Journal of Microbial World
Volume 17, No. 1, June 2024

Original Article

Investigating the ability of wild and preserved strains of *Bacillus subtilis* natto to produce menaquinone 7 (vitamin K) and nattokinase

Abdolreza Karami[1], Mohammad Kargar[2], Farshid Kafilzadeh[3], Ahmad Vaez[4], Alireza Ebrahiminezhad[5]

[1]PhD Candidate, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. [2]Professor, Department of Microbiology, Zand Institute of Higher Education, Shiraz, Iran. [3]Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran. [4]Assistance Professor, Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran. [5]Associate Professor, Biotechnology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Bacillus subtilis* natto is a valuable microbial strain in pharmaceutical biotechnology due to its high potential in producing menaquinone 7 and the enzyme nattokinase. A collection strain of this bacterium is available in Iran, but long-term storage may have a negative effect on its physiological properties. We decided to compare the ability of this strain to produce biological products with the wild strain (isolated from the natto starter).

Material and Methods: Japanese Natto fermented food was prepared by purchasing Natto starter from international companies. By diluting the Natto suspension and culturing it, colonies suspected of being Bacillus subtilis were isolated and purified based on colony morphology and staining. Biochemical tests were performed on the isolates as well as molecular identification by 16S rRNA gene sequencing. The ability of the wild and collection strains (purchased from the Bioresources Center) to produce menaquinone 7 and nattokinase was compared.

Results: The results showed that the isolated strain was Bacillus subtilis natto. The amount of menaquinone 7 production by this strain and the collection strain did not show a significant difference. The ability to produce nattokinase in the wild strain was significantly higher than in the collection strain.

Conclusion: Long-term storage of the collection strain may have reduced its ability to produce pharmaceutical products, or the collection strain may have been a weak strain from the beginning in terms of pharmaceutical production. Efforts are being made to deposit the isolated wild strain, which has significant ability to produce menaquinone 7 and nattokinase, in domestic microbial collections and make it available to researchers.

Keywords: *Bacillus subtilis* natto, Menaquinone 7, Nattokinase

Received: 28 February 2024 Revised: 8 April 2024 Accepted: 1 June 2024

Correspondence to: Mohammad Kargar, Alireza Ebrahiminezhad

Tel: +98 9173149203, +98 9177368796

E-mail: microkargar@gmail.com, a_ebrahimi@sums.ac.ir

Journal of Microbial World 2024, 17 (1): 6 - 19

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفدهم شماره اول (پیاپی ۵۸) بهار ۱۴۰۳
صفحات ۱۹ –۶

Original Article

بررسی توان تولید مناکوئینون ۷ (ویتامین K) و ناتوکیناز در دو سویه وحشی و کلکسیونی *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو

عبدالرضا کرمی [۱]، محمد کارگر [۲*]، فرشید کفیل زاده [۳]، سیداحمد واعظ [۴]، علیرضا ابراهیمی نژاد [۵*]

[۱] دانشجوی دکتری، گروه میکروب شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. [۲] استاد، گروه میکروب شناسی، موسسه آموزش عالی زند، شیراز، ایران. [۳] استاد، گروه میکروب شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران. [۴] استادیار، گروه مهندسی بافت، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین پزشکی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران. [۵] دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو به واسطه قدرت بالا در تولید مناکوئینون ۷ و آنزیم ناتوکیناز یک سویه میکروبی ارزشمند در زیست فناوری دارویی است. در ایران یک سویه کلکسیونی از این باکتری در دسترس است که ممکن است نگهداری طولانی مدت بر ویژگی‌های فیزیولوژیک آن تاثیر منفی داشته باشد. تصمیم گرفتیم توان این سویه در تولید محصولات زیستی با سویه وحشی (جداسازی شده از استارتر ناتو) مقایسه نماییم.

