

توسعه جدایه پربازده ساکارومایسس سرویزیه از طریق جهش‌زایی تصادفی، مهندسی تکاملی و بهینه‌سازی مبتنی بر روش سطح پاسخ

زهرا فتحی^{۱*}، هادی سعیدی^۲

۱. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری میکروبی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

چکیده

سابقه و هدف: مخمر ساکارومایسس سرویزیه کاربردهای گسترده‌ای در تولید خمیرمایه نانویی و تولید اتانول زیستی دارد و از ویژگی‌های شاخص و مهم این سویه که کاربرد آن در صنعت تولید اتانول را تحت تاثیر قرار می‌دهد، می‌توان به تحمل در برابر غلظت‌های بالاتر اتانول اشاره کرد. افزایش تحمل در برابر اتانول در سویه‌های صنعتی منجر به تخمیر سریع‌تر، کامل‌تر و افزایش راندمان تولید اتانول در صنعت می‌شود.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر به منظور بهبود فنوتیپ تحمل اتانول، جدایه‌ی برتر با تحمل بیشترین غلظت اتانول، تحت تیمار با ماده شیمیایی اتیدیوم بروماید و اعمال گزینش بر مبنای تکامل تطبیقی و مهندسی تکاملی قرار داده شدند. جدایه‌های جهش‌یافته با استفاده از محیط حاوی غلظت‌های رو به افزایش اتانول از غلظت ۸٪ تا غلظت ۱۲٪ اتانول در طی ۱۴۴ روز خو داده شده و غربال شدند. غلظت اتانول تولید شده توسط جدایه‌ها بر مبنای تقطیرمستقیم و الکل‌سنجی تعیین شد. میزان تولید اتانول توسط این جدایه با متد سطح پاسخ بهینه‌سازی شد.

یافته‌ها: جدایه طی اعمال جهش‌زایی با اتیدیوم بروماید و همچنین اعمال آزمون‌های تکامل تطبیقی و مهندسی تکاملی از غلظت ۸٪ تا غلظت ۱۲٪ اتانول طی ۱۴۴ روز به غلظت ۱۲٪ اتانول خو داده شد. در این مطالعه بهترین جدایه با قابلیت تولید بیشترین میزان اتانول جدایه F1 نامگذاری شد. پس از اعمال روش‌های جهش‌زایی و گزینش بر مبنای تکامل تطبیقی، توان تولید اتانول توسط این جدایه 10.25 ± 0.10 ٪ شد. این جدایه همچنین با اعمال شرایط بهینه تولید شامل درصد بریکس ۲۶، سولفات آمونیوم ۲۰ گرم در لیتر و میزان تلقیح 10^9 میزان تولید اتانول توسط این جدایه از 10.25 ± 0.10 ٪ به 11.25 ± 0.11 ٪ رسید.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که جدایه F1 از نظر میزان تولید اتانول می‌تواند سویه کارآمدی برای استفاده در صنعت تولید اتانول کشور جهت افزایش راندمان تولید باشد.

واژه‌های کلیدی: اتانول، ساکارومایسس سرویزیه، جهش‌زایی، مهندسی تکاملی

Development of a High-Ethanol Producing *Saccharomyces cerevisiae* isolate through Random Mutagenesis, Evolutionary Engineering, and Response Surface Methodology Optimization

Zahra Fathi^{1*}, Hadi Saeidi²

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran

Abstract

Introduction: *Saccharomyces cerevisiae* yeast has wide applications in the production of baker's yeast and the production of bioethanol, and one of the important characteristics of this strain, which affects its use in the ethanol production industry, is tolerance to higher concentrations of ethanol. Increasing the tolerance against ethanol in industrial strains leads to faster, more complete fermentation and increasing the efficiency of ethanol production in the industry.

Materials and Methods: In the current research, in order to improve the phenotype of ethanol tolerance, the superior isolate with the highest concentration of ethanol was treated with the chemical substance ethidium bromide and selection was applied based on adaptive evolution and evolutionary engineering. Mutant isolates were cultured using medium containing increasing concentrations of ethanol from 8% to 10% ethanol concentration during 144 days and screened. The amount of ethanol production by this isolate was optimized by the response surface method.

Results: The isolate was acclimated to 10% ethanol concentration during 144 days from 8% concentration to 10% concentration of ethanol during mutagenesis with ethidium bromide as well as adaptive evolution and evolutionary engineering tests. In this study, the best isolate with the ability to produce the highest amount of ethanol was named *Saccharomyces cerevisiae* F1. After applying mutagenesis and selection methods based on adaptive evolution, the ethanol production capacity of this isolate was $10 \pm 0.25\%$. Also, by applying the optimal production conditions including the percentage of brix 26, sulfate ammonium 20 g/l, and Inoculation rate 10^9 the amount of ethanol production by this isolate reached from $10 \pm 0.25\%$ to $11 \pm 0.25\%$.

Conclusion: The results of this study showed that the strain of *Saccharomyces cerevisiae* ZF2 can be an efficient strain for use in the country's ethanol production industry in terms of ethanol production to increase production efficiency.

Key words: Bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, Mutation, Evolutionary engineering

مقدمه

از سالیان دور از مخمرها برای تهیه غذاهای تخمیر شده و نوشیدنی‌ها مانند نان، آبجو و نوشیدنی‌های الکلی استفاده می‌شود (۱). اتانول مایعی است بی‌رنگ، قابل تجزیه و قابل اشتعال که می‌توان از آن در صنعت به عنوان حلال و ماده واسطه شیمیایی برای تولید بیشتر ترکیبات آلی استفاده نمود، همچنین اتانول به دلیل داشتن عدد اکتان بالا به عنوان مهم‌ترین سوخت زیستی شناخته شده که می‌تواند به تنهایی به عنوان سوخت و حامل اکسیژن به کار رود (۲). از مهم‌ترین نگرانی‌های جهان کنونی، ایمنی محیط زیست و تامین انرژی می‌باشد چرا که در آن تقاضا برای انرژی به دلیل افزایش مداوم جمعیت و کیفیت زندگی به‌طور چشمگیری افزایش پیدا کرده است. اتانول در مقایسه با تمام سوخت‌های زیستی تجدیدپذیر و در دسترس، یکی از امیدوار کننده‌ترین گزینه‌های سوخت زیستی می‌باشد که با جایگزینی بنزین و سایر سوخت‌های فسیلی می‌تواند بخشی از انرژی مورد نیاز دنیا را فراهم کند (۳). از نظر حجمی و اقتصادی اتانول زیستی یک محصول استراتژیک در حوزه زیست فناوری می‌باشد چراکه سالانه در سراسر جهان حجم حیرت انگیزی از الکل تخمیری تولید می‌شود که این حجم بالغ بر ۱۰۰ میلیارد لیتر می‌باشد (۴). در صنعت، اتانول را از دو طریق می‌توان تولید کرد:

نویسنده مسئول: استادیار گروه زیست

شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه،

مراغه، ایران

آدرس الکترونیک:

z.fathi@maragheh.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۱/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۱۷

روش اول سنتزی از اتیلن و روش دوم به‌صورت تخمیری می‌باشد. اتانول حاصل از روش اول منشا فسیلی دارد چراکه اتانول از اتیلن سنتز می‌گردد و خود اتیلن نیز از ترکیبات هیدروکربن گازی حاصل از نفت به‌وجود می‌آید پس تمایز اصلی اتانول سنتتیک با بیواتانول در این است که اولی ترکیبی تجدیدناپذیر با منشا فسیلی می‌باشد اما دومی ترکیبی تجدیدپذیر با منشا غیر فسیلی می‌باشد (۵). سه گروه قندی، نشاسته‌ای و سلولزی از مواد اولیه زیستی برای تولید بیواتانول‌اند که عمدتاً نیز منشا گیاهی دارند. مهم‌ترین فراوان‌ترین، ارزان‌ترین و در دسترس‌ترین منابع برای تولید اتانول، ضایعات صنایعی نظیر کشاورزی می‌باشد. همچنین برخی از میکروارگانیسم‌هایی نظیر مخمرها، باکتری‌ها و قارچ‌ها قادر به تولید بیواتانول می‌باشند (۶). از بین تمام میکروارگانیسم‌ها، مخمر *Saccharomyces cerevisiae* به عنوان یک میکروارگانیسم (Generally recognized as safe) (عموماً بی‌خطر) طبقه‌بندی شده و قادر به تولید بالاترین میزان اتانول زیستی است. به‌علت پایداری نسبتاً زیاد در شرایط سخت و خشن صنعتی و همچنین انعطاف‌پذیری در سازگاری موثر برای تخمیرهای مقیاس بزرگ باعث شده تا مخمر *Saccharomyces cerevisiae* برای طیف وسیعی از فرایندهای صنعتی زیستی از جمله تولید اتانول تخمیری برگزیده شود و تمام این ویژگی‌های خاص نیز باعث کاهش آلودگی و پایین آوردن هزینه‌ی تقطیر در فرایند تخمیر شده که به همین دلیل استفاده از این مخمر در تولید اتانول زیستی رایج و گسترده می‌باشد (۷). از چالش‌های اصلی این صنعت می‌توان به تولید مقرون به صرفه اتانول با راندمان بالا اشاره کرد و هرگونه افزایش در غلظت تولیدی اتانول در طول تخمیر از نظر کیفیت و ملاحظات اقتصادی مطلوب می‌باشد. افزایش اتانول تولیدی طی فرایند به عوامل متعددی بستگی دارد که چگونگی عملکرد و قدرت بقا و حفظ فیزیولوژی سلول

مخمر در شرایط تخمیری از عوامل مهم آن می باشد (۸). بر اساس مطالعات مختلف صورت گرفته در مورد ترکیبات مواد مغذی و عوامل تنش زا بر رشد مخمر، درمیان عوامل تنش زا، اتانول به عنوان تنش اصلی، مسئول کاهش تولید اتانول و توقف تخمیر می باشد که به دلیل اهمیت زیست شناسی، اکولوژیکی و صنعتی درباره ی تحمل اتانول مطالعات زیادی صورت گرفته است (۹). اتانول از طریق روش های مختلفی بر فیزیولوژی سلول مخمر تاثیر می گذارد که از آن جمله می توان به تاثیرات مضر آن بر ساختار و عملکرد غشای سلولی مخمر اشاره کرد. همچنین اتانول باعث اختلال در آنزیم های مهم مسیر گلیکولیتیک و تولید رادیکال آزاد اکسیژن در مخمر شده و علاوه بر آن، اتانول اندوسیتوز سلول را مهار می کند، بر فعالیت پمپ های هیدروژنی غشاهای داخل میتوکندریایی تاثیر می گذارد و باعث مهار آنزیم هایی مانند الکل دهیدروژناز می شود. تجمع اتانول بر سیستم انتقال درون سلولی نیز تاثیر می گذارد و در نهایت باعث کاهش مقدار اتانول تولیدی می شود (۱۰). از جمله تغییراتی که اتانول در مخمر ایجاد می کند می توانیم به مهار متابولیسم، کاهش مصرف سوپسترا توسط مخمر، کاهش رشد، تغییر در ساختار غشا و افزایش نفوذپذیری اشاره کنیم که در نهایت منجر به مرگ سلول مخمر می شود. با توجه به اینکه در سال های اخیر تلاش های زیاد و مطالعات وسیعی برای شناسایی ساز و کارهای پاسخ به تنش اتانول انجام شده اما با این حال ساز و کار تحمل به اتانول در این مخمر به طور کامل شناسایی نشده، به عبارت دیگر صفت تحمل در برابر اتانول به شبکه ی پیچیده ای وابسته است که واکنش های متقابلی در سطح ژنوم باهم دارند (۱۱). یکی از دلایلی که باعث شده تعیین ساز و کار تحمل اتانول مشکل شود، پیچیدگی شبکه ی پاسخ مخمر می باشد به طوری که مسیرها به طور مداوم برنامه ریزی می شوند. بسیاری از ژن های شناخته شده در تحمل به اتانول نقش دارند، مربوط به ترکیب غشای سلولی اند؛ برای مثال، ژن های *ETRI*، *OARI*

SUR4، *FEN1* و *HTD2* مربوط به متابولیسم اسیدهای چرب اشباع غشا و ژن های *DEPI*، *FEN2*، *UME6*، *HAC1* و *PEX15* مربوط به متابولیسم لیپیدها و اسیدهای چرب هستند (۱۲). افزایش تحمل به اتانول در مخمرهای سویه صنعتی به تخمیر سریع تر و کامل تر منجر می شود و همچنین باعث افزایش بازده تولید، کارایی و پایداری سویه حین فرایند خواهد شد. این سویه ها قادر به افزایش زمان عملکرد فرایند تخمیر به مدت طولانی تر در حضور اتانول می شوند. همچنین تحقیق بر سویه های مقاوم در برابر تنش اتانول نشان داده است که این سویه ها از قابلیت های دیگر مانند مقاومت به سایر عوامل تنش زا از جمله فشار اسمزی و تنش اکسایشی و حرارتی برخوردارند (۱۳). از دو رویکرد مهندسی ژنتیک و مهندسی تکاملی می توان در مسیر بهبود سویه *ساکارومایسس سرویزیه* برای افزایش تحمل به اتانول بهره برد. در هردو این رویکردها، تغییرات اعمال شده به طور مستقیم یا غیرمستقیم از طریق تغییرات ژنتیکی اتفاق می افتد و تمامی این تغییرات نیازمند درک سطح بالایی از توانمندی سلول در برابر تنش های مدنظر و ژن های موثر در این صفات فنوتیپی می باشد (۱۴). مهندسی تکاملی رویکردی است جهت بهبود صفتی (صفت تحمل به اتانول *ساکارومایسس سرویزیه*) که در آن آزمایش های تکامل تطبیقی در شرایط دلخواه و با استفاده از اعمال فشار انتخابی به مدت طولانی طراحی می شوند (۱۵). هنگامی که زمان تولید نسل میکروارگانیسم، کوتاه و اندازه ی جمعیت بزرگ باشد، آزمایش ها در شرایط ایده آل خواهند بود؛ زیرا بسیاری از جهش های رخ داده در هر نسل خودبه خودی است و نسل تطبیق یافته به سرعت در کل جمعیت تکثیر می یابد (۹). بنابراین از عوامل موثر در مهندسی تکاملی می توان به مدت زمان و میزان جمعیت اولیه اشاره کرد (۱۶). به عبارت دیگر می توان گفت، هرچه جمعیت آزمایش شده بیشتر باشد، احتمال وقوع جهش های بیشتر و مفیدتر، زیادتر است. همچنین از لحاظ آماری طی آزمون های طولانی مدت امکان

جداسازی فنوتیپ مطلوب تر افزایش می یابد (۱۷). بیشتر ارگانیسم ها نرخ جهش پایینی یعنی در حدود 10^{-9} تا 10^{-10} در هر نسل دارند، بنابراین در شرایط رشد، هر عاملی هر چند کوچک که باعث افزایش نرخ جهش شود، زمینه را برای جهش های مفید فراهم می کند. جهش هایی که با استفاده از اشعه یا مواد شیمیایی رخ می دهد، اغلب باعث افزایش تنوع ژنتیکی جمعیت اولیه در آزمایش های تکاملی می شود (۱۸). ترکیب مواد مغذی محیط تخمیر در فیزیولوژی سلول مخمر و همچنین توان تحمل و تولید اتانول مخمر از اهمیت حیاتی برخوردار می باشد. عوامل تاثیرگذاری مانند در دسترس بودن مواد معدنی، برای مثال پتاسیم، گوگرد، منیزیم، نیتروژن، عناصر کمیاب و همچنین اکسیژن برای رشد سلول ها موثر است. این عوامل به طور چشم گیری بر رشد مخمر، تحمل تنش و بازده تولید اتانول تأثیرگذار هستند (۱۹). یکی دیگر از پارامترهای مهم pH محیط تخمیر است که برای جلوگیری از رشد ناخواسته باکتری ها، به ویژه باکتری های اسید لاکتیک و رشد میکروارگانیسم های کشت شده باید کنترل شود (۲۰). ملاس با غلظت بالای قند برای تخمیر و تولید اتانول مناسب است و به عنوان منبع کربن در ابعاد صنعتی استفاده گسترده دارد (۲۱ و ۲۲). مخمر ساکارز را به دو مونوساکارید گلوکز و فروکتوز هیدرولیز و آن را به شکل منبع کربن در مسیرهای متابولیک خود مورد استفاده قرار می دهد. به دو علت اصلی ملاس چغندر یا نیشکر ماده اولیه و اصلی در تولید مخمر است: ۱- مخمر به خوبی از قند موجود در ملاس استفاده و رشد می کند؛ ۲- استفاده از ملاس از نظر اقتصادی به صرفه است؛ زیرا پسایی است که بدون انجام هیچ عملیاتی از تصفیه شکر به دست می آید. ملاس به هر مایعی که در اجزای تشکیل دهنده آن بیش از ۴۳ درصد قند وجود داشته باشد، گفته می شود؛ عموماً این قند ساکارز است. ترکیب ملاس بسیار متفاوت بوده و به مراحل تصفیه شکر، موقعیت آب و هوایی و فصلی بستگی دارد. ملاس نیشکر محصول جانبی کارخانه تولید شکر از

نیشکر است که دست کم ۴۶ درصد قند دارد و بیریکس آن نباید کم تر از ۷۹/۵ درصد باشد (۲۳). ملاس چغندر محصول جانبی تولید شکر از چغندر است که دارای دست کم ۴۸ درصد قند و بیریکس ۷۹/۵ است (۲۴). بهینه سازی یک محیط صنعتی یکی از راه های افزایش تولید بیواتانول است. محیط بهینه شده حاوی مقادیر بهینه تمام اجزاء از جمله منابع کربن و نیتروژن و فاکتورهای رشد و حداقل مقادیر مورد نیاز برای رشد و تولید متابولیت ها توسط یک میکروارگانیسم است (۲۵ و ۲۶). متد سطح پاسخ مجموعه ای از تکنیک های آماری می باشد که در بهینه سازی فرایندهایی به کار می رود که پاسخ مورد نظر توسط تعدادی از متغیرها تحت تاثیر قرار می گیرد. شمای گرافیکی مدل ریاضی سبب تعریف واژه ی سطح پاسخ به این متد شده است. از مزایای این طرح آماری می توان به کاهش تعداد آزمایش ها اشاره کرد و همچنین کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و اثر متقابل فاکتورها قابل برآورد می باشند. مهم ترین مسئله این تحقیق بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورها بود که از این رو طرح آماری سطح پاسخ انتخاب شد (۲۷ و ۲۸). در این روش با معیار قراردادن تعداد متغیرها، حدود بیشینه و کمینه تعیین شده برای هر متغیر، می توان ماتریس آزمایش را طراحی کرد. زمانی که تعداد متغیرها زیاد باشد، این روش درمقایسه با روش های پرحجمی مانند فاکتوریل کامل ارجحیت دارد و در شرایط خاص (مواردی که آزمایش تجربی نامنظم و غیر سیستمیک است) بسیار مفید می باشد. در این مطالعه ابتدا از نمونه های خمیرمایه و تخمیری جمع آوری شده، جدایه مخمر ساکارومایسس سروریزه با قابلیت تحمل غلظت های اتانول بالاتر جداسازی می گردد و سپس با هدف افزایش توان تحمل و تولید غلظت های بالاتر اتانول، این جدایه با عوامل جهش زای شیمیایی (اتیدیوم بروماید) و همچنین راهبرد تکامل تطبیقی و مهندسی تکاملی به غلظت های اتانول بالاتر خو داده می شود. نهایتاً پس از بررسی توان تولید اتانول توسط جدایه توسعه یافته، عوامل

محیطی مهم تاثیرگذار در توان تولید اتانول از جمله بریکس محیط کشت، غلظت های سولفات آمونیوم و میزان تلقیح با استفاده از روش طراحی آزمایش سطح پاسخ (RSM) بهینه خواهد شد و تولید اتانول با راندمان بالا ایجاد خواهد گردید.

مواد و روش ها

محیط های کشت و شرایط کشت مخمرها

جداسازی سلول های مخمر با تحمل به غلظت های بالاتر اتانول از خمیرمایه های مختلف موجود در کشور به عنوان جمعیت اولیه و سویه های والدی انجام شد. سویه ی والد در محیط کشت مایع YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) حاوی ۸٪ اتانول (حجم در حجم) کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی گراد در شیکر انکوباتور گرماگذاری شد. این محیط حاوی ۲۰ گرم در لیتر گلوکز (مرک)، ۲۰ گرم در لیتر پپتون (مرک) و ۱۰ گرم در لیتر عصاره مخمر (مرک) می باشد. برای ساخت محیط جامد، ۲ درصد وزنی آگار (مرک) به سایر مواد افزوده شد و در نهایت، محیط ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل شدند. پس از ۴۸ ساعت رشد در محیط کشت مایع YPD حاوی ۸٪ اتانول، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط بر روی محیط های کشت YPDA (Yeast extract Peptone Dextrose Agar) حاوی ۸٪ اتانول منتقل و کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. کلنی های تشکیل شده برای سنجش توانایی تولید اتانول در ابتدا و سپس برای اعمال جهش زایی برداشت شدند.

جهش زایی با اتیدیوم بروماید

به این منظور 2×10^8 سلول از محیط کشت مایع YPD، تهیه و سپس سوسپانسیون سلولی در بافر فسفات سدیم با غلظت ۰/۱ مولار و pH ۷/۲ در یک لوله در پیچ دار تهیه شد

و به مدت ۱ ساعت روی شیکر در ۳۰ درجه سانتی گراد با دور rpm ۱۱۰ در مجاورت ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر اتیدیوم بروماید (سیگما) جهت ایجاد تنوع ژنتیکی قرار داده شد. سلول ها در دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ و ته نشین شدند و واکنش با شست و شوی سوسپانسیون سلولی با بافر فسفات سدیم متوقف شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده به محیط کشت مایع YPD حاوی ۸٪ (حجم در حجم) اتانول منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی گراد در شیکر انکوباتور گرماگذاری شد (۱۱ و ۲۹).

آزمایش های تکامل تطبیقی

در این آزمایش از محیط کشت ملاس برای آزمایش های تکامل تطبیقی و از الکل اتانول به عنوان تنش فیزیولوژیک در مجاورت غلظت ۵ میکروگرم بر لیتر اتیدیوم بروماید (سیگما) به عنوان عامل ایجاد جهش تصادفی و ایجاد تنوع ژنتیکی استفاده شد. محیط کشت ملاس با رقیق کردن ملاس چغندر قند در آب مقطر تا بریکس ۱۸ تهیه شد. پس از تهیه رقت، به منظور حذف ناخالصی های جامد، محیط کشت آماده شده در rpm ۵۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی - گراد سانتریفیوژ شد. پس از افزودن ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم، محیط کشت با افزودن اسید سولفوریک در pH ۴/۵ تنظیم شد. محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو شد (۳۰). تکامل تطبیقی طی ۸۰ مرحله متوالی کشت جدایه ها و هر مرحله به مدت زمان ۲۴

ویژه رشد برای هر نمونه استفاده گردید. مقادیر اولیه OD₆₀₀ یکسان برای همه چاهکها محاسبه و مورد استفاده قرار گرفت. نرخ ویژه رشد با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (۳۲).

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_1 - t_2)$$

بررسی توان تولید اتانول توسط جدایه های حاصل از

تکامل تطبیقی

جدایه مخمر حاصل از تطابق در محیط غلظت ۱۲٪ اتانول (حجمی - حجمی)، به محیط کشت YPDA حاوی ۱۲٪ اتانول منتقل و کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. کلنی های تشکیل شده برای سنجش توان تولید اتانول به ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت ملاس با بریکس ۲۲ حاوی ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم، محیط کشت با افزودن اسید سولفوریک در pH ۴/۵ منتقل و در دمای ۲۹ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری می شوند. پس از ۲۴ ساعت رشد هوازی و افزایش زیست توده سلولی، محیط جهت تولید اتانول بی هوازی می شود و در دمای ۲۹ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری می شوند. به منظور ایجاد شرایط بی هوازی جهت تولید اتانول از درپوش نازل دار و دارای قفل هوا جهت جلوگیری از ورود اکسیژن به داخل محفظه استفاده می شود. میزان تولید اتانول توسط جدایه خاصی با بالاترین میزان تولید جدایه های والدی مقایسه خواهد شد. جهت شناسایی فنوتیپی جدایه مخمر، آزمون های ریخت شناسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی به همراه تست های بیوشیمیایی افتراقی انجام می شود. کلنی ها پس از کشت روی محیط YPD آگار در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت از نظر ویژگی های ظاهری (رنگ، سطح، حاشیه و برجستگی) و به صورت میکروسکوپی مورد بررسی قرار می گیرند. همچنین توانایی تخمیر قندها

ساعت، در میکروپلیت هایی با ۹۶ چاهک انجام خواهد شد. به عبارتی در هر چاهک جمعیتی حاصل از جدایه های جهش یافته در شرایط تنش الکل و غلظت غیرکشنده ماده جهش زای اتیدیوم بروماید قرار گرفت و غلظت اتانول به تدریج در طول کشت های متوالی افزایش خواهد یافت. در این تحقیق، مثبت بودن رشد سلول ها و افزایش کدورت محیط کشت در هر مرحله، به عنوان پارامتر انتخابی برای انتخاب و انتقال جدایه های با تحمل بالاتر به مرحله بعد مدنظر قرار می گیرد. جمعیت مخمری با رشد مکرر در حضور اتیدیوم بروماید و غلظت بالای تنش الکل با آن خو گرفته و سازگار شده که در نهایت به تکثیر جمعیت برتر در این شرایط منجر شد و سویه های تکامل یافته به غلظت های بالاتر اتانول انتقال داده می شوند (۳۱). باتوجه به جداسازی جدایه های اولیه در غلظت اتانول ۸٪، برای شروع آزمایش های تکامل تطبیقی از غلظت اولیه ۸٪ (حجم در حجم) تا ۱۲٪ درصد (حجم در حجم) اتانول، به صورت افزایش ۰.۵٪ اتانول در هر افزایش غلظت و ۱۰ پاساژ در هر غلظت جهت اعمال تطابق کارآمدتر، استفاده شد که به طور مستقیم و بدون استریل کردن به محیط کشت اضافه شد. سپس هر میکروپلیت با فویل غشایی کاملاً محکم پوشیده شد تا از تبخیر الکل جلوگیری شود. میکروپلیت ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و دور ۷۰ rpm گرماگذاری شدند. برای جلوگیری از تبخیر محیط از بیرونی ترین ردیف های میکروپلیت استفاده نشد (۱۱ و ۱۶). رشد مثبت با توجه به خوگیری سویه ها از طریق اندازه گیری میزان کدورت در OD₆₀₀ هر ۲۴ ساعت یک بار با استفاده از دستگاه (Bio tech, USA) خوانش می شود و هر دور در صورت افزایش کدورت به مرحله بعدی پاساژ داده خواهد شد. به منظور نگهداری و حفظ تمامی رده های سلول تکامل یافته، قبل از هر بار تکرار کشت، ۰/۲ میلی لیتر از کشت قبلی به ۰/۲ میلی لیتر از محلول گلیسرول ۴۰ درصد در محیط کشت YPD تازه، اضافه و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد ذخیره سازی صورت گرفت. از تابع رشد نمایی برای محاسبه ی نرخ

شامل گلوکز، مالتوز، ساکاروز، لاکتوز و گالاکتوز بررسی خواهد شد (۳۳ و ۳۴).

ارزیابی تولید اتانول با روش تقطیر مستقیم و الکل

سنجی نمونه

پس از اتمام فرایند ۴۸ ساعت کشت بی هوازی، کل محتویات محیط کشت درون بالن تقطیر ۵۰۰ میلی لیتری تخلیه گردید و با استفاده از سیستم تقطیر شیشه‌ای، اتانول تولید شده از محیط ملاس استخراج گردید. در نهایت ۱۰۰ میلی لیتر از مایع حاصل از تقطیر به منظور اندازه‌گیری درصد اتانول در یک استوانه مدرج ریخته شد و با استفاده از الکل سنج آنالوگ درصد اتانول سنجش شد.

طراحی آزمایش به روش سطح پاسخ

از روش‌های متداول طراحی آزمون، روش سطح پاسخ برای ساخت مدل‌های تجربی استفاده می‌شود. روش سطح پاسخ مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری و ریاضیات کاربردی می‌باشد. هدف در این گونه طرح‌ها بهینه‌سازی پاسخ (متغیر خروجی) است که متاثر از چندین متغیر مستقل ورودی می‌باشد. روش سطح پاسخ برای بهینه‌سازی طرح، در کاهش هزینه روش‌های گران‌قیمت و بی‌نظمی‌های عددی مرتبط با آن‌ها کاربرد دارد (۳۵). متغیرهای میزان بریکس، غلظت سولفات آمونیوم و میزان تلقیح سویه به محیط تخمیر، پارامترهای ورودی هستند که در جدول ۱ آورده شده اند و در سه سطح وارد معادله سطح پاسخ می‌شوند. پس از وارد نمودن این اطلاعات، نرم‌افزار ۱۵ آزمایش مختلف را برای انجام آزمایش‌ها پیشنهاد نمود که همه آن‌ها در جدول ۲ آورده شده است. عموماً معادله سطح پاسخ، مدل درجه دوم کامل یا فرم کاهیده آن است. مقدار تولید الکل براساس مقادیر واقعی محاسبه شد. از نرم‌افزار Minitab 19 جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ استفاده شد.

جدول ۱. عوامل اصلی (بریکس محیط، سولفات آمونیوم، میزان تلقیح) و سطوح آن‌ها

بیشینه	کمینه	عامل
۲۶	۱۸	بریکس محیط (%)
۳۰	۱۰	سولفات آمونیوم (g/L)
۱۰ ^۹	۱۰ ^۷	میزان تلقیح (CELL/ML)

جدول ۲. آرایه‌های متعامد برای سطوح مختلف عوامل اصلی بریکس محیط، سولفات آمونیوم و میزان تلقیح

میزان تلقیح	سولفات آمونیوم	بریکس محیط	شماره آزمایش
۱۰ ^۷	۳۰	۲۲	۱
۱۰ ^۹	۱۰	۲۲	۲
۱۰ ^۸	۲۰	۲۲	۳
۱۰ ^۷	۲۰	۲۶	۴
۱۰ ^۸	۱۰	۲۶	۵
۱۰ ^۸	۲۰	۲۲	۶
۱۰ ^۷	۱۰	۲۲	۷
۱۰ ^۸	۱۰	۱۸	۸
۱۰ ^۹	۲۰	۱۸	۹
۱۰ ^۹	۲۰	۲۶	۱۰
۱۰ ^۷	۲۰	۱۸	۱۱

۱۲	۱۸	۳۰	۱۰. ^۸
۱۳	۲۶	۳۰	۱۰. ^۸
۱۴	۲۲	۳۰	۱۰. ^۹
۱۵	۲۲	۲۰	۱۰. ^۸

نتایج

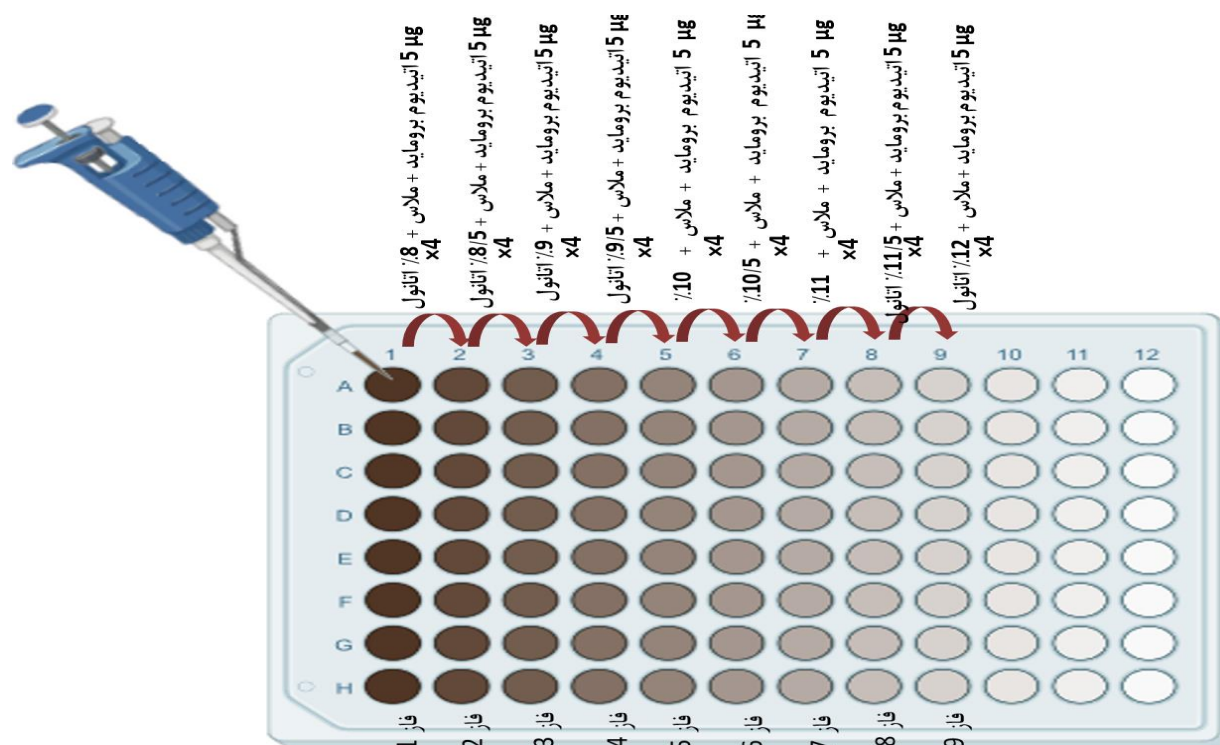
جداسازی جدایه‌های با توان تحمل غلظت‌های بالاتر اتانول

سلول‌های مخمر خمیرمایه‌های مختلف و نمونه‌های تخمیری موجود در کشور تحت تنش ثابت ۸ درصد (حجم در حجم) اتانول در محیط کشت مایع YPD قرار گرفتند و پس از ۴۸ ساعت رشد در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، کشت بر روی محیط YPDA انجام شد و مجدداً سلول‌های مخمری تحت تنش ۸ درصد اتانول قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت، کلنی‌های ۳ جدایه حاصل از غربال‌گری اولیه، تحت عنوان جمعیت اولیه و سویه‌های والدی جهت اعمال جهش‌زایی و آزمایش‌های تکامل تطبیقی بهره‌گرفته شد. جدایه‌های حاصل قابلیت تولید اتانول به طور میانگین 7 ± 0.5 درصد را در ابتدا و قبل از جهش‌زایی و اعمال مهندسی تکاملی نشان دادند.

نتایج جهش‌زایی و مهندسی تکاملی

قبل از شروع آزمایش‌های تکامل تطبیقی میزان رشد جدایه‌های ساکارومایسس سرویزیه در محیط کشت YPD دارای

۸٪ اتانول تحت ارزیابی قرار گرفت. این جدایه‌ها پس از تیمار با ماده شیمیایی اتیدیوم بروماید و اعمال جهش‌زایی، در معرض غلظت‌های مختلفی از اتانول از ۸ تا ۱۲ درصد (حجم در حجم) قرار گرفت و نرخ رشد سویه در هر یک از غلظت‌های یاد شده تعیین گردید. در این مطالعه، کلنی‌های حاصل از جهش با اتیدیوم بروماید و سویه‌ی والدی ابتدا در محیط کشت YPD کشت داده شدند و جمعیت حاصل کشت هر یک از آن‌ها که جمعیت اولیه نامیده شد، طی ۱۴۴ روز در آزمایش‌های تکامل تطبیقی در شرایط تنش اتانول قرار گرفتند. در راستای مشابه‌سازی با شرایط صنعتی در جهت انتخاب جدایه‌های برتر از لحاظ مقاومت به اتانول، از محیط کشت ملاس در آزمایش‌های تکامل تطبیقی استفاده شد. معیارمان برای گزینش جدایه برتر، توان تکثیر و رشد طی کشت‌های پی‌درپی در شرایط تنش اتانول بود. این جمعیت‌ها در محیط کشت ملاس در دو حالت کلی تنش افزایشی و ثابت در معرض اتانول قرار گرفتند؛ به‌صورتی‌که از ۸ تا ۱۲ درصد در تنش افزایشی با نرخ افزایش ۰.۵٪/اتانول و در هر پله تحت تنش ثابت به مدت ۲۰ الی ۲۴ روز و ۱۰ الی ۱۲ پاساژ در هر پله قرار گرفته سازگار شدند. در شکل ۱، طرح شماتیک آزمایش‌های فوق آورده شده است. این آزمایش به‌طوری انجام شد که در رویکرد افزایشی فرایند انتقال سویه به یک محیط تازه حاوی غلظت بالاتر اتانول زمانی صورت گرفت که نرخ رشد در غلظت قبلی برای چندین نسل ثابت باقی مانده بود. پس از بیش از ۲۰ دوره کشت که طی ۱۶۰ روز صورت گرفته بود، در رویکردی تنش افزایشی و ثابت در معرض قرار گرفتن تحت فشار انتخابی اتانول برخی از رده‌های سلولی آزمایش شده قادر به رشد در غلظت ۱۲٪ (حجم در حجم) اتانول بودند؛ درحالی‌که سویه‌ی والد قادر به رشد در این غلظت نبودند.



شکل ۱. طرح شماتیک جهش‌زایی و تکامل تطبیقی

محیط YPD آگار، کلنی‌هایی با رنگ کرم تا سفید، سطح صاف و حاشیه‌های مشخص ایجاد کرد که با ویژگی‌های شناخته‌شده ساکارومایسس سرروزیه همخوانی داشت. مشاهده میکروسکوپی سلول‌ها شکل بیضی و در حال جوانه زنی مشخص را نشان داد که بیانگر ریخت‌شناسی کلاسیک این گونه است (۳۳). در جدول ۳ آزمون‌های تخمیری نشان داد جدایه قادر به مصرف گلوکز، مالتوز، ساکاروز و گالاکتوز بوده اما لاکتوز را تخمیر نکرد؛ این الگوی متابولیکی کاملاً با مشخصات فنوتیپی ساکارومایسس سرروزیه مطابقت دارد (۳۴). نتایج فوق در مجموع تأیید می‌کند که جدایه مورد نظر از نظر فنوتیپی با ساکارومایسس سرروزیه تطابق کامل دارد و برای مطالعات بعدی مهندسی زیستی و بهینه‌سازی تولید اتانول قابل اعتماد است.

به تدریج در طول آزمایش‌های تکامل تطبیقی رشد مثبت در برخی از تکرارها مشاهده شد و بدین ترتیب به مرحله بعد تنش‌افزایی ارتقاء یافتند. در برخی از تکرارها نیز در مراحل رشد مثبت مشاهده نگردید و کاهش رشد در این کشت‌ها نشان دهنده عدم تطابق با فشار تنشی اعمال شده و در نتیجه به حذف آن‌ها از ادامه مراحل تکامل شد. بنابراین پس از چندین دوره کشت متوالی در شرایط تنش انتخابی اتانول، از بین جدایه‌های تطابق یافته با ۱۲ درصد (حجم در حجم) اتانول، یک جدایه با قابلیت تحمل و رشد در بالاترین غلظت اتانول یعنی ۱۲٪ ارتقا پیدا کرد، که این جدایه دارای حداکثر رشد مثبت به عنوان جدایه‌های منتخب پس از آزمایش تکامل تطبیقی انتخاب شد. این جدایه تحت عنوان جدایه F1 نامگذاری گردید. جدایه مورد بررسی پس از کشت روی

عدم توانایی مصرف لاکتوز	منفی	محیط حاوی لاکتوز	تخمیر لاکتوز
توانایی مصرف گالاکتوز	مثبت	محیط حاوی گالاکتوز	تخمیر گالاکتوز

جدول ۳. نتایج آزمون های فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه مخمر ساکارومایسس سروریه

میزان تولید اتانول توسط جدایه ی منتخب

برای مشخص کردن تاثیر افزایش تحمل به الکل بر میزان اتانول تولیدی در جدایه های تکامل یافته منتخب، جدایه F1، بر افزایش تولید اتانول توسط آن ها، میزان تولید اتانول هر جدایه ی تکامل یافته مشخص گردید به صورت مستقیم با روش تقطیر و اندازه گیری درصد اتانول با الکل سنج انجام گردید که در شکل ۲ نشان داده شده است. در جهت بررسی اثرات جهش بر میزان تولید اتانول جدایه ها، میزان تولید والدین میانی جدایه ی منتخب (جهش یافته های قبل از آزمایش های تکامل تطبیقی) نیز مورد بررسی قرار گرفتند. آزمون ها نیز نشان دهنده ی افزایش میزان تولید اتانول والدین میانی نسبت به سویه ی اولیه می باشد.



شکل ۲. تقطیر اتانول تولید شده با سیستم تقطیر شیشه ای

تفسیر	نتیجه مشاهده شده	ویژگی / تست انجام شده	نوع آزمون
ویژگی تیپیک ساکارومایسس سروریه	مثبت	رنگ کرم تا سفید، سطح صاف، لبه های کامل و برجسته	مشاهده ماکروسکوپی کلنی
ریخت شناسی شاخص مخمرها	مثبت	سلول های بیضوی (۵-۱۰ میکرومتر) در حال جوانه زنی	مشاهده میکروسکوپی
توانایی تخمیر گلوکز	مثبت (تشکیل حباب گاز)	محیط حاوی گلوکز با لوله دورهام	تولید گاز از گلوکز
قابلیت مصرف گلوکز	مثبت (اسیدی شدن محیط)	محیط حاوی گلوکز	تخمیر گلوکز
ویژگی خاص ساکارومایسس سروریه	مثبت	محیط حاوی مالتوز	تخمیر مالتوز
تایید هویت گونه ای ساکارومایسس سروریه	مثبت	محیط حاوی ساکاروز	تخمیر ساکاروز

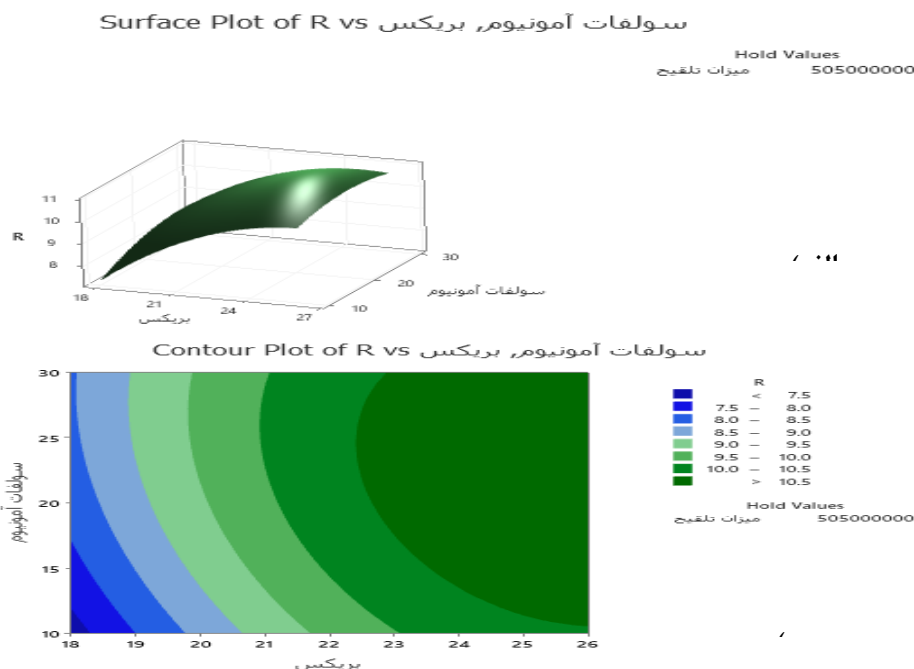
(V/V %) با در سطح صفر در نظر گرفتن متغیر دیگر نشان داده شده است. حداکثر غلظت اتانول در محدوده بریکس ۲۶٪ و 30 g/L سولفات آمونیوم مشاهده شد. شکل ۴، اثر متقابل بریکس محیط و میزان تلقیح را بر غلظت اتانول با در سطح صفر در نظر گرفتن متغیر دیگر نشان می‌دهد. همانطور که در نمودار نشان داده شده است، غلظت بهینه اتانول تحت افزایش بریکس از مقدار مرکزی محدوده آزمایش، نزدیک به ۲۶٪ و 10^9 cell/ml میزان تلقیح مشاهده شد. شکل ۵، اثر متقابل سولفات آمونیوم با میزان تلقیح را بر غلظت اتانول با در سطح صفر در نظر گرفتن متغیر دیگر نشان می‌دهد. همانطور که در نمودار نشان داده شده است، غلظت بهینه اتانول در محدوده 30 g/L سولفات آمونیوم و 10^9 cell/ml میزان تلقیح مشاهده شد. برای تایید شرایط بهینه آزمایش تایید در سه تکرار صورت گرفت. با آنالیز داده‌ها جهت بررسی رگرسیون داده‌های تجربی، مقادیر R -Squared (adj)، R -Squared (Pred) و مقدار 0.981 تاییدکننده قابل قبولی برای رگرسیون بودند. مقدار پارامتر R -sq نشان دهنده این است که بیش از ۹۸/۱ درصد داده‌های تجربی با مدل پیشنهادی قابل توصیف هستند و تنها حدود ۲ درصد خطا در پیش‌بینی داده‌ها وجود دارد.

یافته ها

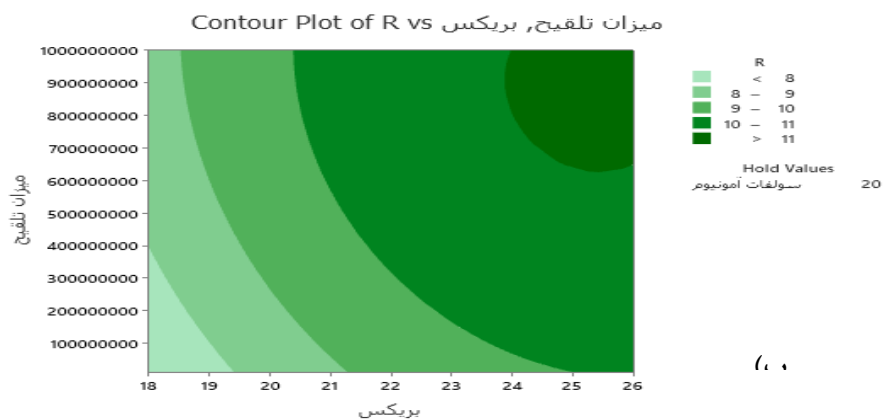
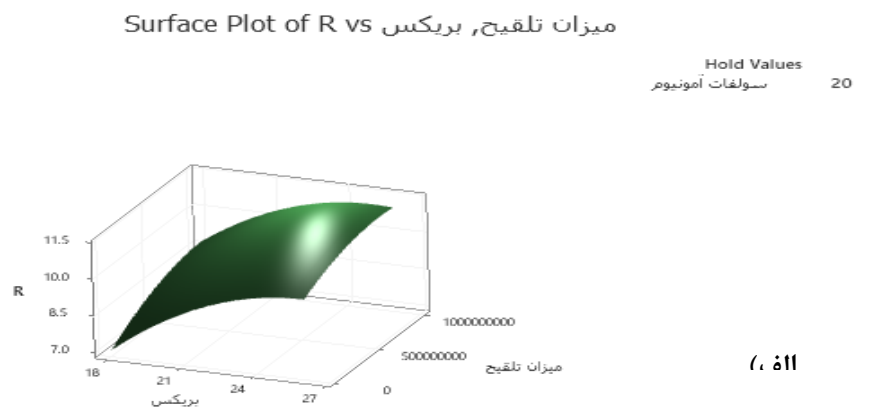
نتایج نشان داد که مقدار تولید اتانول برای جدایه تکامل یافته منتخب افزایش یافته است به طوری که بیشترین میزان تولید اتانول توسط سویه والد که قبل از انجام آزمون تکامل تطبیقی با اتیدیوم بروماید جهش و جدایه F1 منتخب به برابر با 10 ± 0.25 (حجم در حجم) اتانول تکامل یافت. بنابراین طبق این نتایج مقدار تولید اتانول با اعمال راهبردهای مهندسی تکاملی و فشار تنشی اتانول در این جدایه ۲۰٪ افزایش یافت. این داده‌ها نشان‌دهنده افزایش تحمل مخمر به اتانول می‌باشد که منجر به افزایش تولید اتانول در جدایه‌ی منتخب گردیده است.

