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

مهرناز اسماعیل زاده[a*]، آنیتاخنافری[b]، عباس اخوان سپهی[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 دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۸ /۱۳۹۰/۳

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 Skim milk، MRS 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 CO_2 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 فازلگاریتمی رشد حاصل شد درحالی که تولید این ترکیبات در سه سویه استاندارد در ابتدای فاز رکود مشاهده گردید.

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

[*] نویسنده مسئول مکاتبات email: esmaeilimehrnaz@gmail.com

jftn.srbiau.ac.ir

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 ضدمیکروبی عمل نمایند (FAO/WHO, 2001). دو گروه بزرگ از میکروارگانیسم‌ها که به عنوان پروبیوتیک از آنها استفاده می گردد، *لاکتوباسیل*‌ها و *بیفیدوباکتریوم*‌ها 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* (Masson *et al*., 2001).

اثر حفاظتی باکتری‌های اسیدلاکتیک در نگهداری غذاهای تخمیری بطور عمده به دلیل شرایط اسیدی است که در زمان رشد باکتری‌ها در غذا به وجود می آید. 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 نیتریت‌ها 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*، *Staphylococcus sp*، (Ennahar *et al*., 2000) و غیره اثر بازدارندگی رشد دارند. آزمایشات متعددی بر روی آنتاگونیسم *لاکتوباسیلوس*‌های مختلف در مقابل *Helicobacter pylori*، *Clostridium difficile*، *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 *لاکتوباسیل*‌ها 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 ضدمیکروبی در سه جدایه پروبیوتیک و اثر آن بر *L. monocytogenes* می‌باشد.

مواد و روش ها

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

jftn.srbiau.ac.ir

- جمع‌آوری نمونه و جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک

جهت جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک در سال ۱۳۸۷ از ۲۰ نمونه ماست محلی در سرعین اردبیل، محلات، دماوند و شاهندشت 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 پلیت‌ها حرکت داده شدند. در روش دیگر رقت‌های تهیه شده بصورت سطحی(Spread) بر روی محیط کشت MRS Agar پخش شد. در نهایت تمامی پلیت‌ها 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 میکروسکپی با رنگ‌آمیزی گرم بررسی شد. بعد از خالص‌سازی، پرگنه‌ها توسط آزمون های 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).

- سویه های استاندارد

به منظور مقایسه توان ضدمیکروبی پروبیوتیک‌های جدا شده از نمونه ماست‌های محلی با نمونه شاهد، کشت‌های لیوفیلیزه *لاکتوباسیلوس رئوتری* (PTCC۱۶۵۵)، *لاکتوباسیلوس کازئی* (PTCC ۱۶۰۸) و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (PTCC۱۶۳۷) از مرکز کلکسیون باکتری ها و قارچ های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. به منظور تهیه کشت فعال باکتریایی، پودرهای لیوفیلیزه به لوله‌های حاوی 5 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 ضدمیکروبی 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 پلیت مولر هینتون آگار با چاهک کشت شدند. از کشت تلقیح ۴۸ ساعته *لاکتوباسیل*‌های 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 سانتی گراد 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×g سانتریفوژ و ۵۰ میکرولیتر از بخش‌های جدا شده جهت بررسی خاصیت آنتاگونیستی به چاهک‌ها منتقل شد. جهت انتشار بهتر عصاره‌های *لاکتوباسیلی*، پلیت‌ها به مدت یک

jft.srbiau.ac.ir

ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد، سرماگذاری شدند. بعد از گذشت مدت زمان‌های ذکر شده، قطر هاله عدم رشد با خط کش میلی‌متری، اندازه‌گیری و در جداول مربوطه ثبت گردید (Devuyst *et al*., 1994; Padmanabha *et al*., 2006).