مواد و روش‌ها: با خرید استارتر ناتو از شرکت‌های بین‌المللی، غذای تخمیری ژاپنی ناتو تهیه شد. با رقیق‌سازی سوسپانسیون ناتو و کشت آن، کلنی‌های مشکوک به *باسیلوس سوبتیلیس* بر اساس ریخت‌شناسی کلنی و رنگ‌آمیزی جداسازی و خالص‌سازی شدند. روی جدایه‌ها آزمون‌های بیوشیمیایی و همچنین شناسایی مولکولی به روش توالی‌یابی ژن rRNA 16s انجام شد. توانایی سویه وحشی و کلکسیونی (خریداری شده از مرکز ذخایر زیستی) برای تولید مناکوئینون ۷ و ناتوکیناز مقایسه گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که سویه جداسازی شده، *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو می‌باشد. میزان تولید مناکوئینون ۷ توسط این سویه و سویه کلکسیونی تفاوت معنی‌داری نشان نداد. قدرت تولید ناتوکیناز در سویه وحشی نسبت به سویه کلکسیونی به‌طور معنی‌داری بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: نگهداری طولانی مدت سویه کلکسیونی ممکن است موجب کاهش توان این سویه در تولید محصولات دارویی شده باشد یا اینکه سویه کلکسیونی از ابتدا یک سویه ضعیف از نظر تولیدات دارویی بوده است. تلاش می‌شود تا سویه وحشی جداسازی شده که دارای توان قابل توجهی در تولید مناکوئینون ۷ و ناتوکیناز می‌باشد در کلکسیون‌های میکروبی داخلی سپرده‌گذاری و در اختیار پژوهشگران قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو، مناکوئینون ۷، ناتوکیناز.

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۲/۹ ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۱/۲۰ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۳/۱۲

مقدمه

ناتو یک غذای تخمیری و از غذاهای سنتی و قدیمی ژاپنی است. این غذا بیشتر از تخمیر دانه‌های سویا به‌دست می‌آید اما تولید ناتو با تخمیر دیگر حبوبات مانند لوبیای سیاه، لوبیای آزوکی و لوبیای چشم بلبلی نیز مرسوم است. ناتو دارای طعمی ویژه و بویی تند است. طعم این غذا در دسته طعم‌های اکتسابی طبقه‌بندی می‌شود، بدین معنا که درصورتی که فرد برای اولین

۲*) آدرس برای مکاتبه: گروه میکروب شناسی، موسسه آموزش عالی زند، شیراز، ایران.
تلفن: ۰۹۱۷۳۱۴۹۲۰۳ پست الکترونیک: microkargar@gmail.com
۵ *) آدرس برای مکاتبه: مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران.
تلفن ۰۷۱-۳۶۲۸۱۴۰۷ پست الکترونیک: a_ebrahimi@sums.ac.ir