نتایج بهینه سازی تولید اتانول به روش پاسخ سطح

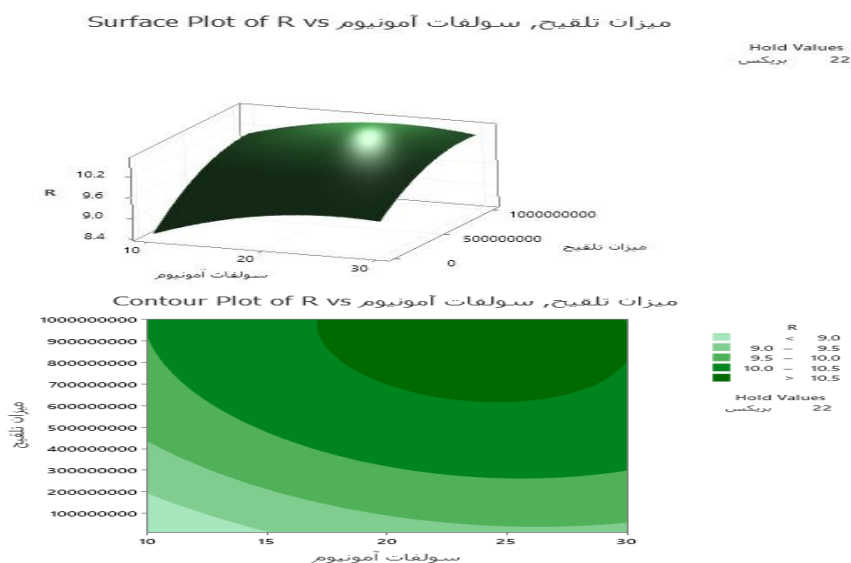
با استفاده از نمودار سه بعدی سطح پاسخ، تعامل بین دو عامل متغیر و سطوح بهینه آن‌ها به راحتی قابل درک است. در شکل ۳، اثر بریکس محیط و سولفات آمونیوم بر غلظت اتانول



شکل ۳. نمودارهای الف) سطح پاسخ و ب) کانتور، اثر بریکس محیط و سولفات آمونیوم بر غلظت اتانول ($V/V\%$) با سایر متغیرها



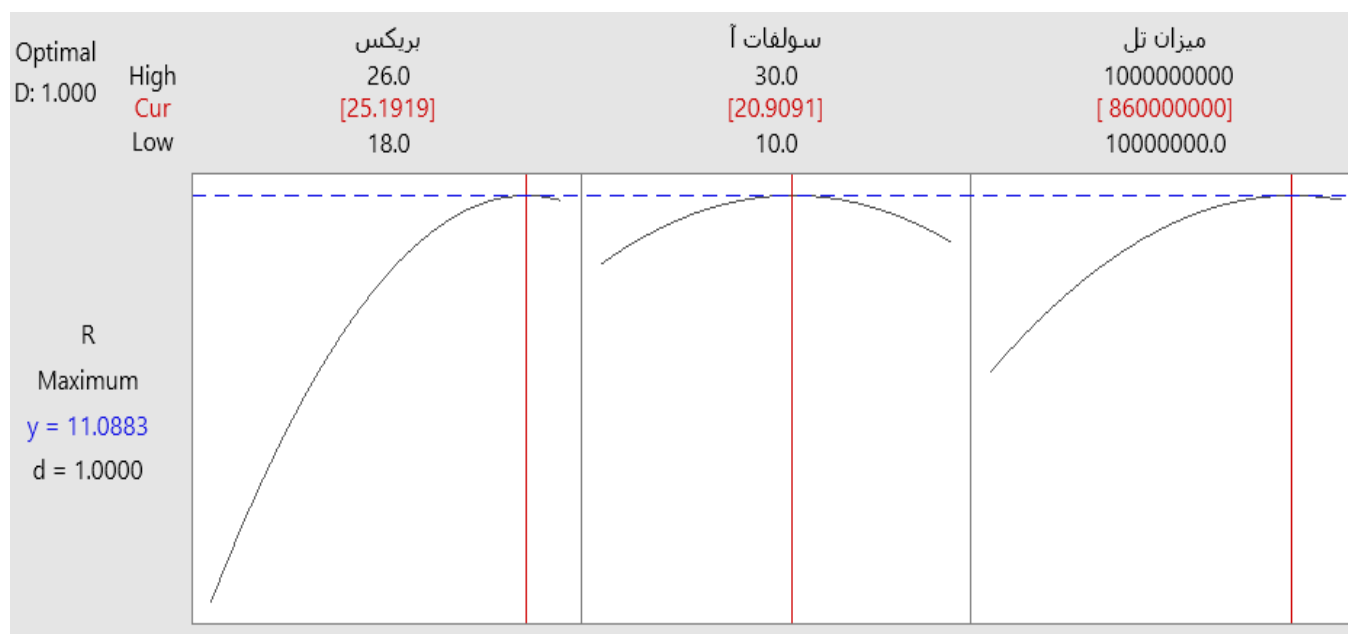
شکل ۴. نمودارهای الف) سطح پاسخ و ب) کانتور، اثر بریکس محیط و میزان تلقیح بر غلظت اتانول ($V/V\%$) با سایر متغیرها



شکل ۵. نمودارهای الف) سطح پاسخ و ب) کانتور، اثر سولفات آمونیوم و میزان تلقیح بر غلظت اتانول (v/v) با سایر متغیرها

هدف، تولید اتانول بالای ۱۰٪ است. حد پایین ۱۰٪ و حد بالایی ۱۱/۹٪ (v/v) می باشد. حداکثر پاسخ پیش بینی شده از مدل ۱۱/۰۸٪ (v/v) بود. همچنین آزمایش های مکرری جهت تأیید بهینه پیش بینی شده صورت گرفت. نتیجه حاصل از سه تکرار با مقدار پیش بینی شده منطبق بود. میانگین ۱۱٪ (v/v) بود که مدل ثابت شد. در مقایسه با محیط غیر بهینه، نزدیک به ۱۰٪ افزایش در بازده نهایی اتانول تحت شرایط بهینه آماری مشاهده شد.

مطابق شکل ۶ برای انتخاب شرایط و محدوده بهینه، مدل به طور جداگانه نیز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از گزارش اعتبارسنجی، معیارهای مورد نیاز با حداکثر اتانول به عنوان هدف انتخاب شدند. انتخاب راه حل ها نیز به طور خودکار توسط نرم افزار بازیابی شدند. هدف نهایی دستیابی به حداکثر بازده اتانول با بهینه کردن عوامل محدودکننده می باشد زیرا منبع کربن یکی از منابع غذایی پرهزینه برای تخمیر است. بنابراین بریکس ۲۵٪ ملاس انتخاب شد. سطوح سولفات آمونیوم در محدوده ۲۱ g/L و میزان تلقیح نیز در محدوده $10^7 \times 86$ cell/ml انتخاب شد.



شکل ۶. پیش بینی بهینه حالت و بیشترین درصد اتانول تولید شده توسط متد سطح پاسخ

بحث و نتیجه گیری

اتانول زیستی وجود دارد (۳۶). این بدان معناست که در هر مرحله از تولید این محصول زیستی بهبود عملکرد و بهره وری بسیار ضروری می باشد. بسیاری از این شرایط با مهندسی

باتوجه به افزایش رشد تقاضای جهانی اتانول زیستی، پاندمی اخیر COVID-19 در سراسر جهان و نیاز به تولید هرچه بیشتر اتانول در سال های اخیر، در زمان حاضر نیاز به حجم زیادی از

میکروارگانیزمها قابل برطرف شدن می باشد که با طراحی دوباره ی مسیرهای متابولیسمی منجر به افزایش سطح عملکرد و بهره وری می شود؛ درنهایت، مواد اولیه موردنیاز در مقیاس کارخانه های تولیدکننده و میزان سرمایه و هزینه های تولید کاهش می یابد (۳۷ و ۳۸). به منظور تولید کارآمد و مقرون به صرفه اتانول، تخمیر سریع لازم است؛ از این رو، سویه مخمر برگزیده شده باید دارای سرعت رشد خوب و میزان تولید اتانول در غلظت بالای اتانول باشد (۳۹). طی مطالعات متعددی که تاکنون صورت گرفته است، جهش هایی که با استفاده از مواد جهش زا در ژنوم سویه ها رخ می دهد یا جهش های خودبه خودی که از طریق انطباق تکاملی جمعیت مخمری با تنش اتانول سازگار می شوند باعث می شود که میزان رشد مخمر در تنش افزایش یابد. در واقع جهش هنگامی صورت می گیرد که مخمر در غلظت کشنده یا مهارکننده رشد اتانول قرار می گیرد و با تغییرات حاصل از جهش، بقای خود را در حدود این غلظت الکل به طور چشم گیری در مقایسه با سویه های والدی بهبود می دهد (۴۰ و ۴۱). بنابراین، رشد مخمرها در غلظت بالای اتانول به عنوان پارامتر انتخاب مناسبی برای آزمایش های تکامل تطبیقی برای صفت تحمل اتانول می باشد (۱۵). برای بررسی تأثیر افزایش تحمل به الکل بر افزایش تولید اتانول، از سنجش مستقیم تولید اتانول توسط جدایه مذکور استفاده شد. نتایج نشان دادند تحمل این سویه ها نسبت به اتانول بهبود یافته و همچنین توان تولید اتانول توسط این جدایه نسبت به سویه ی والد افزایش یافته است و علاوه بر اینکه رشد خود را در این

شرایط ادامه دادند؛ درنهایت، میزان اتانول بیشتری نیز نسبت به سویه ی والدی تولید کردند. Dinh و همکاران (۲۰۰۸) با روش ناپیوسته و با استفاده از راهبرد مهندسی تکاملی، تحمل به اتانول یکی از سویه های ساکارومایسس سرویزیه هاپلوئید آزمایشگاهی را از ۸ درصد به ۱۰ درصد ارتقا دادند (۲۶). طی مطالعه دیگری Stanley و همکاران در سال ۲۰۱۰ پس از جهش سویه ی ساکارومایسس سرویزیه W303-1A با اتیل متان سولفونات، میزان تحمل به اتانول سویه های جهش یافته و سویه ی والدی را پس از یک دوره آزمایش تکامل تطبیقی در اتانول به صورت پیوسته بررسی کردند و نشان دادند که پس از ۱۹۲ روز کشت مداوم در بیوراکتور در شرایط تنش اتانول، میزان تحمل به اتانول هر دو سویه از ۷/۵ درصد به ۹ درصد (حجم در حجم) افزایش یافته بود؛ اما میزان مصرف گلوکز در سویه ای که بدون هیچ گونه عامل جهش زایی در شرایط تنش اتانول تکامل یافته بود، نسبت به سویه ی دیگر نیز افزایش یافته بود (۴۲). Turanli و همکاران (۲۰۱۷) در مطالعه ای از اتیل متان سولفونات برای جهش زایی استفاده کردند و میزان تحمل یک سویه ی ساکارومایسس سرویزیه هاپلوئید آزمایشگاهی CEN.PK 113-7D را از ۵ درصد تا ۱۰ درصد (حجم در حجم) افزایش دادند. در ادامه نیز با روش مهندسی تکاملی تحمل به اتانول را تا ۱۲ درصد افزایش دادند و پس از آن تغییرات در تعداد کروموزوم ها در سویه های تکامل یافته را مورد بررسی قرار دادند. در تحقیق حاضر افزایش تحمل به اتانول روش تنش

افزایشی و ثابت طی ۱۴۴ روز و در کشت بسته، در میکروپلیت-های با ۹۶ چاهک و در حجم بسیار کم با غلظت‌های افزایشی ۸٪ تا ۱۰٪ صورت گرفت (۳۹). بهبود نرخ رشدی که طی روند تکاملی صورت گرفت، در مقایسه با هزینه‌های بالای کشت پیوسته و حفظ شرایط بسیار سخت این سیستم‌ها، در زمان کوتاه و با صرف هزینه بسیار کمی همراه بود. در این مطالعه تغییرات رشدی و رشد مثبت مقاوم‌ترین جدایه‌های جهش‌یافته بررسی و در نهایت به انتخاب ۱ جدایه‌ی برتر منجر شد. هم-چنین در این تحقیق از سویه والد اولیه به‌عنوان شاهد استفاده شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، می‌توان از درصدهای تعیین شده‌ی اتانول به منظور فشار انتخابی در مرحله‌ی غربالگری و همچنین در مرحله بعد از جهش و تطابق سازشی همراه با فشار انتخابی بهره‌برد. این فرایند به انتخاب جدایه‌هایی منجر شد که تحمل به اتانول در آن‌ها افزایش یافته بود. استفاده از محیط کشت ملاس تاثیر چندانی در روند بهبود مقاومت به اتانول در مقایسه با محیط آزمایشگاهی YPD نداشت. در سال ۲۰۱۲ Paradeep و همکاران مطالعه‌ای را تحت عنوان بهینه‌سازی فرایند تولید اتانول از طریق گندمیان انگشتی با استفاده از روش سطح‌پاسخ آغاز کردند. متغیرهایی که در این مطالعه بهینه شده بود عبارت بودند از: غلظت عصاره مخمر، سولفات منیزیم و pH محیط که پس از بهینه‌سازی این عوامل، غلظت اتانول به میزان ۱۳/۶۶ درصد رسید. مقادیر پیش‌بینی شده برای شرایط فرایند بهینه‌سازی شده با داده‌های تجربی هم‌خوانی خوبی داشت. تایید مدل ثابت کرد که تفاوت

معناداری بین مقادیر پیش‌بینی شده و مشاهده شده وجود ندارد (۴۳). Ratnam و همکاران در سال ۲۰۰۳ مطالعه‌ای تحت عنوان تولید اتانول از نشاسته‌ی درخت نخل در مرحله‌ی تخمیر و در غلظت‌های مختلف انجام دادند. طی این آزمایش غلظت بهینه مشخص شد و سپس بهترین شرایط تولید اتانول تخمیر به مدت زمان ۱۷ ساعت و اسیدیته ۲ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای غلظت ۱۴۰ گرم در لیتر نشاسته به‌دست آمد که این مقادیر از طریق روش سطح پاسخ به‌دست آمدند. هم-چنین غلظت بهینه مشخص شده توسط روش سطح پاسخ با توجه زمان و هزینه با روش تجربی کاملاً هم‌خوانی داشت (۴۴). Gebregergs و همکاران در سال ۲۰۱۶ مطالعه‌ای تحت عنوان تولید اتانول صنعتی از پوست موز برای کشورهای درحال توسعه و بهینه‌سازی روش از طریق سطح پاسخ را انجام دادند. در واقع آن‌ها از پوست موز جهت تولید اتانول از طریق مخمر ساکارومایسس سرویزیه بهره بردند و اثرات عوامل هیدرولیز را مورد بررسی قرار دادند و با طرح‌های سطح پاسخ ترکیبی بهینه از عوامل پیدا کردند. تجزیه و تحلیل ضریب همبستگی واریانس $R^2 = 0/865$ و R^2 تعدیل شده $= 0/9782$ بیانگر ارزیابی بسیار خوبی از داده‌های تجربی توسط مدل رگرسیون چندجمله‌ای درجه‌ی دوم می‌باشد. این مقدار همبستگی داده‌های تجربی بیانگر توانایی روش سطح پاسخ در صحت و درستی شرایط آزمایشگاهی می‌باشد (۴۵). در مطالعه فوق از پوست موز جهت تخمیر اولیه استفاده نمودند درحالی‌که در مطالعه ما از ملاس چغندر استفاده شد و ضریب همبستگی واریانس تقریباً مشابه

بود. El-Gendy و همکارانش در سال ۲۰۱۳ مطالعه‌ای تحت عنوان طراحی و بهینه‌سازی فرایند تخمیر ملاس چغندر قند توسط ساکارومایسس سرویزیه با استفاده از روش سطح پاسخ انجام دادند. از روش سطح پاسخ بر اساس طراحی مرکزی نمای کامپوزیت به‌منظور ارزیابی و بهینه‌سازی شرایط برای تولید حداکثری بیواتانول بهره برده‌شد. در این آزمایش اهمیت دوره انکوباسیون، pH اولیه، دمای انکوباسیون و غلظت ملاس در عملکرد بیواتانول مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از معادله ی مدل، تولید حداکثر اتانول در شرایط بهینه ۲۵۵ گرم در لیتر در اسیدیته ی ۵/۶ و دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد که با شرایط آزمایشگاهی آن همخوانی بالائی با مطالعه

حاضر داشت (۴۶). در هر دو مطالعه از ملاس چغندر قند به- عنوان منبع کربن استفاده شده است اما تفاوت در میزان الکلی تولید شده ناشی از تفاوت در سایر عوامل از قبیل دما و pH و... و همچنین جدایه مخمری مورد استفاده در تولید می‌باشد. در تمامی موارد ذکر شده، روش سطح پاسخ بهینه‌ترین و بهترین شرایط را برای تولید اتانول تعیین کرده و هم‌خوانی روش نتیجه تجربی با نتیجه‌ی مدل ارائه شده توسط روش سطح پاسخ تایید شده است، لذا جهت تولید بیواتانول با بالاترین راندمان و کم- ترین هزینه می‌توان از روش سطح پاسخ بهره‌برد و توصیه به استفاده از این روش در مدل‌های آزمایشگاهی می‌گردد.

منابع

1. Barnett JA, Lichtenthaler FW. A history of research on yeasts 3: Emil Fischer, Eduard Buchner and their contemporaries, 1880-1900. *Yeast*. 2001;18(4):363-88.
2. Wang F, Jiang Y, Guo W, Niu K, Zhang R, Hou S, et al. An environmentally friendly and productive process for bioethanol production from potato waste. *Biotechnol Biofuels*. 2016;9(1):50.
3. Mohseni M, Ebrahimi H. Isolation, identification and optimization of ethanol producing bacteria from *Saccharomyces*-based fermentation process of alcohol industries in Iran. *J Microb Biol*. 2013;2(7):15-28.
4. Azizi S, Tarinejad A, Pazhang M. Isolation, cloning and analysis of the hexose transporter 6 gene (*HXT6*) in a native strain of *Saccharomyces cerevisiae* IBRC-M30069. *J Microb Biol*. 2016;5(18):29-40.
5. Liu X, Xu W, Mao L, Zhang C, Yan P, Xu Z, et al. Lignocellulosic ethanol production by starch-base industrial yeast under PEG detoxification. *Sci Rep*. 2016;6(1):20361.
6. Celińska E, Borkowska M, Białas W. Evaluation of a recombinant insect-derived amylase performance in simultaneous saccharification and fermentation process with industrial yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(6):2693-707.
7. Rodionova M V, Poudyal RS, Tiwari I, Voloshin RA, Zharmukhamedov SK, Nam HG, et al. Biofuel production: Challenges and opportunities. *Int J Hydrogen Energy*. 2017;42(12):8450-61.
8. Dekker WJC, Wiersma SJ, Bouwknecht J, Mooiman C, Pronk JT. Anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* CEN. PK113-7D does not depend on synthesis or supplementation of unsaturated fatty acids. *FEMS Yeast Res*. 2019;19(6):foz060.
9. Deparis Q, Claes A, Foulquié-Moreno MR, Thevelein JM. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in

- yeast cell factories. FEMS Yeast Res. 2017;17(4):fox036.
10. Argyros DA, Stonehouse EA. Yeast train improvement for alcohol production. alcohol Textb. 2017;6:287–97.
11. Wallace-Salinas V, Gorwa-Grauslund MF. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for
12. Attfield P V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. Nat Biotechnol. 1997;15(13):1351–7.
13. Dinh TN, Nagahisa K, Hirasawa T, Furusawa C, Shimizu H. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells to high ethanol concentration and changes in fatty acid composition of membrane and cell size. PLoS One. 2008;3(7):e2623.
14. Lockshon D, Surface LE, Kerr EO, Kaerberlein M, Kennedy BK. The sensitivity of yeast mutants to oleic acid implicates the peroxisome and other processes in membrane function. Genetics. 2007;175(1):77–91.
15. Petek-Cakar Z, Turanli-Yildiz B, Alkim C, Yilmaz Ü. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. FEMS Yeast Res. 2012;12(2):171–82.
16. Fiedurek J, Skowronek M, Gromada A. Selection and adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to increased ethanol tolerance and production. Pol J Microbiol. 2011;60(1):51–8.
17. Stanley D, Chambers PJ, Stanley GA, Borneman A, Fraser S. Transcriptional changes associated with ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;88(1):231–9.
18. Caspeta L, Chen Y, Ghiaci P, Feizi A, Buskov S, Hallström BM, et al. Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. Science (80-). 2014;346(6205):75–8.
19. Zabed H, Sahu JN, Suely A, Boyce AN, Faruq G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. Renew Sustain Energy Rev. 2017;71:475–501.
20. Pradeep P, Goud GK, Reddy OVS. Optimization of very high gravity (VHG) finger millet (ragi) medium for ethanolic fermentation by yeast. Chiang Mai J Sci. 2010;37(1):116–23.
21. Springham DG, Moses V, Cape RE. Biotechnology-the science and the business. CRC press; 1999.
22. Khongsay N, Laopaiboon L, Laopaiboon P. Growth and batch ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* on sweet sorghum stem juice under normal and very high gravity conditions. 2010;
23. Fishell VK, Aberle ED, Judge MD, Perry TW. Palatability and muscle properties of beef as influenced by preslaughter growth rate. J Anim Sci. 1985;61(1):151–7.
24. Gulshan A. Bioethanol and recombinant proteins production from milk whey and molasses. 2014;
25. Antoni D, Zverlov V V, Schwarz WH. Biofuels from microbes. Appl Microbiol Biotechnol. 2007;77(1):23–35.
26. Briggs DE, Brookes PA, Stevens R, Boulton CA. Brewing: science and practice. Elsevier; 2004.
27. Atkinson AC. Optimum experimental design. In: International Encyclopedia of Statistical Science. Springer; 2011. p. 1037–9.
28. Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons; 2016.
29. Stanley D, Fraser S, Chambers PJ, Rogers P, Stanley GA. Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. J Ind Microbiol Biotechnol. 2010;37(2):139–49.
30. Baltz RH, Demain AL, Davies JE. Manual of industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology Press; 2010.
31. Ghiaci P, Norbeck J, Larsson C. Physiological adaptations of *Saccharomyces cerevisiae* evolved for improved butanol tolerance. Biotechnol Biofuels. 2013;6(1):101.
32. Sheikhi F, Rostami K, Azin M, Asadollahi M ali, Ebrahimi M, Ghiaci P. Improving Ethanol Tolerance in Industrial Yeast Strain by a Combination of Mutation and Evolutionary Engineering. J Microb Biol. 2022;11(43):13–28.
33. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification. 1983.
34. Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T. The yeasts: a taxonomic study. Elsevier; 2011.

35. Sasikumar E, Viruthagiri T. Optimization of process conditions using response surface methodology (RSM) for ethanol production from pretreated sugarcane bagasse: kinetics and modeling. *BioEnergy Res.* 2008;1(3):239–47.
36. Abuga K, Nyamweya N %J P. Alcohol-based hand sanitizers in COVID-19 prevention: a multidimensional perspective. 2021;9(1):64.
37. Winston F. EMS and UV mutagenesis in yeast. *Curr Protoc Mol Biol.* 2008;82(1):13.
38. Darvishi F, Abolhasan Moghaddami N. Isolation of industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* with high tolerance to ethanol from Iran's alcohol manufactures. *Cell Mol Res (Iranian J Biol.* 2018;31(4):500–10.
39. Turanlı-Yıldız B, Benbadis L, Alkım C, Sezgin T, Akşit A, Gökçe A, et al. In vivo evolutionary engineering for ethanol-tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* haploid cells triggers diploidization. *J Biosci Bioeng.* 2017;124(3):309–18.
40. Liao JC, Mi L, Pontrelli S, Luo S. Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(5):288–304.
41. Ding J, Huang X, Zhang L, Zhao N, Yang D, Zhang K. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;85(2):253–63.
42. Elshreef AY. Effect of molasses levels as source of energy on broiler performance. *Fac Anim Prod Univ Khartoum.* 2010;
43. Pradeep P, Sarathi Reddy OV, Rama Mohan P, Ko S. Process optimization for ethanol production from very high gravity (VHG) finger millet medium using response surface methodology. *Iran J Biotechnol.* 2012;10(3):168–74.
44. Ratnam BVV, Narasimha Rao M, Damodar Rao M, Subba Rao S, Ayyanna C. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch using response surface methodology. *World J Microbiol Biotechnol.* 2003;19(5):523–6.
45. Gebregergs A, Gebresemati M, Sahu O. Industrial ethanol from banana peels for developing countries: Response surface methodology. *Pacific Sci Rev A Nat Sci Eng.* 2016;18(1):22–9.
46. El-Gendy NS, Madian HR, Amr SSA. Design and optimization of a process for sugarcane molasses fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. *Int J Microbiol.* 2013;2013(1):815631.

تأثیر پودر والک^۱ بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میکروبی همبرگر در شرایط یخچالی

سارامتینی^{*}

^۱. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد خوی، دانشگاه آزاد اسلامی، خوی، ایران

چکیده

سابقه و هدف: امروزه با صنعتی شدن جوامع، نیاز مردم به غذاهایی که سریع آماده مصرف می شوند افزایش یافته است. یکی از محبوب ترین این غذاها، همبرگر است. بنابراین گسترش روش هایی که بتواند ماندگاری و کیفیت همبرگر را بالا ببرد، مورد توجه پژوهش های نوین است. در مطالعه حاضر به بررسی امکان استفاده از پودر والک به عنوان یک نگهدارنده طبیعی ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی برای همبرگر پرداخته شد.

مواد و روش ها: مقادیر مختلف پودر والک خشک (۱٪، ۱/۵٪، ۲٪) در تهیه همبرگر استفاده شد. سپس نمونه های تهیه شده در کیسه های پلی اتیلنی بسته بندی شدند و در دمای ۴ درجه نگهداری شدند. فاکتورهای کیفی نمونه ها در فواصل زمانی ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز ارزیابی شد.

یافته ها: نتایج نشان داد تیمارهای پودر والک در همبرگر به خصوص تیمار ۲٪ از پودر والک توانست رشد تعداد باکتری های سالمونلا و استافیلوکوکوس اورئوس به طور معنی داری کاهش دهد. همچنین استفاده از پودر والک در همبرگر سبب کاهش میزان شاخص پراکسید (PV) و میزان اسید تیوباربیتوریک (TBA) و شاخص نیتروژن فرار (TVB-N) در همبرگر در طی بیست و یک روز شود ($P<0.05$). میزان ترکیبات فنولی و پس از تیمار همبرگر با پودر والک به طور معنی داری به خصوص در تیمار ۲٪ پودر والک افزایش یافت ($P<0.05$).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج ارزیابی کیفی و میکروبی، استفاده از پودر والک در فرمولاسیون همبرگر می تواند سبب افزایش ماندگاری و خواص کیفی این محصول شود.

کلمات کلیدی: همبرگر، والک، نگهدارنده طبیعی، خواص ضد میکروبی، خواص آنتی اکسیدانی

^۱ Allium ursinum

The effect of Wild Garlic powder on physicochemical and microbial properties of hamburger under refrigerated conditions

Matini, S^{1*}

1. Department of Food Science, Khoy.C., Islamic Azad University, Khoy, Iran

Abstract

Introduction: Today, by industrialization of societies, people's need for foods that are ready to be consumed quickly has increased. One of the most popular of these foods is hamburger. Therefore, the development of methods that can increase the shelf life and quality of hamburgers is of interest to modern research. In the present study, the possibility of using Wild Garlic powder as a natural antimicrobial and antioxidant preservative for hamburgers was investigated.

Materials: In this study, different amounts of dry Wild Garlic powder (1%, 1.5% and 2%) were used in the preparation of hamburgers. Then the prepared samples were packed in polyethylene bags and kept at 4 °C. The quality factors of the samples were evaluated at time intervals of 1, 7, 14 and 21 days.

Results and Discussion: The results showed that the treatments of wild garlic powder in hamburger, especially the treatment of 2% wild garlic powder, were able to significantly reduce the growth of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* bacteria. Also, the use of wild garlic powder in hamburger caused a decrease in the peroxide value (PV), the amount of thiobarbituric acid (TBA), and the volatile nitrogen value (TVB-N) in hamburger within twenty-one days ($P<0.05$). Also, the amount of phenolic compounds and after the treatment of hamburger with wild garlic powder increased significantly, especially in the treatment of 2% wild garlic powder ($P<0.05$).

Conclusion: According to the quality and microbial evaluation results, the use of Wild Garlic powder in the hamburger formulation can increase the durability and quality properties of this product.

Keywords: hamburger, Wild Garlic, natural preservative, antimicrobial properties, antioxidant properties

مقدمه

گوشت به دلیل دارا بودن محتوای آب بالا، پروتئین های مرغوب، اسیدهای چرب چندغیراشباعی، کربوهیدرات ها، ویتامین ها، مواد معدنی و رنگدانه ها، منبع غنی از مواد مغذی محسوب می شود. همبرگرهای گوشت گاو به عنوان یکی از محبوب ترین فرآورده های گوشتی فرآوری شده در جهان، توسط طیف وسیعی از مصرف کنندگان مورد استفاده قرار می گیرند. این محبوبیت ناشی از ویژگی هایی مانند کاربردی بودن، سهولت آماده سازی، قیمت مناسب و خواص حسی مطلوب می باشد (۱). چربی ها به عنوان یکی از مهم ترین اجزای تشکیل دهنده محصولات گوشتی، مسئول ایجاد ویژگی های حسی مطلوب (عطر، رنگ و بافت) می باشند (۲). با این حال، ترکیبات مغذی موجود در گوشت آن را مستعد فساد می کند (۳). دو عامل اصلی کاهش کیفیت گوشت شامل فساد میکروبی و اکسیداسیون خودبه خودی هستند. این فرآیندها منجر به ایجاد بوها و طعم های نامطلوب و همچنین تولید مواد خطرناکی مانند گونه های فعال نیتروژن (RNS) و گونه های فعال اکسیژن (ROS) می شوند که می توانند باعث جهش زایی و تهدید سلامت انسان گردند (۴ و ۵). آنتی اکسیدان ها با جلوگیری از تشکیل رادیکال های آزاد، خنثی سازی آنها یا تسریع تجزیه شان، از آسیب بافتی پیشگیری می کنند (۶) هنگامی که تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) از ظرفیت دفاعی آنتی اکسیدانی طبیعی بدن فراتر رود، می تواند منجر به کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی شود. این وضعیت ممکن است به اجزای سلولی آسیب رسانده، پاسخ های خودایمنی مضر را تحریک نموده و استرس اکسیداتیو

و/یا نیتروژناتو ایجاد کند با این حال، آنتی اکسیدان های سنتزی در مقابله مؤثر با خطرات سلامتی ناشی از این استرس و حفظ کیفیت گوشت اکسید شده ناموفق بوده اند و این چالش همچنان برای صنعت گوشت باقی مانده است بنابراین، جستجوی منابع جدید آنتی اکسیدان های طبیعی می تواند گزینه ای پایدار برای حفظ کیفیت گوشت باشد (۷). از مهمترین میکروارگانیسم های بیماریزا (پاتوژن) در فرآورده های گوشتی بویژه آنهایی که طی تولید مکرراً با دست تماس دارند، *استافیلوکوکوس اورئوس* (عامل مسمومیت غذایی استافیلوکوکال) و *سالمونلا انتریدیس* (عامل مسمومیت غذایی سالمونلوز) می باشند که نگرانی عمده ای برای تقریباً تمامی بخش های صنعت غذا محسوب می شوند. در واقع، این میکروارگانیسم ها به عنوان عامل بیماری زای مهم در بسیاری از مشخصات تولید و خرید صنایع غذایی و همچنین در استانداردهای قوانین مرتبط با ایمنی مواد غذایی لحاظ شده است و در حال حاضر سلامت عمومی را در سراسر جهان به خطر انداخته است گسترش این قبیل بیماری های مربوط به غذا در کنار مشکلات اجتماعی و اقتصادی ناشی از آن، لزوم تولید مواد غذایی سالمتر و به تبع آن استفاده از ترکیبات ضد میکروبی جدید و تا حد امکان غیرسنتزی را مطرح نموده است (۸). در سالهای اخیر توجه به ترکیبات نگهدارنده طبیعی با منشاء مختلف بسیار افزایش پیدا کرده است، افزایش سطح آگاهی مردم نسبت به خواص سلامتی بخش این ترکیبات، آگاهی از اثرات منفی مستقیم و غیر مستقیمی که نگهدارنده های سنتزی یا شیمیایی در سلامت انسان ایجاد میکنند و می توانند عوارض جانبی متعددی داشته باشند، مصرف کنندگان و محققان را بر این داشته است که تلاش برای جایگزینی ترکیبات طبیعی به جای ترکیبات شیمیایی و سنتزی را افزایش دهند. بنابراین، استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی مانند والک در صنعت گوشت امکان پذیر و مورد پذیرش مصرف کنندگان شده است. بسیاری از آنتی اکسیدان های طبیعی برای بهبود طعم و مزه استفاده شده اند و می توانند به دلیل فعالیت ضد میکروبی خود، ماندگاری محصول را افزایش دهند (۱۰). والک یکی از گونه های سیر و به اصطلاح نوعی سیرکوهی است با نام علمی *Allium L Wild Garlic, Board- Leaved ursinum* و انگلیسی

نویسنده مسئول: گروه علوم و صنایع غذایی، واحد خوی، دانشگاه آزاد اسلامی، خوی، ایران

آدرس الکترونیک:

matinii.sara@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۲/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۲۰

گوشتی به منظور بهبود ارزش تغذیه ای و ارتقای پیامدهای مثبت سلامتی به کار گیرند. در حالی که هیچ تحقیقی در مورد استفاده از والک در همبرگرهای گوشت گاو انجام نشده است. بنابراین، هدف از این مطالعه استفاده از پودر گیاه والک برای پیشگیری یا کاهش اکسیداسیون چربی ها در همبرگرهای گوشت گاو طی نگهداری و بررسی اثر ضد میکروبی آن بر میکروب های بیماری زای منتقله از غذا (استافیلوکوکوس/اورئوس و سالمونلا/انتریدیس) بود.

مواد و روش ها

تجهیزات و لوازم آزمایشگاهی

محل انجام آزمایش

فراوری همبرگر با درصدهای مختلف والک و همچنین آزمایش های مورد بررسی در این مطالعه در آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوی مورد ارزیابی قرار گرفت.

تهیه پودر والک

مقدار یک کیلوگرم گیاه والک پس از جمع آوری و شستشو، در دمای اتاق و دور از نور خورشید به طور کامل خشک گردید. سپس توسط آسیاب برقی پودر و از الکی با مش ۴۰ عبور داده شد و برای آزمایشات بعدی در محلی تاریک، سرد و خشک نگهداری گردید. پودر حاصل شده ۲۴ ساعت قبل از مصرف در داخل زیر نور UV و داخل هود لامینار، بر روی فویل آلومینیومی پخش شد تا در صورت وجود آلودگی استریل شود.

شد. سپس غلظت های مختلف (شاهد، ۱٪، ۱/۵٪، ۲٪) از پودرهای والک استریل شده به همبرگر اضافه شد سپس همبرگرها در بسته های پلی اتیلنی در دمای یخچال به مدت ۲۱ روز نگهداری گردید. تیمارها در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. نمونه برداری در فواصل ۷ روزه انجام شد.

بعد ۶۰ سی سی متانول به آن افزوده شد. پس از ۲۴-۱۲ ساعت، ۳۶ سی سی آب مقطر به نمونه افزوده شده به مدت ۱-۲ ساعت استراحت داده شده تا ۳ فاز تشکیل شود. با دقت، ۲۰ سی سی از فاز پایین، به ارلن مایر ۲۵۰ سی سی سر سمبادهای انتقال داده، ۲۵ سی سی اسید استیک کلروفرمی (نسبت کلروفرم به اسید استیک ۳:۲) به آن افزوده گردید. سپس ۵/۰ سی سی محلول یدور پتاسیم اشباع (که به صورت تازه آماده شده و در

Garlic و از خانواده Liliaceae می باشد (۱۱). خواص بسیار زیاد والک آن را در آسیا و اروپا بسیار محبوب کرده است والک به دلیل فرمول ساختاری غنی به عنوان یک گیاه دارویی استفاده می شود و به دلیل داشتن ترکیبات فنولی فراوان، خواص آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریال قوی دارند. علاوه بر وجود قابل توجه ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، مقادیر کمتری از سایر ترکیبات فعال زیستی نیز شامل گلیکوزیدهای استروئیدی، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب، لسیتین و اسانس های فرار وجود دارد که این ترکیبات می توانند در کاهش استرس اکسیداتیو، محافظت از سلول ها در برابر آسیب های شیمیایی و حفظ سلامت بافت های متابولیک و توانایی مهار رشد باکتری ها نقش داشته باشند (۱۳ و ۱۲) و همچنین از ترکیبات متعدد سولفور مانند آمینواسیدهای گوگرددار، آلئوسین و ترکیبات آزاد دیگر مانند دی وینیل سولفور، دی متیل تیوسولفونات و همچنین سرشار از ویتامین های A, B, C و مواد معدنی متعدد مانند ژرمانیوم، منگنز، گوگرد، کلسیم، سلنیم و روی تشکیل شده است. ترکیبات حاوی سولفور و خواص ضد عفونی کنندگی، ضد باکتریایی، ضد انگلی، ضد قارچی والک از نظر مقاصد آشپزی و دارویی به کار می رود و همچنین کیفیت طعم و مزه عالی آن باعث می شود از آن به عنوان ادویه نیز در غذاها استفاده کرد (۱۵ و ۱۴). با این حال، والک به طور معمول در محصولات غذایی استفاده نمی شوند. این مطالعه می تواند به صنایع غذایی کمک کند تا والک را در محصولات معمولی مانند فرآورده های

تهیه نمونه همبرگر

نمونه های همبرگر بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲۳۰۴ در شرایط آزمایشگاهی تولید شد (۱۶). به این ترتیب که گوشت چرخ شده گوسفندی خریداری شده و در مجاورت یخ و در شرایط استریل با پیازهای رنده شده مخلوط گردید. نمک به همراه آرد با نسبت مشخصی با گوشت و پیاز به مخلوط اضافه

آزمایش های شیمیایی

اندازه گیری PV

برای تعیین مقدار پراکسید ابتدا ۱۵ گرم از گوشت چرخ کرده مورد استفاده در همبرگر را که خوب میکس شده بود، در دکانتور ۵۰۰ سی سی قرار داده، سپس ۳۰ سی سی کلروفرم به آن افزوده و کمی تکان داده مجدداً، ۳۰ سی سی کلروفرم و

مقطر ۲، قطره اکتانول (به عنوان ضد کف) و تعدادی ساچمه شیشه ای (یا سنگ جوش به منظور بهتر صورت گرفتن انتقال حرارت و به دام افتادن حباب های حاصل از عمل جوش در داخل فضای متخلخل و محبوس شده ی آن و جلوگیری از پریدن مایع) نیز به محتویات بالن افزوده شده است. سپس سیستم کلدال نصب شده و در زیر لوله خروجی سیستم، ارلنی ۵۰۰ سی سی حاوی ۲۵ سی سی اسیدبوریک ۲٪ دارای ۳-۲ قطره معرف متیل رد قرار گرفته به طوریکه سر لوله خروجی کاملاً درون محلول ارلن قرار گیرد. سپس گازهایی که معرف بازهای از ته فرار پس از برقرای جریان آب سرد و روشن شدن هیتر متصاعد شده، که به صورت تغییر رنگ محلول از ارغوانی به زرد نمایان می گردد. که در نهایت این محلول با اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال تیتتر شده تا محلول مجدداً ارغوانی شود و سپس با استفاده از رابطه زیر بر حسب میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت محاسبه گردید (۱۹).

$$TVB-N = \text{حجم اسید سولفوریک مصرفی} \times 14$$

اندازه گیری مقدار فنول کل

میزان ترکیبات فنولی کل در پودر والک با کمک روش فولین سیوکالتو اندازه گیری شد و نتایج به دست آمده بر حسب میلی گرم اسید گالیک در گرم ارائه گردید. ابتدا مقدار ۱ میلی لیتر از عصاره پودر والک، ۱ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتوی ۱۰ برابر رقیق شد و به آن ۱ میلی لیتر محلول سدیم کربنات (۵٪) و ۱ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. جذب مخلوط در دمای اتاق و طول موج ۷۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و محتوای فنول کل با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید تعیین شد (۲۰).

فعالسازی سویه های میکروبی استافیلوکوکوس و سالمونلا

آمپول لیوفیلیزه حاوی سویه استاندارد/ستافیلوکوکوس/اورئوس و سالمونلا را طبق دستورالعمل شرکت سازنده از محل بالای توده پنبه خراش داده شده، سپس اطراف آمپول با گاز استریل

تاریکی قرار گرفته و ۳۰ سی سی آب مقطر به محتویات ارلن اضافه شد، درب آن را گذاشته، به مدت ۱ دقیقه در تاریکی استراحت داده شده و بعد مقدار ۰/۵ سی سی معرف نشاسته ۱٪ به آن افزوده می شود و درب ارلن را گذاشته، محلول به شدت تکان داده شده است. ید آزاد شده، باعث تغییر رنگ محلول شده که با محلول تیوسولفات ۰/۰۱ نرمال، تا بیرنگ شدن محلول یا ظهور رنگ شیری و شفاف شدن فاز بالایی روغن تیتتر شده و در نهایت با استفاده از رابطه زیر، میزان پراکسید بر حسب میلی اکسی والان پراکسید در یک کیلوگرم چربی محاسبه گردید (۱۷).

$$PV = \frac{1000 \times \text{نرمالینه} \times \text{حجم مصرفی تیوسولفات}}{\text{وزن نمونه}}$$

اندازه گیری TBA

برای اندازه گیری TBA ابتدا ۲۰۰ میلی گرم از نمونه گوشت میکس شده همبرگر را، به بالن ۲۵ سی سی انتقال داده، و با ۱- بوتانول به حجم رسانده و ۵ سی سی از این محلول را به لوله فالکون خشک دربدار انتقال داده سپس ۵ سی سی معرف TBA (که از انحلال ۲۰۰ میلی گرم پودر TBA در ۱۰۰ سی سی حلال ۱- بوتانول و صاف کردن بوسیله کاغذ صافی به دست آمده) به آن افزوده شده است. سپس لوله ها در بن ماری با دمای °C ۹۵، به مدت ۲ ساعت قرار گرفت. و در دمای محیط سرد و سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب آنها (As) در ۵۳۰ نانومتر در مقابل شاهد آب مقطر (Ab) خوانده شد. با استفاده از رابطه زیر، میزان TBA (بر حسب میلی گرم مالون دی آلدئید در هر کیلوگرم از بافت همبرگر) مورد محاسبه قرار گرفت (۱۸).

اندازه گیری TVB-N

ابتدا ۱۰ گرم از گوشت میکس شده ی همبرگر و ۲ گرم اکسید منیزیم در یک بالن کلدال توزین شد. سپس ۳۰۰ سی سی آب

آزمون های میکروبی

سویه میکروبی مورد مطالعه: /ستافیلوکوکوس/ اورئوس استاندارد ATCC-25923 و /سالمونلا/ تریکا سروتیپ تیفی موریوم استاندارد ATCC-13076 مورد نیاز جهت افزودن به همبرگر، بصورت آمپول لیوفیلیزه از کلکسیون میکروبی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی با غلظت استاندارد (۰/۵) مک فارلند

هدف آن ایجاد تراکم باکتریایی مشخص برای همسان سازی شرایط آزمون که این غلظت معادل تقریباً 1.5×10^8 CFU/ml باکتری زنده است. برای این کار از کشت ذخیره (ساب ماستر) به محیط کشت آگار شیبدار مغذی برای هر دو باکتری (به صورت جداگانه) تلقیح انجام شد. محیط های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار می گیرد تا کلونی های تازه رشد کنند. کلونی های رشد یافته سطح آگار با محلول نرمال سالین ۰/۹٪ شسته شدند. با این عمل، یک سوسپانسیون غلیظ از سالمونلا و استافیلوکوکوس (به صورت جداگانه) به دست آمد که حاوی میکروارگانیسم هایی در فاز رشد فعال هستند. مقدار کمی از این سوسپانسیون غلیظ با استفاده از پمپ پاستور استریل داخل لوله های استریل در پیچ دار ریخته شد. سپس با افزودن محلول نرمال سالین، سوسپانسیون رقیق گشت. کدورت حاصل با استاندارد ۰.۵ مک فارلند مقایسه می شود و تا رسیدن به تراکم حدود 1.5×10^8 CFU/ml باکتری تنظیم شد. این مرحله با دستگاه اسپکتروفتومتر (در طول موج مناسب، معمولاً ۶۰۰ نانومتر) یا مقایسه چشمی انجام پذیرفت (۲۳). سپس با انجام محاسبات لازم مشخص گردید که برای رسیدن غلظت نهایی استافیلوکوکوس / اورئوس و سالمونلا به 5×10^5 cfu/g، به ۶ میلی لیتر از سوسپانسیون فوق نیاز است. سپس بلافاصله مقدار ۱۲۰۰ گرم همبرگر با ۶ میلی لیتر سوسپانسیون حاوی استافیلوکوکوس و سالمونلا (به طور جداگانه) مخلوط گردید. در مرحله بعد تحت شرایط استریل، ۱۰ نمونه ۲۰ گرمی از مخلوط حاصل درون ظروف پلاستیکی استریل توزین شده و بعنوان شاهد انتخاب گردیدند. سپس ۲۴۰ گرم از مخلوط همبرگر آلوده توزین و به آن ۲ گرم پودر خشک والک اضافه و به طور کامل مخلوط گردید (نمونه ۱ درصد) و سایر تیمارها نیز به همین ترتیب با افزودن ۳ گرم (نمونه ۱/۵ درصد) و ۴ گرم (نمونه ۲ درصد) پودر به آنها آماده شده و پس از توزین در اندازه نمونه های ۲۰ گرمی، در ظروف پلاستیکی مورد نظر پر و در شرایط یخچالی نگه داده شدند. در دوره های زمانی روز اول، هفتم، چهاردهم و بیست و یکم از هر تیمار ۲ نمونه گرفته شد و به

مرطوب شده با الکل ۷۰ درجه کاملاً ضد عفونی گردید. آمپول احاطه شده توسط گاز استریل، از محل خراش شکسته شد. توده پنبه به کمک یک پنس استریل خارج شده، تحت شرایط استریل در زیر هود و به کمک پمپ پاستور استریل ۰/۵ تا ۱ میلی لیتر از محیط کشت مایع استریل تریپتون سویا برات (TSB) برای استافیلوکوکوس و مایع استریل برین هرت اینفیوژن برات (BHI) برای سالمونلا (Merck) به ماده خشک موجود در آمپول اضافه و پس از یکنواخت شدن، سوسپانسیون میکروبی حاصل شد. سوسپانسیون های حاصل توسط آنس استریل مخلوط شده و مقداری از آن جهت تهیه کشت مادر روی محیط آگار مغذی (Difco, Laboratories, Detroit, MI) منتقل و کشت انجام گردید. سپس برای رشد استافیلوکوکوس / اورئوس و سالمونلا، محیط های کشت حاوی میکروب به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. بعد از این مدت، از کشت مادر رشد یافته، کشت دیگری روی آگار مغذی به عنوان کشت ذخیره تهیه شد و در مراحل بعدی استفاده گردید (۲۱).

تهیه محلول استاندارد ۰/۵ مک فارلند

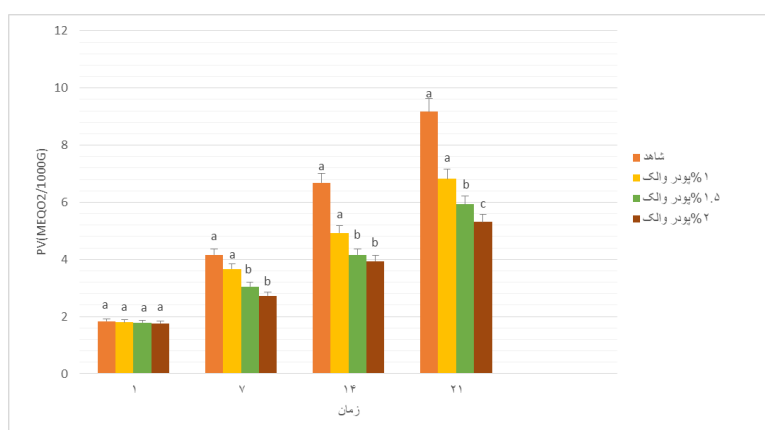
یکی از روش های تعیین تعداد باکتریها در محیط مایع، روش شمارش غیر مستقیم است. در روش کدورت سنجی که یکی از معمولترین روش های شمارش غیر مستقیم است، کدورت محیط مایع که باکتری در آن رشد کرده است، با یک استاندارد که کدورت آن با تعداد معینی باکتری متناسب است، مقایسه میشود. کدورت استاندارد را می توان بوسیله مخلوط مقادیر مشخصی از مواد شیمیایی ایجاد نمود که یک نمونه از آن سولفات باریوم است که شدت آن توسط مک فارلند با تعداد تقریبی باکتریها ارزیابی شده است (۲۲). استانداردهای مک فارلند با افزودن حجم خاصی از محلول اسید سولفوریک ۱٪ و کلرید باریوم ۱/۷۵٪ برای بدست آوردن یک محلول سولفات باریوم با دانسیته نوری خاص تهیه می شوند و معمولاً استاندارد ۰/۵ مک فارلند که از افزودن ۹/۹۵ میلی لیتر اسید سولفوریک خالص ۱٪ حجم به حجم به ۰/۰۵ میلی لیتر کلرید باریوم حاصل می شود، بیشتر کاربرد دارد (۲۳).

شمارش و شناسایی میکروارگانیسمها از کلنی کانترو ISO 6579 برای سالمونلا و ISO 6888 برای استافیلوکوکوس اورئوس استفاده شد (۲۴ و ۲۵).

آزمون های شیمیایی

نتایج میزان PV

بررسی PV در همبرگرهای تیمار شده با درصدهای مختلف پودر والک در روزهای تیمار تفاوت معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$). بیشترین PV مشاهده شده در گروه شاهد در روز بیست و یک ($9/17 \pm 0/14$) و کمترین میزان PV مشاهده شده در گروه همبرگرهای تیمار شده با ۲٪ پودر والک در روز اول ($1/0 \pm 0/14$) مشاهده شد ($P < 0.05$).



