفت (Shirzad et al., 2018). اسید اسکوربیک (۱ mg/mL) به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. جذب محلول حاصل در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه Bio Tek (Instruments, Winooski, VT) پس از سانتریفیوژ در ۶۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه خوانده شد و درصد مهار رادیکال‌های آزاد توسط فرمول زیر محاسبه شد (Wang et al., 2015a).

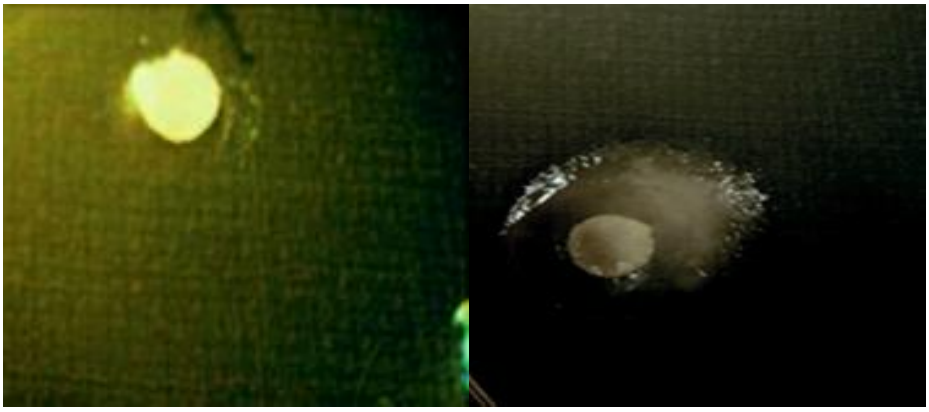
$$\text{درصد مهار} = (A_{control} - A_{sample}) / A_{control} * 100$$

تجزیه تحلیل آماری

کلیه مراحل آزمایش با ۳ تکرار انجام گرفت و تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار (SPSS) و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون توکی در سطح احتمال $p < 0.01$ انجام شد.

نتایج

وجود اگزوپلی‌ساکارید مرتبط با سلول‌های باکتریایی را می‌توان با تشکیل کلنی‌ها در محیط کشت جامد تشخیص داد. بنابراین، وجود ماده شفاف یا خامه‌ای که شامل یک کلنی موکوئید در اطراف دیسک است، نشانگر پتانسیل تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط باکتری پروبیوتیک است (شکل ۱). در روش دیسک‌گذاری با مشاهده اشباعیت دیسک‌ها توسط ماده موکوئیدی تولید اگزوپلی‌ساکارید در هر محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در روش دیسک کاغذی، ساکارز به عنوان منبع کربن محیط کشت بهینه برای تولید اگزوپلی‌ساکارید مناسب‌تر از دکستروز است (جدول ۱). با مخلوط کردن مواد موکوئیدی هر کلنی در دو میلی لیتر الکل مطلق و تشکیل رسوب در ته لوله وجود اگزوپلی‌ساکارید تایید شد (شکل ۲).



الف ب

شکل ۱-الف - نمونه باکتری در محیط کشت حاوی دکستروز (بدون تشکیل موکوئید) ، **ب**- نمونه باکتری در محیط کشت حاوی ساکارز (تشکیل موکوئید)

شکل ۲- تولید اگزوپلی ساکارید با رسوب مواد موکوئیدی در اتانول

جدول ۱- تولید اگزوپلی ساکاریدها در شرایط تغییر محیط کشت با منبع کربن مختلف به روش دیسک

منبع کربن		تولید اگزوپلی ساکارید
سوکروز	دکستروز	باکتری پروبیوتیک
+	-	NIMBB003
+	-	NIMBB014
+	-	ATCC

NIMBB 003 (لاکتوباسیلوس پلانتاروم)، NIMBB 014 (*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*) - ATCC (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* تجاری) است.