- تاثیر دما، CO_2، هوادهی، ترکیب محیط کشت در تولید باکتریوسین

جهت ارزیابی تاثیر دما در تولید باکتریوسین از چهار دمای ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد برای گرمخانه‌گذاری استفاده شد و نمونه‌ها پس از ۸، ۱۵، ۲۳ و ۳۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. تاثیر هوادهی با قرار دادن نمونه‌ها در سه شرایط متفاوت انکوباتور معمولی، انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰rpm و انکوباتور CO_2 دار با جو ۵٪ CO_2 ارزیابی شد. همچنین به منظور بررسی تاثیر ترکیب محیط کشت در تولید باکتریوسین توسط *لاکتوباسیل*‌ها از سه محیط Skim milk، MRS broth، MRS broth به همراه عصاره مخمر و ترکیبات معدنی از جمله سولفات منیزیوم، استات سدیم، سولفات منگنز و فسفات پتاسیم استفاده گردید و فعالیت ضدمیکروبی عصاره محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. تمام آزمایشات ۱۲ بار در شرایط کاملا مشابه تکرار شدند و میانگین هاله‌های عدم رشد در نمودارها آورده شده است.

- استخراج باکتریوسین و تائید عملکرد ضدمیکروبی آن

در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط MRS broth استریل مقدار یک لوپ از *لاکتوباسیل*‌های مولد، کشت گردید. ارلن‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به منظور حداقل ساختن تبادل هوایی درب ارلن ها با فویل آلومینیوم مسدود گردید. هنگامی که OD نمونه‌ها به ۱ مک فارلند رسید به میزان ۵ ٪ به ارلن‌های حاوی ۵۰۰ میلی لیتر MRS broth تلقیح گردیدند. و در شرایط اپتیمم حاصل از نتایج بهینه‌سازی تولید ترکیبات باکتریوسینی که در مراحل قبل بدست آمده بود، یعنی دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، انکوباتور با جو ۵٪ CO_2، تلقیح اولیه از محیط Skim milk، به محیط MRS broth به همراه عصاره مخمر، صورت گرفت. بعد از طی زمان 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 خنثی‌سازی، در شرایط استریل به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰×g سانتریفوژ گردید تا توده سلولی تولید شده جداسازی شود. سپس مایع رویی به آرامی به لوله‌های استریل دیگر منتقل شدند. نمونه‌ها یک شب (over night) در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد 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 لوله‌های استریل منتقل و در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ دقیقه در ۷۰۰۰ ×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 فراکسیون‌های حاصله از نظر فعالیت باکتریوسینی مورد سنجش قرار گرفتند. بخشی از فراکسیون‌ها نیز برای انجام دیالیز کنار گذاشته شدند. در این تحقیق برای اندازه‌گیری پروتئین محلول از روش Lowry استفاده شد. نمونه‌ها 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) × 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 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 × ۱۰۰

jftn.srbiau.ac.ir

یافته‌ها

از ۱۲۰ نمونه ماست محلی مجموعا 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 پلیتMRS 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 تماما 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 ضدمیکروبی 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.

جدول۱- آزمون های بیوشیمیایی در تشخیص جدایه ها

Chemical test strain	Arginin hydrolysis	suger					Oxydase	Catalase	Motility	H_2S
		G*	Gal	M	L	R				
Ld1	-	+	-	−	+	−	−	−	−	−
Ld2	+	+	-	−	+	−	−	−	−	−
Ld3	-	+	-	−	+	−	−	−	−	−
Ld4	-	+	پپتونه*	−	+	−	−	−	−	−
Ld5	+	+	-	−	+	−	−	−	−	−
Ld6	-	+	-	−	+	−	−	−	−	−
Ld7	-	+	-	−	+	پپتونه	−	−	−	−
Ld8	-	+	پپتونه	−	+	−	−	−	−	−
Ld9	+	+	-	−	+	−	−	−	−	−
Ld10	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−
Ld11	+	+	+	−	+	+	−	−	−	−
Ld12	-	+	-	−	+	−	−	−	−	−
Ld13	+	+	-	−	+	−	−	−	−	−
Ld14	+	+	-	−	+	−	−	−	−	−
Ld15	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−
Ld16	-	+	−	−	+	−	−	−	−	−
Ld17	+	+	-	−	+	−	−	−	−	−
Ld18	-	+	-	−	+	−	−	−	−	−
Ld19	+	+	-	−	+	−	−	−	−	−
Ld20	-	+	پپتونه	−	+	−	−	−	−	−
Ld21	-	+	-	−	+	−	−	−	−	−
L. casei	+	+	-	−	−	−	−	−	−	−
L. rhamnosus	+	+	-	−	+	−	−	−	−	−
L. reuteri	-	+	-	−	+	−	−	−	−	−