شکل ۱. نمودار تغییرات میزان PV در طول زمان

بررسی میزان TBA در همبرگرهای تیمار شده با والک نشان داد که تفاوت معنی داری بین روزهای تیمار و دوزهای مختلف والک از نظر میزان TBA وجود دارد ($P < 0.05$). تیمار دوزهای ۱/۵ تا ۲٪ والک سبب کاهش معنی دار میزان TBA در همبرگر شد که کاملاً وابسته به دوز استفاده شده والک بود ($P < 0.05$) (شکل ۲). بیشترین میزان TBA در تیمار شاهد در روز بیست و یک ($3/94 \pm 0/12$) و کمترین میزان TBA در تیمار ۲٪ والک در روز اول ($0/560 \pm 0/02$) مشاهده شد (شکل ۲).

منظور اندازه گیری رشد / استافیلوکوکوس / اورئوس و سالمونلا، در محیط های برد پارکر آگار و سالمونلا-شیگلا آگار به ترتیب کشت سطحی و مخلوط انجام گردید و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. به منظور

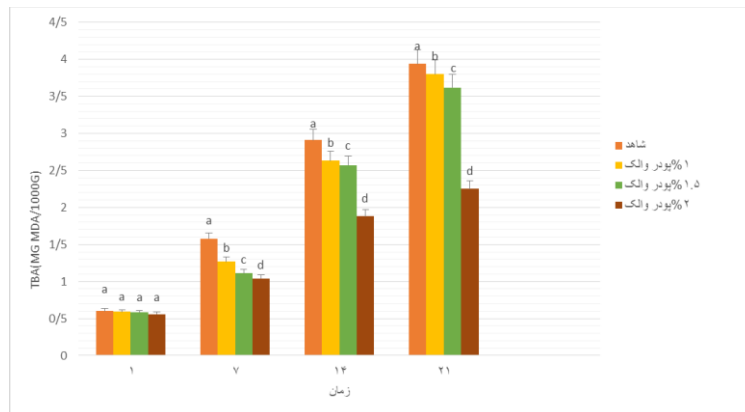
آنالیز آماری

مطالعات کتابخانه ایی و آنالیزهای آماری در همه آزمایشات با سه تکرار انجام شد. از طرح آنالیز واریانس دو طرفه برای تحلیل نتایج استفاده و مقایسه میانگین ها با کمک آزمون دانکن انجام می شود. سطح معنی داری ۹۵٪ در نظر گرفته خواهد شد. تجزیه و تحلیل داده در نرم افزار spss ورژن ۲۱ و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excell (۲۰۱۳) انجام شد.

نتایج و بحث

گیاهان دارویی حاوی مواد زیست فعالی مانند فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، تانن ها و ترپنوئیدها هستند که دارای خواص آنتی باکتریال و آنتی اکسیدانی هستند (۲۶) وجود رابطه مثبت بین ترکیبات فنولی و خاصیت اکسیدانی و توانایی شکستن رادیکالهای آزاد، افزایش درصد پودر والک باعث کند شدن افزایش عدد پراکسید می شود (۲۷). میزان مجاز پراکسید در فرآورده های گوشتی برای مصرف انسانی ۵ است (۲۸).

نتایج میزان TBA

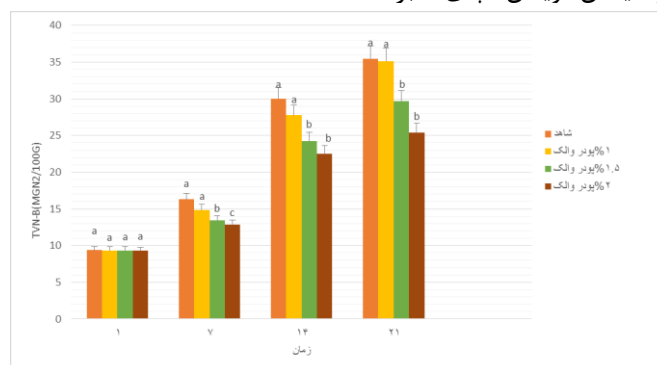


شکل ۲. نمودار تغییرات میزان TBA در طول زمان

مریم گلی و برگ بود بر تغییرات اکسیداسیون همبرگر ماهی سبب کاهش معنی دار اکسیداسیون چربی ها شد. آنها وجود ترکیبات فنولی بالا را در این گیاهان یکی از علت های کاهش اکسیداسیون چربی ها عنوان کردند (۳۱). در مطالعه متینی و خوشبخت نژاد (۲۰۲۵) با افزایش درصد پودر دارچین در همبرگر میزان PV و TBA کاهش یافت (۳۲).

نتایج میزان TVB-N

نتایج حاصل از بررسی میزان TVB-N نشان داد که تیمار دوزهای متفاوت والک از روز ۱ تا ۲۱ سبب تغییر معنی دار میزان TVB-N در همبرگرها شد ($P < 0.05$). تیمار درصدهای ۱/۵ تا ۲٪ از والک در همبرگرها سبب کاهش معنی داری در میزان TVB-N در همبرگر گردید ($P < 0.05$) (شکل ۳).



شکل ۳. نمودار تغییرات میزان TVB-N در طول زمان

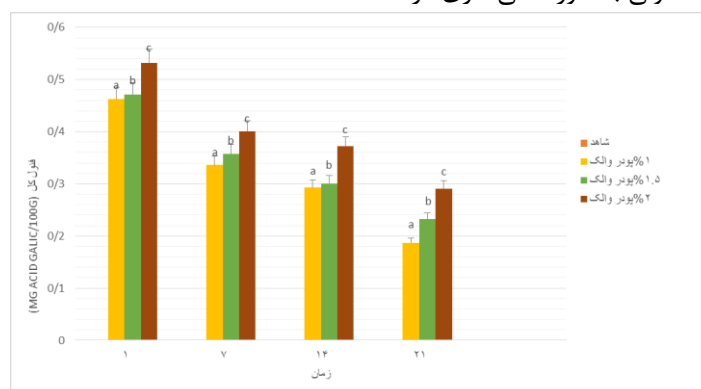
فرار نیتروژنی مرتبط با فساد غذایی است (۳۳). افزایش ترکیبات فنولی و تاثیر آنها بر مکانیسم ضد میکروبی به دلیل داشتن گروههای هیدروکسیل باعث کاهش TVB-N می شود. در مطالعه مختاریان و همکاران (۲۰۲۱) نیز درصدهای مختلف عصاره گیاه بره موم در همبرگر ماهی سبب کاهش میانگین شاخص TVB-N در همبرگرها شد (۳۴).

نتایج میزان فنول کل

افزایش میزان TBA تیمارها در طول دوره را می توان به اکسیداسیون چربی و تولید ترکیبات فرار در حضور اکسیژن نسبت داد (۲۹). پایداری مواد غذایی و گسترش ماندگاری همبرگر در کیفیت این فراورده غذایی بسیار اهمیت دارد. از جمله مهم ترین عوامل کنترل کننده کیفیت مواد غذایی حاوی روغن بالا نظیر همبرگر، کنترل فرآیند اکسیداسیون چربی است تا پایداری اکسیداتیو و ماندگاری قابل قبولی طی دوره زمانی مشخص داشته باشند (۳۰). با توجه به نتایج به دست آمده، کاهش میزان شاخص پراکسید PV و شاخص اسید تیوباربیتوریک (TBA) در همبرگرها پس از اضافه کردن پودر والک بیانگر پایداری بهتر این محصول است. نظیر نتایج مشاهده شده در مطالعه حاضر، در مطالعه Ozogul و Uçar (۲۰۱۳) تاثیر غلظت های ۰/۳ و ۰/۶ پودر گیاهان آویشن، چای سبز،

با توجه به نتایج، در تمامی روزها بیشترین مقادیر بازهای نیتروژنی فرار در تیمار شاهد مشاهده شد و با افزایش درصد پودرها، مقادیر بازهای نیتروژنی فرار کاهش یافت. TVB-N یک اصطلاح کلی است که شامل اندازه گیری تری متیل آمین ناشی از فساد باکتریایی، دی متیل آمین تولید شده به وسیله آنزیمهای اتولیتیک طی نگهداری، آمونیاک ناشی از آمین زدایی آمینواسیدها و کاتابولیت های نوکلئوتیدی و دیگر ترکیبات بازی

گروه های مختلف تیمار همبرگر افزایش نشان داد ($P<0.05$) (شکل ۴). بیشترین میزان ترکیبات فنولی در همبرگرها روز اول تیمار ۲٪ پودر والک (0.532 ± 0.01) مشاهده شد.



شکل ۴. نمودار تغییرات میزان فنول کل در طول زمان

دار ترکیبات فنولی در همبرگر شد (۴). در مطالعه Rounds و همکاران (۲۰۱۳) اضافه کردن پودر پیاز به همبرگر گوشت گاو سبب افزایش معنی دار ترکیبات فنولی موجود در همبرگر و کاهش معنی دار شاخص های اکسیداسیون چربی شد (۳۶).

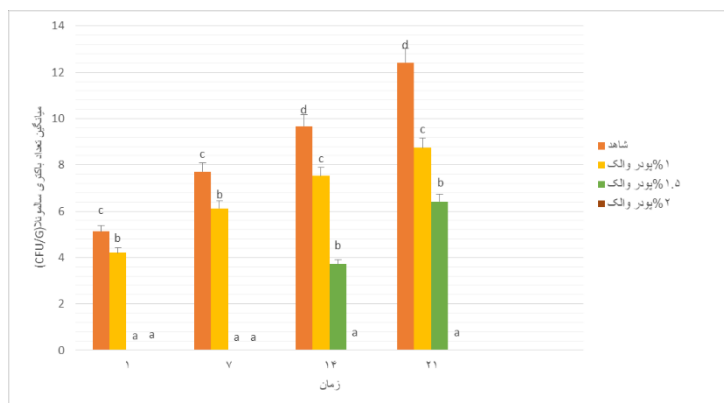
بررسی نتایج ترکیبات فنولی کل نشان داد که تفاوت معنی داری در میزان این ترکیبات در همبرگرها پس از تیمار با درصد های مختلف پودر والک وجود داشت ($P<0.05$). میزان ترکیبات فنولی در گروه شاهد در همه روزهای تیمار صفر بود و با افزایش درصد پودر والک، میزان ترکیبات فنولی به طور معنی داری در

بالا بودن ترکیبات فنولی دلیل عمده بالا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی پودر والک می باشد. ترکیبات فنولی خاصیت آنتی اکسیدانی بسیار قوی دارد و سبب جذب رادیکالهای آزاد می شوند (۳۵). در مطالعه متینی و درستی (۲۰۲۳) نیز اضافه کردن عصاره زالزالک به همبرگر گوشت گاو سبب افزایش معنی

شمارش تعداد باکتری سالمونلا

ممانعت از سنتز DNA و پروتئین ها و نیز ممانعت از سنتز لیپیدها می باشد (۳۷). در مطالعه دیگری که توسط Chen و همکاران (۲۰۲۱) انجام شده بود مشخص شد که عصاره زیتون، عصاره سیب، روغن پونه کوهی و روغن دارچین اضافه شده به گوشت خوک چرخ شده سبب کاهش معنی دار تعداد باکتری های سالمونلا به خصوص در روزهای ۳ تا ۷ شد (۳۸).

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد پودر والک تاثیر معنی داری بر میزان رشد باکتری سالمونلا دارد ($P<0.05$) (شکل ۵). بیشترین میزان رشد باکتری سالمونلا برابر $12/42 \pm 0/58$ مربوط به نمونه شاهد و کمترین میزان رشد مربوط به نمونه حاوی ۲ درصد پودر والک در تمام زمان نگهداری بوده است. مکانیسم ممانعت ترکیبات فنولی از رشد سالمونلا به علت تاخیر یا

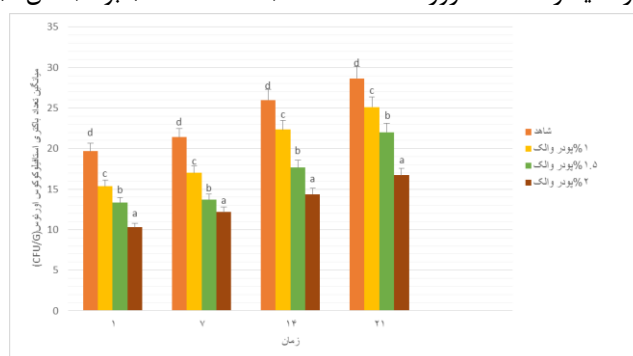


شکل ۵. نمودار تغییرات تعداد باکتری سالمونلا در طول زمان

شمارش باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

بر اساس نتایج اختلاف معنی داری بین تیمارها وجود دارد ($P < 0.05$) (شکل ۶). نتایج نشان داد که بیشترین مقدار باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس در تیمار شاهد روز ۲۱ (28.0 ± 10) بود (شکل ۶).

و کمترین تعداد باکتری رشد یافته استافیلوکوکوس اورئوس در تیمار ۱/۵٪ واک بود (شکل ۶).



شکل ۶. نمودار تغییرات تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در طول زمان

ضدباکتریایی سیر را به اثرات ترکیبات گوگرددار گیاه (آلیسین) بر سنتز DNA و پروتئین پروکاریوت نسبت داد (۴۰). در مطالعات دیگر روی عصاره کلم، اثر ضدباکتریایی آن بر استافیلوکوکوس اورئوس به دلیل محتوای بالای اسید فنولیک آن گزارش و نتایج مشابهی به دست آمد (۴۱).

ترکیبات فنولی موجود در گیاهان غشای خارجی میکروارگانیسم‌ها را تخریب کرده و سبب خروج لیپوساکاریدها و افزایش نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی به ATP می‌شود. خروج ATP منجر به تمام شدن ذخیره انرژی سلول و مرگ آن می‌شود (۳۹). درسه و همکاران در سال ۲۰۱۰ فعالیت

بحث و نتیجه گیری

ایده این پژوهش بر بهره‌گیری از خاصیت فیزیوشیمیایی و ضد میکروبی پودر واک (Wild Garlic) با مقادیر ۱ تا ۲ درصد برای حفظ کیفیت همبرگر گوشت گاو در شرایط نگهداری ۲۱ روزه در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) استوار بود. نتایج تجزیه و تحلیل شیمیایی همبرگرهای تیمار شده با پودر واک

نشان داد که میزان شاخص های اکسیداسیون چربی (PV و TBA و TVB-N) به صورت معنی داری کاهش یافت در حالیکه میزان ترکیبات فنولی افزایش معنی داری داشت. نتایج نشان داد که پودر واک به دلیل داشتن خواص ضد میکروبی می‌تواند مانع از رشد باکتری های پاتوژن نظیر باکتری های

می شود از پودر والک به عنوان افزودنی غذایی در غذاهای فراسودمند برای افزایش ماندگاری آنها استفاده شود.

پیشنهادهات

تحقیقات آینده می تواند بر ترکیب پودر والک با ادویه های دیگر غنی از آنتی اکسیدان ها و آنتی باکتری های طبیعی و همچنین تاثیر استفاده از پودر والک در همبرگر بر خواص حسی و کیفی آن به منظور افزایش پذیرش کلی محصولات متمرکز شود.

سالمونلا انتریدیس و استافیلوکوکوس اورئوس در همبرگر شود. مقدار تیمار ۲٪ بیشترین تاثیر ضد میکروبی را نشان داد. با توجه به تأکید سازمان بهداشت جهانی استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی و نتایج حاصل از این پژوهش، می توان استفاده از پودر والک بعنوان یک افزودنی طبیعی با خاصیت ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی به عنوان جایگزینی برای آنتی اکسیدان ها و آنتی باکتریال های صنعتی جهت دستیابی به محصولات با ارزش تغذیه ای بالا در مواد غذایی مورد بررسی بیشتری قرار داد که علاوه بر کاهش بار میکروبی، سبب افزایش پایداری اکسیداسیونی و نیز بهبود سایر ویژگی های تغذیه ای محصول می گردد. در نتیجه، توصیه

منابع

- Alqahtan, N. K., Makki, H. M., Mohamed, H. A., Alnemr, T. M., Al-Senaen, W. A., Al-Ali, S. A., & Ahmed, A. R. (2022). The potential of using bisr date powder as a novel ingredient in beef burgers: The effect on chemical composition, cooking properties, microbial analysis, and organoleptic properties. *Sustainability*, 14(21), 14143.N.##
- Baer, A. A., & Dilger, A. C. (2014). Effect of fat quality on sausage processing, texture, and sensory characteristics. *Meat Science*, 96(3), 1242–1249##
- Olvera-Aguirre, G., Piñeiro-Vázquez, Á. T., Sanginés-García, J. R., Sánchez Zárate, A., Ochoa-Flores, A. A., Segura-Campos, M. R., Vargas-Bello-Pérez, E., & Chay-Canul, A. J. (2023). Using plant-based compounds as reservatives for meat products: A review. *Heliyon*, 9(6), e17071.. ##
- S. Matini, V. Dorosti,. Antibacterial effect of Hawthorn extract on Hamburger. *FSCT* 2023; 20 (134):193-200##
- Estévez, M. (2021). Critical overview of the use of plant antioxidants in the meat industry: Opportunities, innovative applications and future perspectives. *Meat Science*, 181, 108610.##
- Ribeiro, J. S., Santos, M. J. M. C., Silva, L. K. R., Pereira, L. C. L., Santos, I. A., da Silva Lannes, S. C., & da Silva, M. V. (2019). Natural antioxidants used in meat products: A brief review. *Meat Science*, 148, 181–188##
- Falowo, A. B., Fayemi, P. O., & Muchenje, V. (2014). Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International* (Ottawa, Ont.), 64, 171–181.##
- Rasooli, B. 1999. Study of antimicrobial activity of tyme, mint, sumac and wild garlic by in vitro

- method. Msc Thesis of Urmia university.##
9. BELL, C. and KYRIAKIDES, A. 2002. Salmonella: A Practical Approach to the Organism and Its Control in Foods, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, GB.##
10. Pires, M. A., Munekata, P. E. S., Villanueva, N. D. M., Tonin, F. G., Baldin, J. C., Rocha, Y. J. P., Carvalho, L. T., Rodrigues, I., & Trindade, M. A. (2017). The antioxidant capacity of rosemary and green tea extracts to replace the carcinogenic antioxidant (BHA) in Chicken Burgers. Journal of Food Quality, 2017(1), 1–6##
11. Jazayeri, G. A. 1932. The Language of Food, printed and bound by Sepehr Printing House, Tehran, Volume 1, page 182. ##
12. M Krivokapic, V. Jakovljevic, M. Sovrljic, J. Bradic, A. Petkovic, I. Radojevic, S. Brankovic, L. Comic, M. Andjic, A. Kocovic and M. Tomovic. 2020. BIOLOGICAL ACTIVITIES OF DIFFERENT EXTRACTS FROM ALLIUM URSINUM LEAVES. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, 77(1) 121-129##
13. Samiei, A. Tabatabaei-Yazdi, F. Mazaheri Tehrani, M. (2018). An investigation into the antioxidant activity, phenolic compounds, antimicrobial effect and interaction of the essential oils of Curcuma longa and Ocimum basilicum on some pathogenic bacteria. JFST No. 74, Vol. 15. 99-107##
14. Kesik, T. Blazewicz, M. Michnowski, A. Michowska, A (2011) Influence of mulching and nitrogen nutrition on bear garlic (Allium ursinum L.) growth. Acta sci. pol, hortorum cultus, 10(3), 221-233##
15. Benkelia, N. Dahmouni, S. Onodera, SH, SHiomi, N (2005) Antimicrobial activity of phenolic compound extracts of various onions (Allium cepa L.) cultivars and garlic (Allium sativum L). Journal of food technology, 3(1), 30-34. ##
16. Iran Institute of Standards and Industrial Research, National Standard of Iran No. 2304, Characteristics of hamburgers and mixed burgers, test method. 2016. ##
17. H. Egan, H.E. Cox, D. Pearson, Pearson's chemical analysis of foods, Churchill livingstone 1981. ##
18. A. Natseba, I. Lwalinda, E. Kakura, C. Muyanja, J. Muyonga, Effect of pre-freezing icing duration on quality changes in frozen Nile perch (Lates niloticus), Food Research International 38(4) (2005) 469-474. ##
19. Y.-J. Jeon, J.Y. Kamil, F. Shahidi, Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod, Journal of agricultural and food chemistry 50(18) (2002) 5167-5178. ##
20. M. Sengul, H. Yildiz, N. Gungor, B. Cetin, Z. Eser, S. Ercisli, Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants, Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 22(1)(2009) ##
21. Baghi, N., 1995-1996, Study of antimicrobial effect of salvia leriifolia. Phd thesis. Pharmacology faculty. Mashhad medical science university.##
22. Baron EJ. et al., 1984. Z̄incer Microbiology. 18th ed. A Publishing division of Prentice- Hall Inc. London., PP:444-445. 453-456, 605-606, 1186-1187.##
23. Mahun, C.R. , Manuselis, G. 1995. Diagnostic Microbiology. W.B. Saunders. Company, London. pp: 58-96.##
24. International Organization for Standardization. (2017). Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1: Detection of Salmonella spp. (ISO 6579–1:2017).##
25. International Organization for Standardization. (1999). Microbiology of food and animal

- feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium (ISO 6888-1:1999).##
26. Yaghoobi, M., Sanikhani, M., Samimi, Z., and Kheiry, A., 2022. Selection of a suitable solvent for bioactive compounds extraction of myrtle (*Myrtus communis* L.) leaves using ultrasonic waves. *Journal of Food Processing and Preservation*, e16357. ##
27. Ouerfelli, M., Villasante, J., Ben Kaâb, L.B. and Almajano, M. 2019. Effect of neem (*Azadirachta indica* L.) on lipid oxidation in raw chilled beef patties. *Antioxidants*. 8(8): 305. ##
28. Jalali, M., Ariai, P. and Fattahi, E. 2016. Effect of alginate/carboxyl methyl cellulose composite coating incorporated with clove essential oil on the quality of silver carp fillet and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition during refrigerated storage. *J Food Science and Technology*. 53 (7). 757-765. ##
29. Munekata, P. E. S., Rocchetti, G., Pateiro, M., Lucini, L., Domínguez, R. and Lorenzo, J. M. 2020. Addition of plant extracts to meat and meat products to extend shelf-life and health-promoting attributes: An overview. *Current Opinion in Food Science*. 31, 81–87. ##
30. M. Hu, C. Jacobsen, Oxidative stability and shelf life of foods containing oils and fats, Elsevier 2016. ##
31. Y. Ozogul, Y. Uçar, The effects of natural extracts on the quality changes of frozen chub mackerel (*Scomber japonicus*) burgers, *Food and Bioprocess Technology* 6(6) (2013) 1550-1560. ##
32. S. matini, F. khosbakht Nejad. 2025. The effect of cinnamon powder on the microbial and chemical properties of hamburger under refrigerated conditions. *Studies of Biological Sciences and Biotechnology* 3(9). ##
33. F. Valipour Kootenaie, P. Ariai, D. Khademi Shurmasti, and M. Nemati. 2017. Effect of chitosan edible coating enriched with eucalyptus essential oil and α -tocopherol on silver carp fillets quality during refrigerated storage, *Journal of Food Safety*. 37 (1): e12295. ##
34. M. Mokhtarian, M. Shabani, R. Kazempoor, Extending Oxidative Stability of Fish Burgers Using Propolis Ethanolic Extract during Storage, *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology* 16(1) (2021) 109-122. ##
35. A. S. Munoz. (2006). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. *International Dairy Journal*, 45, 281-8. ##
36. L. Rounds, C.M. Havens, Y. Feinstein, M. Friedman, S. Ravishankar, Concentration-dependent inhibition of *Escherichia coli* O157: H7 and heterocyclic amines in heated ground beef patties by apple and olive extracts, onion powder and clove bud oil, *Meat science* 94(4) (2013) 461-467. ##
37. PS. Negi. 2012. Review Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *Int J Food Microbiol*. 156: 7-17 ##
38. C.H. Chen, J. Marchello, M. Friedman, S. Ravishankar, Plant Extracts and Essential Oils at Concentrations Acceptable to a Sensory Panel Inactivate *Salmonella Typhimurium* DT104 in Ground Pork, *Food and Nutrition Sciences* 12(02) (2021) 162 ##
39. S. Burt. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. *International Food Microbiology*. 94 (3): 223- 253. ##
40. D. Deresse. 2010. Antibacterial effect of garlic (*Allium sativum*) on

- Staphylococcus aureus: An in vitro study. Asian Journal of Medical Sciences 2: 62-65. ##
41. Romano, S, C., Abadi, K., Repetto, V., Vojnov, A A., Moreno, S. 2009. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. FoodChemistry. In press.##

بررسی سمیت سیانوباکتری آنابنا جدا شده از تالاب بندر انزلی

سهیلا افشاری آزاد^{۱*}، فرزانه حسینی^۲، عباس اخوان سپهری^۳

۱. استادیار، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. استاد، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سیانوباکتری ها گروه میکروارگانیسمی غنی از متابولیت های زیستی به شمار می آیند و توانایی تولید ترکیبات بیواکتیو ضدباکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد سرطان، جلبک کش و ایمنوساپرسیو را دارند. در مطالعه ی حاضر سنجش سمیت سیانوباکتری آنابنا واریابیلس جدا شده از منطقه سرخانکل بر روی موش های نر سوری انجام گرفت.

مواد و روش ها: در این تحقیق سیانوباکتری آنابنا از منطقه سرخانکل در قسمت مرکزی تالاب بندر انزلی جداسازی و شناسایی با استفاده آنالیز ملکولی SrRNA ۱۶ صورت گرفت. برای تعیین سمیت حاد، ۳۰ سر موش سوری نر به ۶ گروه ۵ تایی تقسیم شدند، گروه ابتدایی به عنوان گروه شاهد قرار گرفتند و گروه های اول تا پنجم دوزهای ۵۰۰، ۷۰۰ و ۱۰۰۰ و ۱۳۰۰ و ۲۰۰۰ میلی گرم از پودر سیانوباکتری را به صورت تزریق داخل صفاقی و به شکل محلول در نرمال سالین، به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، به میزان ۰/۵ میلی لیتر دریافت کردند، گروه شاهد ۰/۵ میلی لیتر نرمال سالین ۰/۹٪ به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند.

یافته ها: در گروه های شاهد، اول، دوم و سوم پس از تزریق مرگ مشاهده نشد، اما در گروه چهارم پس از تزریق آثار عدم تحرک مشاهده شد و ۳ عدد از موش های این گروه از بین رفتند، در گروه پنجم پس از تزریق آثار عدم تحرک و بی حالی مشاهده شد، تمام موش های این گروه از بین رفتند. در بررسی های آسیب شناسی بافتی در موش های گروه اول بافت کبد بزرگتر از میزان نرمال، افزایش هپاتوسیت های پلی مورفیک، و زیکولار شدن هپاتوسیت ها مشاهده شد، در گروه دوم بافت کبد از میزان نرمال بزرگتر و دژنره، اتساع سینوزوئیدها و دژنراتیو نکروز سلول ها مشاهده شد، در گروه سوم بافت کبد سگمنته، کانونی از تجمع سلول ها، تراوش آماسی تک هسته ای در فضای پورتال و صفحات نامنظم هپاتوسیت ها مشاهده شد و در گروه چهارم و پنجم بافت کبد بزرگ، دژنره و سگمنته، کانونی از تجمع سلول ها و صفحات نامنظم هپاتوسیت ها مشاهده شد.

نتیجه گیری: سم موجود در این سیانوباکتری از نوع هپاتوتوکسین می باشد، میزان LD50، ۱۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن تعیین شد.

کلمات کلیدی: آنابنا واریابیلس، آسیب شناسی بافتی، هپاتوتوکسین، کبد، LD50، موش نر

Toxicity measurement of *Anabaena* isolated from *Anzali* wetland

Soheila AfshariAzad^{1*}, Farzaneh Hosseini², AbbasAkhavansepahi³

1. Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran. Iran
2. Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran. Iran
3. Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran. Iran

Abstract

Background: Cyanobacteria are one of the most diverse prokaryotic groups that are widely spread around the world. These microorganisms possess special metabolic pathways which make them suitable in various aspects such as having access to new compounds with various applications in pharmaceutical industry, conducting of scientific research, producing food for humans and livestock, and having other aquaculture strengthens.

Materials and Methods: For the purpose of this study, the *Cyanobacteria Anabaena* were separated and purified from Sorkhankol area in the central part of Anzali wetland. Valid keys and 16srRNA molecular analysis were carried out as part of the diagnosis process. The toxicity examination of the isolated cyanobacteria was conducted on 30 male mice which were divided randomly into 6 groups. The first group of mice, considered as the control group, received 0.5 ml saline solution, while the other group, considered as the experimental group, received Anabaena extract with dosages of 500, 700, 1000, 1300, and 2000 mg/ kg. The extract was dissolved in saline solution at a rate of 0.5 ml and intraperitoneally injected to the mice in the experimental group.

Result: The results obtained from histopathological examination of liver revealed that Anabaena toxin is hepatotoxin and its symptoms include; increased hepatocellular polymorphism, vesicular hepatocytes, sinusoid dilatation, degenerative cell necrosis, focal accumulation of cells, mononuclear inflammatory, and irregular hepatic plates.

Conclusion: This result show that Amount of LD50 determined 1250 mg/kg.

Key word: Anabaena, histopathologic, hepatotoxin, liver, LD50 , male mice

مقدمه

معمولاً برای ارزیابی سمیت سیانوباکتری‌ها از موش‌های نرسوری به‌عنوان حیوان آزمایشگاهی استفاده می‌شود. در این روش، سلول‌های سیانوباکتری به محلول نمکی اضافه و به صورت داخل صفاقی تزریق می‌شوند. پس از ۲۴ ساعت مشاهده موش‌ها، آن‌ها تشریح شده و بافت‌های آسیب‌دیده برای تحلیل نتایج بررسی می‌شوند (۱۴،۱۵).

مواد و روش‌ها

نمونه آب از منطقه سرخانگل تالاب انزلی برداشت شد. جهت جداسازی سیانوباکتری‌های دریایی، حجم ۵۰۰ میلی لیتر نمونه آب از صافی میلی پور با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. سپس کاغذ صافی به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی لیتر از محیط کشت BG11 انتقال داده شد (Merck Co Germany) (۱۶،۱۷). نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به عنوان دمای بهینه رشد، شدت نور ۲۵۰۰ لوکس با تناوب نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و pH معادل ۷/۵ قرار گرفتند. به منظور هوادهی محیط کشت مایع از شیکر با دور ۱۵۰ rpm و پمپ‌های هوا استفاده شد (۱۸). آزمون رقت‌های سریالی انجام شد. سپس محیط کشت BG11 جامد ساخته شد و سپس آنتی‌بیوتیک نیستاتین به منظور حذف آلودگی‌های قارچی و نیز آنتی‌بیوتیک سیکلوهاگزامید برای حذف آلودگی‌های باکتریایی به محیط کشت اضافه شدند. درون ۱۰ پلیت استریل ۱ میلی‌لیتر از هرکدام از رقت‌های مربوطه ریخته و به هرکدام ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت BG11 به پلیت‌ها اضافه شد و سپس پلیت‌ها با حرکت دورانی تکان داده شد و در حالت ساکن قرار داده شدند تا خنک شده و سپس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس قرار گرفتند (۱۹). شناسایی سیانوباکتری با استفاده از کلیدهای معتبر و آنالیز ملکولی SrRNA ۱۶ و ویژگی‌های مورفولوژی یا ظاهری آن انجام شد (۲۰،۲۱). بعد از رشد سیانوباکترها در محیط کشت BG11، برای مشاهده مستقیم

سیانوباکتری‌های آبی قادر به سنتز متابولیت‌های متنوع فعال ثانویه هستند (۱). این میکروارگانیسم‌ها به عنوان یکی از مهمترین و قدیمی ترین موجودات پروکاریوتی شناخته شده در زمین به شمار می‌آیند (۲). فعالیت این ترکیبات با آنچه در ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و سایر گونه‌های جلبکی مشاهده میشود متفاوت است (۳،۴،۵،۶). به همین دلیل، سیانوباکتری‌ها پتانسیل زیادی برای تولید داروهای جدید، ساختارهای تازه و متابولیت‌های دارای فعالیت زیستی دارند (۷). این میکروارگانیسم‌ها متابولیت‌های اولیه یا ثانویه ای تولید میکنند که به عنوان ترکیبات زیست فعال میتوانند در صنعت استفاده شوند (۸). سیانوتوکسین‌ها میتوانند حیوانات و انسان‌ها را از طریق تماس با آب (حاوی شکوفایی جلبکی) مسموم کنند. همچنین ممکن است باعث مسمومیت غیرمستقیم از طریق مصرف غذای آلوده شوند (۹،۱۰). مرگ‌ومیر حیات وحش در پستانداران خشکی‌زی نیز می‌تواند تحت تأثیر سموم سیانوباکتریایی قرار می‌گیرد که قادرند در اکوسیستم تجمع پیدا کنند. از جمله سیانوباکتری‌های مولد سیانوتوکسین‌ها می‌توان به میکروسیستیس *آئروژینوزا*، *آفانیزومون فلوس آکوا*، *پلنکتوتریکس آگاردی ای*، *لینگبیا*، *نودولاریا*، *آنانا* و *اوسیلانوریا* اشاره کرد (۱۱،۱۲،۱۳). سمیت سیانوباکتری‌ها را می‌توان با روش‌های مختلفی تعیین کرد. یکی از این روش‌ها، اندازه‌گیری سطح سمیت در موش‌هاست.

نویسنده مسئول: استادیار، گروه میکروب

شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال،
دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

آدرس الکترونیک:

mdm_358@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۱/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۱۷

نوری و بزرگنمایی $X100$ بررسی شدند. آنالیز مولکولی با روش Marmur انجام شد (۲۲).

سیانوباکتری های رشد کرده درون ارلن ها، لام تهیه گردید و با روش رنگ آمیزی ساده رنگ شدند و در زیر میکروسکوپ

واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی CYAN738 و CAYN1281R برای سیانو باکتری ها انجام شد.

Sequence 5 to 3	Primer Name
ATACCCCWGTAGTCCTAGC	CYAN738F
GCAATTACTAGCGATTCCTCC	CYAN1281R

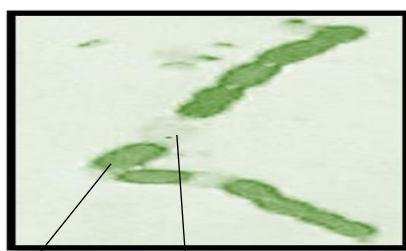
صفاقی و به شکل محلول در نرمال سالین، به ازای هر کیلو گرم وزن بدن، به میزان $0/5$ میلی لیتر دریافت کردند، گروه شاهد $0/5$ میلی لیتر نرمال سالین 9% به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند، موش ها پس از تزریق تا پایان ۲۴ ساعت از لحاظ رفتاری، میزان مصرف آب و مرگ تحت مراقبت قرار گرفتند (۲۳). موش ها با قطع نخاع بی درد کشته شدند و کبد آن ها برای بررسی بافت شناسی جدا شد. نمونه ها در فرمالین 10% ثابت شدند و سپس آگیری، شفاف سازی با زایلن، قالب گیری با پارافین، برش گیری و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اؤزین انجام شد.

برای مشخص شدن میزان تلفات بین گروه های مختلف با توجه به دوز دریافتی از آزمون دقیق فیشر استفاده شد.

به منظور لیوفیلیزه کردن توده سیانوباکتریایی به توده سیانوباکتری کشت شده گلو تامات سدیم افزوده شد، سپس به دستگاه افزوده شد و منجمد شد و سپس در خلا و در فشار پایین خشک شد، در این مرحله توده سیانوباکتریایی به حالت پودری یکنواخت درآمد.

برای آزمون سنجش حساسیت ۳۰ سر از موش های نر نژاد سوری سفید با وزن تقریبی ۲۵ گرم از خانه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه شدند، به ۶ گروه ۵ تایی تقسیم شدند، گروه ابتدایی به عنوان گروه شاهد قرار گرفتند و گروه های اول، دوم، سوم و چهارم و پنجم دوزهای ۵۰۰ ، ۷۰۰ و ۱۰۰۰ و ۱۳۰۰ میلی گرم از پودر سیانوباکتری (تولید شده توسط عمل لیوفیلیزاسیون) را به صورت تزریق داخل

یافته ها



هتروسیست

آکینت تخم مرغی شکل

شکل ۱. تصویر میکروسکوپی سیانوباکتری: ویژگی های میکروسکوپی سیانوباکتری آنابنا: سلول های رویشی مانند دانه های تسبیح به دنبال هم قرار گرفتند، آکینت تخم مرغی و هتروسیست در لابه لای سلول های رویشی قرار گرفتند، تریکوم ها به صورت مارپیچ است.

نتایج حاصل از توالی خوانی ژن SrRNA ۱۶ نشان دادند سویه مذکور با ۵۳۴ نوکلئوتید به میزان ۱۰۰٪ با سویه *آنابنا واریابیلیس* قرابت فیلوژنی دارد (۲۴،۲۵).

```

CCCGCCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACA
AGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGACTTGACAT
GTCGCGAATCTTCTTGAAGGGAAGAGTGCCTTAGGGAGCGCGAACACAGGTGGTGCATG
GCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCG
TTTTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGG
AAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACGTCTTGGGCTACACACGTACTACA
ATGCTACGGACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGCAAGCAAATCCCGTAAACCGTAGCTC
AGTTCAGATCGCAGGCTGCAACTCGCCTGCGTGAAGGAGG
    
```

۵۳۴ نوکلئوتید توالی یابی شده از ژن 16SrRNA (توالی یابی بر اساس روش sanger انجام گرفت)

علائم آسیب شناسی بافتی در موش های گروه آزمایش:
علائم در موش های گروه شاهد : اندازه کبد طبیعی و شکل آن نرمال است، هپاتوسیت های طبیعی مشاهده شدند.
علائم در موش های گروه اول: بافت کبد بزرگتر از میزان نرمال است، افزایش هپاتوسیت های پلی مورفیک، و زیکولار شدن هپاتوسیت ها مشاهده شد.
علائم در موش های گروه دوم: بافت کبد از میزان نرمال بزرگتر و دژنره است، اتساع سینوزوئیدها و دژنراتیو نکروز سلول ها مشاهده شد.
علائم در موش های گروه سوم: بافت کبد سگمنته شده است، کانونی از تجمع سلول ها، تراوش های آماسی تک هسته ای در فضای پورتال و صفحات نامنظم هپاتوسیت ها مشاهده شد.
علائم در موش های گروه چهارم و پنجم: بافت کبد بزرگ، دژنره و سگمنته شده است، کانونی از تجمع سلول ها و صفحات نامنظم هپاتوسیت ها مشاهده شد.

نتایج حاصل از بررسی های سنجش سمیت نشان داد، در گروه شاهد (گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی دریافت کردند و دریافت نکردند) و گروه های اول (با میزان دوز دریافتی ۵۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و دوم (با میزان دوز دریافتی ۷۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و سوم (با میزان دوز دریافتی ۱۰۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) پس از تزریق و *آنابنا واریابیلیس* هیچ گونه مرگ و میری مشاهده نشد (در این گروه های تیماری فقط آثار هیستوپاتولوژیکی بافت کبدی مشاهده شد)، اما در گروه چهارم با میزان دوز دریافتی ۱۳۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) پس از تزریق *آنابنا واریابیلیس* ابتدا آثار عدم تحرک مشاهده شد و در عرض ۲۴ ساعت ۳ عدد از موش های این گروه از بین رفتند، در گروه پنجم (با میزان دوز دریافتی ۲۰۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) پس از تزریق *آنابنا واریابیلیس* ابتدا آثار عدم تحرک و بی حالی مشاهده شد و در عرض ۲۴ ساعت تمام موش های این گروه از بین رفتند.

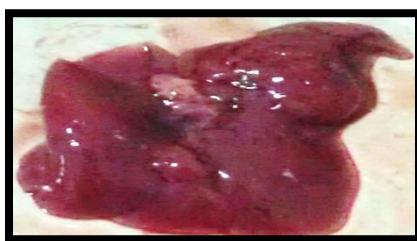
جدول ۱. نتایج سنجش سمیت

گروه	دوز دریافتی بر حسب میلی گرم	تعداد تلفات	درصد وزن کبد به وزن بدن	علائم ماکروسکوپی	علائم میکروسکوپی
شاهد	سرم فیزیولوژی	-	۰/۰۷	اندازه کبد طبیعی و شکل آن نرمال است	هپاتوسیت های طبیعی
اول	۵۰۰	-	۰/۰۸	بافت کبد بزرگتر از میزان نرمال	افزایش هپاتوسیت های پلی مورفیک، وزیکولار شدن هپاتوسیت ها
دوم	۷۰۰	-	۰/۱	بافت کبد از میزان نرمال بزرگتر و دژنره است	اتساع سینوزوئیدها، دژنراتیو نکروز سلول ها
سوم	۱۰۰۰	-	۰/۱۲	بافت کبد سگمنته شده است	کانونی از تجمع سلول ها، تراوش های آماسی تک هسته ای در فضای پورتال، صفحات نامنظم هپاتوسیت ها
چهارم	۱۳۰۰	۳ عدد	۰/۱۷	بافت کبد بزرگ، دژنره و سگمنته شده است	کانونی از تجمع سلول ها، صفحات نامنظم هپاتوسیت ها

کانونی از تجمع سلول ها، صفحات نامنظم هپاتوسیت ها	بافت کبد بزرگ، دژنره و سگمنته شده است	۰/۱۷	۵ عدد	۲۰۰۰	پنجم
---	--	------	----------	------	------



تصویر مربوط به بافت کبد در موش های گروه شاهد
اندازه کبد طبیعی و شکل آن نرمال است



(الف)



(ب)



(ج)

شکل ۲. نتایج آسیب شناسی بافتی

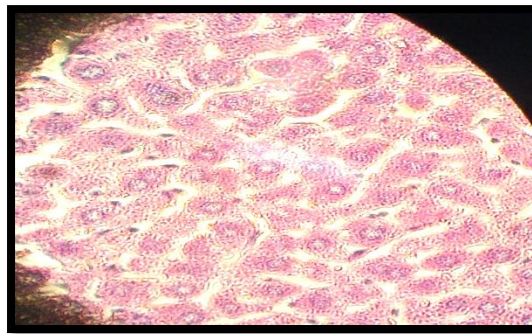
الف) تصویر مربوط به بافت کبد در موش های گروه اول (بافت کبد بزرگتر از میزان نرمال است)

ب) تصویر مربوط به بافت کبد در موش های گروه دوم (بافت کبد از میزان نرمال بزرگتر و دژنره است)

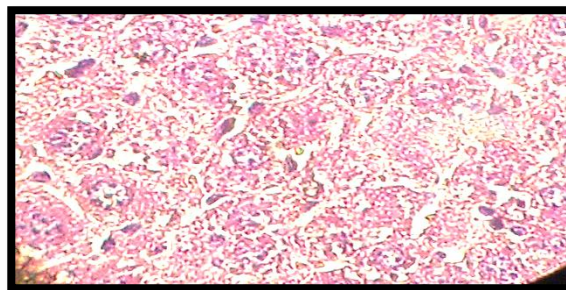
ج) تصویر مربوط به بافت کبد در موش های گروه سوم (بافت کبد سگمنته شده است)

آسیب های بافت کبد در گروه های تحت مطالعه بصورت تصادفی انتخاب شدند و مورد بررسی قرار گرفتند.

شکل ۳. رنگ آمیزی برش های تهیه شده از بافت کبد موش های مورد آزمایش



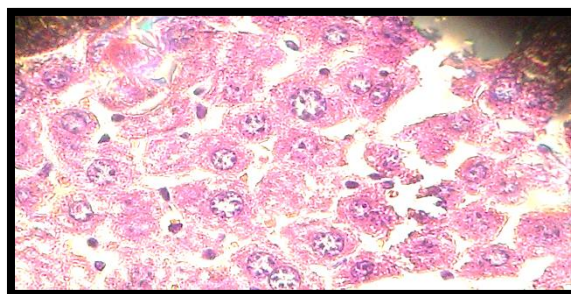
تصویر مربوط به برش بافت کبد در موش های گروه شاهد: هپاتوسیت های طبیعی در شکل مشاهده می شوند



تصویر مربوط به برش بافت کبد در موش های گروه اول:

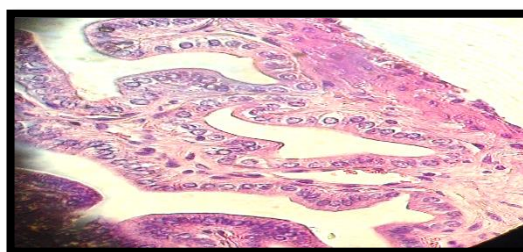
❖ افزایش هپاتوسیت های پلی مورفسم

❖ وزیکولار شدن هپاتوسیت ها



تصویر مربوط به برش بافت کبد در موش های گروه دوم:

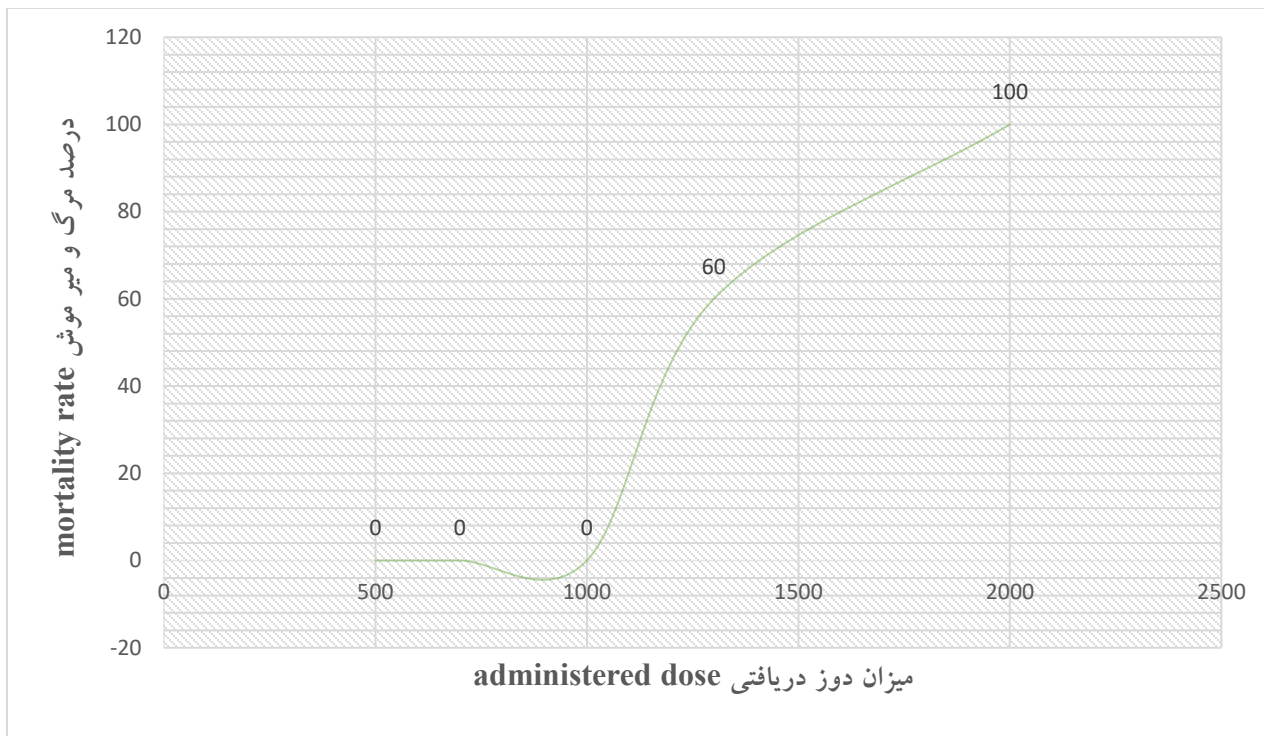
- ❖ اتساع سینوزوئیدها
- ❖ دژنراتیو نکروز سلول ها



تصویر مربوط به برش بافت کبد در موش های گروه سوم:

- ❖ کانونی از تجمع سلول ها
- ❖ تراوش های آماسی تک هسته ای در فضای پورتال
- ❖ صفحات نامنظم هیپاتوسیت ها

میزان LD50 سیانوباکتری *آنابنا واریابیلیس* در تزریق داخل صفاقی موش پس از ۲۴ ساعت ۱۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به دست آمد.



شکل ۴. میزان LD50 سیانوباکتری *آنابنا واربابیلیس* بر موش های سوری نر: میزان LD50 در تزریق داخل صفاقی

با توجه به جدول ۲، تفاوت آماری معناداری در میزان تلفات با توجه به میزان دوز دریافتی وجود دارد ($p < 0.0001$). برای مشخص شدن تفاوت بین سطوح مختلف دوز دریافتی، دوزهای مختلف دو به دو با هم مقایسه شدند و آشکار گردید میزان تلفات در دوز ۲۰۰۰ به صورت معناداری بیشتر از دوزهای ۱۰۰۰ و کمتر است ($p < 0.014$). تفاوت آماری معناداری در میزان تلفات دوز ۱۳۰۰ با دوزهای ۱۰۰۰ و کمتر همچنین دوز ۲۰۰۰ مشاهده نشد ($p < 0.167$).