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

بار آن را تجربه نماید احساس خوشایندی نخواهد داشت و باید به مرور ذائقه انسان به این طعم جدید آشنا شود. ظاهر و بافت این غذا نیز با غذاهای متداول تفاوت چشمگیر دارد. ظاهر ناتو به صورت دانه‌های سویا با یک قوام چسبنده (شبیه به پنیر پیتزا) و لزج می‌باشد. در هنگام جویدن دانه سویای ناتو، تخریب و از هم‌پاشیدگی بافت دانه سویا در اثر تخمیر به خوبی احساس می‌شود. در فرهنگ ژاپنی، ناتو معمولا به‌عنوان صبحانه و همراه با برنج صرف می‌شود. این محصول غذایی تخمیری از نظر ارزش غذایی بسیار غنی از انواع ویتامین‌ها و به خصوص مناکوئینون ۷ می‌باشد. میزان این ویتامین در ناتو به حد چشمگیری بالا است و به هر دو فرم MK4 و MK7 وجود دارد. یکی از دلایل عمر طولانی مردم ژاپن به عادات غذایی این خطه جغرافیایی نسبت داده شده است. مطالعات کوهورت نشان داده است که مصرف مداوم ناتو خطر ابتلا به سرطان‌های دستگاه هاضمه را به میزان قابل توجه کاهش می‌دهد (۱). در حقیقت ناتو در نتیجه فعالیت متابولیسمی و تخمیر به‌وسیله سویه *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو (Natto) به‌دست می‌آید. این سویه از نظر طبقه‌بندی ایمنی جزء سویه‌های به طور کلی ایمن (GRAS) و همچنین پروبیوتیک طبقه‌بندی می‌شود (۲). این باکتری دارای توان بالایی در تولید مناکوئینون ۷ است، به همین جهت فرایندهای تولید مناکوئینون ۷ با استفاده از این باکتری به‌طور گسترده مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است. تلاش‌های بسیاری نیز صورت گرفته تا با بهینه‌سازی شرایط رشد بتوانند قدرت این سویه را در تولید مناکوئینون ۷ افزایش دهند و به دنبال آن این سویه را جهت تولید صنعتی مناکوئینون ۷ به‌کار برند (۳ و ٤ و ٥). در حال حاضر شرکت‌های دارویی و تولیدکنندگان مکمل‌های غذایی از این سویه جهت تولید مناکوئینون ۷ استفاده می‌کنند. ویژگی‌های برجسته دارویی و پزشکی این سویه محدود به تولید مناکوئینون ۷ نیست. *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو دارای قدرت بالایی در تولید آنزیم ناتوکیناز است. این آنزیم کاربردهای دارویی و درمانی قابل توجه دارد. ناتوکیناز قادر به حذف ترومبوز و لخته‌های خونی است، بدون آنکه در فرایند انعقاد خون خللی ایجاد گردد (٦ و ۷). نشان داده شده است که ناتوکیناز در درمان بیماری‌های آمیلوئیدی و همچنین پیشگیری و درمان بیماری‌های قلبی و عروقی موثر است (۸). این آنزیم قادر است پوشش‌های فیبرینی اطراف تومورها را هضم نموده و به درمان موثر تومور کمک نماید (۹ و ۱۰). علی‌رغم اهمیت *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو به عنوان یک سویه ارزشمند در صنایع دارویی، پژوهش‌های زیست پزشکی و به خصوص زیست فناوری میکروبی، این سویه باکتری در ایران از طریق کلکسیون‌های میکروبی قابل دسترسی نمی‌باشد. مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران یک سویه باکتریایی *باسیلوس سوبتیلیس* را با نام *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو ارائه می‌نماید، اما در بررسی دقیق این سویه به چند نکته برخورد خواهید کرد. این سویه با نام *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis Bacillus* natto و کد شناسایی IBRC-M 11153 در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران ارائه شده است. همچنین این سویه با کد ATCC 23857 نیز از طرف این مرکز معرفی شده است. با بررسی این کد در کلکسیون میکروبی ایالات متحده آمریکا (ATCC) مشاهده می‌شود که این سویه توسط این کلکسیون به عنوان یک سویه با کاربرد در صنایع غذایی معرفی شده، اما به عنوان *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو معرفی نشده است. از نظر ریخت شناسی کلنی، کلنی‌های سویه IBRC-M 11153 با کلنی‌های *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو متفاوت است. کلنی‌های سویه IBRC-M 11153 به صورت مجزا، صاف و با قوام یکنواخت دیده می‌شود، در حالی که *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو دارای کلنی‌های به هم پیوسته، پهن و ناهموار می‌باشد (۱۱). در علم میکروب‌شناسی تفاوت در ریخت‌شناسی کلنی به‌عنوان نشانه‌ای قطعی بر عدم تطابق دو سویه باکتریایی در نظر گرفته می‌شود. این عدم تطابق ممکن است به دلیل موتاسیون سویه در اثر پاساژها و ساب کالچرهای متوالی در کلکسیون‌های میکروبی باشد و یا آنکه سویه مورد نظر دارای تفاوت‌های ذاتی با *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو می‌باشد، لذا نیاز است تا *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو به‌عنوان یک سویه ارزشمند در داخل کشور جداسازی، شناسایی و سپرده‌گذاری شود.