علامت (+) تولید اگزوپلی ساکارید، علامت (-) عدم تولید اگزوپلی ساکارید

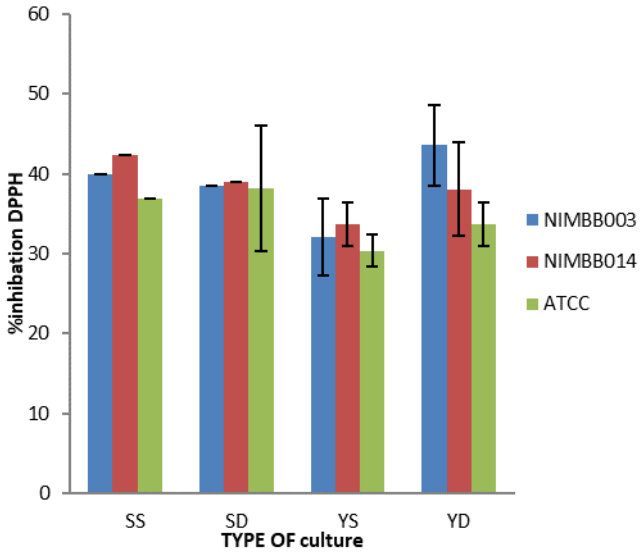
یکی از مهم‌ترین متغیرهای مؤثر بر تولید اگزوپلی‌ساکارید، منبع کربن است. در این مطالعه، تأثیر دو منبع کربن متداول دکستروز و ساکارز، بر تولید EPS توسط NIMBB014 ، NIMBB003 ، ATCC مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ارائه شده در جدول۲ نشان داد که حداکثر تولید اگزوپلی ساکارید ۱۰/۱۴ میلی‌گرم در میلی لیتر مربوط به باکتری NIMBB014 در محیط YS و ۱۳/۵۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به باکتری NIMBB003 در محیط YS همراه با ساکارز بود. در حالی‌که بیشترین میزان، تولید اگزوپلی‌ساکارید برای سویه ATCC در حضور ساکارز در محیط کشت SS، ۱/۵ میلی گرم در میلی‌لیتر بود، که نشان دهنده کاهش چشم‌گیر در تولید اگزوپلی‌ساکارید در طول رشد باکتری تجاری در محیط پیچیده حتی در حضور ساکارز است. در بین باکتری‌ها، تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط باکتری NIMBB003 به طور معنی داری در سطح $p < 0.05$ نسبت به سایر باکتری‌ها بیشتراست و بهترین محیط کشت برای تولید EPS توسط این باکتری YS است. میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی باکتری‌های پروبیوتیک بستگی به نوع منبع کربوهیدرات موجود در محیط کشت متفاوت می‌باشد.

نمودار یا شکل ۳ نشان می‌دهد، بهترین محیط کشت برای افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی برای باکتری‌های پروبیوتیک NIMBB014 ، NIMBB003 و ATCC، به ترتیب SS، YD و SD می‌باشد که برای باکتری ATCC هم تفاوت معنی‌داری در سطح $p < 0.01$ وجود ندارد. به طورکلی هر دو باکتری پروبیوتیک NIMBB014 و NIMBB003، در شرایط متفاوت محیط کشت به طور معنی‌داری در سطح $p < 0.05$ دارای خواص آنتی-اکسیدانی بالاتری نسبت به باکتری ATCC بودند.

جدول ۲- تأثیر منبع کربن بر بازده تولید EPS باکتری‌های NIMBB014 ، NIMBB003 و ATCC رشد یافته در محیط‌های مختلف کشت

اگزوپلی ساکارید	راندمان تولید (mg/mL) در محیط کشت			
	SS	SD	YS	YD
NIMBB003	۵/۱۸±۰/۰۰۲۸۹ c†	۵/۳۰±۰/۰۰۲۸ b	۱۳/۵۶ ±۰/۰۰۲۸۹ c	۳/۰۵ ± ۰/۰۰۲۸۸ c
NIMBB014	۲/۵۸±۰ b	۷/۳۰±۰ c	۱۰/۱۴ ±۰ b	۲/۰۰ ±۰ b
ATCC	۱/۵۰±۰/۰۰۲۸۹a	۰/۸۶۲ ±۰/۰۰۲۹ a	۱/۲۱۵±۰/۰۰۲۸۹ a	۱ /۰۹ ± ۰/۰۰۲۹ a
ANOVA	*p < 0/01*	*p < 0/01*	*p < 0/01*	*p < 0/01*

† حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد می‌باشند. ۱۰ درصد شیر بدون چربی و ۱۰ درصد ساکاروز (محیط کشت SS)، ۱۰ درصد شیر بدون چربی و ۱۰ درصد دکستروز (محیط کشت SD)، ۵ درصد شیر بدون چربی، ۰/۳۵ درصد عصاره مخمر، ۰/۳۵ درصد پپتون و ۵ درصد ساکارز (محیط کشت YS)، ۵ درصد شیر بدون چربی، ۰/۳۵ درصد عصاره مخمر، ۰/۳۵ درصد پپتون و ۵ درصد دکستروز (محیط کشت YD).