جدول ۲. مقایسه میزان تلفات موش ها با توجه به میزان دوز دریافتی

گروه	تلفات ندارد		تلفات دارد		آزمون دقیق فیشر P-value
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
شاهد	۵	۱۰۰	۰	۰	<0/0001
۵۰۰	۵	۱۰۰	۰	۰	
۷۰۰	۵	۱۰۰	۰	۰	

۱۰۰۰	۵	۱۰۰	۰	۰
۱۳۰۰	۲	۴۰	۳	۶۰
۲۰۰۰	۰	۰	۵	۱۰۰

نتیجه گیری

سیانوباکتری‌ها هنوز به طور کامل در زمینه ی فعالیت های ضد قارچی مورد مطالعه قرار نگرفته اند و مطالعات کمی در این خصوص انجام گرفته است، با توجه به فراوانی و اهمیت سیانوباکتری‌ها در میکروفلور تالاب های استان گیلان در این بررسی سیانوباکتری جنس آنابنا، بومی تالاب‌های گیلان جداسازی شد. در مطالعه‌ی انجام شده سیانوباکتری آنابنا از منطقه سرخانکل در قسمت مرکزی تالاب بندر انزلی تا عمق ۵۰ سانتی متری جداسازی شد، قاسمی و همکاران نیز در سال ۲۰۰۳ به منظور جداسازی سیانوباکتری‌ها از مناطق ساحلی دریای خزر نمونه‌برداری نمودند و این مناطق را مناسب تر از نواحی دور از ساحل اعلام نمودند (۲). در این پژوهش جهت ازدیاد و رشد سیانوباکتری‌ها از محیط BG11 استفاده شد، اولین بار Stanier و همکاران در سال ۱۹۷۱ از این محیط برای کشت سیانوباکتری‌ها استفاده نمودند و از آن به بعد این محیط کشت بعنوان محیط مغذی جهت رشد و جداسازی سیانوباکتری‌ها معرفی و به کار گرفته شد (۱۶). در پژوهش حاضر سیانوباکتری موجود در نمونه با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر و آنالیز ملکولی SrRNA ۱۶ تا سطح جنس و گونه انجام شد، نتایج حاصل از توالی خوانی ژن SrRNA ۱۶ نشان دادند سویه مذکور با ۵۳۴ نوکلئوتید به میزان ۱۰۰٪ با سویه آنابنا واریابیلیس قرابت فیلوژنی دارد. William و همکاران در سال ۲۰۰۶ بیان داشتند ترکیبی از روش‌های

شناسایی بر مبنای خصوصیات ظاهری و روش‌های ملکولی بسیار مناسب می‌باشد، در همین راستا آنها اظهار داشتند اطلاعات ملکولی در سال‌های اخیر اعتبار برخی از جنس‌های سیانوباکتریایی نظیر سودوآنابنا، اسپیرولینا، میکروسیستیس و پلنکتوتریکس را ثابت می‌نماید (۲۶). درحالیکه Hongmei و همکاران در سال ۲۰۰۵ اظهار داشتند استفاده از اطلاعات ملکولی SrRNA ۱۶ ناسازگاری بین اطلاعات مورفولوژیکی و ملکولی ایجاد می‌نماید (۲۷). در مطالعه‌ی حاضر سنجش سمیت آنابنا واریابیلیس جدا شده از منطقه سرخانکل بر روی موش‌های نر سوری انجام گرفت، بیشترین میزان مرگ و میر مربوط به دوز دریافتی ۲۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به دست آمد. تفاوت آماری معناداری در میزان تلفات با توجه به میزان دوز دریافتی وجود دارد ($p < 0.001$). نتایج حاصل نشان داد سم موجود در این سیانوباکتری از نوع هپاتوتوکسین می‌باشد، آسیب‌های بافت کبد در گروه‌های تیمار مورد بررسی قرار گرفتند، علائم شامل: افزایش هپاتوسیت‌های پلی مورفیسیم، وریکولار شدن هپاتوسیت‌ها، اتساع سینوزوئیدها، دژنراتیو نکروز سلول‌ها، کانونی از تجمع سلول‌ها، تراوش‌های آماسی تک‌هسته‌ای در فضای پورتال، صفحات نامنظم هپاتوسیت‌ها مشاهده شد.

بیشتر از ۱۰۰۰: غیر سمی

۵۰۰-۱۰۰۰: سمیت کم

۵۰۰-۱۰۰: سمیت متوسط

کمتر از ۱۰۰: سمیت بالا

نتایج حاصل از بررسی‌های هیستوپاتولوژیک نشان داد سم موجود در این سیانوباکتری از نوع هپاتوتوکسین می‌باشد، علائم شامل: افزایش هپاتوسیت‌های پلی‌مورفسم، وزیکولار شدن هپاتوسیت‌ها، اتساع سینوزوئیدها، دژنراتیو نکروز سلول‌ها، کانونی از تجمع سلول‌ها، تراوش‌های آماسی تک‌هسته‌ای در فضای پورتال، صفحات نامنظم هپاتوسیت‌ها مشاهده شد. همچنین میزان LD₅₀ ۱۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تعیین شد.

تحقیقات Sivonen در سال ۱۹۹۶ همسو با پژوهش حاضر بود، او بیان نمود سیانوباکتری‌های جدا شده از دریاچه Ladoga حاوی میکروسیستین با میزان سمیت بالای ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم هستند، همچنین او اظهار داشت اغلب میکروسیستین‌ها از نواحی کم‌عمق یوتروفیک قسمت جنوبی دریاچه جدا شده‌اند (۲۸). در پژوهشی مشابه Abdel-raouf و Ibraheem در سال ۲۰۰۷ نشان دادن عصاره دی‌اتیل‌استات سیانوباکتری *آنابنا واریابیلیس* جدا شده از بیابان Koom Osheema در اطراف شهر El-Fayoum دارای اثرات نوروکسیک بوده و LD₅₀ آن ۲۶۴/۶۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد (۲۹). نتیجه پژوهش حاضر نشان داد میزان *آنابنا واریابیلیس* LD₅₀ ۱۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تعیین شد که با توجه به نتایج Lawton و همکاران غیر سمی تلقی می‌شود، Lawton و همکاران در سال ۱۹۹۴ بیان داشتند میزان LD₅₀ سموم سیانوباکتری به شکل زیر طبقه‌بندی می‌شود (۳۰):

منابع

1. Leflaive J, Ten-Hage L. Algal and cyanobacterial secondary metabolites in freshwaters: a comparison of allelopathic compounds and toxins. *Freshw Biol.* 2007;52:199-214.
2. Ghasemi Y, Tabatabaei Yazdi M, Shokravi S, Soltani N, Zarrini G. Antifungal and antibacterial activity of paddy-fields cyanobacteria from the north of Iran. *J Sci Islam Repub Iran.* 2003;14:203-9.
3. Carmichael W. Cyanobacterial secondary metabolites – the cyanotoxins: a review. *Freshw Biol.* 1992;15:1453-63.
4. Mundt S, Teuscher E. Blue-green algae as a source of pharmacologically active compounds. *Pharmazie.* 1988;43:809-15.
5. Patterson GML, Larsen LK, Moore RE. Bioactive natural products from blue-green algae. *J Appl Phycol.* 1994;6(2):151-7.
6. Skulberg OM. Microalgae as a source of bioactive molecules: experience from cyanophyte research. *J Appl Phycol.* 2000;12:341-8.
7. Singh S, Bhushan K, Banerjee U. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Crit Rev Biotechnol.* 2005;25(3):73-95.
8. Tuney I, Cadirci BH, Nal D, Sukatar A. Antimicrobial activities of the extracts of

- marine algae from the coast of Urla. Turk J Biol. 2006;30:171-5.
9. Falconer IR, Bartram J, Chorus I, Goodman T, Utkilen H, Burch M, Codd GA. Safe levels and safe practices. In: Chorus I, Bartram J, editors. Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E&FN Spon; 1999. p.155-78.
 10. Iochimeen EM, Carmichael WW, An JS, Cardo DM, Cookson ST, Jarvis WR. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. N Engl J Med. 1998;338:873-8.
 11. Banack SA, Johnson HE, Cheng R, Cox PA. Production of the neurotoxin BMAA by a marine cyanobacteria. Mar Drugs. 2007;5:180-96.
 12. Hitzfeld BC, Höger SJ, Dietrich DR. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment and human risk assessment. Environ Health Perspect. 2000;108 Suppl 1:113-22.
 13. Rao PV, Gupta N, Bhaskar AS, Jayaraj R. Toxins and bioactive compounds of cyanobacteria (blue-green algae) from rice paddy fields and their differential susceptibility to ten fungicides used in Korea. J Microbiol Biotechnol. 2002;16(2):240-6.
 14. Mattsson C, Puu G. Toxiska blågröna alger. FOA Rapport. 1997;C40098-CI:8.
 15. Willén T, Mattsson R. Water blooming and toxin producing cyanobacteria in Swedish fresh and brackish waters, 1981-1995. Hydrobiologia. 1997;353:181-92.
 16. Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M, Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). Bacteriol Rev. 1971;35:171-205.
 17. Summers ML, Wallis JG, Campbell EL, Meeks JC. Genetic evidence of a major role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in nitrogen fixation and dark growth of the cyanobacterium Nostoc sp. strain ATCC 29133. J Bacteriol. 1995;177(21):6184-94.
 18. Hanan M, El-Kassas Y. Active substances from some blue-green algal species used as antimicrobial agents. Afr J Biotechnol. 2010;9(19):2789-800.
 19. Andersen RA. Algal culturing techniques. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2005. p.589.
 20. Desikachary TV. Cyanophyta. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research; 1959. p.684.
 21. Prescott GW. Algae of the western Great Lakes area. Dubuque: W.C. Brown; 1962. p.977-85.
 22. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J Mol Biol. 1961;3:208-18.
 23. Underdal B. Blågrønnalgetoksin – påvisning og eigenskapar. Vann (Norsk Vannforening). 1984:359-63.
 24. Altsch SF, Madden TL, Schaeffer AA, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997;25:3389-402.
 25. Sivonen K. Cyanobacterial toxins and toxin production. Phycologia. 1996;35:12-24.
 26. Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi H, Won S, Chun J. Introducing EZTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA

- gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62:716-21.
27. Willame R, Boutte CH, Grubisic S, Wilmotte A, Komárek J, Hoffmann L. Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *Appl Phycol.* 2006;42:1312-22.
 28. Hongmei J, Aitchison JC, Lacap DC, Peerapornpisal Y, Sompong U, Pointing SB. Community phylogenetic analysis of moderately thermophilic cyanobacterial mats from China, the Philippines and Thailand. *Extremophiles.* 2005;9:325-32.
 29. Ibraheem IBM, Abdel-Raouf N. Allelopathic activity of some local cyanobacterial extra-metabolites against some pathogenic bacteria. *Egypt J Phycol.* 2007;8:120-9.
 30. Lawton LA, Beattie KA, Hawser SP, Campbell DL, Codd GA. Evaluation of assay methods for the determination of cyanobacterial hepatotoxicity. In: Codd GA, Jefferies TM, Keevil CW, Potter E, editors. *Detection methods for cyanobacterial toxins.* Cambridge: Royal Society of Chemistry; 1994. p.111-6.

بهینه سازی استخراج RNA از نمونه های مدفوع با استفاده از بافر لیز طراحی شده: ارزیابی و مقایسه با کیت تجاری

حنان خدائی^۱، لیلا عظیمی^{۲*}، عباس اخوان سپهی^۳، فاطمه اشرفی^۴، مریم رجب نژاد^۵

۱. دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. استاد، گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۴. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۵. استادیار، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: استخراج RNA از نمونه های مدفوع به دلیل وجود مهارکننده ها و پیچیدگی های ترکیب شیمیایی مدفوع، یک چالش عمده در تشخیص مولکولی عوامل بیماری زای دستگاه گوارش به شمار می رود. هدف این مطالعه، طراحی و بهینه سازی یک بافر لیز کارآمد برای استخراج RNA کامل از نمونه های مدفوع و مقایسه عملکرد آن با کیت تجاری می باشد.

مواد و روش ها: نمونه های مدفوع از بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان کودکان مفید جمع آوری شد. بافر لیز بر اساس ترکیبات گوانیدینیوم تیوسیانات، Tris-HCl، EDTA و CTAB تهیه گردید. شرایط استخراج شامل تغییر در مقادیر بافر لیز، پروتئیناز K و حامل RNA در سه حالت مختلف بررسی شد. کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از بافر لیز طراحی شده و استفاده از ستون های استخراج سیلیکونی، با استفاده از دستگاه Qubit و تکنیک Real-Time PCR با کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از کیت تجاری بر پایه بید مغناطیسی، مورد مقایسه قرار گرفت. به منظور انجام Real-Time PCR از ژن کنترل داخلی RNase P، ژن های ویروسی E و S و ویروس SARS-CoV-2 استفاده گردید.

یافته ها: حالت بهینه استخراج در ترکیب ۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز طراحی شده، ۲۰ میکرولیتر حامل RNA و ۶۰ میکرولیتر پروتئیناز K به دست آمد. در این شرایط، میانگین مقادیر Ct برای ژن های RNase P، S و E کمتر از کیت تجاری بود و غلظت RNA نیز بالاتر اندازه گیری شد.

نتیجه گیری: روش استخراج با استفاده از بافر لیز طراحی شده، کارایی بالاتری نسبت به کیت تجاری در استخراج RNA از نمونه های مدفوع داشت و می تواند به عنوان جایگزین مقرون به صرفه در تشخیص مولکولی به کار رود.

کلمات کلیدی: استخراج RNA، نمونه مدفوع، SARS-CoV-2، بافر لیز

Optimization of RNA Extraction from Stool Samples Using a Designed Lysis Buffer: Evaluation and Comparison with a Commercial Kit

Hannan Khodaei¹, Leila Azimi^{2*}, Abbas Akhavan Sepahy³, Fatemeh Ashrafi⁴, Maryam Rajabnejad⁵

1. Ph.D. student, Department of Microbiology, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Associate professor, Pediatric Infections Research Center, Research Institute for children's Health, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
3. Professor, Department of Microbiology, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
4. Assistant professor, Department of Microbiology, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran
5. Assistant professor, Pediatric Infections Research Center, Research Institute for children's Health, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objective: Extracting RNA from stool samples poses a major challenge in the molecular diagnosis of gastrointestinal pathogens due to the presence of inhibitors and the complex chemical composition of feces. This study aimed to design and optimize an efficient lysis buffer for extracting intact RNA from stool samples and to compare its performance with that of a commercial kit.

Materials and Methods: Stool samples were collected from patients hospitalized in various wards of Mofid Children's Hospital. The lysis buffer was prepared using guanidinium thiocyanate, Tris-HCl, EDTA, and CTAB. Extraction conditions were tested by varying the amounts of lysis buffer, proteinase K, and RNA carrier across three different setups. The quality of RNA extracted using the designed lysis buffer combined with silica spin columns was evaluated by Qubit and Real-Time PCR and compared to RNA extracted using a commercial magnetic bead-based kit. For Real-Time PCR, the internal control gene RNase P and SARS-CoV-2 viral genes E and S were employed.

Results: The optimal extraction condition consisted of 600 μ L of the designed lysis buffer, 20 μ L of RNA carrier, and 60 μ L of proteinase K. Under these conditions, the average Ct values for RNase P, S, and E genes were lower than those obtained with the commercial kit, and RNA concentration was also higher.

Conclusion: The extraction method using the designed lysis buffer demonstrated higher efficiency than the commercial kit for RNA extraction from stool samples and can serve as a cost-effective alternative in molecular diagnostics.

Keywords: RNA extraction, stool sample, SARS- CoV-2, lysis buffer.

مقدمه

استخراج اسیدهای نوکلئیک، به‌ویژه RNA، یکی از مراحل کلیدی در مطالعات تشخیصی، اپیدمیولوژیک و مولکولی به شمار می‌رود. RNA به‌عنوان مولکولی تک‌رشته‌ای، نقش اساسی در انتقال اطلاعات ژنتیکی و بیان ژن‌ها ایفا می‌کند. در حوزه ویروس‌شناسی، شناسایی RNA ویروسی از نمونه‌های بالینی، گامی حیاتی برای تشخیص سریع و دقیق بیماری‌ها محسوب می‌شود. کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده، به‌طور مستقیم بر دقت و حساسیت آزمون‌های مبتنی بر تکنیک‌های تکثیر اسیدهای نوکلئیک مانند Real-Time PCR تأثیرگذار است (۱). در سال‌های اخیر، همه‌گیری ویروس کرونا (SARS-CoV-2) و نیاز فوری به شناسایی آن، موجب تمرکز گسترده بر توسعه روش‌های سریع و دقیق استخراج RNA شده است. نمونه‌های مدفوع به‌دلیل قابلیت ردیابی طولانی‌تر ویروس و همچنین مطالعات اپیدمیولوژیک در مراحل ابتدایی و انتهای عفونت، مورد توجه قرار گرفته‌اند. با این حال، استخراج RNA از این نوع نمونه‌ها به‌دلیل ترکیب پیچیده و حضور مهارکننده‌ها در نمونه مدفوع، چالش‌برانگیز است. مدفوع یکی از نمونه‌های بیولوژیکی است که از دیرباز برای تشخیص عوامل عفونی به‌ویژه پاتوژن‌های روده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است. با ظهور COVID-19، شواهد متعددی نشان داده‌اند که RNA ویروس SARS-CoV-2 حتی زمانی که تست‌های تنفسی منفی

می‌شوند، می‌تواند در نمونه‌های مدفوع بیماران وجود داشته باشد (۲، ۳). این ویژگی، ارزش بالینی نمونه‌های مدفوع را در شناسایی بیماران، پیگیری روند بهبودی و پایش فاضلاب شهری جهت مطالعات اپیدمیولوژی محیطی افزایش داده است (۴، ۵). با این حال، ماهیت فیزیکی و شیمیایی مدفوع، که شامل مواد پیچیده‌ای مانند چربی‌ها، اسیدهای صفراوی، پلی‌ساکاریدها، فلور میکروبی متنوع و آنزیم‌های تخریب‌کننده اسید نوکلئیک است، استخراج RNA را دشوار می‌کند. بسیاری از این ترکیبات، مهارکننده‌های قوی واکنش‌های آنزیمی نظیر PCR هستند و در صورت عدم حذف کامل، می‌توانند باعث نتایج منفی کاذب یا کاهش حساسیت آزمون شوند (۶). یکی از مهم‌ترین موانع استخراج RNA از نمونه‌های مدفوع، حضور آنزیم‌های RNase است. این آنزیم‌ها به‌صورت طبیعی در دستگاه گوارش وجود دارند و به‌سرعت RNA را تخریب می‌کنند. علاوه بر این، وجود ذرات معلق و پلی‌ساکاریدهای محلول باعث انسداد ستون‌های سیلیکونی یا کاهش کارایی بیدهای مغناطیسی می‌شود (۷). همچنین، تنوع ترکیب شیمیایی مدفوع بین افراد و حتی در نمونه‌های یک فرد در روزهای مختلف، می‌تواند باعث تغییرپذیری بالا در کارایی روش‌های استخراج گردد. کیت‌های تجاری معمولاً برای حذف این مهارکننده‌ها، از ترکیبات chaotropic مانند گوانیدینیوم تیوسیانات، بافرهای شستشو با محتوای اتانول و شستشوی چندمرحله‌ای استفاده می‌کنند. با وجود این، کارایی این کیت‌ها در نمونه‌های مدفوع گاهی کمتر از نمونه‌های ساده‌تر مانند خون یا سواب بینی است (۷).

روش‌های مبتنی بر ستون سیلیکونی بر اساس توانایی باند شدن اسیدهای نوکلئیک به سطح سیلیکا در حضور نمک‌های chaotropic کار می‌کنند (۸). پس از باند شدن، طی شستشوی متوالی، آلاینده‌ها حذف شده و RNA با بافر کم‌نمک یا آب RNase-free شسته می‌شود. از مزایای این روش‌ها می‌توان به سرعت بالا، سهولت کاربری و حداقل نیاز به تجهیزات اشاره کرد. البته در کنار آن معایبی همچون حساسیت به گرفتگی ستون و کاهش راندمان در حضور ذرات جامد و مهارکننده‌ها نیز وجود دارد (۸). در روش‌های مبتنی

نویسنده ی مسئول: دانشیار، مرکز تحقیقات

عفونی اطفال، پژوهشکده سلامت کودکان،

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
ایران

آدرس الکترونیک:

leilaazimi1982@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۲/۰۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۰۶/۱۹

بر بید مغناطیسی بیدهای پوشش داده شده با مواد متصل کننده به RNA، در حضور نمک های chaotropic، اسید نوکلئیک را جذب می کنند. سپس با اعمال میدان مغناطیسی، جداسازی و شستشو انجام شده و RNA استخراج می شود. این روش در اغلب کیت های تجاری استخراج RNA از نمونه مدفوع به کار می رود. از مزایای این روش می توان به قابلیت اتوماسیون و کاهش خطر آلودگی اشاره کرد اما متاسفانه این روش دارای هزینه بالایی است و نیاز به تجهیزات خاص دارد (۹). با توجه به هزینه بالای کیت های وارداتی، محدودیت های دسترسی در شرایط تحریم و نیاز به روش هایی که در شرایط بحران (مانند همه گیری ها) قابل اجرا باشند، طراحی و بهینه سازی روش های بومی اهمیت ویژه ای پیدا کرده اند. بافرهای لیز طراحی شده بر اساس ترکیبات موجود در بازار داخلی، می توانند جایگزینی کم هزینه و قابل اطمینان برای روش های تجاری باشند. علاوه بر این، روش های بومی امکان تغییر و بهینه سازی متناسب با نوع نمونه، شرایط آزمایشگاهی و تجهیزات موجود را فراهم می آورند. این موضوع در کشورهایی که با محدودیت منابع روبه رو هستند، می تواند موجب افزایش ظرفیت آزمایشگاه ها و کاهش زمان انتظار بیماران شود. بافر لیز، به عنوان اولین مرحله استخراج اسید نوکلئیک از نمونه، نقش حیاتی در تخریب سلول ها، غیرفعال سازی آنزیم های تخریب کننده RNA و آزادسازی اسیدهای نوکلئیک دارد. ترکیبات chaotropic مانند گوآنیدینیوم تیوسیانات با دناتوره کردن پروتئین ها و آنزیم ها، مانع تخریب RNA می شوند. ترکیب این ماده با عوامل شوینده مانند CTAB، که توانایی حذف پلی ساکاریدها و لیپیدها را دارد، می تواند کارایی استخراج از نمونه های پیچیده ای مانند مدفوع را افزایش دهد (۱۰، ۱۱). همچنین، افزودن حامل RNA به ویژه در نمونه هایی با غلظت پایین RNA می تواند به افزایش بازدهی استخراج کمک کند. پروتئیناز K نیز با هضم پروتئین های همراه RNA و مهارکننده های PCR، کیفیت محصول نهایی را بهبود می بخشد. با وجود پیشرفت های قابل توجه در فناوری های استخراج RNA، هنوز روش های موجود در فرآیند استخراج اسید نوکلئیک از نمونه های مدفوع با چالش های متعدد روبه رو هستند. هزینه بالای کیت های تجاری، نیاز به تجهیزات خاص،

و محدودیت های واردات، مانع استفاده گسترده از این فناوری ها در بسیاری از مراکز تشخیصی کشور می شود. بنابراین، توسعه یک روش بومی که بتواند با هزینه کمتر و راندمان بالا، RNA باکیفیت و عاری از مهارکننده ها را استخراج کند، ضرورت دارد. هدف از این پژوهش، طراحی و بهینه سازی یک بافر لیز کارآمد بر پایه ترکیبات در دسترس، برای استخراج RNA کامل از نمونه های مدفوع و مقایسه کارایی آن با یک کیت تجاری مبتنی بر بید مغناطیسی است. کارایی روش ها با سنجش غلظت RNA و ارزیابی عملکرد در فرآیند Real-Time PCR برای ژن های ویروسی و کنترل داخلی بررسی گردید.

مواد و روش ها

طراحی مطالعه و جمع آوری نمونه ها

در این مطالعه ۱۰۰ نمونه مدفوع از بیماران بستری در بخش های اورژانس، عفونی، گوارش و بخش های ویژه نوزادان و اطفال بیمارستان کودکان مفید، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، جمع آوری گردید. تمامی مراحل با اخذ رضایت آگاهانه از بیماران یا والدین آنان و طبق کد اخلاق (IR.SBMU.RICH.REC.1400.038) انجام شد.

آماده سازی نمونه ها

نمونه های مدفوع پس از جمع آوری در ظروف استریل، بلافاصله به مرکز تحقیقات عفونی اطفال مستقر در بیمارستان کودکان مفید منتقل و تا زمان آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. در زمان استخراج، نمونه ها به دمای اتاق رسانده شده و با آب استریل RNase/DNase-free به نسبت ۱:۵ (وزنی/حجمی) همگن سازی شدند. برای تعیین وزن خالص مدفوع، ابتدا میکروتیوب ها توزین شده، سپس مقدار مشخصی نمونه به آن ها اضافه و مجدداً توزین شدند.

ترکیب و تهیه بافر لیز

خوبی مخلوط گردید تا محلولی کاملاً یکنواخت حاصل شود. گوانیدینیوم تیوسیانات در دنا توره کردن پروتئین ها و غیرفعال سازی RNase ، EDTA در مهار یون های دوظرفیتی، Tris در تثبیت pH و CTAB در حذف پلی ساکاریدها و لیپیدها، نقش دارند.

طراحی شرایط استخراج و بهینه سازی

به منظور تعیین بهترین شرایط استخراج، مقادیر متفاوت بافر لیز، پروتئیناز K و Poly-A به عنوان حامل RNA انتخاب شد (جدول ۲) و بر روی پنج نمونه با در نظر گرفتن ۲۷ حالت مختلف مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳).

جدول ۲. حجم مواد متغیر استفاده شده در بهینه سازی کیت استخراج

حجم بافر لیز	حجم حامل RNA	حجم پروتئیناز K
۳۰۰ میکرولیتر	۵ میکرولیتر	۱۵ میکرولیتر
۶۰۰ میکرولیتر	۱۰ میکرولیتر	۳۰ میکرولیتر
۹۰۰ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر	۶۰ میکرولیتر

جدول ۳. حالت های (۱-۲۷) در نظر گرفته شده برای بهینه سازی کیت استخراج

بافر لیز اختصاصی این مطالعه بر پایه مواد chaotropic و شوینده های قوی تهیه شد. ترکیب نهایی بافر در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱. ترکیبات بافر لیز

نام ماده	غلظت (میلی مول)	حجم/وزن (گرم)
گوانیدینیوم تیوسیانات ^۲	۱۰۱۶	۱۲۰
Tris-Cl (0.1 M, pH = 6.4)	۱۰	۱/۵۶۷
EDTA ^۳ (0.5 M, pH = 8.0)	۵۰	۱۸/۶۱۲
ستیل تری متیل آمونیوم بروماید ^۴	۴/۲	۱/۴۸

در یک ارلن مایر ۱/۵۷۶ گرم Tris-Cl در ۶۰ میلی لیتر آب دیونیزه استریل با هم زدن مداوم حل شد. میزان pH با استفاده از محلول سدیم هیدروکساید ۰/۱ مولار روی ۶/۴ تنظیم و سپس با استفاده از آب دیونیزه و خالص به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید.

۱۲۰ گرم گوانیدینیوم تیوسیانات وزن شد و به طور کامل مستقیماً وارد محلول ساخته شده از Tris-Cl شد و با کمک حمام اولتراسونیک در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد حل شد. در یک ارلن مایر دیگر ۱۸/۶۱۲ گرم EDTA با ۸۰ میلی لیتر آب دیونیزه و خالص حل شد و همزمان pH محلول با استفاده از محلول سدیم هیدروکساید ۰/۱ مولار روی ۸ تنظیم گردید. سپس محلول را فیلتر کرده و با استفاده از آب دیونیزه و خالص به حجم ۱۰۰ میلی لیتر می رسانیم، سپس ۸/۸ میلی لیتر از محلول EDTA به محلول گوانیدینیوم تیوسیانات اضافه گردید. در پایان ۱/۴۸ گرم از CTAB در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط و به محلول نهایی اضافه شد و به

^۴ Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)

^۲ Guanidinium thiocyanate

^۳ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

نهایت از ۵۰ میکرولیتر آب گرید مولکولی به عنوان بافر حل کننده استفاده گردید. در انتها سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه انجام شد. در این مرحله محلول خارج شده از ستون، حاوی RNA خالص سازی شده از نمونه مدفوع می باشد.

این روش استخراج پس از بهینه سازی نهایی مقادیر بافر لیز، پروتئیناز K و حامل RNA، بر روی تمامی ۱۰۰ نمونه تکرار و نتایج حاصل از Real-time PCR با نتایج استفاده از کیت تجاری بر پایه بیدهای مغناطیسی مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین غلظت RNA استخراج شده بوسیله دستگاه Qubit که یک دستگاه فلورومتر برای سنجش میزان RNA با واحد میکروگرم در میلی لیتر می باشد، خوانده شد.

روش مقایسه‌ای با کیت تجاری

برای مقایسه عملکرد، استخراج RNA از همان نمونه‌ها با استفاده از کیت تجاری استخراج کامل RNA از شرکت Tianlong (Lot No: H2219011811. PRC) انجام شد. مکانیسم این کیت بر پایه‌ی بیدهای مغناطیسی و بار الکتریکی می باشد و حاوی پلیتهایی است که پس از اضافه کردن نمونه در دستگاه استخراج اتومات (Tianlong Extraction machine Libex model) متعلق به همین شرکت قرار گرفت و فرآیند استخراج به صورت ماشینی انجام شد.

تعیین غلظت و خلوص RNA

غلظت RNA با استفاده از فلورومتر Qubit و کیت Qubit RNA HS Assay Kit اندازه گیری شد.

ارزیابی عملکرد روش طراحی شده با Real-Time PCR

ارزیابی کارایی استخراج بر اساس توانایی شناسایی ژن کنترل داخلی (RNase P) و دو ژن ویروسی S و E مربوط به SARS-COV-2 انجام شد به این منظور از کیت تجاری COVITECH (Lot No: COVIT-21008-1.Iran) دستگاه Real-Time PCR برند Corbett Rotor-Gene 6000 استفاده شد. برنامه حرارتی در جدول ۴ ذکر شده است.

حامل RNA			حامل RNA			حامل RNA			
۲۰ میکرولیتر			۱۰ میکرولیتر			۵ میکرولیتر			
پروتئیناز k ۶۰ میکرولیتر	پروتئیناز k ۳۰ میکرولیتر	پروتئیناز k ۱۵ میکرولیتر	پروتئیناز k ۶۰ میکرولیتر	پروتئیناز k ۳۰ میکرولیتر	پروتئیناز k ۱۵ میکرولیتر	پروتئیناز k ۶۰ میکرولیتر	پروتئیناز k ۳۰ میکرولیتر	پروتئیناز k ۱۵ میکرولیتر	
۹	۸	۷	۶	۴	۴	۳	۲	۱	بافر ۳۰۰ میک رولی تر
۱۸	۱۷	۱۶	۱۵	۱۴	۱۳	۱۲	۱۱	۱۰	بافر ۶۰۰ میک رولی تر
۲۷	۲۶	۲۵	۲۴	۲۳	۲۲	۲۱	۲۰	۱۹	بافر ۹۰۰ میک رولی تر

فرایند استخراج RNA

پس از اضافه کردن آب استریل و عاری از آنزیم‌های DNase و RNase، به میکروتیوب‌های حاوی مدفوع، نمونه‌ها مخلوط و همگن شدند، سپس با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و در نهایت به میزان ۳۰۰ میکرولیتر از مایع رویی برای انجام مراحل استخراج برداشت شد. در مرحله بعد از بافر لیز با توجه به مقادیر مختلف موجود در جدول ۳ به هر نمونه اضافه شد و ۱۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا محلول برداشت شده از نمونه‌ی مدفوع با بافر لیز همراه با حامل RNA و پروتئیناز K تیمار گردند. در مرحله بعد محلول به ستون استخراج دارای فیلترهای سیلیکونی (ساخت شرکت روژ، ایران) که به صورت تجاری خریداری شد، اضافه گردید و سانتریفیوژ به مدت یک دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. مراحل شست و شو با استفاده از الکل مطلق و طی دو مرحله انجام شد و در

جدول ۴. برنامه دمایی Real-Time-PCR

مرحله	دما (درجه سانتیگراد)	زمان	دور
رونویسی معکوس	۵۵	۱۰ دقیقه	۱
واسرشتگی اولیه	۹۵	۳ دقیقه	۱
واسرشتگی	۹۵	۱۵ ثانیه	۵۰
اتصال مجدد، طولی سازی و جمع آوری داده ها	۶۰	۱ دقیقه	

میکرولیتر Proteinase k (بهترین Ct را در ارتباط با ژن کنترل داخلی (IC=Ranase P) در هر پنج نمونه نشان داد که باتوجه به کمتر بودن میزان بافر لیز در حالت ۱۸ ، به عنوان بهینه ترین روش و میزان انتخاب شد (جدول ۵).

جدول ۵. نتایج ۲۷ حالت مختلف بهینه سازی بر روی ۵ نمونه

نتایج Ct ژن کنترل داخلی در پنج نمونه بهینه سازی شده	۲۷ حالت مختلف بهینه سازی				
	نمونه ۵	نمونه ۴	نمونه ۳	نمونه ۲	نمونه ۱
۱	۳۳/۵	-	-	۳۸/۳	-
۲	۳۳/۱	۳۶/۳	-	۳۸	۳۴/۳
۳	۳۳	۳۶	۳۸/۵	۳۷/۹	۳۴
۴	۳۳	۳۶/۱	۳۸/۳	۳۷/۵	۳۲/۹
۵	۳۲/۸	۳۵/۶	۳۷/۷	۳۷	۳۲/۵
۶	۳۲/۶	۳۵/۳	۳۷/۵	۳۶/۵	۳۲/۳
۷	۳۲	۳۵	۳۷/۵	۳۴/۶	۳۲/۵
۸	۳۲/۱	۳۵	۳۷/۲	۳۴/۵	۳۲/۳
۹	۳۱/۷	۳۴/۸	۳۶/۵	۳۳	۳۱/۶
۱۰	۳۱/۷	۳۴	۳۶/۳	۳۴/۵	۲۹
۱۱	۳۱/۵	۳۴/۱	۳۶	۳۴	۲۹/۳
۱۲	۳۱/۳	۳۳/۶	۳۶	۳۴/۲	۲۸/۵
۱۳	۳۱/۵	۳۳	۳۵/۵	۳۳/۲	۲۸/۵
۱۴	۳۱	۳۲/۸	۳۵	۳۳	۲۸/۳
۱۵	۲۹/۸	۳۲/۵	۳۵	۳۲/۵	۲۷/۱
۱۶	۲۹/۳	۳۱	۳۴	۳۲/۸	۲۶/۳
۱۷	۲۸/۷	۲۹/۶	۳۳/۵	۳۲/۳	۲۵/۷
۱۸	۲۷/۵	۲۸/۳	۳۲/۳	۳۱	۲۵/۳
۱۹	۳۱/۵	۳۴/۵	۳۶	۳۴/۳	۲۹
۲۰	۳۱/۳	۳۴	۳۶/۲	۳۴/۵	۲۹
۲۱	۳۱/۴	۳۴/۳	۳۵/۸	۳۴	۲۸/۸
۲۲	۳۱	۳۳/۵	۳۵/۳	۳۳/۶	۲۸/۶
۲۳	۲۹/۶	۳۳/۳	۳۵	۳۳/۵	۲۸/۵
۲۴	۲۹/۴	۳۳/۶	۳۴/۸	۳۳	۲۷
۲۵	۲۹	۳۱/۷	۳۴/۲	۳۲/۷	۲۶/۷
۲۶	۲۸/۵	۳۰/۲	۳۳/۵	۳۲/۳	۲۵/۵
۲۷	۲۷/۳	۲۹/۸	۳۲	۳۱/۲	۲۵/۲

تحلیل آماری

برای مقایسه میانگین مقادیر Ct و غلظت RNA بین روش طراحی شده و کیت تجاری، از آزمون Paired t-test در نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد.

نتایج

ویژگی های جمعیت شناختی نمونه ها

در این مطالعه از ۱۰۰ نمونه مدفوع استفاده شد. علایم شایع در بیماران تب (۷۴٪) و دل درد (۶۵٪) بود، متوسط سنی بیماران ۲/۶۴ سال بود. بیماران شامل ۶۰٪ پسر و ۴۰٪ دختر بودند. این بیماران در بخش های مختلف بیمارستان مانند اورژانس، ریه، عفونی، گوارش، مراقبت های ویژه نوزادان ، بخش مراقبت های ویژه اطفال بستری بودند. بیشترین درصد نمونه ها به ترتیب مربوط به بخش عفونی با ۳۵/۸٪ و بخش گوارش با ۳۲/۵٪ بودند.

بهینه سازی بافر لیز

نتایج بهینه سازی در ۲۷ حالت مختلف، نشان داد که حالت شماره ۱۸ (۶۰۰ میکرولیتر بافر لیز، ۲۰ میکرولیتر RNA حامل و ۶۰ میکرولیتر Proteinase k) و شماره ۲۷ (۹۰۰ میکرولیتر بافر لیز، ۲۰ میکرولیتر RNA حامل و ۶۰

و در روش استخراج با کیت تجاری و دستگاه اتومات ۶/۷ میکروگرم در میلی لیتر بود.

شناسایی SARS-CoV-2 در نمونه های مدفوع

از ۱۰۰ نمونه مدفوع بررسی شده با کیت های طراحی شده در این مطالعه تعداد ۴۵ نمونه کووید مثبت شناسایی شد علاوه بر آن، ۵ نمونه که در روش تجاری منفی کاذب گزارش شده بودند، با روش بافر لیز مثبت شدند. این یافته ها حاکی از حساسیت بالاتر روش پیشنهادی در شناسایی موارد با بار ویروسی پایین است. در مجموع، تمامی نمونه های مثبت شده با استفاده از کیت تجاری و دستگاه استخراج اتومات، در روش استخراج طراحی شده نیز مثبت شدند (نتایج منفی کاذب در روش استخراج طراحی شده مشاهده نگردید).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که طراحی و بهینه سازی یک بافر لیز بر پایه ترکیبات chaotropic و شوینده های قوی، می تواند کارایی استخراج RNA از نمونه های مدفوع را به طور معنی داری بهبود بخشد. مقادیر Ct پایین تر در ژن کنترل داخلی (RNase P) و ژن های ویروسی S و E در روش طراحی شده نسبت به روش تجاری، نشان دهنده کیفیت بالاتر RNA و حذف بهتر مهارکننده ها است. این یافته ها همسو با مطالعات پیشین است که نقش کلیدی بافرهای حاوی گوانیدینیوم تیوسیانات را در غیرفعال سازی RNase ها و افزایش بازده استخراج RNA گزارش کرده اند (۸، ۱). در این پژوهش، روش طراحی شده با یک کیت تجاری مبتنی بر بید مغناطیسی (Tianlong) مقایسه شد. اگرچه کیت های تجاری اغلب به عنوان "استاندارد طلایی" در استخراج اسیدهای نوکلئیک استفاده می شوند، اما محدودیت هایی مانند هزینه بالا، نیاز به تجهیزات خاص و کاهش کارایی در نمونه های پیچیده ای مانند مدفوع دارند (۷) در مطالعه حاضر، روش طراحی شده توانست میانگین مقادیر Ct را در همه ژن ها به میزان ۲/۵ تا ۳/۲ سیکل کاهش دهد، که از نظر حساسیت واکنش PCR به معنای افزایش قابل توجه بازدهی استخراج است. مطالعات مشابه نیز گزارش کرده اند که اصلاح ترکیب بافر لیز و استفاده از حامل RNA، به ویژه در نمونه های با

مقایسه روش طراحی شده با کیت تجاری

پس از بهینه سازی، در این مطالعه به منظور استخراج RNA تمامی نمونه های مدفوع مورد مطالعه (۱۰۰ نمونه) همزمان از کیت استخراج تجاری مربوط به دستگاه استخراج اتومات و بافر لیز بهینه شده همراه با ستون استخراج سیلیکونی استفاده شد و فرآیند Real-Time PCR با استفاده از کیت تجاری تشخیص SARS-COV-2 برند کوویتک انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که روش طراحی شده جهت استخراج کامل RNA از مدفوع توانایی استخراج RNA کامل از تمامی نمونه ها با حساسیت ۱۰۰٪ با CI ۹۵٪ را داشت. مقایسه نتایج Real-Time PCR انجام شده بر روی ۱۰۰ نمونه مدفوع نشان داد که Ct ژن های مورد بررسی در این مطالعه در روش استفاده از بافر لیز طراحی شده از روش کیت تجاری پایین تر بود. به این ترتیب که میانگین Ct ژن کنترل داخلی در نمونه های استخراج شده با استفاده از بافر لیز طراحی شده $26/04 \pm 2/42$ و در روش استخراج با کیت تجاری و دستگاه اتومات $29/27 \pm 2/48$ بود که نشان دهنده میانگین پایین تر برای روش استخراج با استفاده از بافر لیز طراحی شده می باشد.

میانگین Ct ژن S در نمونه های استخراج شده به روش استفاده از بافر لیز طراحی شده $25/63 \pm 3/18$ و در روش استخراج با کیت تجاری و دستگاه اتومات $28/54 \pm 4/32$ بود که نشان دهنده میانگین پایین تر برای روش استخراج با استفاده از بافر لیز طراحی شده می باشد. میانگین Ct ژن E در نمونه های استخراج شده به روش استفاده از بافر لیز طراحی شده $27/39 \pm 3/81$ و در روش استخراج با کیت تجاری و دستگاه اتومات $30/23 \pm 4/73$ بود که نشان دهنده میانگین پایین تر برای روش استخراج با استفاده از بافر لیز طراحی شده می باشد.

غلظت RNA استخراج شده

خوانش RNA استخراج شده بوسیله دستگاه Qubit نشان داد که میانگین غلظت نمونه های استخراج شده به روش استفاده از بافر لیز طراحی شده $8/3$ میکروگرم در میلی لیتر

انعطاف پذیری بالایی برای تغییر نسبت ترکیبات بر اساس نوع نمونه و نیاز آزمایشگاه فراهم می آورد. همچنین استفاده از مواد شیمیایی رایج و در دسترس، هزینه استخراج را به طور قابل توجهی کاهش می دهد. از طرفی عدم نیاز به تجهیزات خاص باعث شده تا این روش قابل اجرا در آزمایشگاه های پایه با سانتریفیوژ و تجهیزات استاندارد باشد. کاهش معنی دار Ct در همه ژن ها و شناسایی موارد مثبت اضافی نشان از حساسیت بالاتر این بافر لیز در مقایسه با کیت تجاری دارد و میتوان از آن برای استخراج RNA از انواع پاتوژن های روده ای و ویروسی استفاده کرد. در شرایطی که محدودیت دسترسی به کیت های وارداتی وجود دارد (به ویژه در زمان همه گیری ها یا تحریم ها)، روش های بومی مقرون به صرفه می توانند ظرفیت تشخیصی کشور را به طور چشمگیری افزایش دهند. برآورد هزینه ها در این مطالعه نشان داد که بدون کاهش کیفیت و حتی با بهبود حساسیت، قیمت تمام شده روش طراحی شده در این مطالعه حدود ۵۲٪ کمتر از کیت تجاری است. با وجود مزایای قابل توجه، این مطالعه محدودیت هایی نیز دارد، به طور مثال ارزیابی روش تنها بر اساس نمونه های انسانی انجام شده و نیاز به آزمایش بر روی نمونه های حیوانی یا محیطی نیز وجود دارد همچنین عملکرد روش در شرایط نگهداری طولانی مدت نمونه ها بررسی نشده است. به طور کلی مقایسه این روش با بیش از یک کیت تجاری می تواند اعتبار یافته ها را افزایش دهد. پیشنهاد می شود در پژوهش های بعدی از این روش برای استخراج RNA از سایر نمونه های پیچیده مانند خاک، لجن فاضلاب و مواد غذایی نیز استفاده شود.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که طراحی یک بافر لیز بهینه بر پایه ترکیبات موجود در بازار داخلی، می تواند عملکردی هم سطح یا حتی بالاتر از کیت های تجاری گران قیمت داشته باشد. کاهش مقادیر Ct، افزایش غلظت RNA و شناسایی موارد مثبتی که در زمان استفاده از کیت تجاری استخراج، نتایج به صورت منفی کاذب مشاهده شده بود، همگی بیانگر کارایی بالای این روش است. این دستاورد نه تنها از نظر علمی، بلکه

غلظت پایین RNA، می تواند باعث بهبود آشکار کیفیت استخراج شود (۱۲). روش ما با افزودن RNA حامل و پروتئیناز K در مقادیر بهینه، همزمان دو مکانیسم بهبود کارایی را فعال کرده است: ۱. افزایش میزان RNA بازیابی شده و ۲. حذف پروتئین های مهارکننده. وجود ترکیباتی مانند اسیدهای صفرای، پلی ساکاریدها، چربی ها و فلور میکروبی متنوع، چالش اصلی استخراج RNA از مدفوع است. مهارکننده ها می توانند باعث عدم شناسایی عوامل بیماری زا حتی در حضور RNA ویروسی شوند. در این مطالعه، ترکیب CTAB در بافر لیز نقش ویژه ای در حذف پلی ساکاریدها و مواد آلی نامحلول داشت. این ویژگی در مطالعات گیاهی نیز اثبات شده است، جایی که CTAB توانسته به طور مؤثری پلی ساکاریدها را از عصاره های پیچیده حذف کند (۱۳). همچنین، گوانیدینیوم تیوسیانات به عنوان یک دناتوره کننده قوی، علاوه بر مهار RNase ها، باعث لیز کامل سلول ها و آزادسازی RNA می شود. ترکیب این ماده با EDTA برای شلاته کردن یون های دوظرفیتی مورد نیاز RNase ها و Tris-HCl برای حفظ pH پایدار در روش ما، یک محیط شیمیایی بهینه برای حفاظت از RNA را فراهم کرد (۱۴). چندین مطالعه پیشین بر استفاده از نمونه های مدفوع برای تشخیص SARS-CoV-2 تمرکز داشته اند (۲). Wu و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که RNA ویروس در ۵۳٪ از نمونه های مدفوع بیماران COVID-19، با وجود نتیجه منفی در نمونه های تنفسی، قابل شناسایی بودند (۲). Medema و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه پایش فاضلاب، اهمیت استخراج RNA با کارایی بالا را برای تشخیص زودهنگام شیوع بیماری برجسته کردند (۴). مطالعه حاضر نیز این اهمیت را تأیید کرد. روش بهینه شده توانست ۵ نمونه مثبت SARS-CoV-2 را که در روش تجاری منفی گزارش شده بودند، شناسایی کند. این امر می تواند ناشی از بازیابی بیشتر RNA در نمونه های با بار ویروسی پایین باشد، موضوعی که در کاربردهای اپیدمیولوژی محیطی (WBE)⁵ بسیار حیاتی است. مزیت اصلی روش پیشنهادی، ترکیب ساده ولی علمی بافر لیز و انطباق آن با شرایط نمونه های مدفوع است. برخلاف بسیاری از روش های تجاری که فرمول بسته دارند، این روش

⁵ Wastewater-Based Epidemiology

از نظر اقتصادی و عملیاتی نیز ارزشمند است و می تواند به عنوان یک گزینه پایدار برای آزمایشگاه های تشخیصی به ویژه در شرایط محدودیت منابع مطرح شود.

منابع

1. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1):156-9.
2. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265-9.
3. Xiao K, Zhai J, Feng Y, Zhou N, Zhang X, Zou JJ, et al. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature*. 2020;583(7815):286-9.
4. Medema G, Heijnen L, Elsinga G, Italiaander R, Brouwer A. Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands. *Environmental science & technology letters*. 2020;7(7):511-6.
5. Ahmed W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, O'Brien JW, et al. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. *The Science of the environment*. ۲۰۲۰;۱۳۸۷۶۴:۲۰۲۰.
6. Monteiro CP, Varela A, Pinto M, Neves J, Felisberto GM, Vaz C, et al. Effect of an aerobic training on magnesium, trace elements and antioxidant systems in a Down syndrome population. *Magnesium research*. 1997;10(1):65-71.
7. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology*. 2012;113(5):1014-26.
8. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*. 1990;28(3):495-503.
9. Adams NM, Bordelon H, Wang KK, Albert LE, Wright DW, Haselton FR. Comparison of three magnetic bead surface functionalities for RNA extraction and detection. *ACS applied materials & interfaces*. 2015;7(11):6062-9.
10. Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*. 1980;8(19):4321-5.
11. Rattanamas K, Taesuji M, Kulthonggate U, Jantafong T, Mamom T, Ruenphet S. Sensitivity of RNA viral nucleic acid-based detection of avian influenza virus, Newcastle disease virus, and African horse sickness virus on flinders technology associates card using conventional reverse-transcription polymerase chain reaction. *Veterinary world*. 2022;15(11):2754-9.
12. Wei M, Yuan J, Liu Y, Fu T, Yu X, Zhang ZJ. Novel Coronavirus Infection in Hospitalized Infants Under 1 Year of Age in China. *Jama*. 2020;323(13):1313-4.
13. Kiss T, Karácsony Z, Gomba-Tóth A, Szabadi KL, Spitzmüller Z, Hegyi-Kaló J, et al. A modified CTAB method for the extraction of high-quality RNA from mono-and dicotyledonous plants rich in secondary metabolites. *Plant Methods*. 2024;20(1):62.
14. Ali N, Rampazzo RCP, Costa ADT, Krieger MA. *Current Nucleic Acid*

Extraction Methods and Their
Implications to Point-of-Care

Diagnostics. BioMed research
international. 2017;2017:9306564.