در داخل کشور جهت جداسازی *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو با یک مشکل جدی مواجه خواهیم شد. ناتو در ایران و کشورهای غرب آسیا تولید نمی‌شود. همچنین واردات این محصول تخمیری و یا استارتر آن نیز به ایران صورت نمی‌گیرد. لذا دسترسی به سویه وحشی *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو در داخل ایران ممکن نیست. از سوی دیگر پژوهشگران انگشت شماری که در ایران این سویه را در اختیار دارند به دلیل حفظ منافع شخصی حاضر نمی‌شوند سویه را در اختیار دیگر پژوهشگران کشور قرار دهند، لذا در این پژوهش بر آن شدیم تا ابتدا استارتر تجاری ناتو را به‌عنوان یک منبع مناسب *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو به ایران وارد نماییم. در مرحله بعد *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو(سویه وحشی) از این استارتر تجاری جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی گردید. در نهایت این سویه ارزشمند در کلکسیون‌های میکروبی دانشگاه علوم پزشکی شیراز و همچنین کلکسیون‌های زیستی ملی در داخل کشور سپرده‌گذاری شد. بدین ترتیب مسیر مطالعات زیست فناوری میکروبی بر روی *باسیلوس سوبتیلیس ناتو* و بکارگیری آن در صنایع غذایی و دارویی در کشورمان هموار گردیده است.

مواد و روش‌ها

استارتر ناتو و یا محصول تخمیری ناتو در ایران قابل دسترسی نیست. لذا با واسطه شرکت مالتینا (ایران، کرج) و از طریق شرکت بین‌المللی آمازون (آمریکا، سیاتل) پودر استارتر ناتو با نام تجاری KAWASHIMAYA محصول شرکت ZanboriMusashimurayama (Tokyo,Japan) خریداری و به ایران وارد گردید (تصویر م -۱). (به فایل مکمل رجوع شود)

الف) فعال سازی استارتر ناتو: جهت فعال سازی استارتر ناتو از دانه‌های سویا فرآوری نشده استفاده شد. برای این منظور ۲۰ گرم دانه خشک سویا به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شد. دانه‌های خیس شده درون یک ارلن ۵۰۰ میلی لیتری ریخته و اتوکلاو شد. بعد از سرد شدن در دمای محیط، مقدار ۱/۵ گرم پودر استارتر ناتو به دانه‌های سویا اضافه شد و با تکان دادن ارلن تلاش شد تا پودر استارتر به صورت کامل در دانه‌های سویا پخش گردد. دهانه ارلن با استفاده از چندین لایه گاز استریل پوشانده شد و ارلن به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید (۱۲). پس از طی مدت زمان مذکور، با فعال شدن استارتر ناتو، دانه‌های سویا تخمیر شده و ناتو با قوام کششی مناسب بدست آمد.

ب) جداسازی باسیلوس ناتو: در فرایند فعال‌سازی استارتر ناتو، اسپورهای *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو به سلول‌های رویشی تبدیل شده و رشد نموده‌اند. لذا جداسازی *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو از ناتو تخمیری به‌دست آمده از مرحله قبل انجام گرفت. برای این منظور یک گرم ناتو در ۹ میلی‌لیتر نرمال سالین استریل به صورت کامل مخلوط گردید. با استفاده از سانتریفیوژ با دور پایین (۱۰۰g به مدت یک دقیقه) قطعات جامد موجود در مخلوط جداسازی شده و از مایع رویی به عنوان سوسپانسیون باکتریایی استفاده شد. جهت کاهش غلظت سلول‌های باکتریایی، سوسپانسیون بدست آمده شش مرتبه و هر مرتبه با نسبت ۱ به ۹ با نرمال سالین استریل رقیق گردید. رقت‌های به‌دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلسیوس در بن ماری حرارت دهی شد. در مرحله بعد ۱۰۰ ماکرولیتر از هر رقت بر روی یک پلیت ۸ سانتی‌متری نوترینت آگار حاوی ۵ درصد شیر فرادما به صورت کامل پخش گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پس از طی مدت زمان مذکور، از کشت رشد یافته جهت جداسازی تک کلنی، به صورت خطی و با روش چهار مرحله‌ای (Quadrant streak pattern) کشت داده شد و مجدد در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری انجام شد. پس از مدت ۲۴ ساعت، تک کلنی‌هایی که از نظر ریخت شناسی کلنی به *باسیلوس سوبتیلیس* مشکوک بودند جداسازی شدند (۱۳).