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

G: آزمون تخمیرگلوکز

Gal: آزمون تخمیرگالاکتوز

M: آزمون تخمیر مانوز

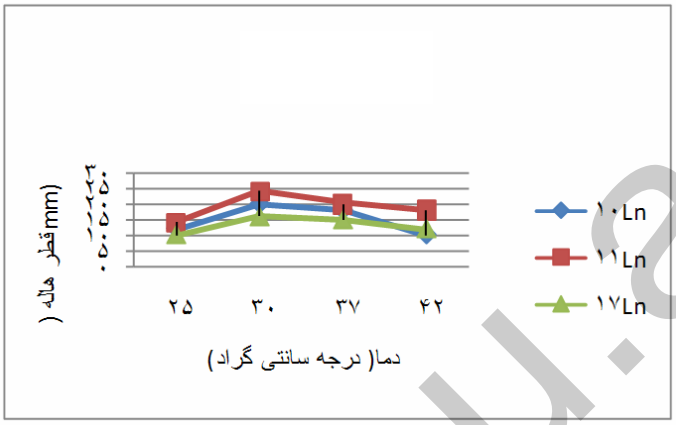
L: آزمون تخمیر لاکتوز

R: آزمون تخمیر رافینوز

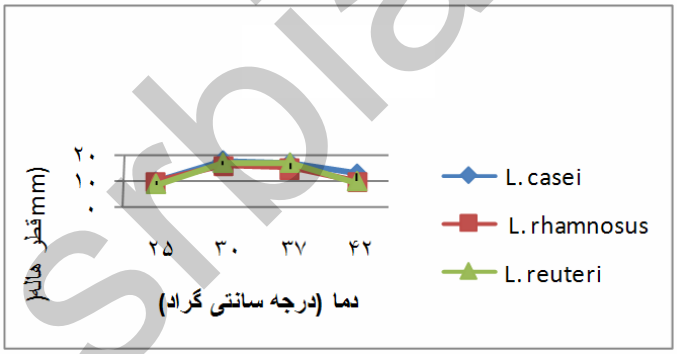
jftn.srbiau.ac.ir

جدول۲- ارزیابی اثر ضدمیکروبی عصاره تخمیری جدایه های منتخب علیه *L. monocytogenes*

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



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



نمودار ۲- تاثیر دما در فعالیت ضدمیکروبی سه سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس*

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

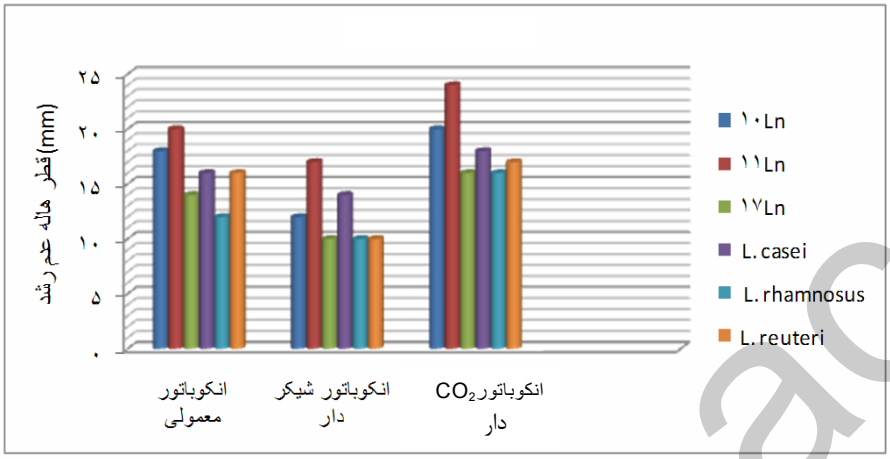
نتایج استفاده از انکوباتور معمولی و انکوباتور CO_2 دار نزدیک به هم بود و باتوجه به میکروآئروفیل بودن *لاکتوباسیل*ها استفاده از شیکر انکوباتور نتایج مطلوبی را به همراه نداشت. در نمودار ۳ هر سه شرایط با هم مقایسه شده است.