بررسی ایمنی و آلرژی‌زایی پروتئین **Deeper Rooting1** در برنج اصلاح‌شده ژنتیکی با رویکرد بیوانفورماتیکی

مطهره محسن پور^{۱*}، محدثه محسن پور^۲

۱. پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: تضمین پایداری تولید و افزایش بهره‌وری برنج (*اوریزا ساتیوا*) به عنوان یکی از مهم‌ترین غلات و غذای اصلی بخش بزرگی از جمعیت جهان از اهمیت بالایی برخوردار است. در این راستا، بهره‌گیری از فناوری‌های نوین نظیر اصلاحات مولکولی، مهندسی ژنتیک و به‌ویژه ویرایش ژنوم، به‌عنوان راهکارهایی مؤثر در بهبود عملکرد و افزایش مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مورد توجه قرار گرفته‌اند. یکی از ژن‌های مورد استفاده در بهنژادی برنج، ژن **Deeper Rooting1 (DRO1)** است که نقش موثری در افزایش عمق ریشه، جذب بهتر آب و عناصر غذایی، به‌ویژه در شرایط تنش خشکی دارد. انتقال این ژن به ارقام دارای ریشه‌های کم‌عمق، موجب توسعه لاین‌هایی با ریشه‌های عمیق‌تر شده و در نتیجه، عملکرد گیاه در شرایط کم‌آبی به طور قابل توجهی بهبود می‌یابد. با توجه به لزوم ارزیابی ایمنی زیستی در گیاهان تراریخته، به‌ویژه در خصوص پتانسیل آلرژی‌زایی یا حساسیت‌زایی پروتئین‌های نوظهور، این مطالعه به بررسی ایمنی پروتئین **DRO1** اختصاص یافته است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، پس از تحلیل توالی کامل پروتئین **DRO1**، تعداد ۱۷۲ قطعه با طول ۸۰ اسیدآمینه و ۲۴۴ پپتید ۸ اسیدآمینه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: هیچ‌یک با توالی‌های آلرژنی شناخته‌شده مطابقت نداشتند. همچنین، بررسی هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های گوارشی و تحلیل ساختار سه‌بعدی این پروتئین نیز عدم پتانسیل آلرژی‌زایی و حساسیت‌زایی را نشان دادند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، پروتئین **DRO1** را می‌توان به‌عنوان ترکیبی ایمن از منظر زیستی در نظر گرفت. بهره‌گیری از این ژن در برنامه‌های اصلاحی می‌تواند گامی مؤثر در جهت افزایش تحمل برنج به خشکی، کاهش مصرف آب، ارتقای بهره‌وری و در نهایت، دستیابی به امنیت غذایی و خودکفایی در تولید این محصول راهبردی باشد.

کلمات کلیدی: اثرات بالقوه آلرژی‌زایی و حساسیت‌زایی، برنج، **Deeper Rooting1**، امنیت غذایی

Evaluation of the properties and safety of Deeper Rooting 1 protein transferred to rice plant by investigating its allergenicity potential

Motahhareh Mohsenpour^{1*}, Mohaddeseh Mohsenpour²

1. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

2. Department of Microbiology, NT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: Ensuring the sustainability of production and enhancing the productivity of rice (*Oryza sativa*)-one of the most important cereal crops and a staple food for a large portion of the global population-is of paramount importance. In this regard, the utilization of advanced technologies such as molecular breeding, genetic engineering, and particularly genome editing has been recognized as an effective strategy to improve yield and increase resistance to biotic and abiotic stresses. One of the genes employed in rice breeding is the Deeper Rooting 1 (DRO1) gene, which plays a significant role in increasing root depth, thereby improving water and nutrient uptake-especially under drought stress conditions. The introduction of this gene into shallow-rooted rice varieties has led to the development of lines with deeper root systems, significantly enhancing plant performance under water-limited conditions. Given the necessity of biosafety assessment in genetically modified plants, particularly concerning the allergenic or sensitizing potential of novel proteins, this study focused on evaluating the safety of the DRO1 protein.

Material and method: In this research, following the complete sequence analysis of the DRO1 protein, a total of 172 fragments of 80 amino acids in length and 244 peptides of 8 amino acids were examined.

Result: none of which showed homology with known allergenic sequences. Furthermore, enzymatic digestion using digestive enzymes and three-dimensional structural analysis of the protein also indicated no allergenic or sensitizing potential. Based on the obtained results, the DRO1 protein can be considered biologically safe. Incorporating this gene into breeding programs can serve as an effective step toward enhancing rice drought tolerance, reducing water consumption, increasing productivity, and ultimately achieving food security and self-sufficiency in the production of this strategic crop.

Keywords: Allergenicity potential, Rice, Deeper Rooting1, Food security

مقدمه

در مهندسی ژنتیک اطمینان اولیه از ایمن بودن محصول پروتئینی ژن انتقالی دارای اهمیت است و عدم وجود اثرات بالقوه واکنش حساسیت‌زایی و آلرژی‌زایی در محصول ژن انتقالی می‌تواند به اطمینان اولیه در عدم مشاهده اثرات جانبی در مراحل آنالیز احتمال خطر و بررسی‌های ایمنی‌زیستی منجر شود. پیش‌بینی پتانسیل آلرژی‌زایی یک پروتئین، به ویژه در غذاهای جدید یکی از چالش‌های عمده در موضوع آلرژی مولکولی است. در این موضوع لازم است دو جنبه را از هم متمایز کرد: ایمنی‌زایی و واکنش متقابل. ایمنی‌زایی، پتانسیل یک پروتئین برای القای آنتی‌بادی‌های IgE را منعکس می‌کند، در حالی که واکنش متقابل، واکنش آنتی‌بادی‌های IgE (معمولاً از قبل موجود) با پروتئین هدف است. علاوه بر این دو موضوع، ارتباط بین پتانسیل اتصال IgE و علائم بالینی نیز مورد توجه قرار می‌گیرد. این مورد تحت تأثیر خواص فیزیکی (به عنوان مثال، ثبات و اندازه) و ویژگی‌های ایمونولوژیک (به عنوان مثال میل و ظرفیت اپی‌توپ) است. پیش‌بینی احتمال ایمنی‌زایی و واکنش متقابل آلرژن‌ها بر ایجاد شباهت‌ها و تفاوت‌های ساختاری بین آلرژن‌ها و بین آلرژن‌ها و غیر آلرژن‌ها تکیه دارد (۱). ابزارهای بیوانفورماتیک می‌توانند به پیش‌بینی و بررسی پتانسیل آلرژی‌زایی پروتئین‌ها کمک کنند.

نویسنده ی مسئول: پژوهشگاه بیوتکنولوژی

کشاورزی (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج ایران

آدرس الکترونیک: mthrhbm@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۲/۲۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۰۶/۰۳

دانه های غلات هزاران سال به عنوان اجزای اصلی غذای انسان نقش مهمی در جوامع بشری ایفا کرده‌اند. در سراسر جهان، برنج، گندم و ذرت و تا حدودی جو، سورگوم و ارزن از محصولات غذایی اصلی هستند که برای بقای میلیاردها انسان ضروری هستند. بیش از ۵۰ درصد کالری دریافتی جهان مستقیماً از مصرف غلات ناشی می‌شود (۲). کاهش جهانی عملکرد محصول یا به عبارتی کاهش عملکرد واقعی نسبت به حداکثر پتانسیل محصول که برای برنج، گندم و ذرت در برخی از مناطق حدود ۳۰ تا ۶۰ درصد تخمین زده شده است، به کمبود آب و مواد مغذی نسبت داده می‌شود (۳). پیش‌بینی می‌شود برای ایجاد امنیت غذایی تا سال ۲۰۵۰، تقاضای غلات تا ۶۰ درصد افزایش یابد (۴) بنابراین لازم است رویکردهای اصلاحی فعلی صفاتی را در نظر بگیرند که با اصلاح آنها امکان ایجاد ارقامی فراهم شود که بتوانند شرایط رشد نامناسب و شرایط آب و هوایی سخت را تحمل کنند.

ساختار ریشه گیاهان در به حداقل رساندن خلأ عملکرد اهمیت دارد و زیربنای دومین انقلاب سبز در جهت برآورده کردن تقاضای غذایی انسان‌ها است (۵). علاوه بر عملکردهای استقرار گیاه و جذب آب و مواد مغذی توسط سیستم‌های ریشه، ذخیره‌سازی، سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌ها در روابط میکروب‌های همزیست نقش مهمی دارند (۶ و ۷). ریشه‌ها در حال تبدیل شدن به هدف اصلی برای انقلاب سبز دوم هستند و اصلاح آنها برای تولید غلات غذایی پرمحصول مانند گندم و برنج ضروری به نظر می‌رسد (۸). متأسفانه، صفات ریشه در اصلاح به دلیل چالش‌های فنوتیپی بسیار نادیده گرفته می‌شوند، اما اگر بتوان از تنوع در صفات ساختار ریشه به طور کامل استفاده کرد، بسیار با ارزش خواهد بود (۹). تاکنون، تعداد زیادی از ژن‌ها که دارای نقش بالقوه‌ای در بهبود ساختار ریشه هستند با جزئیات شناسایی شده‌اند. ما در گزارش‌های قبلی انتقال ژن DRO1 را به همراه ژن‌های دیگر موثر بر ساختار ریشه به رقم تجاری برنج هاشمی گزارش کردیم (۱۰-۱۲). ژن DRO1 در افزایش طول سلول در نوک ریشه نقش دارد که باعث رشد نامتقارن ریشه و خم شدن ریشه به سمت

بررسی قرابت توالی پروتئین DRO1 برنج با توالی های متناظر از گیاهان تک لپه و دو لپه و کشف موتیف

توالی های متناظر با پروتئین DRO1 برنج از پایگاه NCBI دریافت و قرابت آنها بررسی شد. سپس برای جستجوی موتیف از پایگاه SMART و برای کشف موتیف از پایگاه MEME استفاده شد. موتیف یک الگوی توالی تقریبی است که به طور مکرر در گروهی از توالی های مرتبط رخ می دهد. الگوهای دارای شکاف با طول متغیر توسط MEME به دو یا چند موتیف جداگانه تقسیم می شوند. برای مقایسه موتیف مرتبط با آلرژن از پایگاه Tomtom (۱۷) استفاده شد. این پایگاه یک یا چند موتیف را با پایگاه داده ای از موتیف های شناخته شده (مانند JASPAR) مقایسه می کند. Tomtom موتیف ها را در پایگاه داده رتبه بندی می کند و برای هر تطابق قابل توجه یک تراز ایجاد می کند.

بررسی اثرات بالقوه آلرژی زایی و حساسیت زایی

برای بررسی اثرات بالقوه آلرژی زایی و حساسیت زایی پروتئین گذشونده توسط ژن DRO1 از چندین پایگاه استفاده شد که به شرح زیر هستند.

الف) پایگاه AllergenOnline (<http://www.allergenonline.org>) دسترسی به یک لیست آلرژن بررسی شده و پایگاه داده قابل جستجوی توالی را فراهم می کند که برای شناسایی خطر بالقوه واکنش متقابل آلرژیک پروتئین حاصل از بیان ژن DRO1 در نظر گرفته شد. این پایگاه برای کمک به ارزیابی ایمنی پروتئین هایی که ممکن است از طریق مهندسی ژنتیک یا از طریق روش های فرآوری مواد غذایی وارد غذاها شوند، طراحی شده است. هدف، شناسایی پروتئین هایی است که ممکن است به آزمایش های بیشتری نیاز داشته باشند، مانند اتصال IgE سرم (IgE binding)، آزادسازی هیستامین بازوفیل (release Basophil histamine) یا چالش in vivo برای ارزیابی واکنش متقابل بالقوه (In vivo challenge to evaluate potential cross-reactivity)، این پایگاه داده سالانه به روز می شود. نسخه چهارم آن در یک وب سایت عمومی در سال ۲۰۰۴ منتشر

پایین در پاسخ به نیروی جاذبه می شود. انتقال این ژن به یک رقم برنج با ریشه کم عمق، لاین حاصل را قادر می کند تا از خشکی توسط افزایش عمق ریشه دهی خود اجتناب کند و این امر منجر به حفظ عملکرد بالا در شرایط تنش خشکی در مقایسه با رقم اولیه شاهد خواهد شد. این ژن که به طور طبیعی در رقم وحشی برنج Kinandang patong وجود دارد، در ارقام زراعی مثل رقم هاشمی به دلیل ایجاد کدون پایان زودهنگام فاقد عملکرد است. بنابراین به منظور برگرداندن اثرات مفید این ژن در اجتناب از خشکی، توالی ناحیه کدکننده آن پس از بهینه سازی کدونی، از نظر ایمنی پروتئین حاصل با بررسی اثرات بالقوه آلرژی زایی و حساسیت زایی مورد ارزیابی قرار گرفت و سپس تحت نواحی تنظیمی گیاهی به برنج رقم هاشمی منتقل شد.

مواد و روش ها

جستجوی منابع و بررسی های بیوانفورماتیکی برای انتخاب ژن بالقوه ایمن و موثر در بهبود ساختار ریشه و تحمل به خشکی

مقالات مرتبط با عوامل ژنتیکی دخیل در تغییر ساختار ریشه برنج و تاثیر ساختار ریشه بر عملکرد و تحمل تنش های محیطی با تاکید بر استرس خشکی بررسی و بر این اساس ژن های کاندید مرتبط با صفات مهم ساختاری ریشه انتخاب شدند. یکی از این ژن های موثر در تغییر زاویه رشد ریشه و اجتناب از خشکی ژن 1 DEEPER ROOTING نام داشت. این ژن عامل به وجود آوردن ریشه عمیق و کنترل کننده زاویه رشد ریشه است که باعث طول شدن سلول ها در نوک ریشه شده و با رشد نامتقارن سلول های نوک ریشه، سبب خم شدن ریشه در پاسخ به گرانش زمین خواهد شد. این ژن به دلیل وجود گزارش های معتبر از موثر بودن آن در افزایش تحمل به خشکی (۱۶-۱۳) به عنوان ژن کاندید برای انتقال به برنج به طور اولیه انتخاب شد تا پس از تایید ایمنی بالقوه آن، برای مهندسی ژنتیک برنج مورد استفاده قرار گیرد.

شد. این پایگاه در تاریخ ۲۵ می ۲۰۲۳ به نسخه ۲۲ به روز شده است. نسخه ۲۲ حاوی لیست جامعی از آلرژن های دریافت شده از منابع معتبر است. این پایگاه داده با هدف ارائه یک ابزار ساده و مفید که می تواند در ارزیابی ایمنی مواد غذایی مفید باشد، به صورت رایگان در دسترس است. این ابزار به محقق این امکان را می دهد تا توالی پروتئین مورد نظر خود را با توالی های موجود در پایگاه داده AllergenOnline، که به صورت سالانه به روزرسانی می شود، مقایسه کند. این کار برای ارزیابی پروتئین های جدید در محصولات اصلاح شده ژنتیکی یا در غذاهای جدید در نظر گرفته شده است.

حالت اول جستجوی کل توالی پپتیدی و مقایسه آن با آلرژن ها است. در جستجوی هم ترازای های کل طول توالی پپتیدی، تطابق بیشتر از ۵۰ درصد، نشان دهنده واکنش متقابل احتمالی است.

حالت دوم که بر اساس دستورالعمل های CODEX Alimentarius (۲۰۰۳) طراحی شده، توالی پروتئینی مورد نظر را به بخش هایی شامل پپتیدهای ۸۰ اسید آمینه ای تبدیل و شباهت هر قطعه را با آلرژن ها جستجو می کند. بر اساس دستورالعمل کدکس پپتیدهای ۸۰ اسید آمینه ای که شباهت آنها با آلرژن ها بیش از ۳۵ درصد باشد پتانسیل آلرژی زایی داشته و لازم است تحت آنالیزهای تکمیلی آزمایشگاهی قرار بگیرند.

حالت سوم جستجو برای تطابق دقیق هشت اسید آمینه است. برخی ضوابط نظارتی دنیا نتایج این جستجوی بسیار دقیق را هم درخواست می کنند. به هر حال نظر مراکز علمی مرتبط با بررسی احتمال آلرژی زایی این است که هیچ مدرکی مبنی بر اینکه تطابق هشت اسید آمینه بتواند پروتئینی را شناسایی کند که احتمالاً واکنش متقابل دارد در حالی که تطابق ۸۰ اسید آمینه ای آن نتوانسته باشد شباهت بالای ۳۵ درصد با آلرژن ها را نشان دهد، وجود ندارد. بنابراین توصیه شده است از حالت سوم یعنی بررسی توالی های کوتاه ۶ تا ۸ اسید آمینه ای برای بررسی آلرژی زایی استفاده نشود، زیرا هیچ مدرک علمی مبنی بر پیش بینی واکنش متقاطع IgE وجود ندارد و فعالیت های بالینی مشترک را پیش بینی نمی کنند (۱۸).

ب) پایگاه PeptideCutter (https://web.expasy.org/peptide_cutter) پایگاه دیگری است که محل های برش احتمالی توسط پروتئازها یا مواد شیمیایی را در یک توالی پروتئینی مورد نظر پیش بینی می کند. در این تحقیق محل برش آنزیم های معده از جمله پپسین، تریپسین و کیموتریپسین روی پروتئین DRO1 مورد بررسی قرار گرفت و سپس قطعات حاصل از هضم برای بررسی پتانسیل آلرژی زایی و حساسیت زایی در پایگاه های AllergenOnline و Allermatchtm مورد بررسی قرار گرفتند.

ج) پایگاه Allermatch (<https://www.allermatch.org>) برای بررسی پتانسیل آلرژی زایی قطعات حاصل از شبیه سازی هضم پروتئین DRO1 با آنزیم های معده با طول بیش از ۸ اسید آمینه مورد استفاده قرار گرفت. این پایگاه یک ابزار تحت وب است که با استفاده از آن می توان پروتئین مورد نظر را با توالی پروتئین های آلرژی زا مقایسه کرد. این ابزار برای پیش بینی حساسیت زایی بالقوه پروتئین ها با رویکردهای بیوانفورماتیک بر اساس Codex alimentarius و FAO/WHO در مورد حساسیت زایی مواد غذایی مشتق شده از طریق بیوتکنولوژی مدرن طراحی شده است (۲۰ و ۱۹). آخرین به روز رسانی این پایگاه در ۵ سپتامبر ۲۰۲۲ انجام شده است و شامل ۲۵۶۹ توالی پلی پپتیدی، ۲۲۵۵ شناسه از UniProt، ۲۹ شناسه از UniProt با چندین زنجیره پلی پپتیدی و ۳۱۴ شناسه GenBank RefSeqProtein است. پایگاه داده (AllergenDB) Allermatchtm با استفاده از ترکیب UniProt و GenBank NCBI و COMPARE (منبع جامع پروتئین آلرژن UniProt و آلرژن WHO/IUIS) ساخته شده است.

د) وب سرور AllerCatPro 2 (۲۱) برای پیش بینی پتانسیل حساسیت زایی پروتئین DRO1 مورد استفاده قرار گرفت. این ابزار تحت وب می تواند برای پیش بینی پتانسیل حساسیت زایی پروتئین با دقت بهتری نسبت به سایر روش های محاسباتی و ویژگی های جدید استفاده شود که به محققان و ارزیابی کنندگان در تصمیم گیری آگاهانه کمک می کند. پایگاه AllerCatPro 2 با استفاده از توالی

اسیدآمینه و ساختارهای سه بعدی، شباهت پروتئین‌های ورودی را در برابر جامع‌ترین مجموعه داده‌های پروتئین‌های قابل اعتماد مرتبط با حساسیت‌زایی پیش‌بینی می‌کند. این مجموعه داده‌ها در حال حاضر شامل ۴۹۷۹ پروتئین آلرژن، ۱۶۲ پروتئین کم آلرژی‌زا و ۱۶۵ آلرژن خودایمنی با نظارت دستی متخصصان از پایگاه‌های داده زیر است.

نتایج

انتخاب ژن‌های کاندید، جداسازی ژن و طراحی سازه‌ها

و انتقال ژن

توالی پروتئین مرتبط با DRO1 از منشأ برنج از پایگاه NCBI دریافت شد و حضور و قرابت این پروتئین با پروتئین‌هایی که پیش‌بینی می‌شد در ایجاد فنوتیپ ریشه عمیق نقش دارند در چندین گیاه تک لپه‌ای و دو لپه‌ای مقایسه و نتایج آن در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج WHO اتحادیه بین المللی انجمن‌های ایمونولوژیک^۶ (IUIS)؛ منبع جامع آلرژن پروتئین^۷ (COMPARE)؛ برنامه تحقیقاتی و منابع آلرژی غذایی^۸ (FARRP)؛

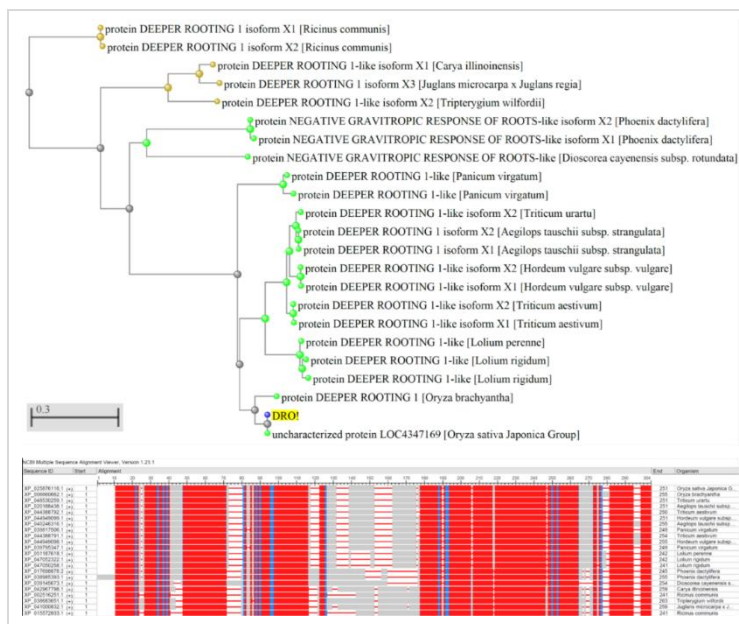
نشان می‌داد که پروتئین DRO1 برنج بیشترین قرابت را با پروتئین مرتبط در گیاه (A. برانچیانثا) با حدود ۸۷ درصد مطابقت نشان می‌دهد و سپس با توالی‌های پروتئین مرتبط از جنس و گونه‌های تریتیکوم/اوراتو، آنجیلوپس تاسچی، ت. آئستیوم، هوردم ولگار و پانیکوم ویرگاتوم حدود ۷۶-۶۹ درصد مطابقت دارد که همانطور که انتظار می‌رود همه آنها گیاهانی تک لپه‌ای هستند. به هر حال نتایج نشان می‌داد این توالی با توالی مرتبط از گیاهان فونیکس داکتیلیفرا و دیوسکورا/کاینسیر که آنها نیز گیاهانی تک لپه‌ای هستند کمتر و بین ۴۳-۳۷ درصد است. همچنین این بررسی نشان داد که نزدیک‌ترین توالی‌های مرتبط با DRO1 برنج از منشأ گیاهان دو لپه‌ای مربوط به گیاهان کاریا/یلینوینسیر، ریسینوس کامیونیز، تربیتریگیوم ویلفوردی و جاکلانس میکروکاریا هستند که شباهت آنها بین ۳۶ تا ۳۷ درصد نشان داده شد (شکل ۱).

AllerCatPro و UniProtKB. وب سرور Allergome. 2 بصورت رایگان در آدرس -<https://allercatpro.bii.a-star.edu.sg> در دسترس است.

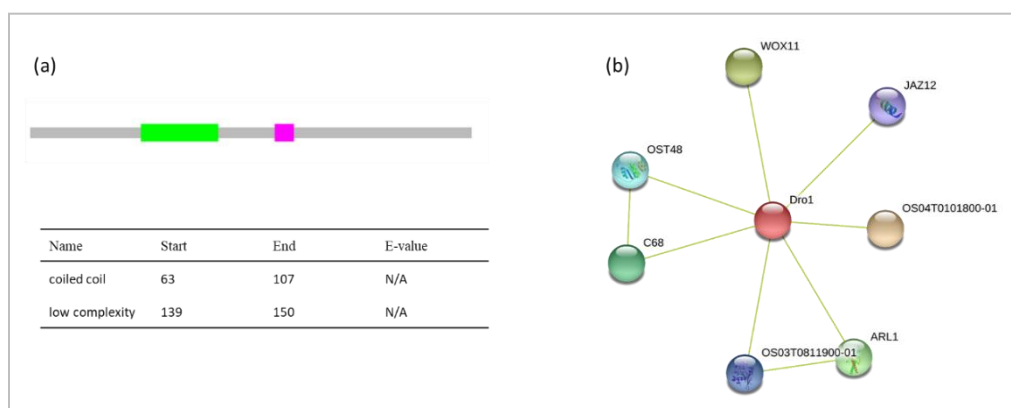
⁸ Food Allergy Research and Resource Program

⁶ International Union of Immunological Societies

⁷ Comprehensive Protein Allergen Resource



شکل ۱. بررسی قرابت پروتئین DRO1 برنج مورد استفاده در این تحقیق با پروتئین‌های متناظر در گیاهان تک لپه و دولپه. در شکل ۲ دایره سبز توالی متناظر از منشأ گیاهان تک لپه و دایره زرد گیاهان دولپه را نشان می‌دهد. دایره آبی مربوط به پروتئین DRO1 مورد استفاده در این تحقیق است



شکل ۲. نتایج پایگاه SMART برای شناسایی موتیف‌های توالی پروتئینی DRO1 (a) و شناسایی پروتئین‌های مرتبط با DRO1 برنج (b).

جدول ۱. پیشگویی عملکرد پروتئین DRO1 برنج مورد استفاده در این تحقیق بر اساس ارتباطات پروتئینی

Predicted Functional Partners		Score	Neighborhood	Gene Fusion	Cooccurrence	Coexpression	Experiments	Databases	Textmining	[Homology]
OS04T0101800-01	<i>Os04g0101800 protein (689 aa)</i>	۰/۷۳۳							✓	
WOX11	<i>WUSCHEL-related homeobox 11; Transcription factor which may be involved in developmental processes (By similarity). Promotes the development of crown roots (both initiation and elongation), main components of the fibrous root system, by regulating the expression of genes required for crown root development and hormone-responsive genes involved in cytokinin (e.g. RR1, RR2, RR3 and RR4) and auxin (e.g. IAA5, IAA11, IAA23 and IAA31) signaling; Belongs to the WUS homeobox family (262 aa)</i>	۰/۴۹۹							✓	
ARL1	<i>Adventitious rootless1; Expressed protein; LOB domain protein; Os03g0149100 protein (259 aa)</i>	۰/۴۹۵							✓	
C68	<i>Os02g0236100 protein; Putative SERK1 protein; cDNA clone-J013129G20, full insert sequence ; Belongs to the protein kinase superfamily. Ser/Thr protein kinase family (620 aa)</i>	۰/۴۹۵							✓	
OST48	<i>Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa subunit; Essential subunit of the N-oligosaccharyl transferase (OST) complex which catalyzes the transfer of a high mannose oligosaccharide from a lipid-linked oligosaccharide donor to an asparagine residue within an Asn-X-Ser/Thr consensus motif in nascent polypeptide chains (439 aa)</i>	۰/۴۹۱							✓	
OS03T0811900-01	<i>ADP-ribosylation factor; ADP-ribosylation factor, putative, expressed; Os03g0811900 protein ; Belongs to the small GTPase superfamily. Arf family (181 aa)</i>	۰/۴۲۶							✓	
JAZ12	<i>Protein TIFY 11d; Repressor of jasmonate (JA) responses (By similarity). May act on an initial response of JA-regulated gene expression toward drought tolerance as part of a BHLH148-TIFY11D/JAZ12-COI1A complex (171 aa)</i>	۰/۴۲۲							✓	

پایگاه SMART ([http://smart.embl-](http://smart.embl-heidelberg.de))

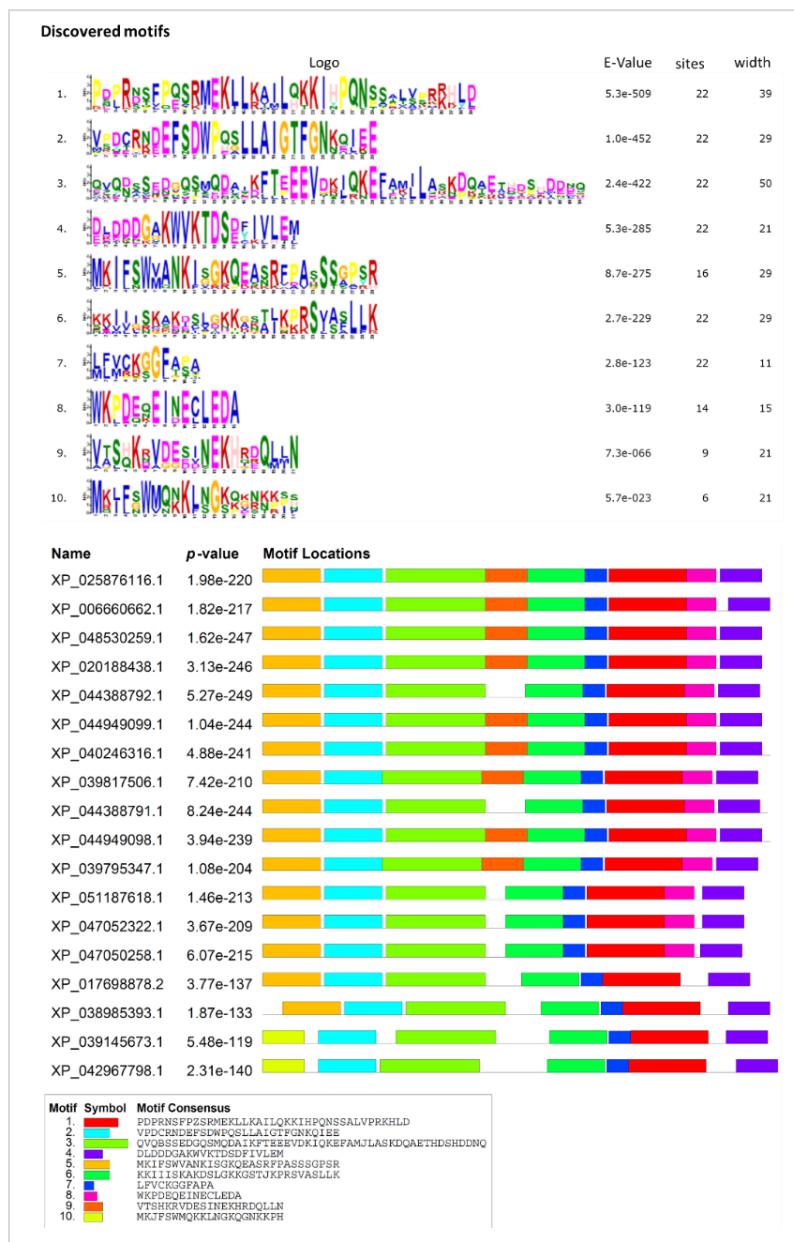
نتوانست موتیف دارای کارکردی برای (heidelberg.de)

توالی اسیدآمینه‌ای ژن DRO1 برنج پیدا کند (شکل ۲ و جدول ۱).

شناسایی موتیف DRO1

که نتایج آن در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد از ۱۰ موتیف پیشگویی شده در این پایگاه، تعداد شش موتیف در ۲۲ پروتئین DRO1 از گونه های تکلیفه و دولفه مورد بررسی در این تحقیق مشترک هستند.

به دلیل اینکه پایگاه SMART نتوانست موتیف هایی را بر اساس پروتئین های شناخته شده قبلی برای ژن DRO1 برنج شناسایی کند بنابراین به منظور پیدا کردن موتیف های کارکردی از پایگاه MEME ([https://meme-](https://meme-suite.org/meme/tools/meme)) استفاده شد (22)



شکل ۳. نتایج پایگاه MEME در انتخاب موتیف های کارکردی پروتئین DRO1 برنج. از ده موتیف احتمالی (قسمت بالای شکل) که بر اساس E-Value مرتب شده اند تعداد شش موتیف در ۲۲ گیاه تک لپه و دولپه مورد بررسی در این تحقیق مشترک تشخیص داده شدند. Width: عرض موتیف الگویی با عرض ثابت را توصیف می کند، زیرا وجود هیچ شکافی در موتیف در پایگاه MEME مجاز نیست. Sites: تعداد سایت هایی که در ساخت موتیف نقش دارند را نشان می دهد. نتایج نشان می دهد

بررسی ایمنی پروتئین حاصل از تراژن DRO1
توالی پپتیدی DRO1 مورد استفاده در این تحقیق با طول ۲۵۱ اسید آمینه در پایگاه AllergenOnline مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز ۱۷۲ قطعه ۸۰ اسید آمینه ای در کل توالی این پروتئین شباهت بالای ۳۵ درصد با هیچ

آلرژنی نشان نداد (شکل ۴-بالا). همچنین ۲۴۴ قطعه پپتید ۸ اسید آمینه ای کل این توالی با هیچ توالی آلرژنی منطبق نشدند (شکل ۴).

80mer Sliding Window Search Results	
Database	AllergenOnline Database v21 (February 14, 2021)
Input Query	>query mkifswvankisgkqeanrfpanssapyranvscdrkdefsdwpqsliaigtfgnqkiee vaqvnsndnvsvqdtvkfteeevdkirkefetllaikdqaearshdddqvgllqkrad gednekhirlqlinkriivsksknslgkkgntlkprsvasllklfmckggfts vvppeprnt fpqsrmeklkailqkkihpnssstlvakrhldwkpdeinecledalrlddddgakv ktdseyivlem
Length	251
Number of 80 mers	172
Number of Sequences with hits	0
No Matches of Greater than 35% Identity Found	
AllergenOnline Database v21 (February 14, 2021)	
<u>>query.</u>	
number of 8mer = 244	
Number of Sequences with at least one 8mer match = 0	

شکل ۴. نتایج پایگاه AllergenOnline برای بررسی احتمال آلرژی زایی پروتئین حاصل از تراژن DRO1. هیچ شباهتی با آلرژن ها در این بررسی مشاهده نشد.

قطعه ۲۳ و ۹ اسید آمینه ای (جدول ۲ - با رنگ قرمز مشخص شده است). با توجه به اینکه در آنالیز پایگاه AllergenOnline تمام احتمالات آلرژنی زایی قطعات ۸ تایی این پروتئین مورد بررسی قرار گرفته و شباهتی به آلرژن ها نشان داده نشده بود، بنابراین تنها پتانسیل

نتایج بررسی In-silico هضم DRO1 توسط آنزیم های پپسین، تریپسین و کیموتریپسین در پایگاه PeptideCutter، ایجاد ۲۵۱ قطعه از این پروتئین را نشان داد (جدول ۲) که تعداد زیادی از آنها یک تا دو اسید آمینه و بقیه قطعات دارای طول زیر ۸ اسید آمینه بودند بجز دو

شباهتی با آلرژن‌ها نشان نداد. توالی ۹ اسیدآمینهای PDETEINEC نیز در پایگاه AllergenOnline شباهتی به آلرژن‌ها نشان نداد ولی در پایگاه Allermatchtm در برش ۶ تایی شباهت ۲۵ درصدی به یک پروتئاز سرین نشان داد (شکل ۵).

آلرژی‌زایی این دو قطعه ۲۳ و ۹ اسیدآمینهای در پایگاه‌های AllergenOnline و Allermatchtm مورد بررسی قرار گرفت. توالی ۲۳ اسیدآمینهای QIEEVAQVENSSDNVQSVQDTVK حاصل از هضم DRO1 با آنزیم‌های معده در این دو پایگاه هیچ

جدول ۲. نتایج برش پروتئین حاصل از تراژن DRO1 توسط آنزیم‌های پپسین، تریپسین و کیموتریپسین

Position of cleavage site	Name of cleaving enzyme(s)	Resulting peptide sequence	Peptide length [aa]	Peptide mass [Da]
۱	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	M	۱	۱۴۹/۲۰۸
۲	Trypsin	K	۱	۱۴۶/۱۸۹
۳	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	I	۱	۱۳۱/۱۷۵
۴	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	F	۱	۱۶۵/۱۹۲
۵	Pepsin (pH>2)	S	۱	۱۰۵/۰۹۳
۶	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH>2)	W	۱	۲۰۴/۲۸۸
۱۰	Trypsin	VANK	۴	۴۳۰/۵۰۵
۱۴	Trypsin	ISGK	۴	۴۰۳/۴۹۷
۱۹	Trypsin	QEANR	۵	۶۱۶/۶۳۲
۲۰	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	F	۱	۱۶۵/۱۹۲
۲۷	Pepsin (pH>2)	PANSSAP	۷	۶۴۲/۶۶۶
۲۸	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	Y	۱	۱۸۱/۱۹۱
۲۹	Trypsin	R	۱	۱۷۴/۲۰۳
۳۷	Trypsin	ANVSDCRK	۸	۸۹۱/۹۹۸
۴۰	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	DEF	۳	۴۰۹/۳۹۶
۴۳	Pepsin (pH>2)	SDW	۳	۴۰۶/۳۹۵
۴۶	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	PQS	۳	۳۳۰/۳۴۱
۴۷	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۴۸	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵

	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)			
۵۲	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	AIGT	۴	۳۶۰/۴۱۰
۵۳	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	F	۱	۱۶۵/۱۹۲
۵۶	Trypsin	GNK	۳	۳۱۷/۳۴۵
۷۹	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2) Trypsin	QIEEVAQVENSDDNVQSVQDTVK	۲۳	۲۵۴/۶۸۴
۸۹	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	F	۱	۱۶۵/۱۹۲
۸۷	Trypsin	TEEEVDK	۷	۸۴۸/۸۶۲
۸۹	Trypsin	IR	۲	۲۸۷/۳۶۲
۹۰	Trypsin	K	۱	۱۴۶/۱۸۹
۹۲	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	EF	۲	۲۹۴/۳۰۷
۹۴	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	ET	۲	۲۴۸/۲۳۶
۹۵	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۹۶	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۹۹	Trypsin	AIK	۳	۳۳۰/۴۲۸
۱۰۶	Trypsin	DQAEAQR	۷	۸۱۶/۸۲۶
۱۱۴	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	SHDDDDQVG	۸	۸۷۱/۸۱۶
۱۱۵	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۱۱۷	Trypsin	QK	۲	۲۷۴/۳۲۰
۱۱۸	Trypsin	R	۱	۱۷۴/۲۰۳
۱۲۶	Trypsin	ADGEDNEK	۸	۸۷۶/۸۳۲
۱۲۷	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	H	۱	۱۵۵/۱۵۶
۱۲۹	Trypsin	IR	۲	۲۸۷/۳۶۲
۱۳۰	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	Q	۱	۱۴۶/۱۴۶
۱۳۱	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۱۳۴	Trypsin	INK	۳	۳۷۳/۴۵۳
۱۳۵	Trypsin	R	۱	۱۷۴/۲۰۳
۱۴۰	Trypsin	IIVSK	۵	۵۵۸/۷۱۹
۱۴۲	Trypsin	SK	۲	۲۳۳/۲۶۸
۱۴۵	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	NSL	۳	۳۳۲/۳۵۷
۱۴۷	Trypsin	GK	۲	۲۰۳/۲۴۱

۱۴۸	Trypsin	K	۱	۱۴۶/۱۸۹
۱۵۱	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	GNT	۳	۲۹۰/۲۷۶
۱۵۲	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	L	۱	۱۳۱/۱۷۰
۱۵۵	Trypsin	KPR	۳	۳۹۹/۴۹۴
۱۵۹	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	SVAS	۴	۳۶۲/۳۸۳
۱۶۰	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۰
۱۶۱	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۰
۱۶۲	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2) Trypsin	K	۱	۱۴۶/۱۸۹
۱۶۳	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۰
۱۶۴	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	F	۱	۱۶۵/۱۹۲
۱۶۵	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	M	۱	۱۴۹/۲۰۸
۱۶۷	Trypsin	CK	۲	۲۴۹/۳۲۸
۱۷۰	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	GGF	۳	۲۷۹/۲۹۶
۱۸۷	Trypsin	TSVVPEPR	۸	۸۸۴/۰۰۰
۱۸۱	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	NTF	۳	۳۸۰/۴۰۱
۱۸۵	Trypsin	PQSR	۴	۴۸۶/۵۲۸
۱۸۶	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	M	۱	۱۴۹/۲۰۸
۱۸۸	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2) Trypsin	EK	۲	۲۷۵/۳۰۵
۱۸۹	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۰
۱۹۰	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	L	۱	۱۳۱/۱۷۰
۱۹۱	Trypsin	K	۱	۱۴۶/۱۸۹
۱۹۴	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	AIL	۳	۳۱۵/۴۱۳
۱۹۶	Trypsin	QK	۲	۲۷۴/۲۳۰
۱۹۷	Trypsin	K	۱	۱۴۶/۱۸۹
۲۰۵	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	IHPQNSST	۸	۸۸۲/۹۲۸
۲۰۶	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۰
۲۰۹	Trypsin	VAK	۳	۳۱۶/۴۰۱
۲۱۰	Trypsin	R	۱	۱۷۴/۲۰۳

۲۱۱	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	H	۱	۱۵۵/۱۵۶
۲۱۲	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۲۱۴	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	DW	۲	۳۱۹/۳۱۷
۲۱۵	Trypsin	K	۱	۱۴۶/۱۸۹
۲۲۴	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	PDETEINEC	۹	۱۰۴۹/۰۷۴
۲۲۵	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۲۲۸	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	EDA	۳	۳۳۳/۲۹۸
۲۲۹	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۲۳۰	Trypsin	R	۱	۱۷۴/۲۰۳
۲۳۱	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	D	۱	۱۳۳/۱۰۴
۲۳۲	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۲۳۸	Pepsin (pH>2) Trypsin	DDDGAK	۶	۶۱۹/۵۸۶
۲۳۹	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH>2)	W	۱	۲۰۴/۲۲۸
۲۴۱	Trypsin	VK	۲	۲۴۵/۳۲۲
۲۴۵	Pepsin (pH>2)	TDSE	۴	۴۵۰/۴۰۳
۲۴۶	Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P) Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH>2)	Y	۱	۱۸۱/۱۹۱
۲۴۸	Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	IV	۲	۲۳۰/۳۰۷
۲۴۹	Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P) Pepsin (pH1.3) Pepsin (pH>2)	L	۱	۱۳۱/۱۷۵
۲۵۱	end of sequence	EM	۲	۲۸۷/۳۲۳

6 Amino Acid Wordmatch

Database : AllergenDB_propeptides_removed

No	Db	Description	No of exact wordmatches	% of exact wordmatches	External db	Scientific Name	Detailed Information
*1	*2		*3	*4	*5	*6	*7
1	UniProt	Venom serine protease	1	25.00	Q7Z269	Polistes dominula	Go

Analyzed 4 windows

1. Number of the hit, best hit comes first
2. External Database:
= UniProt : UniProt Protein Knowledgebase
= GenBank : GenBank NCBI (RefSeqProtein)
3. Description of the sequence
4. The number of exact 6 aa hits the input sequence had with this allergen
5. The Percentage of exact hits the input sequence is found to hit this allergen sequence
6. External database accession id linking to this database, the superscript ids indicate which database this is:
= U : UniProt
= G : GenBank NCBI (RefSeqProtein)
7. Species name of the allergen
8. Links to a page with specific details on this database sequence and the part of the input sequence aligning to the database sequence.

6 Amino Acid Wordmatch against SP4_POLDO

Database : AllergenDB_propeptides_removed

Allergen Id	SP4_POLDO
Allermatchtm Database	UniProt
Allergen Name	Pol d 4
Source database	Uniprot
Accession Id	Q7Z269
External link	http://www.uniprot.org/uniprot/Q7Z269
Scientific Name	Polistes dominula
Common Name	European paper wasp
Description	Venom serine protease
Size mature protein	258
Sequence	reenckcgwdnpsrivngveteinefpmvarliypspgmycggtiitpqhivtaahclqk ykrtnygtihvvvgehdyyttdtetnvtkrytiaevtihpnyshndiaivktnerfeys mkvgpvcplpfnytmrnltnetvtalwgklryngqnsklrkvdihvitreqcethyga iananllctfdvgrdacqndsggpilwrspttdnlilvgvvnfgtrtcaddapgggnarvts fmefihnatigetyckad

Input Sequence

The '#' denotes which parts of the input sequence have an exact 6 aa match against this specific database sequence

```

0 : PDETEINEC
0 : #####
  
```

Database Sequence

The '#' denotes which parts of the database sequence have an exact 6 aa match against the input sequence

```

0 : reenckcgwdnpsrivngveteinefpmvarliypspgmycggtiitpqhivtaahclqk
0 : #####

60 : ykrtnygtihvvvgehdyyttdtetnvtkrytiaevtihpnyshndiaivktnerfeys
60 :

120 : mkvgpvcplpfnytmrnltnetvtalwgklryngqnsklrkvdihvitreqcethyga
120 :

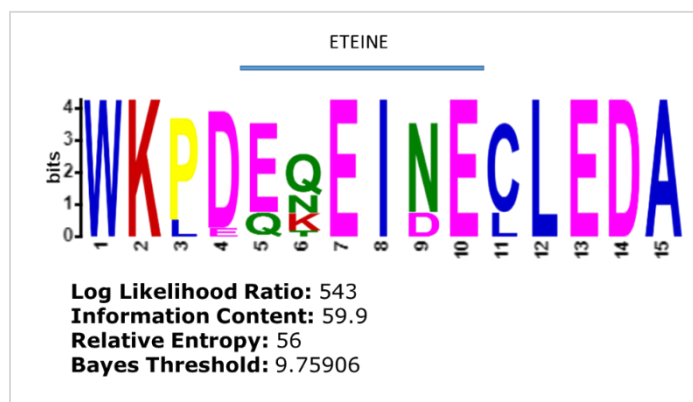
180 : iananllctfdvgrdacqndsggpilwrspttdnlilvgvvnfgtrtcaddapgggnarvts
180 :

240 : fmefihnatigetyckad
240 :
  
```

شکل ۵. نتیجه بررسی شباهت قطعه ۹ اسیدآمینهای (PDETEINEC) حاصل از هضم پروتئین DRO1 با آنزیم های پپسین، تریپسین و کموترپسین در پایگاه Allermatchtm

این ۱۴ توالی DRO مشترک و در سه اسیدآمین به بین این توالی ها اختلاف است که بیشترین اختلاف مربوط به حضور اسیدآمین ترئونین (دومین اسیدآمین مچ شده با آلرژن) نشان داده شده است. بر اساس جدول ۳ حضور این موتیف با بیشترین مطابقت بین توالی های DRO1 انتخاب شده مربوط به *H. vulgare* و با P-value ی $2/49e-19$ بوده است.

بررسی ما نشان داد توالی ۶ تایی مرتبط با آلرژن مربوط به اسیدهای آمینه ۲۱۸ تا ۲۲۳ در موتیف هشتم کشف شده توسط پایگاه MEME از پروتئین DRO1 بوده (شکل ۳ بالا) و در ۱۴ توالی از ۲۲ توالی انتخاب شده ما حضور دارد. بررسی بیشتر این موتیف در شکل ۶ و جدول ۳ نشان داده شده است. محل این شش اسیدآمین (ETEINE) در این موتیف ۱۵ اسیدآمین ای نشان می دهد سه اسیدآمین آن در



شکل ۶. الگوی تشخیص داده شده توسط پایگاه MEME برای توالی ETEINE حاصل از هضم شبیه سازی شده پروتئین DRO1 برنج با آنزیم های معده

آمین ترئونین با حداقل تعداد در الگوی این موتیف (جایگاه ششم) وجود دارد.