ج)رنگ‌آمیزی و آزمون‌های بیوشیمیایی (سویه وحشی): پس از انجام رنگ‌آمیزی گرم و رنگ‌آمیزی اسپور، یک تک کلنی از باکتری طبق دستورالعمل ارائه شده در کتاب Bergey's Manual of Systematic Bacteriology تحت آزمایش‌های شناسایی فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی قرار گرفت (۱۴). در این راستا آزمون‌های مصرف سیترات، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین،

تولید سولفید هیدروژن، تحمل نمک (با غلظت‌های ۵، ۷ و ۹ درصد)، کاتالاز ، ووگس- پروسکوئر (V-P)، تخمیر گلوکز، تخمیر مانیتول و احیای نیترات انجام گرفت (۱۵).

د) *شناسایی مولکولی (سویه وحشی):* شناسایی مولکولی با روش تعیین توالی ژن 16S ribosomal RNA (16S rRNA) انجام شد. برای این منظور استخراج DNA با روش تغییر یافته Marmur و با استفاده از کیت استخراج DNA (DNP KIT –Sinaclon, Tehran, Iran) انجام شد (۱۶). ابتدا سلول‌های باکتریایی در محیط کشت نوترینت براث به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. کشت باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰g سانتریفیوژ شد تا بیومس مناسب جهت استخراج DNA به‌دست آید. بیومس به‌دست آمده (۲۰-۱۰ میلی‌گرم) در یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری با ۱۰۰ ماکرولیتر محلول Protease solution سوسپانسیون گردید. سپس ۵ میکرولیتر پروتئاز به سوسپانسیون اضافه شد. مخلوط به‌دست آمده در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد و سپس این مخلوط جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت.

برای شروع فرایند استخراج DNA ابتدا کیت استخراج DNA در دمای اتاق قرار داده شد تا به دمای اتاق برسد. همزمان Lysis buffer نیز به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شیکرانکوباتور گرم شد. در مرحله بعد ۱۰۰میکرولیتر از نمونه با ۴۰۰ میکرولیتر lysis buffer مخلوط شده و به مدت ۱۵ الی ۲۰ ثانیه ورتکس گردید تا سوسپانسیونی کاملا همگن به‌دست آید. در مرحله بعد ۳۰۰ میکرولیتر precipitation solution به سوسپانسیون اضافه شد. تیوب به مدت پنج ثانیه ورتکس شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد لوله به آرامی به صورت معکوس بر روی تکه‌ای کاغذ خشک‌کن قرار داده شد تا محتویات آن به مدت ۳ ثانیه تخلیه گردد. سپس یک میلی‌لیتر wash buffer به رسوب ته تیوب اضافه شده و به مدت ۳ تا ۵ ثانیه ورتکس شد. سپس به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰g انجام شده و wash buffer تخلیه گردید. بعد از تخلیه کامل wash buffer، رسوب ته تیوب به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس خشک شد. سپس رسوب ته تیوب در ۵۰ میکرولیتر solvent buffer با تکان دادن آرام در دمای ۶۵ درجه سلسوس به مدت ۵ دقیقه حل گردید. در مرحله پایانی نیز مواد حل نشده، به وسیله سانتریفیوژ به مدت ۳۰ ثانیه در دور ۱۲۰۰۰g رسوب داده شد. مایع رویی که حاوی DNAخالص بود جهت انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش با استفاده از پرایمرهای یونیورسال 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) و 1492R (GGTTACCTIGTTACGACTT) جهت تکثیر بخشی از توالی ژن 16srRNA انجام شد. جهت هر واکنش مخلوطی شامل ۲۰/۷۵ میکرولیتر آب مقطر، ۳ میکرولیتر بافر، ۰/۶ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها، ۰/۴۵ میکرولیتر dNTPs، ۰/۲ میکرولیتر Taq DNA Polymerase و یک میکرولیتر DNA آماده شد. واکنش PCR در طی ۳۰ چرخه دمایی انجام شد. در چرخه دمایی اول دناتوراسیون اولیه به مدت سه دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس انجام شد. در هر چرخه دمایی، دناتوراسیون به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، اتصال پرایمرها به مدت ۴۵ ثانیه دردمای ۵۵ درجه سلسیوس، تکثیر به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد.