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

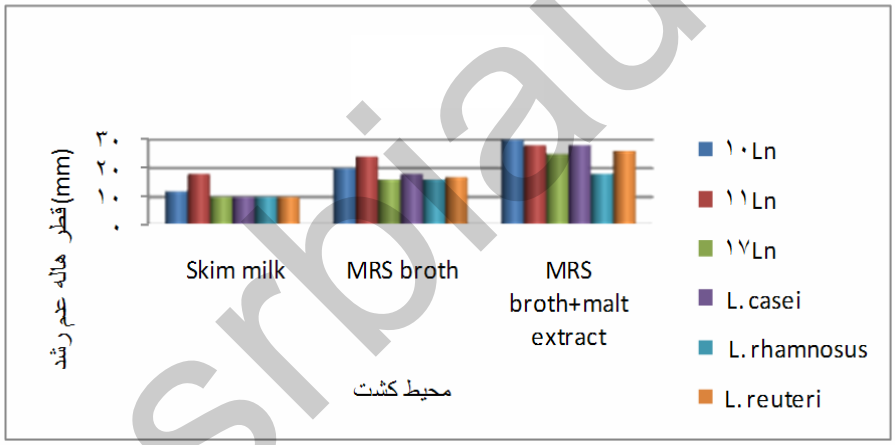
نتایج خالص سازی باکتریوسین‌های تولید شده پس از تیمار با سولفات آمونیوم، تشکیل سه فاز بود، شامل :فاز سبک رویی حاوی ترکیبات لیپیدی و سایر مواد سبک موجود در محیط، فاز آبی حاوی پروتئین‌های رسوب داده شده و فاز رسوبی حاوی پروتئین‌ها. فاز رویی و فاز میانی عصاره محیط کشت هر سه جدایه روی باکتری گرم منفی

jftn.srbiau.ac.ir

L. monocytogenes اثر ضدمیکروبی داشت که حداکثر آن مربوط به عصاره *Ln10* بود. میزان باکتریوسین‌های استخراج شده در مایع تخمیر، قبل و بعد از دیالیز در جدول۳ آورده شده است. نتایج الکتروفورز به 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.



نمودار ۳- تاثیر هوادهی و جو CO_2 در فعالیت ضدمیکروبی سه جدایه برتر و سه سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس*



نمودار ٤- تاثیر محیط کشت در فعالیت ضدمیکروبی 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

فاکتورها	مایع تخمیر	*Ln10*	
		قبل از دیالیز	بعد از دیالیز
حجم نمونه(ml)	۱۳۱	۴۶	۴۳
واحد فعالیت (Unit/ml)	۵۰	۱۰۰	۵۰
فعالیت کل	۶۶۰۰	۳۶۰۰	۲۱۰۰
غلظت پروتئین (mg/ml)	۲/۲۹	–	۰/۴۱
میزان کل پروتئین (mg)	۳۰۲/۲۸	–	۱۷/۲۲
فعالیت اختصاصی (U/mg)	۲۱/۸۳	–	۱۲۱/۹۵
راندمان	۱۰۰	۵۴/۵۴	۳۱/۸۱
درصد بازیافت	۱۰۰	–	۵/۷
ضریب تخلیص	۱	–	۵/۵۸