این الگو که در موتیف هشتم معرفی شده در این تحقیق برای پروتئین DRO1 برنج وجود دارد نشان داد شباهت آن به آلرژن پروتئاز سرین بسیار ناچیز است به ویژه اینکه اسید

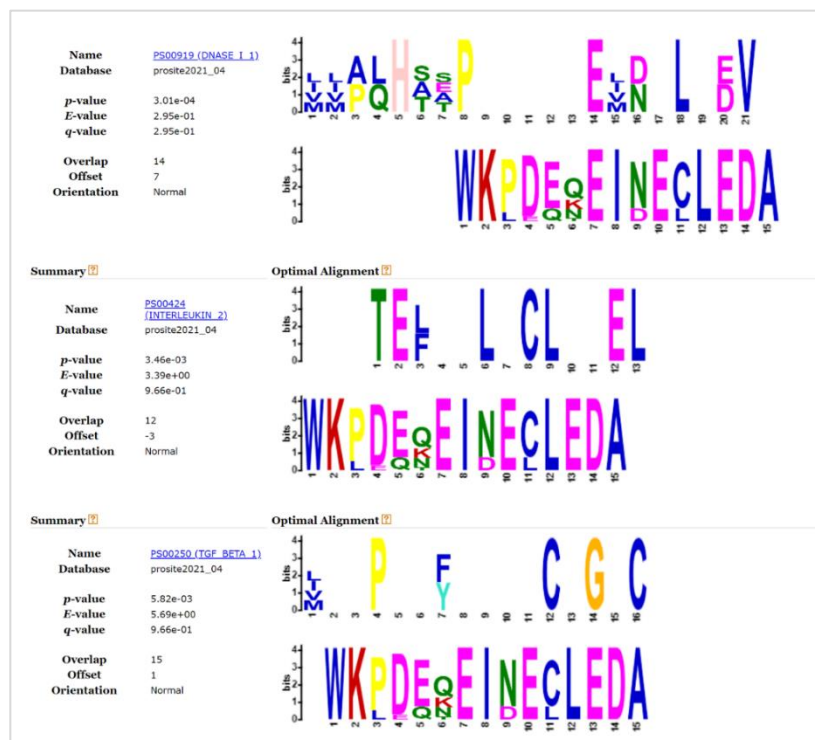
جدول ۳. سایت موتیف (موتیف هشتم معرفی شده برای پروتئین DRO1 برنج) با ۱۰ اسیدآمین کناری در دو طرف (SALAPRRHLDWKPDEQEINECLEDALRDLDDDGAK) در ۱۴ توالی متناظر با DRO1 از گیاهان مختلف

ترتیب قرابت به DRO1 برنج	Name	Start	p-value
۱۰	XP_044949098.1	۲۱۴	2.49e-19
۹	XP_044388791.1	۲۱۳	2.49e-19
۷	XP_040246316.1	۲۱۴	2.49e-19
۶	XP_044949099.1	۲۱۴	2.49e-19

۵	XP_044388792.1	۲۱۳	2.49e-19
۴	XP_020188438.1	۲۱۴	2.49e-19
۳	XP_048530259.1	۲۱۴	2.49e-19
۱	XP_025876116.1	۲۱۴	1.36e-18
۱۱	XP_039795347.1	۲۱۲	1.61e-17
۸	XP_039817506.1	۲۱۲	1.61e-17
۲	XP_006660662.1	۲۱۴	2.32e-17
۱۴	XP_047050258.1	۲۰۳	3.21e-16
۱۳	XP_047052322.1	۲۰۳	3.21e-16
۱۲	XP_051187618.1	۲۰۳	3.21e-16

E-value نسبت به موتیف شماره ۸ در شکل ۷ نشان داده شده است و نشان دهنده این است که شش اسید آمینه مرتبط با آلرژن در موتیف های شناخته شده توسط این پایگاه وجود ندارد.

موتیف دارای توالی حاصل از هضم شبیه سازی شده پروتئین DRO1 برنج با آنزیم های معده در برش ۶ تایی در پایگاه Tomtom نیز بررسی شد. نتایج مربوط به سه موتیف شناخته شده پیدا شده توسط این پایگاه بر اساس رتبه بندی



شکل ۷. نتیجه بررسی موتیف هشتم معرفی شده برای پروتئین DRO1 برنج در پایگاه Tomtom

بینی پتانسیل حساسیت‌زایی است (۲۱) استفاده شد. این پایگاه که اخیراً توسعه داده شده پیش‌بینی پتانسیل آلرژی‌زایی توالی‌های پروتئین را هم بر اساس شباهت توالی اسید آمینه و هم بر اساس شباهت ساختارهای سه بعدی آنها بررسی کرده و از مجموعه داده‌های جامع برای این منظور استفاده می‌کند. نتایج این پایگاه نه تنها به طور ۱۰۰ درصد عدم وجود شواهدی دال بر آلرژین بودن این پروتئین را نشان داد بلکه حتی عدم شباهت DRO1 به پروتئین‌هایی با آلرژی‌زایی کم و نیز عدم شباهت به آلرژن‌های خودایمنی را نیز نشان داد. نتایج این پایگاه در شکل ۸ نشان داده شده و هیچ شواهدی مبنی بر شباهت به آلرژن‌ها و پتانسیل آلرژی‌زایی در آن یافت نشده است.

با توجه به اینکه نتایج ما ایمن بودن بالقوه پروتئین DRO1 را نشان می‌داد ساختار سه بعدی این پروتئین نیز برای اطمینان بیشتر از عدم مشابهت با پروتئاز سرین که در برش ۶ تایی به دست آمده بود در پایگاه Phyre2 (۲۳) به دست آمد و مقایسه شد و عدم مشابهت ساختار سه بعدی آنها تایید شد (شکل ۸).

بنابراین نتایج این تحقیق نشان داد شواهدی مبنی بر آلرژی‌زایی و حساسیت‌زایی پروتئین DRO1 برنج به صورت بالقوه وجود ندارد. برای اطمینان بیشتر از عدم پتانسیل آلرژی‌زایی و حساسیت‌زایی این پروتئین، از پایگاه AllerCatPro 2.0 نیز که یک وب سرور جدید برای پیش

AllerCatPro 2.0 Results

Protein sequence of interest					Predicted most similar allergen (non-autoimmune allergens)	Potential cross-reactivity of query protein (# and links)	Protein info, functionality of most similar allergen				Clinical relevance of most similar allergen		Similarity to most similar allergen			Similarity to allergen and resulting predicted evidence for allergenicity		Similarity to autoimmune allergen (% identity to closest human hit)	Similarity to low allergenic protein (% identity to closest hit)
Query#	Name	Sequence Length	Gluten allergens (# of Q-repeats)	# of 3x6-mer overlaps	Protein allergen	Species	UniProt/NCBI	Functionality (SUPFAM)	Pfam	InterPro	IgE prevalence	Allergen info	% identity, linear 80 aa window	% identity, 3D epitope	Show 3D epitope	Result	Comment		
1	DRO	251	0	-	No significant hit (E-value threshold 0.001)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	no evidence	no hits	-	-

Download result as comma-separated table (can also be opened in Excel)

Summary result (Model 2.0 cv 1.1):

strong evidence

0/1 (0.0%)

weak evidence

0/1 (0.0%)

no evidence

1/1 (100.0%)

no hits

1

شکل ۸. تایید ایمن بودن پروتئین DRO1 برنج در پایگاه AllerCatPro 2.0 وب سروری برای پیش‌بینی پتانسیل حساسیت‌زایی پروتئین (۲۱)

بحث و نتیجه‌گیری

برنج غذای اصلی بیش از نیمی از جمعیت جهان است. این محصول در بیش از ۱۰۰ کشور کشت می‌شود و ۹۰ درصد تولیدات جهانی آن در آسیا است. به دلیل مصرف زیاد آب در کشت برنج ارائه راهکارهایی که بتوانند میزان مصرف آب را در کشت برنج کاهش دهند در جهت دستیابی به امنیت غذایی این محصول موثر خواهند بود. در این تحقیق پروتئین DRO1 از منشا یک گونه وحشی برنج به منظور استفاده اثرات مفید آن در بهبود ساختار ریشه در جهت تحمل به خشکی و افزایش عملکرد گیاه بررسی شد. پس از شناسایی پروتئین‌های متناظر آن در گیاهان تک لپه و دولپه و شناسایی موتیف‌ها، ارزیابی پتانسیل آلرژی‌زایی و ایمنی‌زایی آن نشان داد که فاقد هر گونه شباهت توالی و ساختار سه بعدی با آلرژن‌های شناخته شده بوده و می‌توان آن را به طور بالقوه ایمن در نظر گرفت و با انتقال این ژن به صورت بیش بیان و نیز مختص ریشه در برنج تجاری رقم هاشمی به لاین‌هایی دست یافت که در شرایط کم‌آبی عملکرد مناسبی از خود نشان دهند. در سیستم‌های تولید دیم، ظرفیت گیاهان زراعی برای جذب آب از حجم بیشتری از خاک برای پایداری عملکرد بسیار مهم است و تا حد زیادی به سیستم ریشه عمیق بستگی دارد. در این زمینه، ژن DRO1 در برنج به عنوان یک تنظیم کننده زاویه ریشه شناسایی شده

است (۲۴ و ۲۵). رقم برنج کینلاندنگ پاتلنگ (KP) با یک نسخه کامل از DRO1 ریشه‌ای عمودی با زاویه تند را نشان می‌دهد، در حالی که رقم برنج IR64 دارای ریشه‌های کم عمق‌تری است که به یک نسخه ناقص از آلل DRO1 نسبت داده می‌شود (۲۵). تحقیقات ما نیز نشان داد رقم هاشمی که در بین مردم کشور ما از بازارپسندی خوبی برخوردار است به دلیل وجود نسخه ناقص این ژن نمی‌تولند از مزایای آن در بهبود ساختار ریشه، تحمل خشکی و بهبود عملکرد استفاده کند (۱۲-۱۰). ریشه‌زایی عمیق در برنج برای تحمل به خشکی، جذب نیتروژن، جریان سیتوکینین بیشتر در طول پر شدن دانه و عملکرد بیشتر محصول مرتبط است (۱۴). ارقام مختلفی از برنج وجود دارند که دارای سیستم ریشه‌ای متفاوتی هستند (۲۶). ارقام زراعی مانند IR64 کم‌بهره‌طور وسیعی در آسیا کشت می‌شود دارای ریشه سطحی هستند، در حالی که رقم KP، ریشه‌دهی عمیق را نشان داده است (۱۳). ژن مسئول این صفت، DRO1 است (۲۵). بیان بالای DRO1 سبب تغییر زاویه رشد ریشه شده، منجر می‌شود که ریشه‌ها به سمت عمق خاک رشد کنند (۲۷). ریشه عمیق، صفتی پیچیده و ترکیبی از اثرات زاویه رشد ریشه، طول ریشه اولیه و ریشه‌های گره‌ای است (۲۸). ژن DRO1 رابطه‌ای عکس با اکسین دارد که در طول‌شدن سلول‌ها در راس ریشه که سبب رشد نامتقارن ریشه و گره‌خوردگی انتهای ریشه در پاسخ به جاذبه زمین می‌شود،

پیش‌بینی می‌کند، بیان مختص ریشه و عدم حضور پروتئین حاصل در بذر نیز می‌تولند در اطمینان بیشتر از ایمنی محصولات غذایی حاصل موثر باشد. بررسی‌های ایمنی زیستی تضمین بهره‌برداری از فواید قطعی بیوتکنولوژی مدرن و مدیریت آثار جانبی احتمالی کاربرد این فناوری را دربرداشته و استفاده از مزایای مهندسی ژنتیک در جهت امنیت غذایی را در پی خواهد داشت (۲۹). همچنین در این تحقیق منشا ژن DRO1 از یکی از گونه‌های برنج بوده و انتقال ژن‌های مفید از گونه‌های قابل تلاقی از طریق مهندسی ژنتیک به گیاه هدف که به سیس‌ژنسیس و اینتراژنسیس معروف است در برخی کشورها با قوانین کمتر سختگیرانه‌ای مواجه هستند. بدیهی است آزمایشات تکمیلی ایمنی‌زیستی و فیزیولوژی در مراحل بعدی پژوهشی مورد نیاز خواهند بود.

دخالت دارد (۲۸). این ژن در شرایط خشکی نقش مناسبی در افزایش طول ریشه و افزایش جذب آب و مواد غذایی دارد. انتقال DRO1 به یک رقم برنج با ریشه کم عمق، لاین حاصل را قادر ساخت تا از خشکی توسط افزایش عمق ریشه‌دهی خود اجتناب کند و این امر منجر به حفظ عملکرد بالا در شرایط تنش خشکی در مقایسه با رقم اولیه شاهد شد (۱۳). در تحقیق مذکور، بیوماس و طول ریشه تغییر چندانی نداشت ولی میزان محصول نهایی (دانه‌های پر شده) در تنش خشکی متوسط و شدید حدود ۳۰ درصد افزایش نشان داد (۱۵). مطالعات نشان دادند که ژن DRO1 توانایی افزایش جذب نیتروژن را داشته و همچنین با تنظیم جریان سیتوکینین، نقش مهمی را در پر شدن دانه‌ها را در شرایط مزرعه ایفا می‌کند (۱۴). در این تحقیق علاوه بر تایید ایمنی بالقوه پروتئین DRO1 که بیان دائمی آن را در لاین‌های حاصل فاقد احتمال خطر آلرژی‌زایی و حساسیت‌زایی

منابع

1. Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(2):228–38.
2. Sarwar MH, Sarwar MF, Sarwar M, Qadri NA, Moghal S. The importance of cereals (Poaceae: Gramineae) nutrition in human health: A review. *J Cereal oilseeds*. 2013;4(3):32–5.
3. Mueller ND, Gerber JS, Johnston M, Ray DK, Ramankutty N, Foley JA. Closing yield gaps through nutrient and water management. *Nature*. 2012;490(7419):254.
4. Ray DK, Mueller ND, West PC, Foley JA. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. *PLoS One*. 2013;8(6):e66428.
5. Luo L, Xia H, Lu B-R. Crop breeding for drought resistance. Vol. 10, *Frontiers in plant science*. Frontiers Media SA; 2019. p. 314.
6. Khan MA, Gemenet DC, Villordon A. Root system architecture and abiotic stress tolerance: current knowledge in root and tuber crops. *Front Plant Sci*. 2016;7:1584.
7. Shorinola O, Kaye R, Golan G, Peleg Z, Kepinski S, Uauy C. Genetic screening for mutants with altered seminal root numbers in hexaploid wheat using a high-throughput root phenotyping platform. *G3 Genes, Genomes, Genet*. 2019;9(9):2799–809.
8. Gewin V. An underground revolution: plant breeders are turning their attention to roots to increase yields without causing environmental damage. *Virginia Gewin unearths some promising subterranean strategies. Nature*. 2010;466(7306):552–4.
9. Maqbool S, Hassan MA, Xia X, York LM, Rasheed A. Root system architecture in cereals : progress , challenges and perspective. 2022;23–42.
10. Zandi M, Hosseini R, Mohsenpour M, HOSSEINI SG, Ghareyazie B. Transformation of DRO1, OsNAC5, OsEXPA8 genes in order to improve rice root architecture modification and improved drought tolerance in rice. 2019;
11. Ghorbanzadeh Z, Kazemi Alamouti M, Pourhang L, Mousavi Pakzad SM, Moatamed

- E, Mapar M, et al. Identification and investigation of DRO1 gene in rice cultivar Hashemi and its simultaneous transfer with OsCKX4 gene to improve root structure. *Crop Biotechnol.* 2022;11(36):49–62.
12. Kazemi M, Ghorbanzadeh Z, Pourhang L, Mousavi pakzad SM, Moatamed E, Mapar M, et al. Rice genetic engineering using transformation of Deeper Rooting1 and Phosphorus-Starvation Tolerance1 genes. *Agric Biotechnol J.* 2022;14(1):1–20.
13. Uga Y, Okuno K, Yano M. Dro1 , a major QTL involved in deep rooting of rice under upland field conditions. 2011;62(8):2485–94.
14. Arai-Sanoh Y, Takai T, Yoshinaga S, Nakano H, Kojima M, Sakakibara H, et al. Deep rooting conferred by DEEPER ROOTING 1 enhances rice yield in paddy fields. *Sci Rep.* 2014;4:5563.
15. Uga Y, Kitomi Y, Yamamoto E, Kanno N, Kawai S, Mizubayashi T, et al. A QTL for root growth angle on rice chromosome 7 is involved in the genetic pathway of DEEPER ROOTING 1. *Rice.* 2015;8(1):8.
16. Kitomi Y, Itoh J, Uga Y. Genetic Mechanisms Involved in the Formation of Root System Architecture. 2018. 241-274 p.
17. Gupta S, Stamatoyannopoulos JA, Bailey TL, Noble WS. Quantifying similarity between motifs. *Genome Biol.* 2007;8:1–9.
18. Goodman RE, Ebisawa M, Ferreira F, Sampson HA, van Ree R, Vieths S, et al. AllergenOnline: a peer-reviewed, curated allergen database to assess novel food proteins for potential cross-reactivity. *Mol Nutr Food Res.* 2016;60(5):1183–98.
19. Codex Alimentarius Commission. Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants. Vol. 45, CAC/GL. 2003.
20. FAO/WHO. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology–Allergenicity of Genetically Modified Foods–Rome, 22–25 January 2001. Rome, Food and Agriculture Organisation of the United Nations. 2001.
21. Nguyen MN, Krutz NL, Limvipuvadh V, Lopata AL, Gerberick GF, Maurer-Stroh S. AllerCatPro 2.0: a web server for predicting protein allergenicity potential. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(W1):W36–43.
22. Bailey TL, Elkan C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in bipolymers. 1994;
23. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling , prediction and analysis. *Nat Protoc.* 2015;10(6):845–58.
24. Uga Y. Quantitative measurement of root growth angle by using the basket method. *Methodol root drought Stud rice Philipp Int Rice Res Inst.* 2012;22–6.
25. Uga Y, Sugimoto K, Ogawa S, Rane J, Ishitani M, Hara N, et al. Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. *Nat Genet.* 2013;(August):1–9.
26. Uga Y, Ebana K, Abe J, Morita S, Okuno K, Yano M. Variation in root morphology and anatomy among accessions of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) with different genetic backgrounds. *Breed Sci.* 2009;59(1):87–93.
27. Kondo M, Murty MVR, Aragonés D V. Characteristics of root growth and water uptake from soil in upland rice and maize under water stress. *Soil Sci Plant Nutr.* 2000;46(3):721–32.
28. Araki H, Morita S, Tatsumi J, Iijima M. Physiol-morphological analysis on axile root growth in upland rice. *Plant Prod Sci.* 2002;5(4):286–93.
29. Mohsenpour M, Kahak S, Ghareyazie B. Genetic Engineering and Food Security. *Strateg Res J Agric Sci Nat Resour.* 2018;3(2):195–208.

بررسی و جداسازی میکروارگانیسم های جدا شده از اتاق تمیز یک کارخانه داروسازی و بررسی برخی از عوامل فیزیکو-شیمیایی بر بقای آن ها

عباس اخوان سپهی^{۱*}، امیر مسعود دانشور^۲

۱. استاد، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروب شناسی دانشکده علوم زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: اتاق تمیز نقشی کلیدی در صنایع مختلف از جمله صنایع داروسازی دارد. فضای تمیز مبنا و اساس فضای تولیدی در صنعت داروسازی و برخی از صنایع دیگر است. به همین علت این فضا باید دارای شرایطی پایدار باشد و برای اطمینان از این پایداری به صورت دائمی پایش گشته، تغییرات آن رصد گردد.

مواد و روش ها: در این تحقیق به مدت ۸۴ روز (۷ هفته) از کلاس های مختلف اتاق تمیز در یک شرکت داروسازی بر طبق استانداردهای WHO ، USP 46 (2024) ، PIC/S (2023) با روش ها و تجهیزات استاندارد و بر اساس شاخص های ارزیابی ریسک و تحلیل ریسک نمونه گیری به عمل آمده، میکروارگانیسم های شاخص و دارای اهمیت در استانداردهای دارویی (بر اساس روش های مندرج در USP 46) تعیین جنسیت و گونه گردیدند و در نهایت اثرات برخی از عوامل شیمیایی و فیزیکی (۲ نوع ماده ضدعفونی کننده تجارتي و نور UV حاصل از لامپ نصب شده در فضای BSC) بر این میکروارگانیسم ها بررسی شد.

یافته ها: بررسی ها پس از ۸۴ روز نمونه گیری و تعیین پروفایل میکروبی مبین این بود که تعداد میکروارگانیسم ها (به خصوص در فضاهای با حساسیت بالاتر (ISO Class 5 & 6) مطابق با استانداردهای دارویی می باشد و ارتباط بین برخی از پرسنل و ملزومات بسته بندی که اغلب در شرایط GMP تولید نمی شوند نشان داد که احتمالاً منشأ ورود میکروارگانیسم ها به این فضا، همین مسیرها باشند.

نتیجه گیری: نمونه گیری های میدانی و بررسی و تحلیل این نمونه ها نشان داد که تمام بخش های تولیدی مورد بررسی مطابق با الزامات فضای تمیز بر اساس استانداردهای WHO و استانداردهای سه گانه ISO 14644، تدوین شده در سالهای ۲۰۱۵ و ۲۰۱۹ و فرماکوپه های مورد استناد صنایع داروسازی و سازمان های نظارتی بوده است و به کار بردن راهکارهایی ساده میتواند سطح آلودگی میکروبی را در این فضاها کاهش دهد.

کلمات کلیدی: میکروارگانیسم، دارو، سلامت، کنترل کیفیت، اتاق تمیز

Investigating and identification of microorganisms isolated from the cleanrooms of a pharmaceutical factory and the effect of some physico-chemical factors on their survival

Abbas Akhavan Sepahy ^{1*}, Amir Masoud Daneshvar ²

1. Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, North Tehran Islamic Azac University
2. MS degree student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, North Tehran Islamic Azac Universit

Abstract

Introduction: Clean room plays a key role in various industries including pharmaceutical industries. Clean space or in more precise terms, clean room is the basis of the production space in the pharmaceutical industry and some other industries. For this reason, this space must have stable conditions and to ensure this stability, it must be constantly monitored and its changes monitored. In this research, using standard methods approved by sources and pharmaceutical standards, the clean room in different classes was microbiologically examined and the main microorganisms isolated were identified and sourced.

Methods: In this research, for 84 days (7 weeks), different classes of clean room in a pharmaceutical company according to WHO standards, USP 46 (2024), PIC/S (2023) with standard methods and equipment and Based on the risk assessment indicators and risk analysis of sampling, the indicator and important microorganisms in pharmaceutical standards were determined by sex and species, and finally the effects of some chemical and physical factors (2 types of commercial disinfectants and special UV light) from the lamp installed in the space of BSC) was investigated on these microorganisms. It should be noted that the determination of the type of microorganisms was done by biochemical method based on the classical methods included in the reference pharmacopoeias.

Results: After 84 days of sampling and determining the microbial profile, the investigations showed that the number of microorganisms (especially in high sensitivity spaces (ISO Class 5 & 6) is in accordance with pharmaceutical standards and the relationship between some personnel and supplies The packaging, which are often not produced under GMP conditions, showed that the origin of the entry of microorganisms into this space is likely to be these routes.

Discussion and conclusion: Field sampling and the analysis of these samples showed that all the investigated production sectors comply with the clean space requirements based on WHO standards, ISO Standard 14664-1 (2019) and pharmacopoeias cited by the pharmaceutical industry. and regulatory organizations, and using simple solutions can reduce the level of microbial contamination in these spaces.

Keywords: microorganism, medicine, health, quality control, clean room

مقدمه

سلامتی جامعه مصرف کننده، موجب ایجاد ضررهای هنگفت مالی برای تولید کنندگان دارو و متصدیان امور سلامت جامعه خواهد شد. برای جلوگیری از چنین پیشامدهای ناگوار و ناخواسته ای، ضمن کنترل نهایی کیفیت داروهای تولید شده در آزمایشگاه های کنترل کیفیت میکروبی^۴، لازم است در طی فرایند تولید نیز بر اساس روش های ارزیابی و تحلیل ریسک، کنترل های مناسبی اعمال گردند تا هم امکان بروز و ظهور آلودگی مهیا نگردد و هم در اولین مرحله با تشخیص آلودگی احتمالی از توسعه آن و ادامه روند تولید محصولات آلوده جلوگیری به عمل آید. یکی از این کنترل های بنیادی، بررسی وضعیت فضاهای تولید دارو، تعیین کلاس فضاهای تمیز، تعیین میزان مجاز آلودگی، جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم ها، عوامل موثر بر رشد، بقا و مرگ میکروارگانیسم ها و ... می باشد.

اتاق تمیز

اساس کنترل آلودگی در صنعت داروسازی بر پایه اتاق تمیز مناسب و با عملکرد مکفی استوار است. به فضایی که تعداد ذرات^۵ و شرایط محیطی^۶ آن تحت کنترل باشد اتاق تمیز گویند. به عبارت دیگر، اتاق تمیز، فضایی مهندسی شده است که غلظت ذرات را در مقادیری اندک و قابل کنترل حفظ می کند. چنین فضایی به خوبی ایزوله شده و آلودگی آن به صورت فعال^۷ زوده می گردد. اتاق تمیز یک محیط پویا است. به کلیه عواملی که ناخواسته وارد محیط می

امروزه طب^۱ نوین بر ۲ اصل اساسی بنا نهاده شده است که عبارتند از: تشخیص^۲ و درمان^۳. درمان موثر بیماریهای مختلف با استفاده از داروهای صورت می پذیرد که پس از دستیابی انسان به دانش نوین در شاخه های مختلف علوم کشف، فرموله و یا طراحی شده اند. درمان کار آمد و استفاده از داروهای مختلف، خود نباید موجبات بروز مشکلات دیگری برای سلامت مصرف کننده را فراهم آورند. یکی از شایع ترین این مشکلات، عفونت ها و آلودگی های ثانویه ناشی از مصرف داروهای است که، استانداردهای لازم را کسب ننموده اند. علیرغم پیشرفت های شگرف در صنعت داروسازی، متأسفانه سالانه موارد متعددی از عفونت های میکروبی ناشی از مصرف داروهای آلوده گزارش می گردد که حتی مرگ مصرف کنندگان - به ویژه کودکان - را موجب می شوند. تولید داروهای با آلودگی های میکروبی علاوه بر ایجاد مشکلاتی در

نویسنده ی مسئول: استاد، دانشکده ی علوم
زیستی تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی،
تهران، ایران

آدرس الکترونیک:

akhavansepahi@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۱/۱۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۰۶/۲۳

⁵ Particles

⁶ Enviromental Condition

⁷ Dynamic

¹ Medicine

² Diagnosis

³ Treatment

⁴ Microbial Quality Control Laboratory (MQCL)

استفاده از پانسمان های آغشته به کربولیک اسید^۶ (فنل) عفونت پس از جراحی را کنترل کند (T.Sandle, 2016). اتاق تمیز به معنای امروزی آن توسط فیزیکدان آمریکایی ویلیس ویتفیلد^۸ در آزمایشگاه ملی سانديا^۹ در سال ۱۹۶۰ میلادی طراحی و ساخته شد (Naughton, 2019).

اهمیت آلودگی میکروبی و پایش اتاق تمیز در صنعت داروسازی

صنعت داروسازی از جمله صنایعی است که از امکانات اتاق تمیز استفاده می کند. تولید داروی سلامت از ارکان مهم تامین سلامت پایدار جامعه است وجود آلودگی در اتاق تمیز مورد مصرف در صنایع دارویی می تواند موجبات بروز انواع بیماری ها و واکنش های آلرژیک در مصرف کننده گردد.

سالانه، وجود آلودگی های میکروبی که توسط آزمایشگاه های کنترل کیفیت میکروبی صنایع داروسازی تشخیص داده نشده است و موجب ورود داروی آلوده به بازار مصرف گردیده است عاملی است بر بازخوانی^{۱۰} محصول از بازار و در نتیجه ضررهای هنگفت مالی برای تولید کنندگان دارو (Roy et al, 2023). عوامل موثر در کیفیت اتاق تمیز عبارتند از طراحی اتاق تمیز، نقش مصالح ساختمانی یا سطوح، سیستم هواساز (HVAC^۹)، تجهیزات مرتبط با فرایند تولید و پرسنل. پس از استفاده از اتاق تمیز در صنایع داروسازی، توجه به حفظ شرایط میکروبی این فضا و پایش میکروبی آن جلب گردید و برخی از محققین با جدا سازی میکروارگانیسم ها

گردند و موجب بروز مشکلات متعددی در فرایندهای جاری در یک محیط می شوند، آلودگی^۱ اطلاق می شود. وظیفه کلیه اجزاء یک اتاق تمیز کنترل آلودگی و به حداقل رساندن آن است (Naughton, 2019). تعداد ذرات مجاز در این فضا بر اساس کاربرد اتاق تمیز تعیین میگردد تا تاثیر آلودگی بر فرایندها، تجهیزات و افراد را کاهش دهد (ASHREA Handbook, 2018).

کاربرد اتاق تمیز

اتاق تمیز در بسیاری از صنایع تحقیقاتی و تولیدی مدرن مانند ساخت نیمه هادی ها^۲، صنایع الکترونیک و کامپیوتر، صنایع هوا و فضا، صنایع ابزار دقیق، کالبراسیون، تولید میکروماشین ها و همچنین فرآیند تولید انواع داروها، تجهیزات پزشکی و علوم زیستی، بیوتکنولوژی، صنایع نظامی، غذاهای آماده و بسیاری محصولات دیگر کاربرد دارند (Naughton, 2019).

گذری بر پیشینه اتاق تمیز

سربازان رومی اولین کسانی بودند که جهت بستری بیماران خود به فکر استفاده از اتاق تمیز افتادند (Naughton, 2019). قدم بعدی. در طی جنگ داخلی آمریکا، بین سال های ۱۸۶۰ تا ۱۸۶۵، برداشته شد (T.Sandle, 2016). ژوزف لیستر^۳ پیشگام در استفاده از روش های آسپتیک^۴ در جراحی بود. او با الهام از کشفیات موثر لویی پاستور^۵ در ارتباط با روش های از بین بردن میکروب ها تلاش کرد تا با استفاده از پخش و پاشش مواد ضد عفونی کننده^۶ در فضا و

⁶ Disinfectant

⁷ Carbolic Acid

⁸ Willis Witfield

⁹ Sandia National Laboratories (SNL)

¹⁰ Recall

¹ Contamination

² Semiconductors

³ Joseph Lister

⁴ Aseptic

⁵ Louis Pasteur

انتخاب گردید. سپس برای تعیین تعداد نمونه ها و جایگاه نمونه گیری از روشی موسوم به Risk Analysis استفاده گردید. بدین صورت که بر اساس دستور العمل مندرج در USP 46 و فرمول ($n=\sqrt{A}$) ، که در آن A سطح اتاق تمیز است و جداول Military تعداد نهایی نمونه های لازم تعیین گردید. سپس به میزان حداقل ۳ برابر این تعداد، مکانهایی تحت عنوان محل نمونه گیری اولیه یا PSP^۴ مشخص شد. این نقاط بر اساس سرعت جریان هوا که توسط دستگاه Anemometer و میزان CFM^۵ خروجی از HVAC که توسط Accubalance Hood اندازه گیری می گردد، تعیین شدند. سپس به مدت ۲۱ روز کاری نمونه گیری از تمام نقاط به عمل آمد و در انتها نقاطی را که بالاترین میزان آلودگی میکروبی در طی این ۳ هفته را دارا بودند، به عنوان نقاط نهایی یا TSP^۶ یا بدترین حالت^۷ انتخاب شدند. در نهایت نمونه گیری از نقاط نهایی به مدت ۸۴ روز مطابق با ۱۲ هفته (بر اساس تواتر و کلاس) انجام گردید. تعداد و نقشه نقاط نهایی نمونه گیری به شرح ذیل است. این نقاط جهت نمونه گیری از هوا و سطوح مورد استفاده واقع گردیدند. * تعداد نقاط نهایی در Grade A (ISO Class 5) : ۹ نقطه با تواتر نمونه برداری روزانه

* تعداد نقاط نهایی در Grade B (ISO Class 6) : ۶ نقطه با تواتر نمونه گیری روزانه

* تعداد نقاط نهایی در Grade C (ISO Class 7) : ۱۳ نقطه با نمونه گیری هفتگی

موجود در اتاق تمیز مورد استفاده در صنایع داروسازی نشان، به این مهم پرداختند. مطالعه دامنه، انواع و الگوهای میکروارگانیسم ها یافت شده در اتاق های تمیز یا Microflora می تواند اطلاعات ضروری را برای میکروبیولوژیست ها فراهم کند و به پرسنل بخش کنترل کیفیت در درک اتاق تمیز و کمک به کنترل آلودگی یاری رساند (Park et al , 2013). با وجود اهمیت چنین اطلاعاتی، مطالعات بسیار کمی در زمینه داروسازی انجام شده است و مقالات اندکی درباره میکرو فلور اتاق تمیز در سال های اخیر منتشر شده است (T.Sandle , 2011) و همکارانش از پیشروان بررسی کیفیت میکروبی اتاق تمیز بودند. تحقیقات در مورد میکروبیوم اتاق تمیز در ISO Class 5 & 6 از سال ۲۰۲۰ بیشتر مورد توجه قرار گرفت (Hamdi , 2018 و Kawaei et al , 2019) و (Pacchioni et al , 2018). در ایران تقریباً تمامی مطالعات در مورد اتاق تمیز، مربوط به حوزه مهندسی این اتاق بوده است و در حوزه میکروبیولوژی اتاق تمیز تحقیق مدونی در دست نیست.

نمونه برداری

در این تحقیق نمونه برداری از هوای اتاق تمیز، سطوح موثر (شامل دیوارها، کف و دستگاه های تولیدی)، پرسنل (شامل انگشتان دست^۱، و بخش های مختلف لباس مخصوص^۲ اتاق تمیز) و مواد و ملزومات بسته بندی^۳ مطابق تواتر و کلاس هر بخش انجام گرفت. در ابتدا ۴ کلاس مختلف ISO Class 5 & 6 & 7 & 8 (Grade A & B & C & D) در بخش های ساخت محصولات تزریقی جهت این مطالعه

⁵ Cubic Feet per Minute

⁶ Terminal Sampling Point

⁷ Worst Case

¹ Gloves Test

² Overall Gown

³ Packing Materials

⁴ Primary Sampling Point

گذاری ۴ ساعت و قطر پلیت مورد استفاده ۹۰ mm است.

در نمونه گیری از هوا، روش غیر فعال دارای الویت است و روش نمونه گیری فعال به عنوان روش تاییدی مورد استناد قرار می گیرد. در کلاس Grade A & B نمونه گیری غیر فعال به صورت پیوسته^۵ و در تمام مدت فعالیت تولیدی باید در بازه های ۴ ساعته و با تعویض محیط کشت انجام گردد. برای مثال اگر فعالیت تولیدی به مدت ۱۲ ساعت ادامه داشته باشد، باید در ۳ دوره ۴ ساعته پلیت های حاوی محیط کشت تجدید شوند. نمونه برداری از سطوح به دو روش انجام می یابد. استفاده از Swab های با جنس Dacron: با استفاده از شابلون بر روی سطح مورد بررسی، یک محوطه با ابعاد ۱۰ یا ۲۵ سانتی متر مربع را مشخص کنید. Swab را از تیوب آن خارج کرده و به گونه ای بر روی سطح قرار دهید تا تمام بخش داکرونی آن بر روی سطح قرار گیرد. سپس Swab را در یک لوله حاوی محیط کشت TSB استریل فرو برده و سپس با فشردن آن به دیواره لوله مایع اضافی آن را حتی المقدور کاهش می دهیم. با توجه به الگوی مشخص شده در شکل زیر سواب را در ۴ جهت بر روی سطح می کشیم تا حداکثر مقدار برداشت از روی سطح حاصل آید. سپس Swab را در محیط کشت TSB اولیه قرار داده و با انتقال به آزمایشگاه و به روش Pour Plate تعداد میکروارگانیسم های جدا شده را شمارش می نماییم. استفاده از پلیت تماسی^۷: در روش نمونه گیری با استفاده از Contact Plate یک پلیت مخصوص با قطر ۵/۵ سانتی متر را که به گونه ای از

* تعداد نقاط نهایی در ISO Grade D (Class 8 : ۲۹ نقطه با نمونه گیری ماهانه

نمونه برداری از هوا به دو روش زیر انجام گرفت:

الف- فعال^۱

در نمونه گیری فعال از دستگاه نمونه گیر هوا^۲ استفاده می گردد. در این دستگاه ها هوای مکیده شده از روی یک پلیت حاوی محیط کشت TSA یا SDA عبور کرده و میکروارگانیسم ها موجود در آن بر روی سطح محیط کشت قرار میگیرند و سپس این ظرف در دمای مناسب انکوبه شده و رشد میکروارگانیسم ها در آن بررسی می شود. در این مطالعه از دستگاه Impactor SAS 360 که دارای دو سر^۳ با زاویه ۹۰ درجه نسبت به هم می باشند استفاده شد. این دستگاه قادر است ۱۰۰۰ لیتر هوا را در مدت ۱۰ دقیقه از روی ۲ عدد پلیت حاوی محیط کشت عبور دهد. برای بررسی میکروارگانیسم ها موجود در هوای اتاق های تمیز کلاس های مختلف، از محیط TSA و دمای ۳۲/۵ ± ۲/۵ ° C جهت بررسی رشد قارچ ها و مخمر ها استفاده گردید.

ب- غیر فعال^۴

در این نمونه گیری از پلیت های حاوی محیط کشت TSA در محل های نهایی مشخص شده بر روی سایت هایی خاص از جنس استیل ۳۰۴ و با زاویه ۴۵ ° نسبت به سطح، استفاده می گردد. به این روش پلیت گذاری^۵ هم گفته می شود. زمان لازم برای پلیت

^۵ Settling Plate

^۶ Continius

^۷ Contact Plate

^۱ Active

^۲ Air Sampler

^۳ Head

^۴ Passive

کشت در دمای ۳۷-۳۵ به مدت ۵ روز درجه انکوبه می گردند. و در نهایت از نظر تعداد و نوع مورد بررسی قرار می گیرند.

نمونه برداری از ملزومات بسته بندی

الف - فیلم PVC^۴ و PVDC^۶

برای انجام آزمون میکروبی این اقلام، قطعه ای به اندازه ۱۰ × ۱۰ cm را بر روی محیط TSA و SDA قرار داده و پس از گذشت ۵ روز محتوای میکروبی آن را بررسی می نماییم.

ب - Aluminium Foil همانند PVC و PVDC تحت آزمون قرار میگیرد.

پ - Bottle & Cap ظرف تحت آزمون توسط محیط های کشت TSB و SDB پر شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای مناسب انکوبه می گردد، سپس از نظر وجود میکروارگانیسم های بیماریزا مورد بررسی قرار می گیرند.

نوبت های نمونه برداری و تواتر آن بر اساس Classification هر فضای تولیدی، متفاوت است. بدین منظور از استاندارد مندرج در USP 46,2023 که در جدول ذیل آمده است، استفاده می گردد.

محیط کشت پر شده است که سطحی محدب ایجاد نماید، به مدت ۳ دقیقه بر روی سطح مورد نظر قرار داده و سپس به انکوباتور منتقل می نماییم و رشد میکروارگانیسم ها بر روی آن بررسی می نماییم.

نمونه گیری از پرسنل

الف- Finger Test یا Gloves Test

در این روش پرسنل شاغل در هر بخش انگشتان هر دو دست خود را به مدت ۳۰ ثانیه بر روی سطح محیط کشت TSA نگهداشته و همانند روش اخذ اثر انگشت در ادارات پلیس با حرکت انگشتان و دوران آن ها امکان تماس تمام سطوح انگشتان با محیط کشت را فراهم می آورند. ، سپس محیط های کشت در دمای ۳۷-۳۵ به مدت ۵ روز درجه انکوبه می گردند. و در نهایت از نظر تعداد و نوع مورد بررسی قرار می گیرند.

ب - آزمون لباس^۱

یکی از موارد مهم در بروز آلودگی، آلودگی البسه پرسنل است، چرا که با توجه به تماس مستقیم این پوشش ها با پوست، تجهیزات و ملزومات بسته بندی، امکان آلودگی البسه و پیرو آن نشت آلودگی میکروبی به محصول وجود دارد. بنابراین با استفاده از پلیت های تماسی از ۳ نقطه پوشش کارکنان نمونه گیری میکروبی به عمل می آید. این سه نقطه عبارتند از : قفسه سینه^۲، آرنج^۳ و زانو^۴ (آزمون های به نام نقاط نمونه برداری هم شناخته می شوند). سپس محیط های

جدول شماره ۱. تواتر نمونه برداری در فضاهای تمیز بر اساس کلاس بندی

Classification	Volumetric	Settle plate	Contact plate	Glove print
Grade A (ISO Class 5)	Once per shift	Continous	Once per shift	Once per shift
Grade B (ISO Class 6)	Daily	Continous	Daily	Daily

⁴ Knee

⁵ Polyvinil Chloride

⁶ Polyvinilidene Chloride

¹ Cloth Test

² Chest

³ Elbow

Grade C (ISO Class 7)	Weekly	Weekly	Weekly	Weekly
Grade D (ISO Class 8)	Monthly	Monthly	Monthly	Monthly

نبوده و تمام میکروارگانیسم ها را فارغ از نوع نمونه برداری (Air Sampler ، Settle Plate و Swab) به صورت کلی بررسی می کنند.

در این مطالعه تعداد نمونه ها بر اساس کلاس مطابق جدول ذیل انجام گرفت. با توجه به اهمیت یکسان نمونه برداری از سطوح و هوا در اتاق تمیز، مراجع مختلف تفاوتی در نوع نمونه برداری قائل

جدول شماره ۲. تعداد روز و نقاط نمونه گیری در کلاس های مختلف و میکروارگانیسم های جدا شده

Class	A	B	C	D
No. Of Sampling Time	۸۴	۸۴	۱۲	۳
No. Of Sampling Points	۷۵۶	۵۰۴	۱۵۶	۸۷

بررسی گردید. در مورد محیط های کشت SDA صرفا تعیین Mold و Yeast با استفاده از روش چسب اسکاچ صورت پذیرفت.

از تک تک کلنی های رشد یافته بر روی محیط های کشت اولیه TSA ، کشت خالص تهیه گردید و سپس با استفاده از رنگ آمیزی گرم، مورفولوژی و واکنش گرم این میکروارگانیسم ها

جدول شماره ۳. تعداد میکروارگانیسم های جدا شده بر اساس Domain به تفکیک فضای تمیز

Class	A	B	C	D
Bacteria	۷۴	۳۵۹	۱۷۲۸	۲۰۱۶
Fungi	۱	۱	۱۴	۲۳

نتایج

تقسیم بندی گردیدند، سپس بر اساس دستورالعمل مندرج در USP 46 تعیین جنس و گونه شده و نتایج در جداول زیر مرتب گردیدند.

پس از انجام نمونه برداری و استحصال نتایج اولیه ، میکروارگانیسم های جدا سازی شده بر اساس نمونه مورد آزمون در دو گروه عمده (۱) نمونه های حاصل از پرسنل و ملزومات بسته بندی و (۲) نمونه های حاصل از هوا و سطوح اتاق تمیز به صورت ذیل

جدول شماره ۴. تعداد و درصد از کل میکروارگانیسم های جدا شده بر اساس خانواده به تفکیک فضای تمیز

Class	A	B	C	D
<i>Staphylococci</i>	۲۷ ٪۳۶/۴۹	۱۷۸ ٪ ۴۹/۵۸	۱۰۰۴ ٪ ۵۸/۱۰	۱۰۷۳ ٪ ۵۳/۲۲
<i>Micrococci</i>	۲۶ ٪۳۵/۱۴	۱۴۳ ٪۳۹/۸۳	۴۰۷ ٪ ۲۳/۵۵	۵۲۹ ٪ ۲۶/۲۴
<i>Bacillus</i>	۱۱ ٪۱۴/۸۶	۳۸ ٪ ۱۰/۵۸	۳۱۶ ٪ ۱۸/۲۹	۴۱۱ ٪ ۲۰/۳۹
<i>Corynebacterium</i>	۰ ٪۰/۰۰	۰ ٪ ۰/۰۰	۱ ٪ ۰/۰۶	۳ ٪ ۰/۱۵

جدول شماره ۵. ترکیب مورفولوژیک (تعداد و درصد از کل) میکروارگانیسم های جدا شده به تفکیک فضای تمیز

Class	A	B	C	D
Gram-Positive Cocci	۵۳ ٪ ۷۱/۶۲	۳۲۱ ٪ ۸۹/۴۲	۱۴۱۱ ٪ ۸۱/۶۶	۱۶۰۲ ٪ ۷۹/۴۶
Gram-Positive Non-Spore Forming Rods	۰ ٪ ۰/۰۰	۰ ٪۰/۰۰	۱ ٪ ۰/۰۶	۳ ٪ ۰/۱۵
Gram-Positive Sporing Rods	۱۱ ٪۱۴/۸۶	۳۸ ٪ ۱۰/۵۸	۳۱۶ ٪ ۱۸/۲۹	۴۱۱ ٪ ۲۰/۳۹
Gram-negative Rods	۰ ٪ ۰/۰۰	۰ ٪ ۰/۰۰	۰ ٪ ۰/۰۰	۰ ٪ ۰/۰۰
Fungi	۱ ٪ ۱/۳۳	۱ ٪ ۰/۲۸	۱۴ ٪ ۰/۸۰	۲۳ ٪ ۱/۱۳

جدول شماره ۶. گونه استافیلوکوک های جدا سازی شده به تفکیک فضای تمیز

Class	A	B	C	D
<i>St.aureus</i>	۴	۴۶	۲۱۵	۲۴۴
<i>St.epidermidis</i>	۲۱	۱۳۱	۷۴۱	۸۱۲
Other Staphylococci	۲	۱	۴۸	۱۷

جدول شماره ۷. گونه میکروکوک های جدا سازی شده به تفکیک فضای تمیز

Class	A	B	C	D
<i>M.luteus</i>	۲۵	۱۳۴	۳۸۲	۴۸۶
<i>M.roseus</i>	۱	۶	۱۴	۳۷
Other Micrococci	۰	۳	۱۱	۶

جدول شماره ۸. گونه های باسیلوس جدا شده به تفکیک کلاس فضای تمیز

Class	A	B	C	D
<i>B.megaterium</i>	۸	۲۲	۲۸۴	۳۰۹
<i>B.licheniformis</i>	۱	۷	۲۱	۴۳
<i>B.subtilis</i>	۲	۹	۱۱	۵۹

نتایج تاثیر برخی از عوامل مورد استفاده در اتاق تمیز جهت کنترل جمعیت میکروارگانیسم ها

است. نتایج نشان میدهد، که جدایه های از محیط در برابر نمونه های استاندارد تهیه شده از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران در برابر ماده ضد عفونی کننده، آسیب پذیرتر هستند. این نتیجه در ارتباط با تاثیر نور UV بر روی میکروارگانیسم ها نیز قابل تعمیم است.