شکل ۳-تأثیر محیط کشت بر درصد مهار DPPH توسط باکتری‌هایNIMBB003، NIMBB014 و ATCC که در محیط کشت شیمیایی تعریف شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس رشد کرده است.

بحث

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های بسیاری در زمینه استفاده از مواد پلیمری حاصل شده است. در میان انواع پلیمرها، اگزوپلی ساکاریدها به دلیل ویژگی مطلوبی که دارند از اهمیت بالایی برخوردارند. به تازگی استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای تولید اگزوپلی ساکاریدها به دلیل کارایی بهتر هم‌چون خواص آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با اگزوپلی‌ساکارید جانداران و گیاهان در حال افزایش است (Mahdhi et al., 2017). هدف از این مطالعه بهینه-سازی محیط کشت برای تولید اگزوپلی‌ساکاریدها توسط سویه‌های بومی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و سویه تجاری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* است و سپس ویژگی‌های زیستی این بیوپلیمرها بررسی گردید. میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید بسته به محیط کشت می-تواند متفاوت باشد. بر اساس نتایج افزودن ساکارز ۱۰ درصد به محیط کشت با توجه به این‌که باکتری از مواد آلی مانند ساکارز به عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند افزودن آن باعث افزایش تولید حداکثری در میزان اگزوپلی‌ساکارید می‌شود. با توجه به نتایج جدول ۲، در واقع راندمان تولید اگزوپلی‌ساکارید در محیط کشت حاوی ساکارز نسبت به دکستروز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و pHبرابر ۵/۲ بیشتر می‌باشد. باکتری NIMBB014

نسبت به سایر باکتری‌ها در محیط کشت SD میزان اگزوپلی‌ساکارید بیشتری تولید کرده است. این می‌تواند به دلیل آنزیم‌های موجود در دیواره سلول باکتریایی درتجزیه قندها باشد (Buchanan et al., 2020; Ruas-Madiedo and De Los Reyes-Gavilán, 2005). در واقع، NIMBB014 عملکرد بهتری در متابولیسم قند نسبت به دو باکتری دیگر دارد و قندهای ساکارز و دکستروز را بهتر متابولیزه می‌کند. در نتایج مشابهی در سال ۱۹۹۷ توسط Li و همکارانش برای بهینه سازی تولید اگزوپلی‌ساکارید از باکتری *Bacillus polymyxa* صورت گرفت، بیشترین میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید ۵/۴ mg/ml تولید شد و آن‌ها در تحقیق خود دریافتند که افزایش غلظت ساکارز بیشترین میزان تولید اگزوپلی ساکارید را در پی دارد .(Manca et al., 1996) به علاوه، استفاده از عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن در طی تولید ۳ پلی ساکارید توسط *Bacillus licheniformis* توسط محققان گزارش شده است. علاوه بر این، عصاره مخمر می‌تواند عوامل رشد مانند ویتامین‌ها و اسیدهای-آمینه را که از رشد بسیاری از باکتری‌ها پشتیبانی می-کنند، فراهم کند (Ebube et al., 1992). در سال ۲۰۱۴، Shengjie و همکاران فعالیت مهاری رادیکال-های‌آزاد را در غلظت‌های مختلف اگزوپلی ساکارید جدا شده از باکتری‌های *بیفیدوباکتریوم* و *لاکتوباسیلوس* بررسی کرد و نشان داد که افزایش غلظت اگزوپلی ساکارید نیز باعث افزایش فعالیت مهاری رادیکالهای آزاد می شود .(Li et al., 2014) در این پژوهش با افزایش میزان اگزوپلی‌ساکارید میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافته است. با توجه به این‌که تأثیر محیط کشت و منبع کربن بر راندمان و خاصیت آنتی‌اکسیدانی بر باکتری‌های متفاوت نتیجه متفاوتی می‌دهد، بنابراین می-دانیم که اولاً اگر برای نتایج کار خود از این سه باکتری در صنایع غذایی می‌خواهیم استفاده کنیم، برای باکتری NIMBB003 و NIMBB014 از محیط کشت YS با راندمان تولید بالا استفاده شود و برای باکتری ATCC هم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. اما اگر برای کاربرد دارویی می‌خواهیم استفاده کنیم یکی از ملاک‌های مهم خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد به دلیل این‌که میزان کمی از اگزوپلی‌ساکارید در داروسازی استفاده می‌شود. در حالی‌که در صنایع غذایی حجم زیادی از اگزوپلی ساکارید مورد نیاز است و حجم راندمان تولید مهم است باید صرفه اقتصادی داشته باشد. در این حالت برای کاربرد دارویی برای باکتری NIMBB003 محیط کشت YD و برای باکتری NIMBB014 محیط کشت SS و برای باکتری ATCC محیط کشت SD که خاصیت آنتی اکسیدانی و راندمان بهتری دارد توصیه می‌شود. هر چند اختلاف معنی‌داری در خاصیت آنتی اکسیدانی و راندمان تولید برای باکتری ATCC وجود ندارد باز هم محیط کشت SD پیشنهاد می‌شود. در واقع کاربرد اگزوپلی‌ساکارید در دو بعد بررسی می‌شود. بعد راندمان که در صنایع غذایی اهمیت بیشتری دارد و بعد خواص آنتی‌اکسیدانی که در داروسازی اهمیت بیشتری دارد. در نتیجه زمانی که می-خواهیم اگزوپلی ساکارید استخراج کنیم حتماً قبل از تولید محیط کشت آن را باید ستاپ کرد.