jftn.srbiau.ac.ir

بحث

باکتریوسین‌ها و مولکول‌های شبه باکتریوسین، مستقیماً به صورت پلی پپتید یا پیش پلی پپتید ساخته می‌شوند و اثر ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی بر *L. monocytogenes* بعنوان پاتوژن مواد غذایی بود. حداکثر اثر ضدمیکروی عصاره محیط‌کشت پس از خنثی کردن آب اکسیژنه مربوط به سویه Ln_{10} بود. بسیاری از محققین اثر ضدمیکروبی *لاکتوباسیل* ها را بر سایر میکروارگانیسم‌ها در طی سالیان طولانی مورد بررسی قرار داده اند. تحقیقات آنان نشان داد هنگامیکه نمونه‌های *لاکتوباسیل* بر روی محیط‌های انتخابی و یا اختصاصی کشت داده شوند، قادر به تولید ترکیبات ضدمیکروبی می‌باشند (Alakomi *et al.*, 2000).

مهمترین خاصیت باکتریوسین تولید شده در این تحقیق در مقایسه با باکتریوسین *لاکتوباسیل*‌های استاندارد، فعالیت ضد میکروبی بیشتر آن‌ها بود. همچنین جدایه های 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. ماکزیمم تولید باکتریوسین توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک، ممکن است در فازهای مختلف چرخه رشد، اتفاق افتد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که *لاکتوباسیل*‌ها 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 براث تخمیری در ۳۰ درجه سانتی گراد و زمان ۲۳ ساعت حاصل شد. باکتریوسین‌ها اکثرا 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 CO_2 دار و در محیط کشت حاوی عصاره مخمر مشاهده شد. ترکیبات معدنی و نمک‌ها تاثیری در تولید بیشتر ترکیبات پروتئینی و باکتریوسینی نداشت. از آنجا که جدایه Ln_{10} در مقایسه با سه سویه استاندارد فعالیت باکتریوسینی بیشتری را در مدت زمان کوتاه نشان داد، می توان از آن در شرایط مناسب ذکر شده به عنوان استارتری با توان تولید ترکیبات ضدمیکروبی 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 تاثیر بسزایی دارند. با عرضه محصولات پروبیوتیک در بازار، مصرف‌کنندگان انتظار دارند تا با مصرف این محصولات به اثرات مفید ادعا شده درمورد 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 انتهای 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، (Piard *et al.*, 1990) Lactostrepcin Nicin، (Zajdel *et al.*, 1985)، (Mohamed *et al.*, 1984) و Diplococcin 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

jftn.srbiau.ac.ir

برای تولید فرآورده و وجود بستر رشد مناسب برای میکروارگانیسم می باشد. بنابراین یافتن باکتری هایی که دارای توانایی بلقوه در این زمینه می‌باشند حائز اهمیت و مورد توجه است. این باکتری‌ها دارای توانایی رقابت با سایر میکروارگانیسم‌های صنعتی هستند، پس می‌توان با ادامه تحقیقات، آنها را جایگزین باکتری‌های 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 می‌رسد، حداکثر توان تولید ترکیبات باکتریوسینی با خواص ضد میکروبی را در این فاز داراست و هچنین 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 Diplococcin 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 adalt 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 relative to other bacteriocins. *The Pharmaceutical Journal*, 88 (3), 449-457.

FAO/WHO. (2001). 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.*

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

Kandler, O. & Weiss, N. (1989). *Bergeys Mannual 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). Envidence 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 staphylococcin 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., Goscinia, H. & Przondo Mordarska, A. (2001). Antagonistic activity tract pathogens (*Helicobacter pylori, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Closteridium difficle*). *Med Diew Microbiol.*, 53 (2), 133-142.

jfnr.srbiau.ac.ir

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 *Streptoccus cremosis* 202. *Applied Environmental Microbiology*, 49, 969-974.

jftn.srbiau.ac.ir