در فضای تمیز عموماً از ۲ روش برای کنترل آلودگی میکروبی استفاده می گردد که عبارتند از مواد ضد عفونی کننده و نور حاصل از لامپ UV. البته از روش های دیگری مانند ازن تراپی هم استفاده میگردد که به دلیل مشکلاتی کمتر مورد استفاده واقع می شود. در ذیل نتایج حاصل از تاثیر دادن این عوامل بر روی برخی از جدایه های پژوهش و میکروارگانیسم استاندارد درج شده

جدول شماره ۹. بررسی تاثیر رقت های مختلف ۱/۲، ۵/۵ و ۵٪ از ضد عفونی کننده بر روی *St.aureus* استاندارد (ATCC : 1112) و جدا شده از محیط (Wild Type)

Disinfectant						
Strain	<i>St aureus</i> (ATCC: 1112)			<i>St aureus</i> (Wild Type)		
Dilution	۱%					
Time (min)	۵	۱۰	۱۵	۵	۱۰	۱۵
Primary Population (cfu/ml)	۱۰۰					
Final Population (cfu/ml)	۹۷	۹۴	۹۴	۹۴	۷۲	۵۹
Rest of Population (cfu/ml)	۳	۶	۶	۶	۲۸	۴۱
Performance (%)	۳%	۶%	۶%	۶%	۲۸%	۴۱%
Dilution	۲%					
Time (min)	۵	۱۰	۱۵	۵	۱۰	۱۵
Primary Population (cfu/ml)	۱۰۰					
Final Population (cfu/ml)	۸۸	۵۴	۱۴	۸۰	۵۱	۱۶
Rest of Population (cfu/ml)	۱۲	۴۶	۸۶	۲۰	۴۹	۸۴
Performance (%)	۱۲%	۴۶%	۸۶%	۲۰%	۴۹%	۸۴%
Dilution	۵%					
Time (min)	۵	۱۰	۱۵	۵	۱۰	۱۵
Primary Population (cfu/ml)	۱۰۰					
Final Population (cfu/ml)	< ۱	< ۱	< ۱	< ۱	< ۱	< ۱
Rest of Population (cfu/ml)	< ۱	< ۱	< ۱	< ۱	< ۱	< ۱
Performance (%)	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%

جدول شماره ۱۰. بررسی تاثیر رقت های مختلف ۱/۲، ۵/۵ و ۵٪ از ضد عفونی کننده بر روی *St.epidermidis* استاندارد

(ATCC : 12228) و جدا شده از محیط (Wild Type)

Disinfectant						
Strain	<i>St epidermidis</i> (ATCC: 12228)			<i>St epidermidis</i> (Wild Type)		
Dilution	۱%					
Time (min)	۵	۱۰	۱۵	۵	۱۰	۱۵

Primary Population (cfu/ml)	۱۰۰					
Final Population (cfu/ml)	۹۲	۶۹	۵۴	۸۸	۵۸	۳۴
Rest of Population (cfu/ml)	۸	۳۱	۴۶	۱۲	۴۲	۶۶
Performance (%)	۸%	۳۱%	۴۶%	۱۲%	۴۲%	۶۶%
Dilution	۲%					
Time (min)	۵	۱۰	۱۵	۵	۱۰	۱۵
Primary Population (cfu/ml)	۱۰۰					
Final Population (cfu/ml)	۸۴	۵۱	۱۰	۷۹	۴۷	۸
Rest of Population (cfu/ml)	۱۶	۴۹	۹۰	۲۱	۵۳	۹۲
Performance (%)	۱۶%	۴۹%	۹۰%	۲۱%	۵۳%	۹۲%
Dilution	۵%					
Time (min)	۵	۱۰	۱۵	۵	۱۰	۱۵
Primary Population (cfu/ml)	100					
Final Population (cfu/ml)	< ۱	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Rest of Population (cfu/ml)	< ۱	< ۱	< ۱	< ۱	< ۱	< ۱
Performance (%)	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%	۱۰۰%

جدول شماره ۱۱. مطالعه اثر نور UV بر *St.aureus*

UV Radiation (Type C)	
Strain:S.aureus (ATCC:1112)	
Primary Population (cfu/cm ²) : ۱۰۰	Time (min) : ۲۰
Final Population (cfu/cm ²) : ۱	Efficiency : ۹۹%
Strain:S.aureus (Wild Type)	
Primary Population (cfu/cm ²) : ۱۰۰	Time (min) : ۲۰
Final Population (cfu/cm ²) : .	Efficiency : ۱۰۰%
UV Radiation (Type C)	
Strain:S.aureus (ATCC:1112)	
Primary Population (cfu/cm ²) : ۱۰۰	Time (min) : ۳۰
Final Population (cfu/cm ²) : .	Efficiency : ۱۰۰%
Strain:S.aureus (Wild Type)	
Primary Population (cfu/cm ²) : ۱۰۰	Time (min) : ۳۰
Final Population (cfu/cm ²) : .	Efficiency : ۱۰۰%

جدول شماره ۱۲. مطالعه اثر نور UV بر *St.epidermidis*

UV Radiation (Type C)	
Strain: <i>S.epidermidis</i> (ATCC:12228)	
Primary Population (cfu/cm ²) : ۱۰۰	Time (min) : ۲۰
Final Population (cfu/cm ²) : ۱	Efficiency : ۹۹%
Strain: <i>S.epidermidis</i> (Wild Type)	
Primary Population (cfu/cm ²) : ۱۰۰	Time (min) : ۲۰
Final Population (cfu/cm ²) : ۰	Efficiency : ۱۰۰%
UV Radiation (Type C)	
Strain: <i>S.epidermidis</i> (ATCC:1112)	
Primary Population (cfu/cm ²) : ۱۰۰	Time (min) : ۳۰
Final Population (cfu/cm ²) : ۱	Efficiency : ۱۰۰%
Strain: <i>S.epidermidis</i> (Wild Type)	
Primary Population (cfu/cm ²) : ۱۰۰	Time (min) : ۳۰
Final Population (cfu/cm ²) : ۰	Efficiency : ۱۰۰%

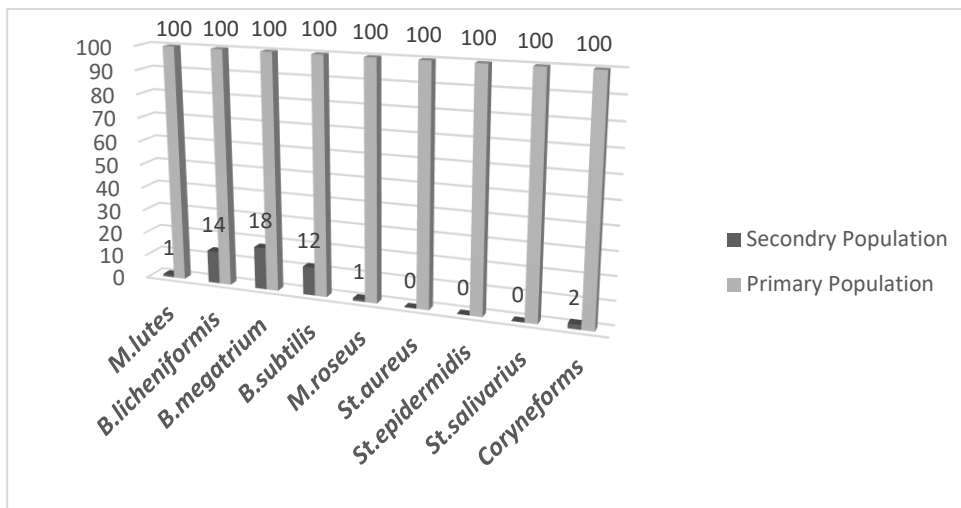
میدهد که نور UV تاثیر تقریبا مشابهی بر روی میکروارگانیسم های جدا شده از محیط دارد.

در نهایت اثر تابش UV به مدت ۲۰ دقیقه بر روی میکروارگانیسم های جدا شده از کلاس های مختلف اتاق تمیز بررسی گردید که نتایج حاصله به شرح جدول ذیل است . نتایج این بررسی نشان

جدول شماره ۱۳. مطالعه اثر نور UV بر میکروارگانیسم های جدا شده

UV Radiation after 20 minute			
Name of Bacteria	Secondary Population	Primary Population	Death Percentage
<i>M.lutes</i>	۱	۱۰۰	۹۹%
<i>B.licheniformis</i>	۱۴	۱۰۰	۸۶%
<i>B.megatrium</i>	۱۸	۱۰۰	۸۲%
<i>B.subtilis</i>	۱۲	۱۰۰	۸۸%
<i>M.roseus</i>	۰	۱۰۰	۹۹%
<i>St.aureus</i>	۰	۱۰۰	۱۰۰%
<i>St.epidermidis</i>	۰	۱۰۰	۱۰۰%

<i>St.salivarius</i>	۰	۱۰۰	۱۰۰%
<i>Coryneforms</i>	۲	۱۰۰	۹۸%



نمودار ۱. میزان باقیمانده جمعیت میکروبی جدا شده پس از تابش نور UV به مدت ۲۰ دقیقه

Micrococcus ، *Staphylococcus epidermidis*
Bacillus ، *Micrococcus roseuse* ، *luteus*
Bacillus و *Bacillus megaterium* ، *licheniformis*
. subtilis

میکروارگانیزم های جدا شده در فرایند تحقیق (از منظر

USP 47) عبارتند از: *Staphylococcus aureus*

جامعه و بررسی آماری

در این پژوهش در مجموع از ۵۷ نقطه در چهار Iso Class مختلف نمونه برداری گردید.

جدول شماره ۱۴. تعداد نقاط نمونه برداری و درصد به تفکیک فضای تمیز

No. Of Sampling Date				
Class	A	B	C	D
No. Of Sampling Time	۸۴	۸۴	۱۲	۳
No. Of Sampling Points	۷۵۶	۵۰۴	۱۵۶	۸۷
Percentage Of Sampling Points	۱۵/۷۹%	۱۰/۵۳%	۲۲/۸۱%	۵۰/۸۸%

بررسی آماری داده ها با استفاده از نرم افزار (Version 27) SPSS انجام گردید و در نهایت مشخص شد به دلیل تفاوت شرایط و خصوصیات هر کلاس از اتاق تمیز نمونه های نهایی استحصالی فاقد توزیع نرمال هستند. همچنین ضریب (Pearson

(همبستگی بین برخی از سویه های شناسایی شده و کلاس اتاق تمیز وجود دارد. در ذیل آنالیز توصیفی، آنالیز واریانس و بررسی ضریب همبستگی کلاس اتاق تمیز و میکروارگانیسم های جدا شده درج گردیده است

جدول شماره ۱۵. آنالیز واریانس تاثیر کلاس اتاق تمیز بر حضور جنس میکروکوکوس

	Dependent Variables	Posterior			95% Credible Interval	
		Mode	Mean	Variance	Lower Bound	Upper Bound
Micrococcus	M.luteus	۲۸۸/۱۱۵۴	۲۸۸/۱۱۵۴	۶۴۲/۶۷۱	۲۳۸/۴۲۸۴	۳۳۷/۸۰۲۴
	M.roseus	۱۶/۷۳۰۸	۱۶/۷۳۰۸	۶۴۲/۶۷۱	۳۲/۹۵۶۲-	۶۶/۴۱۷۷
Bacillus	B.subtilis	۲۳/۵۷۶۹	۲۳/۵۷۶۹	۲۶۰/۴۷۸	۸/۰۵۵۶-	۵۵/۲۰۴۹
	B.megaterium	۱۷۸/۱۵۳۸	۱۷۸/۱۵۳۸	۲۶۰/۴۷۸	۱۴۶/۵۲۱۳	۲۰۹/۷۸۶۳
	B.licheniformis	۲۰/۶۹۲۱	۲۰/۶۹۲۳	۲۶۰/۴۷۸	۱۰/۹۴۰۲-	۵۲/۳۲۴۸
Staphylococcus	St.aureus	۱۴۴/۳۴۶۲	۱۴۴/۳۴۶۲	۲۵۲۴/۷۱۷	۴۵/۸۶۴۷	۲۴۲/۸۲۷۶
	St.epidermidis	۴۸۳/۶۱۵۴	۴۸۳/۶۱۵۴	۲۵۲۴/۷۱۷	۳۸۵/۱۳۳۹	۵۸۲/۰۹۶۸

جدول شماره ۱۶. بررسی ضریب همبستگی (پیرسون) بین کلاس اتاق تمیز و جنس استافیلوکوکوس

		Class	St.aureus	St.epidermidis
Class	Pearson Correlation	۱	.957 [†]	.944
	Sig. (2-tailed)		.043	.056
	N	۴	۴	۴
St.aureus	Pearson Correlation	/۹۵۷ [†]	۱	/۹۹۹ ^{††}
	Sig. (2-tailed)	/۰۴۳		/۰۰۱
	N	۴	۴	۴
St.epidermidis	Pearson Correlation	/۹۴۴	/۹۹۹ ^{††}	۱
	Sig. (2-tailed)	/۰۵۶	/۰۰۱	
	N	۴	۴	۴
†. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).				
††. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).				

جدول شماره ۱۷. بررسی ضریب همبستگی (پیرسون) بین کلاس اتاق تمیز و جنس میکروکوکوس

		Class	M.luteus	M.roseus
Class	Pearson Correlation	۱	/۹۸۵ [†]	/۹۴۰

	Sig. (2-tailed)		/۰۱۵	/۰۶۰
	N	۴	۴	۴
M.luteus	Pearson Correlation	/۹۸۵ [†]	۱	/۹۰۸
	Sig. (2-tailed)	/۰۱۵		/۰۹۲
	N	۴	۴	۴
M.roseus	Pearson Correlation	/۹۴۰	/۹۰۸	۱
	Sig. (2-tailed)	/۰۶۰	/۰۹۲	
	N	۴	۴	۴

†. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

جدول شماره ۱۸. بررسی ضریب همبستگی (پیرسون) بین کلاس اتاق تمیز و جنس باسیلوس

		Class	B.subtilis	B.megaterium	B.licheniformis
Class	Pearson Correlation	۱	/۸۵۵	/۹۲۳	/۹۶۹ [†]
	Sig. (2-tailed)		/۱۴۵	/۰۷۷	/۰۳۱
	N	۴	۴	۴	۴
B.subtilis	Pearson Correlation	/۸۵۵	۱	/۷۰۱	/۹۴۱
	Sig. (2-tailed)	/۱۴۵		/۲۹۹	/۰۵۹
	N	۴	۴	۴	۴
B.megaterium	Pearson Correlation	/۹۲۳	/۷۰۱	۱	/۸۹۹
	Sig. (2-tailed)	/۰۷۷	/۲۹۹		/۱۰۱
	N	۴	۴	۴	۴
B.licheniformis	Pearson Correlation	/۹۶۹ [†]	/۹۴۱	/۸۹۹	۱
	Sig. (2-tailed)	/۰۳۱	/۰۵۹	/۱۰۱	
	N	۴	۴	۴	۴

†. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

اگر مقدار آن منفی شد، به این معنی است که دو متغیر در جهت عکس هم عمل می کنند. در جداول فوق دیده می شود که ضریب پیرسون، مثبت است و باید با افزایش کلاس اتاق تمیز، تعداد میکروارگانیسم ها هم افزایش یابد که در واقع هم چنین اتفاقی می افتد. جهت بررسی ارتباط بین حضور نوع خاصی از

جهت بررسی همبستگی دو متغیر از ضریب پیرسون استفاده می گردد. این ضریب بین +۱ و -۱ در حرکت است. در صورتی که مقدار به دست آمده مثبت باشد، به این معنی است که تغییرات دو متغیر به صورت هم جهت اتفاق می افتد. به عبارت دیگر، با افزایش در هر متغیر، متغیر دیگر نیز افزایش می یابد. در مقابل،

میکروارگانیسم و طبقه اتاق تمیز دو فرض زیر مورد توجه قرار گرفت.

فرض H_0 : رابطه معناداری بین کلاس اتاق تمیز و جنس خاصی از میکروارگانیسم وجود دارد ($P < 0.5$)

فرض H_1 : رابطه معناداری بین کلاس اتاق تمیز و جنس خاصی از میکروارگانیسم وجود ندارد ($P > 0.5$).

سپس میزان P-Value یا Sign. با استفاده از نرم افزار SPSS محاسبه گردید.

بررسی آماری بر روی میکروارگانیسم های جدا شده از اتاق های تمیز با درجات متفاوتی از تمیزی نشان دادند که رابطه معنا داری بین میکروارگانیسم های موجود (جنس استافیلوکوکوس و میکروکوکوس) و اتاق تمیز کلاس ISO Class Grade 1 & 2 وجود دارد.

- بین حضور *Micrococcus roseus* و اتاق تمیز رابطه معنا داری به دست نیامد ($P > 0.5$)

جدول شماره ۱۹. مقادیر P-Value در جنس های استافیلوکوکوس و میکروکوکوس

Bacteria	P-Value
<i>Micrococcus luteus</i>	۰/۰۱۵
<i>Micrococcus roseus</i> *	۰/۰۰۶
<i>Staphylococcus aureus</i>	۰/۰۴۳
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	۰/۰۵۶

همچنین نتایج نشان دادند که رابطه معناداری بین میکروارگانیسم های موجود (جنس باسیلوس) و اتاق تمیز ISO Class Grade 8 وجود دارد.

جدول شماره ۲۰. مقادیر P-Value در جنس باسیلوس

Bacteria	P-Value
<i>Bacillus subtilis</i>	۰/۱۴۵
<i>Bacillus megaterium</i>	۰/۰۷۷
<i>Bacillus licheniformis</i>	۰/۰۳۱

جدول شماره ۲۱. آزمون T-Test (بررسی رابطه بین جنس های باسیلوس، استافیلوکوکوس و میکروکوکوس)

		Paired Differences					t	df	P-Value Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	Staphylococcus / Micrococcus	۲۹۴/۲۵۰	۳۲۰/۰۲۰	۱۶۰/۰۱۰	۲۱۴/۹۷۴	۸۰۳/۴۷۴	۱/۸۳۹	۳	۰/۱۶۳
Pair 2	Staphylococcus / Bacillus	۳۷۶/۵۰۰	۳۴۸/۵۳۷	۱۷۴/۲۶۹	۱۷۸/۱۰۱	۹۳۱/۱۰۱	۲/۱۶۰	۳	۰/۱۲۰
Pair 3	Micrococcus / Bacillus	۸۲/۲۵۰	۴۶/۱۶۹	۲۳/۰۸۵	۸/۷۸۵	۱۵۵/۷۱۵	۳/۵۶۳	۳	۰/۰۳۸

آزمون T بیانگر تفاوت معنادار بین دو گروه متفاوت وابسته به یک متغیر می باشد.

بحث

و تجهیزاتی جابجایی ملزومات (مانند جک پالت های متعدد) است.

۳. تاثیر مثبت پرسنل در رعایت اصول GMP که ناشی از آموزش های مداوم آزمایشگاه میکروبیولوژی سازمان و بخش تضمین کیفیت^۴ آن بود (دوره های مروری ۳ ماهه بنابر برنامه آموزشی سازمان) موجب شده است که میزان آلودگی در نقاط مورد بررسی فراتر از شرایط استاندارد نباشد.

۴. استفاده مداوم و چرخشی از مواد ضدعفونی کننده موجود در بازار نیز باعث گردیده است که میزان آلودگی میکروبی فراتر از میزان استاندارد مندرج در منابع مورد استفاده نباشد.

۵. استفاده مناسب از لامپ UV و دوزیمتری دائمی نور حاصل از این لامپ ها، توسط مسئولین ذیربط باعث گردیده است که به خصوص در شرایط تحت لامینار^۵

۱. در مناطق حضور پرسنل کوکوس هایی که فلور طبیعی انسان هستند دارای جمعیت غالب هستند، اگر چه در این فضاها به دلیل استفاده از HVAC با فیلترهای H13 و H14 و حضور حداکثر ۲ نفر در این قبیل فضاها، بار میکروبی بسیار اندکی وجود دارد و در تمام ایام این پژوهش مواردی به صورت OOS^۱ یا OOT^۲ یا OOR^۳ مشاهده نگردید.

۲. در مناطقی که بارانداز ملزومات بسته بندی است بار غالب میکروبی باسیل ها هستند و ترکیب جمعیتی این خانواده از باکتری ها ارتباط معنا داری با محل تولید آن ها دارد. با توجه به محدوده پذیرش آلودگی میکروبی در فضاهای با Grade D، میزان آلودگی در این مناطق هم به صورت OOS، OOT یا OOR مشاهده نگردید. نکته دیگری که در این قبیل فضاها در ارتباط با بالا بودن میزان آلودگی میکروبی در مقایسه با Grade A & B مورد توجه است، عدم محدودیت حضور پرسنل

⁴ Quality Assurance

⁵ Laminar Air Flow

¹ Out of Specification

² Out of Trend

³ Out of Range

است، توسط سازمان غذا و داروی جمهوری اسلامی ایران و وزارت بهداشت کلیه کشورهای مقصد صادراتی Recall (بازخوانی از بازار) نگردیده است. جالب است که نتایج این پژوهش، به لحاظ ترکیب میکروارگانیسم های یافت شده با نتایج ۲ پژوهش مهم دیگر که در سال های ۲۰۱۶ توسط آقای Sandle و همکارانش و ۲۰۱۹ توسط آقای Tršan و همکارانش انتشار یافت مشابهت دارد. لازم به ذکر است بررسی آقای Sandle و همکارانش در یک دوره ۹ ساله و با جدا کردن بیش از ۹۰۰۰ نمونه انجام گردیده است.

منابع

1. Useller JW. CLEAN ROOM TECHNOLOGY. In: ADMINISTRATION OOTUNAAS, editor. Washington, D.C.1969. p. 1-71.
2. FDA. FEDERAL STANDARD 209E FOR CLEANROOM AN OBSOLETE DOCUMENT. USA1992. p. 15.
3. Li C-S, Hao M-L, Lin W-H, Chang C-W, Wang C-S. Evaluation of Microbial Samplers for Bacterial Microorganisms. Aerosol Science and Technology. 1999;30:9.
4. Howard J. Guidance for Filtration and Air-Cleaning Systems to Protect Building Environments from Airborne Chemical, Biological, or Radiological Attacks. NIOSH DoHaHS, editor. USA: NIOSH Publications Dissemination; 2003. 78 p.
5. Organization WH. WHO guidelines for sampling of pharmaceutical products and related materials. Annex 4. Geneva: World Health Organization; 2005. p. 35.
6. Whyte W. Collection efficiency of microbial methods used to monitor cleanrooms. European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences. 2005;10:3-7.
7. Caselli-Fernández LM, Terkola DR. Clean room environment, personnel, quality assurance and their monitoring. PracticeResearch & Innovation. 2006;12:1-7.
8. Sandle T. Environmental Monitoring Risk Assessment. Journal of GXP Compliance. 2006;27.
9. Holbrook D. Controlling contamination: the origins of clean room technology. History and Technology. 2009;25:21.
10. 10.Kitain M. CLEANROOMS IN PHARMACEUTICAL PRODUCTION: Mikkeli University; 2010.
11. Sandle T. Cleaning cleanrooms. Cleanroom Technology. 2010;18:22-4.
12. Ashour MSE-D, Mansy MS, Eissa ME. Microbiological Environmental Monitoring in Pharmaceutical Facility. Egyptian Academic Journal of Biological Science. 2011;3:12.
13. O'Donoghue K. Validating and Monitoring the Cleanroom. In: Kanegsberg B, Kanegsberg E, editors. Handbook for

میزان آلودگی میکروارگانیسم های تولید کننده اسپور به نزدیک صفر میل کند.

۶. در نهایت به این نتیجه می رسیم که کنترل محیطی میکروبی در بخش آمپول سازی سازمان مورد بررسی هیچ گونه نشانه ای دال بر عدم رعایت استانداردهای مرجع را نشان نمی دهد و به همین علت است که در طی ۲۲ سال گذشته هیچ کدام از محصولات تزریقی تولیدی آن که از نظر آزمون های Sterility ، Bacterial Endotoxins و Particulate Matter توسط آزمایشگاه میکروبیولوژی مورد تایید واقع گردیده

- Critical Cleaning: Applications, Processes, and Controls. USA: CRC Press; 2011. p. 14.
14. Sandle T. A Review of Cleanroom Microflora: Types, Trends, and Patterns. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2011;65:392-403.
15. (WHO) WHO. Environmental Monitoring of Clean Rooms Vaccine Manufacturing Facilities. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO); 2012.
16. Bhatia A. HVAC Design for Pharmaceutical Facilities. CED Engineering. 2012;57.
17. Gayán E, Álvarez I, Condón S. Inactivation of bacterial spores by UV-C light. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 2013;19:6.
18. Park HK, Han J-H, Joung Y, Cho S-H, Kim S-A, Kim SB. Bacterial diversity in the indoor air of pharmaceutical environment. Journal of Applied Microbiology. 2013;116:718-27.
19. EATON T, WARDLE C, WHYTE W. Use of a Real-Time Microbial Air Sampler for Operational Cleanroom Monitoring. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. 2014;68:15.
20. Sandle T. People in Cleanrooms: Understanding and Monitoring the Personnel Factor | IVT Researchgate: Researchgate; 2014]
21. Organization IS. ISO 14644-1. Switzerland2015.
22. Organization IS. ISO 14644-2. Switzerland2015.
23. Sandle T. Settle plate exposure under unidirectional airflow and the effect of weight loss upon microbial growth. European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences. 2015;20:7.
24. Sandle T. The development of cleanrooms: an historical review-From civil war to safe surgical practice. ResearchGate Publication. 2016:2-8.
25. Sandle T. The development of cleanrooms: anhistorical review – The path towards international harmonisation. ResearchGate Publication. 2016:1-6.
26. Sandle T. Cleanrooms and environmental monitoring. Pharmaceutical Microbiology2016.
27. Gupta A, Kaur M, Kaur A. Cleanroom Technology , Chapter 1. Cleanroom Technology. India: New India Publishing Agency; 2017.
28. Mehdi A, Mehmood MD, Ghani MU, Ismail M, Ameen F, Saud-ul-Hassan. Environmental Monitoring and Risk Assessment of Cleanrooms within Pharmaceutical Industry. International Journal of Pharmacy. 2018;8:33.
29. Sandle T. The human microbiome and the implications for cleanroom control. European Journal of Parenteral & Pharmaceutical Sciences. 2018;23:17.
30. Naughton P. History of Cleanrooms. A S H R A E J O U R N A L. 2019;November 2019:38-54.
31. Organization IS. ISO 14644-3. Switzerland2019.
32. Sandle T. Cleanroom Microbiota. Biocontamination Control for Pharmaceuticals and Healthcare2019. p. 199-212.
33. Sandle T. Study of contact plates recovery from pharmaceutical cleanroom surfaces across three-time ranges. European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences. 2020;25:16.
34. ANSI/ASHRAE Standard 62.1-2022. 2022. p. 1-90.

35. Andreoli MRdS. Importance of Environmental Monitoring in Clean Room. Acta Scientific MICROBIOLOGY. 2022;5:5.
36. Sandle T. Best practices in Environmental Monitoring. RSSL. 2022:1-20.
37. Pharmacopeia US. MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NONSTERILE PRODUCTS. <60>. USA: United States Pharmacopeia; 2024. p. 3.
38. Pharmacopeia US. MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NONSTERILE PRODUCTS: MICROBIAL ENUMERATION TESTS. <61>. USA: United States Pharmacopeia; 2024. p. 6.
39. Pharmacopeia US. MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF NONSTERILE PRODUCTS: TESTS FOR SPECIFIED MICROORGANISMS. <62>. USA: United States Pharmacopeia; 2024. p. 9.
40. Pharmacopeia US. MICROBIAL CHARACTERIZATION, IDENTIFICATION, AND STRAIN TYPING. <1113>. USA: United States Pharmacopeia; 2024. p. 5.
41. Pharmacopeia US. MICROBIOLOGICAL CONTROL AND MONITORING OF ASEPTIC PROCESSING ENVIRONMENTS. <1116>. USA: United States Pharmacopeia; 2024.
42. Pharmacopeia US. MICROBIOLOGICAL BEST LABORATORY PRACTICES. <1117>. USA: United States Pharmacopeia; 2024. p. 6.
43. Pharmacopeia US. VALIDATION OF ALTERNATIVE MICROBIOLOGICAL METHODS. <1223>. USA: United States Pharmacopeia; 2024.
44. Pharmacopeia US. VALIDATION OF MICROBIAL RECOVERY FROM PHARMACOPEIAL ARTICLES . <1227>. USA: United States Pharmacopeia; 2024.

مروری بر تأثیر گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های ویروسی با تمرکز بر کووید ۱۹

تینا زرین‌پناه^۱، محدثه لاری‌پور^{۲*}، فاطمه فردی^۳، سینا یعقوبی^۴

۱. گروه میکروب‌شناسی، واحد بین‌المللی کیش، دانشگاه آزاد اسلامی، کیش، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال تهران ایران

۳. گروه میکروب‌شناسی، واحد بین‌المللی کیش، دانشگاه آزاد اسلامی، کیش، ایران

۴. گروه میکروب‌شناسی، واحد بین‌المللی کیش، دانشگاه آزاد اسلامی، کیش، ایران

چکیده

سابقه و هدف: گیاهان دارویی به دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه متنوع، به‌عنوان جایگزین‌های بالقوه برای داروهای شیمیایی در درمان بیماری‌های ویروسی مانند آنفولانزا، هرپس، هپاتیت C و کووید-۱۹ مورد توجه قرار گرفته‌اند. کووید-۱۹ به دلیل رفتار غیرقابل پیش‌بینی سیستم ایمنی و میزان مرگ‌ومیر بالا، اهمیت درمان‌های گیاهی را برجسته کرده است.

مواد و روش‌ها: این تحقیق با روش مرور سیستماتیک انجام شد. ابتدا منابع علمی معتبر از پایگاه‌های داده داخلی و خارجی مانند PubMed، Scopus، Web of Science و Google Scholar جستجو و بررسی شدند. منابع کتابخانه‌ای و مدارک مستند نیز برای تکمیل تحقیق استفاده شد. معیار ورود مطالعات شامل مقالاتی بود که تأثیر گیاهان دارویی بر ویروس‌هایی مانند کووید-۱۹، آنفولانزا، هرپس و هپاتیت C را بررسی کرده بودند.

یافته‌ها: مطالعات نشان می‌دهند ترکیبات موثره گیاهان دارویی نظیر تری‌تپنئیدها، پلی‌ساکاریدها، اسیدهای آلی و چرب و پروتئین‌ها در قالب عصاره‌های مختلف، می‌توانند عوارض کمتری داشته و در پیشگیری و کاهش شدت بیماری‌های ویروسی موثر باشند. این ترکیبات همچنین پتانسیل توسعه درمان‌های جدید برای ویروس‌های مشابه را دارند.

نتیجه‌گیری: گیاهان دارویی به دلیل عوارض جانبی کمتر، به‌عنوان درمان‌های مکمل طبیعی برای مقابله با بیماری‌های ویروسی قابل استفاده‌اند. نتایج این تحقیق می‌تواند زمینه‌ساز تحقیقات بیشتر و توسعه درمان‌های جدید بر اساس ساختار ویروس‌های مشابه باشد.

کلمات کلیدی: کووید-۱۹، گیاهان دارویی، سیستم ایمنی، ترکیبات ضد ویروسی، اثربخشی بالینی، هرپس

A review on the effect of medicinal plants in the treatment of viruses, especially Covid-19

Tina Zarrinpanah¹, Mohaddeseh Larypoor^{2*}, Fatemeh Fardi³, Sina Yaghoubi⁴

1. Department of Microbiology, Kish.C., Islamic Azad University, Kish, Iran

2. Department of Microbiology, nt.C., Islamic Azad University, Tehran north branch, Tehran, Iran

3. Department of Microbiology, Kish.C., Islamic Azad University, Kish, Iran

4. Department of Microbiology, Kish.C., Islamic Azad University, Kish, Iran

Abstract

Introduction: Medicinal plants, due to their diverse secondary metabolites, have been considered as potential alternatives to chemical drugs in the treatment of viral diseases such as influenza, herpes, hepatitis C, and COVID-19. COVID-19, due to the unpredictable behavior of the immune system and high mortality rates, has highlighted the importance of herbal treatments.

Methods: This research was conducted using a systematic review method. Initially, reliable scientific sources were searched and examined from domestic and foreign databases such as PubMed, Scopus, Web of Science, and Google Scholar. Library resources and documentary evidence were also used to complete the research. The inclusion criteria for the studies included articles that investigated the effects of medicinal plants on viruses such as COVID-19, influenza, herpes, and hepatitis C.

Results: Studies show that the active compounds of medicinal plants such as triterpenoids, polysaccharides, organic and fatty acids, and proteins, in various extract forms, can have fewer side effects and be effective in preventing and reducing the severity of viral diseases. These compounds also have the potential to develop new treatments for similar viruses.

Conclusion: Medicinal plants, due to their fewer side effects, can be used as natural complementary treatments to combat viral diseases. The results of this research can pave the way for further research and the development of new treatments based on the structure of similar viruses.

Keywords: Covid-19, medical plantsm, viruse, antiviral properties, Herpes

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی جهت پیشگیری و یا درمان بیماری‌ها به هزاران سال قبل بر می‌گردد. طب سنتی که عمدتاً بر استفاده از گیاهان دارویی تأکید دارد به عنوان یکی از قدیمی‌ترین علوم در کشورهای چین، یونان و ایران شناخته می‌شود بنابر تعریف سازمان بهداشت جهانی (WHO) گیاهان دارویی به اجزای گیاهان طبیعی گفته می‌شود که در غیاب یا حداقل فرآوری صنعتی جهت درمان بیماری‌ها در یک منطقه یا ناحیه مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱،۴). در سال‌های اخیر خواص درمانی گیاهان دارویی مورد توجه پژوهشگران سراسر دنیا قرار گرفته است. همچنین بنابر گزارش سازمان بهداشت جهانی، امروزه بیش از ۸۰٪ جمعیت جهان به درمان‌های سنتی از قبیل گیاهان دارویی اعتماد دارند و این روش درمانی را به عنوان منبع اصلی سلامتی در نظر می‌گیرند این رقم نه تنها شامل کشورهای نظیر چین و هند می‌شود بلکه مردم کشورهای پیشرفته نیز به این روش اعتماد دارند. اگرچه برای درمان بیشتر بیماری‌ها از داروهای سنتز شده شیمیایی استفاده می‌شود ولی این داروها دارای عوارض جانبی فراوان می‌باشند. بنابراین اهمیت استفاده از گیاهان دارویی و فرآورده‌های مشتق شده از آنها به سرعت توسط عموم مردم به عنوان روش درمانی قابل اعتماد تری پذیرفته شده است (۶،۵). تمایل به استفاده از گیاهان دارویی ضد ویروسی بعد از جنگ جهانی دوم شدت گرفت و پژوهش‌های گسترده‌ای به صورت برون تنی و درون تنی صورت گرفت (۷،۸).

نویسنده مسئول: دانشیار قارچ شناسی،

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی،

واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی،

تهران، ایران آدرس الکترونیک :

m.larypoor@iau.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۱/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۱۷

شواهد بسیاری گواه بر آن دارد که استفاده از گیاهان دارویی می‌تواند به عنوان یک روش جایگزین مناسب نسبت به استفاده از داروهای شیمیایی برای درمان بیماری‌ها در نظر گرفته شود و نقش پیشگیرنده در مهاجم شدن عامل اتیولوژیک بیماری‌ها بالاخص بیماری‌های ویروسی داشته باشد. گیاهان دارویی غنی از متابولیت‌های ثانویه متفاوتی نظیر تانن‌ها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و غیره می‌باشند که دارای خواص ضد میکروبی از جمله ضد ویروسی می‌باشند (۲،۵). با این وجود لازم به ذکر است که جهت سنتز برخی از داروهای شیمیایی نظیر آسپیرین، دیگوکسین، مورفین و ... از گیاهان دارویی استفاده می‌شود به طوری که تخمین زده می‌شود بیش از ۵۰٪ داروهای ساخته شده از گیاهان دارویی مشتق شده‌اند (۹). به ویژه، بررسی‌های گسترده چندین گیاه دارویی نشان داده است که گیاهان دارویی دارای ترکیبات درمانی بالقوه جهت مبارزه با ویروس‌های مختلف می‌باشند. باید توجه داشت که برخی گیاهان دریایی نیز به عنوان گیاهان دارویی در نظر گرفته می‌شوند. تمایل به استفاده از ترکیبات طبیعی دریایی نیز به شدت در حال افزایش است چرا که شواهد بالینی بسیاری در خصوص خاصیت درمانی آن‌ها وجود دارد. به عنوان مثال خواص ضد ویروسی جلبک آبی و سیانوباکتر رشته‌ای در مطالعات بسیاری گزارش شده است (۱۰). به طور جالب توجهی، فعالیت مهاری ضد ویروسی اختصاصی آنفلوانزا در شرایط برون تنی توسط جلبک دریایی سیاه بلغاری گزارش شده است (۱۱). افزایش مهاجرت و سفرهایی که در سراسر جهان صورت می‌گیرد، سبب شیوع بیماری‌های ویروسی شده است. انتقال ویروس‌ها به سهولت از طریق هوا، عدم وجود واکسن مناسب برای ویروس‌های تغییر یافته ژنتیکی نبود راه مبارزه مناسب با آن‌ها، سبب گسترش جهانی بیماری‌های ویروسی از جمله کرونا شده است. به دلیل تنوع، غیر قابل پیش بینی و پیچیدگی رفتار ویروس در بدن این بیماری‌ها به یکی از مهمترین بیماری‌ها تبدیل شده است که زندگی بسیاری از افراد سراسر دنیا را تحت

تاثیر قرار داده است (۱۲،۱۳). بیماری کووید-۱۹ یکی از بیماری‌های ویروسی است که به صورت پاندمی زندگی بشر را مختل کرده است. این بیماری ابتدا در اواخر سال ۲۰۱۹ در کشور چین گزارش شد ولی به سرعت تمامی کشورها بروز این بیماری را تایید کردند. این بیماری توسط ویروس کرونا و ویروس سندرم حاد تنفسی ۲^[۱] ایجاد می‌شود. ویروس سارس-کووید ۲ یک ویروس دارای تک رشته RNA می‌باشد و از لحاظ ژنتیکی شباهت زیادی به ویروس‌های SARS و MERS دارد (۱۵،۱۴). اگرچه تاکنون چندین واکسن با مکانیسم‌های مختلف برای مقابله با این بیماری تولید شده است ولی هنوز روش درمانی معینی برای درمان این بیماری وجود ندارد (۱۶). بیش از ۱۶۹ میلیون در نفر در سراسر جهان به این بیماری مبتلا شده‌اند و بیش از ۳ میلیون نفر در اثر ابتلا به این بیماری جان خود را از دست دادند (۱۷). در این مقاله، به بررسی اثرات ضد ویروسی ترکیبات مشتق شده از گیاهان دارویی پرداخته می‌شود. همچنین اثر گیاهان دارویی بر درمان بیماری‌های ویروسی نظیر آنفلوانزا، هپاتیت، هرپس و کووید-۱۹ که به صورت برون تنی، درون تنی و روش‌های مبتنی بر بیوانفورماتیک و بیولوژی محاسباتی صورت گرفته است، پرداخته می‌شود. به منظور بررسی تاثیر گیاهان دارویی بر روی ویروس‌های مختلف از جمله کرونا از مرور سیستماتیک استفاده گردید. جهت جمع‌آوری داده‌های مورد نیاز، کلیه منابع و بانک‌های اطلاعاتی الکترونیکی و غیر الکترونیکی داخلی و خارجی که در دسترس بودند به همراه کلیه مؤسسات و مراکز مهم و کارشناسان مورد جستجو قرار گرفتند. که این منابع شامل Iran،Cochran Library، IranMedex، Doc،sciencedirect، pubmed، چکیده مقاله‌های کنگره‌ها، پایان‌نامه‌ها، مجله‌ها (داخلی و خارجی)، مراکز دولتی (وزارت بهداشت، مطبوعات، سازمان بهزیستی، وزارت ارشاد،

سازمان امور زندان ها، مراکز تحقیقاتی)، مراجع و مآخذ مقاله‌های یافته شده، سازمان‌های غیر دولتی، صاحب نظران و سازمان های جهانی هستند. مطالعات ۲۰ سال اخیر که تاثیر گیاهان دارویی را بر روی درمان چهار ویروس کووید-۱۹، آنفلوانزا، هرپس و هپاتیت C بررسی کرده بودند وارد این مطالعه شدند.

کووید-۱۹

از ابتدای شروع پاندمی کووید-۱۹، پژوهشگران سراسر دنیا به بررسی ژنوم ویروس و ویروس سارس-کووید ۲ و شناسایی هدف‌های بالقوه برای مهار این ویروس پرداختند. شکل ۱ تصویری از کروناویروس در زیر میکروسکوپ را نشان می‌دهد. مهار کردن گیرنده موجود در بدن انسان که آنزیم تبدیل کننده آنژیوتنسنین ۲^{۵۲} (ACE2) یکی از مطلوب‌ترین روش‌ها برای مهار عفونت زایی و تکثیر ویروس و ویروس سارس-کووید ۲ به شمار می‌رود. همچنین روش‌های دیگری نظیر استفاده از پروتئین‌های غیر ساختاری موجود در ویروس و ویروس سارس-کووید ۲ که نقش حیاتی در تکثیر این ویروس دارند، میتواند در مهار این ویروس موثر باشد. به عنوان مثال پروتئیناز شبه کیموتریپسین نقش بسیار مهمی در تکثیر ویروس و ویروس سارس-کووید ۲ دارد. به همین خاطر مهار این پروتئاز به عنوان یکی از هدف‌های درمانی برای بیماری کووید-۱۹ محسوب می‌شود. یکی دیگر از هدف‌های درمانی پروتئیناز شبه پاپائین^{۵۳} (PLpro) است که یکی از پروتئین‌های غیر ساختاری است که توسط ژنوم ویروس سارس-کووید ۲ کد می‌شود و نقش حیاتی در تکثیر ویروس دارد (۱۸).

محصول تجاری Lianhuaqingwen که ترکیبی از ۱۱ گونه گیاهی^{۵۴} می‌باشد یکی از محصولات گیاهی است که توسط کمیته بهداشت ملی چین جهت درمان و یا مدیریت بیماری کووید-۱۹ توصیه شده است چرا که این محصول به طور گسترده جهت درمان تب، خستگی،

fibrosum-Cablin patchouli herb-Herba rhodiola-Houttuynia cordata-Rhubarb root and rhizome Bitter apricot seed.

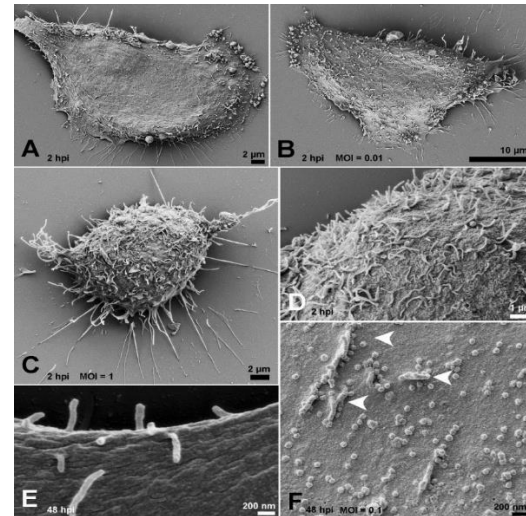
⁵¹ SARS-CoV-2

⁵² Angiotensin 2

⁵³ Papain-like protease

⁵⁴ Apricot kernel-Isatis root-Weeping forsythia-Lonicera japonica-Ephedra-Licorice root-Male fern rhizome-Gypsum

آنفلوانزا، برونشیت و پنومونی مورد استفاده قرار می گیرد و در حال حاضر در حال سپری کردن فاز دوم کار آزمایشی بالینی در آمریکا می باشد (۱۹،۲۰).



شکل ۱. تصویری از کرونا ویروس در زیر میکروسکوپ (۱۹)

همچنین فعالیت ضد ویروس ویروس سارس-کووید ۲ این محصول نیز بر روی سلول های Vero E6 مورد ارزیابی قرار گرفته است که نتایج حاصل از این بررسی نشان داده است که این محصول قادر به مهار همانندسازی این ویروس با حداقل دوز ۲/۴۱۱ میکروگرم بر میلی لیتر بوده و سبب مهار ترشح سیتوکین های پیش التهابی نظیر $TNF-\alpha$ می شود (۲۱). از ۶۱ ملکول شناسایی شده در این در این ترکیب گیاهی، ۷ ملکول دارای بیشترین فعالیت ضد ویروسی که شامل آرکتین، فورزیتوزید A، گالیک اسید، ایزولیکوئیریتیجین، کامپفرول، روتین و زکوکسیلوگانین می باشند (۲۳ و ۲۴). در سال ۲۰۱۱ اثر ۲۰۰ عصاره گیاهی با فعالیت ضد ویروسی علیه سارس-کووید بر پایه آزمایشات سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داده است که ۶ عصاره قادر به

مهار چشمگیر رشد و تکثیر ویروس سارس-کووید هستند که می توان به ریزوم جنتیانا اسکارا^{۵۵}، دانه های سنا تورا^{۵۶}، ساقه و برگ گیاه تاکسیلوس چینی^{۵۷}، گره های گیاه یام چینی یا سیب زمینی شیرین چینی^{۵۸} و همچنین دو عصاره به دست آمده از ریزوم گیاه سرخس طلایی^{۵۹} اشاره کرد که مقدار IC_{50} در دامنه بین ۲۵ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر برآورد شده است (۲۵). یو و همکاران^{۶۰} (۲۶) در مطالعه دیگری به بررسی ۶۴ ملکول استخراج شده از ۱۵ گیاه دارویی جهت اثر مهاری بر روی آنزیم هلیکاز ویروس سارس-کووید به عنوان یک هدف دارویی ضد ویروسی پرداختند. نتایج آن ها نشان داده است که میریستین^{۶۱} و اسکوتلارئین^{۶۲} می توانند در غلظت ۱۰ میکرومولار فعالیت ATPase آنزیم هلیکاز را تا ۹۰٪ مهار کنند. به همین دلیل پژوهشگران این دو ترکیب را به عنوان ضد ویروس هایی علیه ویروس سارس-کووید پیشنهاد کرده اند.

در پژوهش دیگری که توسط وان و همکارانش^{۶۳} (۲۷) بر روی ۱۳۲ بیمار مبتلا به کووید-۱۹ صورت گرفت گزارش شده است که بهترین بازدهی برای درمان بیماری کووید-۱۹ زمانی حاصل شده که داروی لوپیناویر/ ریتوناویر به همراه داروهای گیاهی برپایه طب سنتی چین^{۶۴} (TCM) مصرف شده است. همچنین مشخص شده است که عصاره الکلی ساقه انگورک جاوه ای زیرگونه چینی^{۶۵} دارای فعالیت ضد ویروسی علیه کرونا ویروس انسانی NL63 می باشد به طوری که می تواند بازدهی ویروس، تشکیل پلاک و اتصال ویروس را به طور چشمگیری کاهش دهد (۲۸).

داروهای گیاهی با قابلیت مهار 3Lpro

پژوهش های دیگری پروتئین غیر ساختاری 3Lpro موجود در ساختار ویروس را به عنوان هدف درمانی در نظر گرفته و اثر مهاری گیاهان دارویی و مشتقات آن ها

⁶⁰ Yu et al.

⁶¹ Myricetin

⁶² Scutellarein

⁶³ Wan et al.

⁶⁴ Traditional Chinese medicine

⁶⁵ Sambucus javanica subsp. chinensis (Lindl.) Fukuoka

⁵⁵ Gentiana scabra Bunge

⁵⁶ Senna tora (L.)

⁵⁷ Taxillus chinensis (Roxb.) Danser

⁵⁸ Dioscorea polystachya Turcz

⁵⁹ Cibotium barometz (L.)

ترکیب گیاهی تخلیص شده که پتانسیل مهارى گیرنده ACE که تشابه زیادی به ACE2 دارد گزارش شدند. همچنین ۱۶ خانواده گیاهان دارویی یافت شدند که قادر به مهار گیرنده آنژیوتنسنین نوع 1A در شرایط برون تنی بودند (۳۳). در مطالعه دیگری، هو و همکاران^{۷۷} (۳۴) گزارش کردند که موفق به شناسایی ۲۵ خانواده گیاهان دارویی چینی شدند که می‌توانند برهمکنش بین ویروس سارس-کووید و ACE2 را به طور چشمگیری مهار کنند. از میان این گیاهان دارویی گونه‌های متعلق به هفت‌بندیان^{۷۸}، نعناعیان^{۷۹}، برگ‌بوئیان^{۸۰}، نیلوفرآبیان^{۸۱}، ماگنولیاییان^{۸۲} و زیتونیان^{۸۳}

بالاترین اثر مهارى را دارا بودند. در پژوهشی که به بررسی گیاهان دارویی ایرانی با قابلیت مهارکنندگی فعالیت ACE در شرایط برون تنی پرداخته شد که این گیاهان شامل زرشک کوهی^{۸۴}، زالزالک اروپایی^{۸۵}، خار اسکاتلندی^{۸۶}، و بلوط مازوج‌دار^{۸۷} بودند؛ در این میان ۴ گیاه دارویی با قابلیت مهارکنندگی بالای ۸۰٪ شناسایی شدند که در این بین بلوط مازوج‌دار در غلظت ۳۳۰ میکروگرم در میلی لیتر می‌تواند تا ۹۴ درصد ACE را مهار کند که این اثر مهار کنندگی بالا می‌تواند به دلیل مقدار بالای فنول باشد (۳۵).

داروهای گیاهی با قابلیت مهار PLpro و ویروس

سانگ و همکاران^{۸۸} (۳۶) نیز چندین ترکیب گیاهی مشتق شده از میوه‌های خارخسک^{۸۹} با قدرت مهار PLpro و ویروس سارس-کووید را شناسایی کردند که دوز مهار کنندگی آنها در دامنه ۸/۱۵ تا ۱/۷۰ میکرومولار قرار دارد.

را مورد ارزیابی قرار دادند. پارک و همکاران^{۶۶} (۲۹) از عصاره الکی جلبک قهوه‌ای اکلونیا کاوا^{۶۷} موفق به استخراج ۹ فلورتانین شدند که قادر به مهار 3L pro می‌باشند که اثر مهار کنندگی آنها وابسته به دوز بوده و در این میان Dieckol دارای بهترین فعالیت مهارى بوده است. همچنین این تیم در پژوهش دیگری نشان دادند که عصاره الکی مریم‌گلی قرمز^{۶۸} دارای خاصیت مهارکنندگی 3Lpro تا ۶۰٪ در ویروس کرونا هستند و اثربخشی تانشینون‌ها وابسته به دوز و نه زمان است (۳۰). اثر مهار کنندگی کالکون‌ها و کومارین‌ها استخراج شده از گیاه گلپر کیستی^{۶۹} بر روی 3Lpro توسط پارک و همکاران^{۷۰} با میزان قابل توجهی از اثرگذاری ($IC_{50}(\mu M)$ ۱/۲ و ۱۱/۴) گزارش شد (۳۱). بی‌فلاونوئیدهای به دست آمده از عصاره الکی برگ‌های صنوبر ژاپنی^{۷۱} که شامل آمنتوفلاون^{۷۲}، بیلوبتین^{۷۳}، جینگتین^{۷۴} و اسکیداپیتیسین^{۷۵} هستند نیز خواص ضد 3Lpro با استفاده از روش FRET از خود نشان داده‌اند. در میان بی‌فلاونوئیدهای شناسایی شده، آمنتوفلاون دارای بیشترین اثر مهارى بوده و بررسی‌های داکینگ ملکولی نیز تمایل این بی‌فلاونوئید به پروتئین 3Lpro و ویروس کرونا را تایید کرده است (۳۲).

داروهای گیاهی با قابلیت مهار ACE2

بعد از شناسایی گیرنده آنزیم مبدل آنژیوتنسنین ۲ (ACE2)^{۷۶} به عنوان گیرنده ضروری برای ورود به میزبان پژوهش‌های گسترده‌ای در خصوص مهار این گیرنده از جمله استفاده از گیاهان دارویی صورت گرفت. در مطالعه‌ای ۱۴۱ گونه گیاهی متعلق به ۷۳ خانواده و ۴۹

⁷⁸ Polygonaceae

⁷⁹ Labiatae

⁸⁰ Lauraceae

⁸¹ Nelumbonaceae

⁸² Magnoliaceae

⁸³ Oleaceae

⁸⁴ Berberis integerrima Bunge

⁸⁵ Crataegus laevigata (Poir) DC

⁸⁶ Onopordum acanthium L

⁸⁷ Quercus infectoria G. Olivier

⁸⁸ Song et al.

⁸⁹ Tribulus terrestris L

⁶⁶ Park et al.

⁶⁷ Ecklonia cava

⁶⁸ Salvia miltiorrhiza

⁶⁹ Angelica keiskei

⁷⁰ Park et al.