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه در روش دیسک کاغذی، ساکارز مناسب‌تر از دکستروز به عنوان منبع کربن محیط کشت بهینه برای تولید اگزوپلی‌ساکارید است. در روش تولید اگزوپلی-ساکارید در محیط کشت‌های مختلف، میزان مهار رادیکال‌های‌آزاد و بازده تولید اگزوپلی‌ساکارید سویه‌های پروبیوتیک بومی در همه محیط کشت‌ها بالاتر از سویه تجاری بود، که می‌تواند به دلیل مکانیسم‌های مختلف آنزیم‌های مترشحه از باکتری‌های *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* باشد که در تجزیه قندها و به خصوص ساختار نهایی اگزوپلی‌ساکارید ها نقش دارند. با تعیین چند عامل کلیدی می‌توان اگزوپلی ساکاریدی تولید کرد و به منظور فعالیت آنتی‌اکسیدانی از آن استفاده نمود.

منابع

1. Adebayo-Tayo, B., Ishola, R., Oyewunmi, T., 2018. Characterization, antioxidant and immunomodulatory potential on exopolysaccharide produced by wild type and mutant Weissella confusa strains. Biotechnology Reports 19, e00271,
2. Buchanan, K.L., Rupprecht, L.E., Sahasrabudhe, A., Kaelberer, M.M., Klein, M.E., Villalobos, J., Liu, W.W., Yang, A., Gelman, J., Park, S., 2020. A gut sensor for sugar preference. BioRxiv,
3. Ebube, N., Udeala, O., Ghobashy, A., 1992. Isolation and characterization of a novel polysaccharide from Bacillus licheniformis NCIB 11634. Journal of industrial microbiology 9, 239-245.
4. Huang, F., Liu, H., Zhang, R., Dong, L., Liu, L., Ma, Y., Jia, X., Wang, G., Zhang, M., 2019. Physicochemical properties and prebiotic activities of polysaccharides from longan pulp based on different extraction techniques. Carbohydrate polymers 206, 344-351.
5. Li, S., Huang, R., Shah, N.P., Tao, X., Xiong, Y., Wei, H., 2014. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from Bifidobacterium bifidum WBIN03 and Lactobacillus plantarum R315. Journal of Dairy Science 97, 7334-7343.
6. Mahdhi, A., Leban, N., Chakroun, I., Chaouch, M.A., Hafsa, J., Fdhila, K., Mahdouani, K., Majdoub, H., 2017. Extracellular polysaccharide derived from potential probiotic strain with antioxidant and antibacterial activities as a prebiotic agent to control pathogenic bacterial biofilm formation. Microbial pathogenesis 109, 214-220.
7. Manca, M.C., Lama, L., Improta, R., Esposito, E., Gambacorta, A., Nicolaus, B., 1996. Chemical composition of two exopolysaccharides from Bacillus thermoantarcticus. Applied and environmental microbiology 62, 3265-3269.
8. Nasiraii, L.R., Tabatabaie, F., Alaeddini, B., Noorbakhsh, R., Heravi, R.M., Afsharian, S., 2011. Investigation of lactobacilli from mothers breast milk who were placed on probiotic diet. African Journal of Microbiology Research 5, 1581-1585.
9. Roque, M.R.d.A., Paulo, E.M., Vasconcelos, M.P., Oliveira, I.S., Affe, H.M.d.J., Nascimento, R., Melo, I.S.d., Assis, S.A.d., An alternative method for screening lactic acid bacteria for the production of exopolysaccharides with rapid confirmation.
10. Ruas-Madiedo, P., De Los Reyes-Gavilán, C., 2005. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Journal of dairy science 88, 843-856.
11. Shirzad, M., Hamedi, J., Motevaseli, E., Modarressi, M.H., 2018. Anti-elastase and anti-collagenase potential of Lactobacilli exopolysaccharides on human fibroblast. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology 46, 1051-1061.
12. Tallon, R., Bressollier, P., Urdaci, M.C., 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by Lactobacillus plantarum EP56. Research in Microbiology 154, 705-712.
13. Thambiraj, S.R., Phillips, M., Koyyalamudi, S.R., Reddy, N., 2015. Antioxidant activities and characterisation of polysaccharides isolated from the seeds of Lupinus angustifolius. Industrial Crops and Products 74, 950-956.
14. Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A., Yang, Z., 2015a. Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by Lactobacillus plantarum YW32. International journal of biological macromolecules 74, 119-126.
15. Wang, X., Huang, M., Yang, F., Sun, H., Zhou, X., Guo, Y., Wang, X., Zhang, M.,