⁷¹ Torreya nucifera (L.) Siebold & Zucc

⁷² Amentoflavone

⁷³ Bilobetin

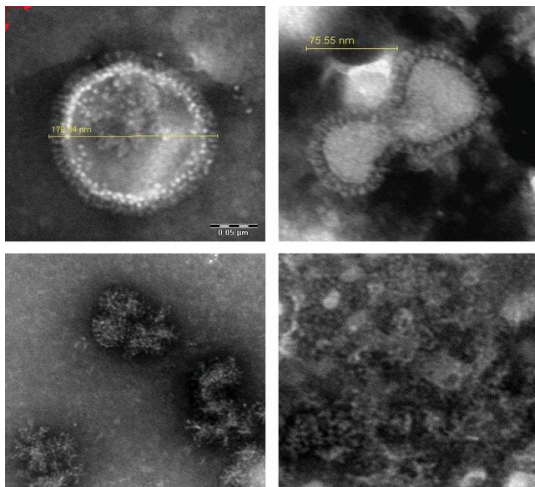
⁷⁴ Ginkgetin

⁷⁵ Sciadopitysin

⁷⁶ Angiotensin-converting enzyme 2

⁷⁷ Hu et al.

پژوهش‌های متعددی به صورت درون تنی و برون تنی مهارکننده‌هایی علیه این ویروس را گزارش کرده‌اند که بیشتر آن‌ها دامنه گسترده‌ای از مشتقات گیاهان دارویی را در بر می‌گیرد. در میان محصولات گیاهی عصاره پلی فنول پومگران‌ات (PPE) خواص ضد میکروبی متعددی علیه ویروس آنفلوانزا از خود نشان داده است. در مطالعه‌ای که به بررسی نقش PPE در جلوگیری از تکثیر ویروس آنفلوانزا پرداخته است، گزارش شده است که هنگامی که سلول‌های MDCK در معرض PPE قرار می‌گیرند جذب ویروسی کاهش می‌یابد (۳۹). در میان ترکیبات PPE با خاصیت ضد ویروسی بالاترین اثر مهار کنندگی مربوط به پونیکالاجین^{۱۰۱} بوده است (۴۰).



شکل ۲. تصویر میکروسکوپی از ویروس آنفلوانزا (۴۱)

ویروتسانگونگ و همکاران^{۱۰۲} (۴۲) گزارش کرده‌اند که عصاره الکلی برگ کلیناکانتوس سیامنسیس^{۱۰۳} قادر است سبب القای تولید آنتی بادی علیه ویروس آنفلوانزا در سلول‌های MDCK و موش شود. همچنین در مطالعه دیگری فعالیت ضد ویروسی عصاره الکلی آگریمونیا^{۱۰۴} پشمالو^{۱۰۴} مورد ارزیابی قرار گرفته و کاهش پلاک بر روی سلول‌های MDCK مشاهده شده است. همچنین

در مطالعه‌ای که توسط چو و همکارانش^{۹۰} صورت گرفت موفق به شناسایی ۵ فلاونون با نام‌های تومن‌تین^{۹۱} A، تومن‌تین B، تومن‌تین C، تومن‌تین D و تومن‌تین E، از عصاره میوه‌های درخت پاولونیا پشمالو^{۹۲} شدند که قادر به مهار فعالیت PLpro بودند. همچنین در مطالعه دیگری گزارش شده است که عصاره دانه‌های بابچی^{۹۳} که حاوی ۶ فلاوونوئید از قبیل باواچینین^{۹۴}، نتوبوایزوفلاون^{۹۵}، ایزوبواچالکون^{۹۶}، متیل‌باواچالکون^{۹۷}، پسورالیدین^{۹۸} و کوریل‌فول^{۹۹} A بوده است دارای اثر مهار کنندگی چشمگیری در فعالیت PLpro ویروس سارس-کووید دارد. در میان فلاوونوئیدهای ذکر شده پسورالیدین و ایزوبواچالکون دارای بالاترین اثر مهار کنندگی بودند (۳۷). پژوهش‌های دیگری نیز ترکیبات و مشتقات گیاهان دارویی دیگر نظیر کالوکون‌ها، کومارین‌ها و تانن‌ها که از عصاره الکلی گیاهان دارویی گلپر کیستی و مریم‌گلی قرمز به دست آمده‌اند را در مهار عملکرد PLpro گزارش کردند (۳۸، ۳۱). همچنین نتایج این پژوهش‌ها نشان داده است که اثر مهار کنندگی کالوکان‌ها وابسته به دوز و اثر مهار کنندگی تانسیون‌ها وابسته به زمان است. همچنین گزارشی مبنی بر تقویت عملکرد دی‌آریل‌هپتانوئیدها^{۱۰۰} که دارای عملکرد مهاری PLpro است توسط گروه‌های کاتکول و کربونیل‌های اشباع نشده آلفا و بتا وجود دارد (۳۹). جدول ۱ خلاصه-های از داروهای گیاهی استفاده شده توسط محققین مختلف برای درمان کووید-۱۹، آنفلوانزا و سارس را نشان می‌دهد.

آنفلوانزا

ویروس آنفلوانزا یک RNA ویروس است که به صورت فصلی با تغییر دمای هوا میلیون‌ها نفر را در سراسر جهت آلوده می‌کند (شکل ۲ را ببینید). در دهه‌های اخیر

⁹⁸ Psoralidin

⁹⁹ Corylifol A

¹⁰⁰ Diarylheptanoids

¹⁰¹ Punicalagin

¹⁰² Wirotasangthong et al.

¹⁰³ Clinacanthus siamensis Bremek

¹⁰⁴ Agrimonia pilosa Ledeb

⁹⁰ Cho et al.

⁹¹ Tomentin

⁹² Paulownia tomentosa (Thunb.) Steud.

⁹³ Cullen corylifolium (L.) Medik

⁹⁴ Bavachinin

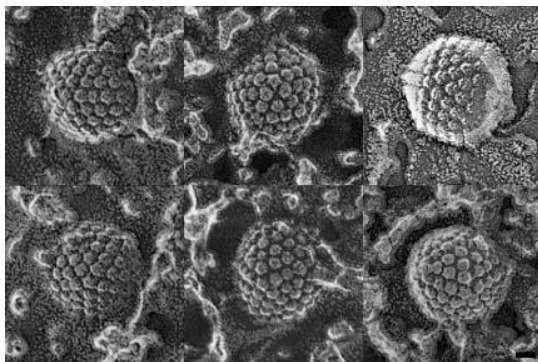
⁹⁵ Neobavaisoflavone

⁹⁶ Isobavachalcone

⁹⁷ O-Methylbavachalcone

هرپس

ویروس‌های هرپس سیمپلکس ۱ و ۲ (HSV-1 و HSV-2) از مهم‌ترین ویروس‌های بیماری‌زای انسانی هستند. ویروس هرپس سیمپلکس ۱، موجب تب‌خال لب و ویروس هرپس سیمپلکس ۲، موجب تب‌خال تناسلی می‌شود در دهه‌های اخیر، در میان ترکیبات دارای فعالیت ضد ویروسی بررسی شده فنول‌های مشتق شده از گیاهان کافئیک اسید می‌باشد. کشف فعالیت ضد ویروسی علیه ویروس هرپس (HSV) موجود در عصاره دانه‌های قهوه سبب جلب توجه پژوهشگران سراسر دنیا شده است. فعالیت ضد ویروسی کافئیک اسید برای اولین بار توسط ایکیدا و همکارانش^{۱۱۱} علیه ویروس هرپس مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج آنها نشان داده است که کافئیک اسید قادر به مهار تکثیر ویروس است (۴۹). به طور جالب توجهی، کلروژنیک اسید که یکی از مشتقات کافئیک اسید است هیچگونه اثر ضد ویروسی از خود نشان نداده است. همچنین بررسی‌های بیشتر نشان داده است که اثر ضد ویروسی کافئیک اسید علیه ویروس هرپس وابسته به زمان است.



شکل ۳: تصویر میکروسکوپی از ویروس هرپس (۵۰)

همچنین گزارش شده است که افزودن Fe^{3+} و تشکیل کمپلکس کافئیک اسید Fe^{3+} -اثر ضد ویروسی حدوداً ۱۰۰ برابر بیشتر نسبت به کافئیک اسید تنها دارد. در میان کمپلکس‌های یونی، کمپلکس آهن بیشترین

بررسی‌های بیشتر در خصوص عصاره این گیاه نشان داده است که فعالیت ضد ویروسی آن وابسته به دوز است و فعالیت‌های متفاوتی علیه آنفلوانزا نوع A و B دارد. پژوهشگران این مطالعه، علت فعالیت ضد ویروسی این عصاره را مقدار بالای پلی فنول می‌دانند با توجه به اینکه که بیشترین ترکیب یافت شده کاتکین بوده است (۴۳). در مطالعه دیگری فعالیت ضد ویروسی ۱ عصاره چای علیه ویروس آنفلوانزا صورت گرفت که در میان عصاره ختمی داروی^{۱۰۵} قوی‌ترین اثر مهار کنندگی را در تکثیر ویروس و بیان انتی ژن‌های ویروسی روی سلول‌های MDCK^{۱۰۶} خود نشان داد (۴۴). در میان پژوهش‌های صورت گرفته در این زمینه، فعالیت ضد ویروسی عصاره‌های گیاهی علیه نوع‌های مختلف ویروس آنفلوانزا که به صورت اختصاصی عمل کرده‌اند نیز مشاهده می‌شود. به عنوان مثال، فعالیت مهار کنندگی عصاره ریشه گل صدتومانی دلاوایی^{۱۰۶} نیز در شرایط برون تنی علیه ویروس آنفلوانزا نورامیدیناز گزارش شده است (۴۵). شوجی و همکاران^{۱۰۷} نیز اثر مهاری عصاره ساقه کروتون انگشتی^{۱۰۸} بر روی سلول‌های MDCK علیه ویروس آنفلوانزا به ویژه نوع H1N1 را گزارش داده است (۴۶). همچنین فعالیت ضد ویروسی PPE علیه ویروس آنفلوانزا H3N2 گزارش شده است. در مطالعه این تیم فعالیت ضد ویروسی عصاره ساقه، برگ و دانه سرو باتلاقی^{۱۰۹} گزارش شد که در این میان بهترین فعالیت مهار کنندگی مربوط به عصاره ساقه این گیاه بوده است (۴۷). لازم به ذکر است اگرچه پژوهش‌های متعددی فعالیت ضد ویروسی پلی‌فنول‌ها را نشان داده‌اند ولی گزارش‌هایی مبنی بر عملکرد ضعیف این ترکیبات نیز موجود هستند. به عنوان مثال بررسی خواص ضد ویروسی ۱۲۲ ترکیب به دست آمده از عصاره شیرین‌بیان اورال^{۱۱۰} نشان داده است که فلاونوئیدها کمتر از سایر ترکیبات نظیر ساپونین دارای خواص ضد ویروسی می‌باشند (۴۸).

¹⁰⁹ Taxodium distichum (L.)

¹¹⁰ Glycyrrhiza uralensis Fisch.

¹¹¹ Ikeda et al.

¹⁰⁵ Althaea officinalis L.

¹⁰⁶ Paeonia delavayi Franch

¹⁰⁷ Shoji et al.

¹⁰⁸ Jatropha multifida L.

نتایج آنها نشان داده است که این ترکیب از تکثیر ویروس HSV در مراحل اولیه جلوگیری می کند (۵۷).

هیپاتیت C

هیپاتیت C یکی از بیماری های عفونی دیگری است که توسط ویروس هیپاتیت C (HCV) ایجاد می شود. این ویروس ممکن است سبب آسیب جدی به کبد شود. این ویروس هر ساله میلیون ها نفر را در سراسر جهان آلوده و بیمار می کند. اگرچه برای فرم حاد این بیماری دارویی وجود ندارد ولی فرم مزمن این بیماری چندین دارو وجود دارد که دارای عوارض جانبی هستند. پژوهش های متعددی در خصوص خواص ضد ویروسی گیاهان دارویی و مشتقات آنها علیه ویروس HCV صورت گرفته است روتای معطر^{۱۱۹} یکی از گیاهانی است که در مناطق مدیترانه ای می روید و متعلق به خانواده تیره سداییان^{۱۲۰} می باشد. برگ این گیاه دارای ترکیباتی نظیر سئودان، آربورینین و کوکوزاگنین است که در میان این ترکیبات سئودان فعالیت ضد ویروسی قوی علیه ویروس HCV نسبت به سایر ترکیبات از خود نشان داده است. آنالیز عملکرد این ترکیب نشان داده است که سئودان سبب کاهش تکثیر RNA و سنتز پروتئین ویروس HCV می شود (۵۸).

یکی دیگر از گیاهان دارویی با خاصیت ضد ویروسی قوی گیاه افاقای نیل^{۱۲۱} و عصاره دی کلرومتان برگ سداب باریک برگ^{۱۲۲} علیه ویروس هیپاتیت C نیز گزارش شده است. گیاه سداب باریک برگ می تواند در دوز پایین نیز خاصیت ضد ویروسی خود را اعمال کند (۶۰ و ۵۹). در مطالعه دیگری واهیوانی و همکاران^{۱۲۳} (۶۱) به بررسی خواص ضد ویروسی گیاهان دارویی اندونزیایی علیه ویروس HCV پرداختند. در میان گیاهان مورد بررسی

افزایش ضد ویروسی را علیه ویروس هرپس اعمال می کند (۵۱). کائمپفرول و کوئرتستین دو ترکیبی هستند که دارای خاصیت ضد ویروسی در فرم آگلیکون هستند که اخیراً نقش قدرتمند ضد ویروسی گلیکوزیدهای آنها مورد ارزیابی قرار گرفته است. در پژوهشی خواص ضد ویروسی علیه ویروس هرپس توسط سه گلیکوزید به نام های کائمپفرول-۳-او-روتینوزید، روتین، و کائمپفرول-۳-او-روبینوبیوزید که از عصاره الکلی فیکوس بنجامین^{۱۱۲} به دست آمده اند گزارش شده است (۵۲). کبولاییک اسید^{۱۱۳} (CHLA) دو ترکیب دیگر تانین قابل هیدرولیز هستند که از هلیله سیاه^{۱۱۴} به دست می آید دارای خاصیت ضد ویروسی علیه HSV-1 هستند. بررسی های بیشتر نشان داده است که هر دو تانین توسط مهار ورود ویروس سبب کاهش معنادار تشکیل پلاک می شوند (۵۳).

کاتکین های به دست آمده از درخت چای^{۱۱۵} نیز دارای خاصیت ضد ویروسی علیه ویروس هرپس هستند. چن و همکارانش^{۱۱۶} گزارش دادند که در میان کاتکین های چای سبز ایپی گالوکاتکین گالات^{۱۱۷} (EGCG) دارای بیشترین خاصیت ضد ویروسی می باشد. همچنین مشخص شده است که این ترکیب از اتصال ویروس به سلول میزبان جلوگیری می کند (۵۴ و ۵۵). با این حال EGCG به شدت در محلول آبی ناپایدار بوده و اکسید می شود و قابلیت ضد ویروسی خود را از دست می دهد. از این رو، تغییرات ساختاری جهت پایدار کردن این ترکیب صورت گرفته است. ترکیب پالمیتول EGCG - یکی از ترکیباتی است که کاهش پلاک HSV-1 تا ۹۹٪ را در غلظت ۵۰ میکرومولار سبب می شود (۵۶).

شمس آبادی پور و همکارانش نیز خواص ضد ویروسی ترکیبی به نام بتولین که از عصاره استون/کلروفرم گیاه فرفیون دندانه دار^{۱۱۸} به دست آمده بود را گزارش کردند.

¹¹⁸ Euphorbia denticulata Lam.

¹¹⁹ Ruta graveolens L.

¹²⁰ Rutaceae

¹²¹ Acacia nilotica

¹²² Ruta angustifolia

¹²³ Wahyuni et al.

¹¹² Ficus benjamina L.

¹¹³ Chebulagic acid

¹¹⁴ Terminalia chebula Retz.

¹¹⁵ Camellia sinensis (L.) Kuntze

¹¹⁶ Chen et al.

¹¹⁷ Green tea Epigallocatechin gallate

کووید-۱۹، آنفلوانزا، هرپس و هپاتیت C پرداخته شده است (جدول ۱).

عصاره الکلی ساقه ملانولپیس چندغده‌ای^{۱۲۴}، عصاره الکلی برگ انجیر وحشی فیستولوزا^{۱۲۵} و چوب سرخ سورنی^{۱۲۶} دارای فعالیت ضد ویروسی چشمگیری بودند. در مطالعه دیگری با بررسی عصاره متانولی بخش‌های مختلف گیاه توت هندی^{۱۲۷} نظیر میوه، ساقه، ریشه و برگ مشخص شده است که تنها عصاره ریشه و برگ این گیاه دارای فعالیت ضد ویروسی علیه ویروس HCV هستند و می‌توانند بیش از ۵۰٪ رشد این ویروس را مهار کنند. در بررسی عصاره متانول ریشه زرشک هندی^{۱۲۸}، برگ آجوگای کوچک‌گل^{۱۲۹} و برگ آجوگای براکتوزا^{۱۳۰} مشخص شده است که عصاره این گیاهان می‌تواند به ترتیب ۳۵٪، ۷۰٪ و ۶۰٪ مقدار ویروس را در سلول‌های کبدی کاهش دهند. فعالیت ضد ویروسی این عصاره‌ها می‌تواند به دلیل مقادیر بالای پلی فنول به ویژه فنولیک اسید باشد (۶۲).

در مطالعه‌ای که اخیراً توسط مفید و همکارانش^{۱۳۱} صورت گرفت اثر ضد ویروسی عصاره برگ جینسینگ هندی^{۱۳۲} گزارش شد. نتایج آنها نشان داده است که این عصاره سبب افزایش مقدار لنفوسیت‌ها و کاهش مقدار ویروس HCV و پلاک می‌شود (۶۳). اثر ضد ویروسی عصاره میوه ملیکوپه پهن‌برگ^{۱۳۳} علیه ویروس HCV نیز در اوایل سال ۲۰۲۱ توسط ویدیاوارویانته و همکاران^{۱۳۴} گزارش شد. از میان ۶ ترکیب استخراج شده از عصاره میوه این گیاه، ان-متیل اوودیونول^{۱۳۵} بیشترین فعالیت ضد ویروسی را از خود نشان داده است و مقدار IC₅₀ آن برابر با ۸/۳ میکروگرم در میلی لیتر بوده است (۶۴).

گیاهان دارویی و ویروس‌ها

در این بخش، به بررسی استفاده و کاربرد گیاهان دارویی به عنوان مکمل درمانیبر روی ویروس‌هایی مانند ویروس

¹³⁰ *Ajuga bracteosa* Wall

¹³¹ Mofed et al.

¹³² *Withania somnifera* (Ashwagandha)

¹³³ *Melicope latifolia*

¹³⁴ Widyawaruyanti et al.

¹³⁵ N-Methyl eudistominol

¹²⁴ *Melanolepis multiglandulosa*

¹²⁵ *Ficus fistulosa* Reinw

¹²⁶ *Toona sureni* (Blume) Merr

¹²⁷ *Morinda citrifolia* L.

¹²⁸ *Berberis lycium* Royle

¹²⁹ *Ajuga parviflora* Benth.

جدول ۱. گیاهان دارویی با خاصیت ضدویروسی

نام داروی گیاهی (منبع)	ویروس های مورد مطالعه	نوع مطالعه	مواد موثره ترکیبات گیاهی	تاثیر عمل کردی ماده	نتایج
Lianhuaqingwen (ترکیبی از ۱۱ گونه گیاهی) (۲۰ و ۱۸)	کرونا (کوید ۱۹)	کار آزمایشی بالینی	ترکیبی از ۱۱ گونه گیاهی	مهار همانندسازی ویروس با دوز حداقل ۲/۴۱۱ میکروگرم بر میلی لیتر و کاهش سیتوکین های پیش التهابی	کاهش علائم و مهار ترشح TNF- α و مهار تکثیر ویروس سارس-کووید
ریزوم ژانتینای زبر ^{۱۳۶} و عصاره های دیگر (۲۵)	کرونا (کوید ۱۹)	برون تنی	ترکیبات موثر از گیاهان مختلف	مهار چشمگیر رشد و تکثیر ویروس سارس-کووید	مهار تکثیر ویروس در سلول های آلوده
اسکوتلارترین و میریستین (۲۶)	سارس-کووید	برون تنی	فلاونوئیدها	مهار فعالیت ATPase آنزیم هلیکاز ویروس سارس-کووید	مهار ۹۰ درصدی فعالیت ATPase با غلظت ۱۰ میکرومولار
عصاره الکلی ساقه انگورک جاوه ای زیر گونه چینی (۲۸)	سارس-کووید	برون تنی	ترکیبات فنولیک	کاهش تشکیل پلاک و مهار اتصال ویروس به سلول های هدف	کاهش موثر تعداد ویروس های متصل شده به سلول
جلبک قهوه ای اکولونیا کاوا (۲۹)	کرونا	برون تنی	فلوروتانین ها	مهار آنزیم 3CLpro وابسته به دوز	Dieckol دارای بالاترین فعالیت مهار بر 3CLpro
عصاره الکلی مریم گلی قرمز (۳۰)	سارس-کووید	برون تنی	تانشینون ها	مهار ۶۰ درصدی آنزیم 3CLpro در ویروس سارس- کووید	اثر بخشی تانشینون ها وابسته به دوز و زمان مصرف
گیاه گلپر کیستی (۳۱)	سارس-کووید	برون تنی	کالکون ها و کومارین ها	مهار آنزیم 3CLpro با میزان IC50 برابر با ۱/۲- ۱/۴ میکرومولار	کاهش قابل توجه فعالیت تکثیر ویروسی در سلول های آلوده
صنوبر ژاپنی (۳۲)	سارس-کووید	برون تنی	بی فلاونوئیدها	آمنتوفلاون دارای بیشترین اثر مهار بر پروتئین 3CLpro	تایید فعالیت مهار بر داکینگ ملکولی
بلوط مازوج دار (۳۵)	سارس-کووید	برون تنی	فنولیک اسیدها	مهار ۹۴ درصدی فعالیت ACE در غلظت ۳۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر	تاثیر بالا به دلیل مقدار زیاد فنول
خارخسک (۳۶)	سارس-کووید	برون تنی	آمیدهای دارویی	مهار PLpro ویروس سارس- کووید با دوز مهار بر دامنه ۱/۷ تا ۸/۱۵ میکرومولار	کاهش تکثیر و مهار پروتئاز PLpro
پونیکالاژین (۳۹)	آنفلانزا	برون تنی	پلی فنول ها	کاهش جذب ویروسی یا جلوگیری از ورود ویروس به سلول های هدف	کاهش جذب ویروسی با قرار گرفتن در برابر سلول
عصاره الکلی برگ کلیناکانتوس سیامنیسیس (۴۹)	انفلانزا	برون تنی	فلاونوئیدها	کاهش پلاک های ویروسی بر سلول های MDCK	کاهش پلاک های ویروسی در سلول های آلوده

عصاره الکلی آگریمونایی پشمالو (۵۱)	انفولانزا	برون تنی	فلاونوئیدها	کاهش جذب ویروس و مهار ویروسی بر سلول های هدف	کاهش تعداد پلاک های ویروسی در سلول های MDCK
عصاره دمنوش ختمی دارویی (۵۲)	آنفلانزا	برون تنی	فلاونوئیدها	مهار تکثیر ویروسی و کاهش ویروس های فعال	کاهش پلاک های ویروسی و جلوگیری از تکثیر ویروس ها در سلول های MDCK
عصاره الکلی فیکوس بنجامین ۵۳	هرپس	برون تنی	فلاونوئیدها	مهار اتصال ویروس به سلول های هدف	کاهش ورود ویروس به سلول های آلوده و مهار تکثیر ویروسی
چای سبز (۵۴)	هرپس	برون تنی	کاتچین ها و پلی فنول ها	مهار ویروس از طریق جلوگیری از ورود و تکثیر	کاهش تکثیر ویروسی و جلوگیری از تشکیل پلاک ویروسی
سداب (۵۵)	هپاتیت سی	برون تنی	فلاونوئیدها و آلکالوئیدها	کاهش تکثیر ویروسی از طریق مهار آنزیم های مهم تکثیر ویروس	مهار تکثیر ویروس و کاهش قابل توجه در تعداد ویروس های فعال
عصاره برگ آشواگاندا (۵۶)	آنفلانزا	برون تنی	آلکالوئیدها و ویتانولیدها	افزایش میزان فعالیت سیستم ایمنی و افزایش تولید سلول های ایمنی در بدن	کاهش تعداد ویروس ها و افزایش قدرت ایمنی در بدن
عصاره میوه ملیکوپه لاتیفولیا (۲۲)	HCV و پلاک	برون تنی	اوبدینول و مشتقات دیگر	مهار تکثیر ویروس و جلوگیری از تشکیل پلاک ویروسی	مهار موثر تکثیر ویروس HCV و کاهش قابل توجه ویروس های فعال
عصاره زیتون اروپایی (۵۷)	HPV	برون تنی	اولثوروپتین، هیدروکسی تیروسول	مهار تکثیر ویروس، اثر آنتی اکسیدانی، ضد التهابی	مهار تکثیر ویروس، اثر آنتی اکسیدانی، ضد التهابی
بذر کتان (۵۸)	HPV	برون تنی	لیگنان ها (سزامین، سزامیولین)	مهار تکثیر ویروس، اثر آنتی اکسیدانی، ضد التهابی	کاهش رشد سلول های آلوده به HPV، کاهش خطر ابتلا به سرطان دهانه رحم
انگور اروپایی (۵۹)	HPV	برون تنی	پروآنتوسیانیدین ها (OPC)	مهار تکثیر ویروس، اثر آنتی اکسیدانی، ضد التهابی	کاهش آسیب DNA ناشی از ویروس، کاهش خطر پیشرفت ضایعات پیش سرطانی

استفاده آنها (عصاره آبی، الکلی و غیره) در جدول ۲ به صورت خلاصه آمده است.

در نهایت، برای جمع بندی نهایی گیاهان مورد استفاده در درمان این چهار نوع بیماری ویروسی، بخشهای موثر و مفید قسمتهای مختلف گیاهان و به همراه شکل

جدول ۲. گیاهان دارویی استفاده شده و مکانیسم اثر آنها

نام گیاه دارویی	نوع محلول ماده موثر	مکانیسم اثر بر روی ویروس	رفرنس
انگورک جاوه ای زیرگونه چینی	عصاره الکلی	مهار تکثیر ویروس از طریق ممانعت از ورود ویروس به سلول، مهار سنتز پروتئین های ویروسی و تحریک پاسخ ایمنی ذاتی	(۳۱)

مریم گلی قرمز	عصاره الکلی	مهار تکثیر ویروس از طریق مهار آنزیم های مورد نیاز برای تکثیر ویروس، کاهش التهاب و اکسیداسیون در سلول های آلوده	(۲۰)
گلپر کیستی	عصاره الکلی	مهار تکثیر ویروس از طریق مهار آنزیم های پروتئازی ویروسی، کاهش التهاب و تقویت سیستم ایمنی	(۳۱)
پلی فنول انار	عصاره الکلی	مهار تکثیر ویروس از طریق مهار اتصال ویروس به گیرنده های سلولی، مهار سنتز اسید نوکلئیک ویروسی و تقویت سیستم ایمنی	(۴۰)
کلیناکانتوس سیامنیسیس	عصاره الکلی	تحریک سیستم ایمنی از طریق افزایش تولید اینترفرون، مهار تکثیر ویروس و کاهش التهاب	(۴۱)
آگریمونیای پشمالو	عصاره الکلی	مهار اتصال ویروس به سلول میزبان، کاهش التهاب و آنتی اکسیدانی	(۴۳)
ختمی دارویی	عصاره الکلی	پوشاندن ویروس و جلوگیری از اتصال به سلول، کاهش التهاب و نرم کنندگی	(۴۲)
گل صدتومانی دلاوایی	عصاره الکلی	مهار تکثیر ویروس، مهار پروتئاز ویروسی، کاهش التهاب	(۴۳)
زرشک هندی	عصاره الکلی	مهار تکثیر ویروس، مهار فعالیت آنزیم های ویروسی، خاصیت ضد میکروبی	(۶۰)
آجو گای کوچک گل	عصاره الکلی	مهار تکثیر سلول های آلوده به ویروس، کاهش التهاب	(۶۱)
زنجبیل	عصاره آبی	مهار تکثیر ویروس، کاهش التهاب، تقویت سیستم ایمنی	(۶۲)
سیر	عصاره آبی	مهار تکثیر ویروس، خاصیت ضد باکتریایی، تقویت سیستم ایمنی	(۶۳)
درخت چای	عصاره آبی	مهار تکثیر ویروس، کاهش التهاب، آنتی اکسیدان	(۶۴)
نعناع فلفلی	اسانس	مهار تکثیر ویروس، کاهش التهاب، ضد اسپاسم	(۶۵)
بابونه آلمانی	اسانس	کاهش التهاب، آرام بخش، ضد اسپاسم	(۶۶)

بحث

خواص ضد ویروسی گیاهان دارویی و مشتقات آنها و نقش آن در کنترل و درمان بیماری‌های عفونی ناشی از ویروس‌ها توسط مطالعات بسیاری گزارش شده است. اثر ضد ویروسی گیاهان دارویی به پارامترهای متفاوتی از جمله نوع عصاره گیری، دوز ترکیب و مدت زمان استفاده بستگی دارد. اگرچه عصاره‌های آبی و آلی گیاهان دارویی فعالیت ضد ویروسی از خود نشان داده ولی اثربخشی آنها بسته به نوع گیاه دارویی و ترکیبات به دست آمده متفاوت خواهد بود. با نگاهی به گزارشات متعددی که در خصوص فعالیت ضد ویروسی گیاهان دارویی وجود دارد به نظر می‌رسد که انواع فاکتورهای ضد ویروسی در این گیاهان وجود دارد که نیازمند بررسی‌های بیشتر شاخصه‌های ترکیبات مشتق شده از گیاهان دارویی می‌باشد. برخی از این ترکیبات متعلق به یک دامنه وسیعی از کلاس‌های ساختاری متفاوت است که می‌توان به کورامین‌ها، فلاونوئیدها، تانین‌ها، ترپن‌ها و آلکالوئیدها اشاره کرد. همچنین برخی از این ترکیبات ممکن است دارای خواص فیزیکیوشیمی جدیدی باشند. در حال حاضر تعداد بسیار زیادی از ترکیبات گیاهان دارویی به صورت تجاری وجود دارند و چندین ترکیب نیز در سراسر جهان در فاز مطالعات بالینی قرار دارند. توسعه محصولات گیاهان دارویی جهت کنترل و درمان بیماری‌های عفونی از جمله عفونت‌های ویروسی ضروری و حیاتی است چرا که این محصولات دارای حداقل عوارض جانبی بوده و به دلیل طبیعی بودن این محصولات بازدهی بیشتری در بدن خواهد داشت.

همچنین در حال حاضر، یکی دیگر از مشکلاتی که در حال بروز است و در آینده زندگی بشر را به خطر می‌اندازد پدیده مقاومت آنتی بیوتیکی می‌باشد. به همین خاطر، درک و یافتن مکانیسم‌های ملکولی کلیدی دخیل در غریبالگری ترکیبات کوچک فعال زیستی دانشمندان را با چالش مواجه کرده است. کاهش اثربخشی و افزایش سمیت داروهای سنتز شده به یک مسئله جدی تبدیل شده است. از این رو، پژوهشگران سراسر جهان به ترکیبات به دست آمده از گیاهان دارویی به عنوان یک

راه حل می‌نگرند چرا که تاکنون خواص درمانی برخی از ترکیبات دارویی مشخص شده است. در نتیجه، نیاز ضروری به جایگزینی برای داروهای شیمیایی به علت عوارض جانبی جدی سبب اشتیاق دانشمندان به استفاده از گیاهان دارویی و مشتقات آنها شده و استفاده از داروهای گیاهی به شدت در حال افزایش است. از علل اصلی که استفاده از گیاهان دارویی را سبب می‌شود می‌توان به مکانیسم عمل متفاوت از داروهای شیمیایی، مقرون به صرفه بودن، و سازگاری بیشتر زیستی اشاره کرد. برای استفاده بیشتر از گیاهان دارویی نیاز به همکاری بین سازمان بهداشت جهانی، سازمان غذا و دارو، کارخانه‌های داروسازی و بیوتکنولوژی وغیره می‌باشد که محصولاتی را با استفاده از گیاهان دارویی تولید و توسعه دهند. بدون شک گیاهان دارویی منابع غنی از ترکیباتی با خاصیت ضد میکروبی هستند به همین خاطر جهت استفاده حداکثری از این ترکیبات نیاز به پژوهش‌های گسترده می‌باشد تا ویژگی‌های این ترکیبات دارویی مشخص شود. جهت کسب نتایج بهتر می‌توان با استفاده از تکنیک‌های بیوانفورماتیکی تمایل این ترکیبات را با پاتوژن‌ها مورد ارزیابی قرار داد.

با وجود پاندمی کووید-۱۹ نیاز به داروهایی با کمترین عوارض جانبی به شدت احساس می‌شود. چرا که بنابر پیش‌بینی مرکز بیماری‌های واگیردار به دلیل افزایش مصرف آنتی بیوتیک در دوران پاندمی کووید-۱۹ احتمال بروز مشکل مقاومت آنتی بیوتیکی در سالهای آینده وجود دارد. از آن جایی که مصرف گیاهان دارویی و ترکیبات مشتق شده از آنها کمترین خطر را نسبت به داروهای شیمیایی سنتز شده دارد استفاده از این گیاهان می‌تواند نویدبخش راه درمانی جدیدی برای درمان این بیماری باشد. همچنین همانطور که در این مقاله گفته شد، بسیاری از عصاره گیاهان دارویی دارای فعالیت ضد ویروسی علیه انواع مختلفی از ویروس‌ها به ویژه ویروس‌های RNA و حتی انواع دیگر کروناویروس می‌باشند. بنابراین با پژوهش‌های بیشتر می‌توان اثر عصاره‌های گیاهان دارویی را در مهار و جلوگیری از تکثیر

ویروس و ویروس سارس-کووید ۲ مورد ارزیابی قرار داد .
همچنین بررسی اثر همزمان استفاده از گیاهان دارویی
به همراه داروهای شیمیایی پیشنهاد می شود.

منابع

1. F. Jamshidi-Kia, Z. Lorigooini, and H. Amini-Khoei, "Medicinal plants: Past history and future perspective," *Journal of herbmed pharmacology*, vol. 7, no. 1, 2018.
2. S. Dahanukar, R. Kulkarni, and N. Rege, "Pharmacology of medicinal plants and natural products," *Indian journal of pharmacology*, vol. 32, no. 4, pp. S81-S118, 2000.
3. S. M. Evans and M. M. Cowan, "Plant products as antimicrobial agents," in *Cosmetic and Drug Microbiology*: CRC Press, 2016, pp. 227-254.
4. J. C. Tilburt and T. J. Kaptchuk, "Herbal medicine research and global health: an ethical analysis," *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 86, pp. 594-599, 2008.
5. Mohaddeseh Larypoor, Mansour Bayat ,Zahur Mohammad Hasan, Masoud Amanlou, Abbas Akhavan. sepahy/Evaluation of the number of CD4+ CD25+ FoxP3+ Treg cells in normal mice exposed to AFB1 and treated with Aged Garlic Extract. Yakhteh/2013(ISI)
6. A. Ganesan, "The impact of natural products upon modern drug discovery," *Current opinion in chemical biology*, vol. 12, no. 3, pp. 306-317, 2008.
7. F. Tinitana, M. Rios, J. C. Romero-Benavides, M. de la Cruz Rot, and M. Pardo-de-Santayana, "Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador," *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, vol. 12, no. 1, pp. 1-18, 2016.
8. M. Akram *et al.*, "Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis, and coxsackievirus: a systematic review," *Phytotherapy Research*, vol. 32, no. 5, pp. 811-822, 2018.
9. A. L. Harvey, "Natural products as a screening resource," *Current opinion in chemical biology*, vol. 11, no. 5, pp. 480-484, 2007.
10. S. A. A. Jassim and M. A. Naji, "Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective," *Journal of applied microbiology*, vol. 95, no. 3, pp. 412-427, 2003.
11. J. Serkedjieva, M. Konaklieva, S. Dimitrova-Konaklieva, V. Ivanova, K. Stefanov, and S. Popov, "Antiinfluenza virus effect of extracts from marine algae and invertebrates," *Zeitschrift für Naturforschung C*, vol. 55, no. 1-2, pp. 87-93, 2000.
12. M. Drexler, "What you need to know about infectious disease," 2014.
13. [13] J. M. Hassell, M. Begon, M. J. Ward, and E. M. Fèvre, "Urbanization and disease emergence: dynamics at the wildlife–livestock–human interface," *Trends in ecology & evolution*, vol. 32, no. 1, pp. 55-67, 2017.
14. Larypoor M (student of Ph.D.), Akhavansepahy A (Ph.D.), Rahimifard N (Ph.D.)*, Rashedi H (Ph.D.) Antidermatophyte Activity of the Essential oil of Hypericum perforatum of North of Iran Journal of medicinal plans . volume 8 .no31 summer 2009
15. P. D. Gupta and T. J. Birdi, "Development of botanicals to combat antibiotic resistance," *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, vol. 8, no. 4, pp. 266-275, 2017.
16. R. Lu *et al.*, "Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding," *The lancet*, vol. 395, no. 10224, pp. 565-574, 2020.
17. N. Zhu *et al.*, "China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019," *N Engl J Med*, vol. 382, no. 8, pp. 727-733, 2020.
18. Y. Ding *et al.*, "The Chinese prescription lianhuaqingwen capsule exerts anti-influenza activity through the inhibition

- of viral propagation and impacts immune function," *BMC complementary and alternative medicine*, vol. 17, no. 1, pp. 1-11, 2017.
19. [64] Caldas, L.A., Carneiro, F.A., Higa, L.M., Monteiro, F.L., da Silva, G.P., da Costa, L.J., Durigon, E.L., Tanuri, A. and de Souza, W., 2020. Ultrastructural analysis of SARS-CoV-2 interactions with the host cell via high resolution scanning electron microscopy. *Scientific reports*, 10(1), p.16099.
 20. D. Gao *et al.*, "Identification of a pharmacological biomarker for the bioassay-based quality control of a thirteen-component TCM Formula (Lianhua Qingwen) Used in treating influenza A virus (H1N1) infection," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 11, p. 746, 2020.
 21. [Soltani M, Larypoor M, Akhavan sepahy A, Pirali Hamedani M. Effect of Allicin of Garlic on Production Nitric Oxide of Macrophage to Candida Albicans. *J. Med. Plants*. 2009; 8 (29) :164-170.
 22. [63] L. Runfeng *et al.*, "Lianhuaqingwen exerts anti-viral and anti-inflammatory activity against novel coronavirus (SARS-CoV-2)," *Pharmacological research*, vol. 156, p. 104761, 2020.
 23. Z. Wang, X. Chen, Y. Lu, F. Chen, and W. Zhang, "Clinical characteristics and therapeutic procedure for four cases with 2019 novel coronavirus pneumonia receiving combined Chinese and Western medicine treatment," *Bioscience trends*, 2020.
 24. C.-H. Wang *et al.*, "A network analysis of the Chinese medicine Lianhua-Qingwen formula to identify its main effective components," *Molecular BioSystems*, vol. 12, no. 2, pp. 606-613, 2016.
 25. C.-C. Wen *et al.*, "Traditional Chinese medicine herbal extracts of Cibotium barometz, Gentiana scabra, Dioscorea batatas, Cassia tora, and Taxillus chinensis inhibit SARS-CoV replication," *Journal of traditional and complementary medicine*, vol. 1, no. 1, pp. 41-50, 2011.
 26. M.-S. Yu *et al.*, "Identification of myricetin and scutellarein as novel chemical inhibitors of the SARS coronavirus helicase, nsP13," *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, vol. 22, no. 12, pp. 4049-4054, 2012.
 27. S. Wan *et al.*, "Clinical features and treatment of COVID-19 patients in northeast Chongqing," *Journal of medical virology*, vol. 92, no. 7, pp. 797-806, 2020.
 28. J.-R. Weng *et al.*, "Antiviral activity of Sambucus Formosana Nakai ethanol extract and related phenolic acid constituents against human coronavirus NL63," *Virus research*, vol. 273, p. 197767, 2019.
 29. J.-Y. Park *et al.*, "Dieckol, a SARS-CoV 3CLpro inhibitor, isolated from the edible brown algae Ecklonia cava," *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 21, no. 13, p. 3730, 2013.
 30. O. K. Park *et al.*, "Comparison of neuroprotective effects of five major lipophilic diterpenoids from Danshen extract against experimentally induced transient cerebral ischemic damage," *Fitoterapia*, vol. 83, no. 8, pp. 1666-1674, 2012.
 31. J.-Y. Park *et al.*, "Chalcones isolated from Angelica keiskei inhibit cysteine proteases of SARS-CoV," *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, vol. 31, no. 1, pp. 23-30, 2016.
 32. Y. B. Ryu *et al.*, "Biflavonoids from Torreya nucifera displaying SARS-CoV 3CLpro inhibition," *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 18, no. 22, pp. 7940-7947, 2010.
 33. G. S. Patten, M. Y. Abeywardena, and L. E. Bennett, "Inhibition of angiotensin converting enzyme, angiotensin II receptor blocking, and blood pressure lowering bioactivity across plant families," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 56, no. 2, pp. 181-214, 2016.
 34. T.-Y. Ho, S.-L. Wu, J.-C. Chen, C.-C. Li, and C.-Y. Hsiang, "Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction," *Antiviral research*, vol. 74, no. 2, pp. 92-101, 2007.

35. N. Sharifi, E. Sour, S. A. Ziai, G. Amin, and M. Amanlou, "Discovery of new angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors from medicinal plants to treat hypertension using an in vitro assay," *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 21, no. 1, pp. 1-8, 2013.
36. Y. H. Song *et al.*, "Papain-like protease (PLpro) inhibitory effects of cinnamic amides from *Tribulus terrestris* fruits," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 37, no. 6, pp. 1021-1028, 2014.
37. D. W. Kim *et al.*, "Phenolic phytochemical displaying SARS-CoV papain-like protease inhibition from the seeds of *Psoralea corylifolia*," *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, vol. 29, no. 1, pp. 59-63, 2014.
38. J.-Y. Park *et al.*, "Tanshinones as selective and slow-binding inhibitors for SARS-CoV cysteine proteases," *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 20, no. 19, pp. 5928-5935, 2012.
39. J.-Y. Park *et al.*, "Diarylheptanoids from *Alnus japonica* inhibit papain-like protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, pp. b12-00623, 2012.
40. M. Haidari, M. Ali, S. W. Casscells III, and M. Madjid, "Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir," *Phytomedicine*, vol. 16, no. 12, pp. 1127-1136, 2009.
41. [65] Kon, T.C., Onu, A., Berbecila, L., Lupulescu, E., Ghiorgisor, A., Kersten, G.F., Cui, Y.Q., Amorij, J.P. and Van der Pol, L., 2016. Influenza vaccine manufacturing: effect of inactivation, splitting and site of manufacturing. Comparison of influenza vaccine production processes. *PloS one*, 11(3), p.e0150700.
42. M. Wirotangthong, T. Nagai, H. Yamada, S. Amnuoypol, and C. Mungmee, "Effects of *Clinacanthus siamensis* leaf extract on influenza virus infection," *Microbiology and immunology*, vol. 53, no. 2, pp. 66-74, 2009.
43. W. J. Shin, K. H. Lee, M. H. Park, and B. L. Seong, "Broad-spectrum antiviral effect of *Agrimonia pilosa* extract on influenza viruses," *Microbiology and Immunology*, vol. 54, no. 1, pp. 11-19, 2010.
44. T. Baatartsogt *et al.*, "High antiviral effects of hibiscus tea extract on the H5 subtypes of low and highly pathogenic avian influenza viruses," *Journal of Veterinary Medical Science*, pp. 16-0124, 2016.
45. J. Li, X. Yang, and L. Huang, "Anti-Influenza virus activity and constituents characterization of *Paeonia delavayi* extracts," *Molecules*, vol. 21, no. 9, p. 1133, 2016.
46. M. Shoji *et al.*, "Anti-influenza virus activity of extracts from the stems of *Jatropha multifida* Linn. collected in Myanmar," *BMC complementary and alternative medicine*, vol. 17, no. 1, pp. 1-7, 2017.
47. C.-F. Hsieh *et al.*, "An extract from *Taxodium distichum* targets hemagglutinin-and neuraminidase-related activities of influenza virus in vitro," *Scientific reports*, vol. 6, no. 1, pp. 1-13, 2016.
48. S. Ji *et al.*, "Bioactive constituents of *Glycyrrhiza uralensis* (licorice): discovery of the effective components of a traditional herbal medicine," *Journal of Natural Products*, vol. 79, no. 2, pp. 281-292, 2016.
49. K. Ikeda *et al.*, "Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 28, no. 4, pp. 595-598, 2011.
50. Cardone, G., Winkler, D.C., Trus, B.L., Cheng, N., Heuser, J.E., Newcomb, W.W., Brown, J.C. and Steven, A.C., 2007. Visualization of the herpes simplex virus portal in situ by cryo-electron tomography. *Virology*, 361(2), pp.426-434.
51. J. Langland, B. Jacobs, C. E. Wagner, G. Ruiz, and T. M. Cahill, "Antiviral activity of metal chelates of caffeic acid and similar compounds towards herpes simplex, VSV-Ebola pseudotyped and vaccinia viruses," *Antiviral research*, vol. 160, pp. 143-150, 2018.
52. L. Yarmolinsky, M. Huleihel, M. Zaccai, and S. Ben-Shabat, "Potent antiviral flavone glycosides from *Ficus*

- benjamina leaves," *Fitoterapia*, vol. 83, no. 2, pp. 362-367, 2012.
53. L.-T. Lin *et al.*, "Hydrolyzable tannins (chebulagic acid and punicalagin) target viral glycoprotein-glycosaminoglycan interactions to inhibit herpes simplex virus 1 entry and cell-to-cell spread," *Journal of virology*, vol. 85, no. 9, p. 4386, 2011.
54. R. K. Dhiman, "The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate (EGCG)—one step forward in antiviral therapy against hepatitis C Virus," *Journal of clinical and experimental hepatology*, vol. 1, no. 3, p. 159, 2011.
55. P. Chen, D. Dickinson, and S. Hsu, "Lipid-soluble green tea polyphenols: stabilized for effective formulation," ed: Nova Science Publishers, Inc, 2009, pp. 45-64.
56. A. De Oliveira *et al.*, "Inhibition of herpes simplex virus type 1 with the modified green tea polyphenol palmitoyl-epigallocatechin gallate," *Food and chemical toxicology*, vol. 52, pp. 207-215, 2013.
57. S. Shamsabadipour *et al.*, "Triterpenes and steroids from Euphorbia denticulata Lam. with anti-Herpes symplex virus activity," *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, vol. 12, no. 4, p. 759, 2013.
58. T. S. Wahyuni *et al.*, "Inhibition of hepatitis C virus replication by chalepin and pseudane IX isolated from Ruta angustifolia leaves," *Fitoterapia*, vol. 99, pp. 276-283, 2014.
59. S. Rehman, U. A. Ashfaq, S. Riaz, T. Javed, and S. Riazuddin, "Antiviral activity of Acacia nilotica against Hepatitis C Virus in liver infected cells," *Virology journal*, vol. 8, no. 1, pp. 1-6, 2011.
60. Y.-B. Zhang *et al.*, "Four matrine-based alkaloids with antiviral activities against HBV from the seeds of Sophora alopecuroides," *Organic letters*, vol. 19, no. 2, pp. 424-427, 2017.
61. T. S. Wahyuni *et al.*, "Antiviral activities of Indonesian medicinal plants in the East Java region against hepatitis C virus," *Virology journal*, vol. 10, no. 1, pp. 1-9, 2013.
62. T. Yousaf *et al.*, "Phytochemical profiling and antiviral activity of Ajuga bracteosa, Ajuga parviflora, Berberis lycium and Citrus lemon against Hepatitis C Virus," *Microbial pathogenesis*, vol. 118, pp. 154-158, 2018.
63. D. Mofed, W. Ahmed, A.-R. Zekri, O. Said, M. Rahouma, and A. H. I. Faraag, "The Antiviral Efficacy of Withania somnifera (Ashwagandha) against Hepatitis C Virus Activity: In Vitro and in Silico Study," *Advances in Microbiology*, vol. 10, no. 9, pp. 463-477, 2020.
64. A. Widyawaruyanti, A. A. Permanasari, L. N. Hidayatus, L. Tumewu, T. S. Wahyuni, and A. F. Hafid, "ANTI HEPATITIS C ACTIVITY AND TOXICITY OF Scoparia dulcis LINN. HERB," *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease*, vol. 8, no. 2, pp. 124-130, 2020.
65. N. R. Farnsworth, O. Akerele, A. S. Bingel, D. D. Soejarto, and Z. Guo, "Medicinal plants in therapy," *Bulletin of the world health organization*, vol. 63, no. 6, p. 965, 1985.
66. B. P. Marasini *et al.*, "Evaluation of antibacterial activity of some traditionally used medicinal plants against human pathogenic bacteria," *BioMed research international*, vol. 2015, 2015.