16. 2015b. Rapeseed polysaccharides as prebiotics on growth and acidifying activity of probiotics in vitro. Carbohydrate Polymers 125, 232-240.
17. Xu, K., Cai, H., Shen, Y., 2020. Management of corona virus disease-19 (COVID-19): the Zhejiang experience. . J Zhejiang Univ (Med Sci) 49, 1-12.
18. Zhong, K., Wang, Q., 2010. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology. Carbohydrate polymers 80, 19-25.
19. Zhong, K., Wang, Q., He, Y., He, X., 2010. Evaluation of radicals scavenging, immunity-modulatory and antitumor activities of longan polysaccharides with ultrasonic extraction on in S180 tumor mice models. International Journal of Biological Macromolecules 47, 356-360.

Optimization of culture medium for exopolysaccharide production by native strains of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, and commercial strain of *Lactobacillus acidophilus*

Enteshari Najafabadi M[1], Roozbeh Nasiraie L[1], Ghasemi Pirblouti A[2*], Noori H R[3]

1. Department of Food Science and Technology, Nour Branch, Islamic Azad University, Nour, Mazandaran, Iran.
2. Research Center for Medicinal Plants, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Science, Babol, Iran.

[*]**Corresponding author:** *nazanin_kh_43713@yahoo.com*

Received: 14 Agust 2021 Accepted: 01 November 2021

Abstract

Exopolysaccharides, compounds derived from the metabolites of probiotic bacteria, play an important role in regulating the immune system. Considering the role of culture medium in the production efficiency of exopolysaccharides, the aim of this investigation was to optimize the culture medium for the production of exopolysaccharides by *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus acidophilus*. In addition, the effect of dextrose and sucrose on the production of exopolysaccharide was investigated using paper disks impregnated with probiotic culture medium. Then, the production efficiency and inhibitory power of exopolysaccharide free radicals were investigated in the culture medium after whey alone and with yeast extract and peptone. Sucrose as a carbon source of optimal culture medium for the production of exopolysaccharide is more suitable than dextrose. In addition, the production efficiency and inhibition of free radicals by exopolysaccharides of native probiotic strains in all culture media was significantly higher than commercial strains, which could be due to different enzyme mechanisms. In the cell wall of *L. fermentum* and *L. plantarum* is involved in the breakdown of sugars, which plays an important role in the formation of the final structure of the exopolysaccharide. Therefore, it is suggested that for *L plantarum* and *L fermentum*, YS culture medium with high production efficiency should be used and there is no significant difference for ATCC bacteria. For medicinal use, we recommend YD culture medium for NIMBB003 bacteria, SS culture medium for NIMBB014 bacteria, and SD culture medium for ATCC bacteria, which has better antioxidant properties and efficiency.

Keywords: Antioxidant, Immune system, Exopolysaccarides, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.
Copyright © 2022 Shahrekord Branch, Islamic Azad University