در مرحله بعد محصول به‌دست آمده از PCR بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید. در این مرحله جهت تهیه ژل آگارز ۳ درصد مقدار ۱/۳۵ گرم از آگارز NA درون ۴۵ میلی‌لیتر بافر TAE ریخته شده و تا زمان جوشیدن حرارت داده شد تا به حالت شفاف درآید. سپس اجازه داده شد تا آگارز خنک شود و بعد به آرامی درون قالب حاوی شانه (جهت تشکیل چاهک در ژل) ریخته شد به گونه‌ای که حبابی درون آن شکل نگیرد. ژل پس از سرد شدن و برداشتن شانه درون تانک الکتروفرز قرار گرفته و آماده بارگیری گردید. در مرحله بعد مقدار ۸ میکرولیتر از هر نمونه با ۲ میکرولیتر محلول loading مخلوط شده و به آرامی

درون چاهک ریخته شد. درون هر ژل در یک یا دو چاهک نیز marker مخلوط شده با محلول loading ریخته شد. پس از انجام مراحل فوق، جریان الکتریسیته با ولتاژ ۱۰۰ ولت و به مدت ۶۰ دقیقه به دستگاه متصل گردید. پس از زمان مورد نظر ژل از درون دستگاه الکتروفورز برداشته شده و درون بافری که حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ ماکروگرم در میلی لیتر) بود قرار داده شد تا باندهای تشکیل شده، اتیدیوم برومید را جذب نموده و قابل رویت شوند. پس از طی شدن زمان ۱۰ دقیقه ژل شست و شو داده شده و به دستگاه Gel documenter منتقل شده و با استفاده از نور UV با طول موج ۲۳۸ نانو متر باندها تشخیص داده شدند. در نهایت قطعه DNA استخراج شده از ژل الکتروفورز با اندازه ۱۳۶۷ کیلوباز جهت تعیین توالی به مرکز ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران (تهران، ایران) ارسال شد. توالی‌یابی با استفاده از DNA anlyzers sequencing (Bioneer, 3730XL, Korea) به روش Sanger انجام شد. توالی به دست آمده با استفاده از نرم افزارBLAST که در پایگاه اطلاعاتیNCBI در دسترس است مورد آنالیز قرار گرفته و در همین پایگاه به ثبت رسید.

ه) تهیه و نگهداری اسپور باسیلوس سوبتیلیس ناتو(سویه وحشی): ابتدا باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو بر روی پلیت‌های نوترنیت آگار غنی شده با سولفات منگنز (پنج میلی‌گرم بر لیتر) کشت داده شد و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. به منظور جلوگیری از تبخیر آب محیط کشت در مدت گرمخانه گذاری، پلیت‌ها درون باکس پلاستیکی سر بسته حاوی یک بشر آب مقطر قرار داده شد. پس از ۵ شبانه‌روز و در شرایط کاملاً استریل، بیومس موجود بر روی پلیت آگار با سواب جمع‌آوری شده و در یک فالکون حاوی ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون گردید. فالکون درون بن‌ماری با دمای ۸۰ درجه سلسیوس و به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد تا سلول‌های رویشی از بین بروند. بعد از سرد شدن و رسیدن به دمای محیط، سوسپانسیون به مدت زمان پنج دقیقه و با دور ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد تا بقایای سلول‌های رویشی ته‌نشین گردد. مایع رویی جداسازی شده و با رنگ‌آمیزی اسپور مورد بررسی قرار گرفت. تعداد اسپورها در واحد حجم با استفاده از لام نئوبار(هموسایتومتر) مورد شمارش قرار گرفت. همچنین کدورت سوسپانسیون در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

و) بررسی توان تولید مناکوئینون ۷: جهت اندازه‌گیری و مقایسه میزان مناکوئینون ۷ تولید شده توسط سویه جداسازی شده و سویه کلکسیونی خریداری شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، از روش رنگ سنجی استفاده شد (۱۷). ابتدا از کشت تازه دو سویه باکتریایی، استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد. سپس از هر سویه به میزان ۲ میلی‌لیتر از این استاندارد به ۱۸ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون براث در یک ارلن ۵۰ میلی‌لیتری اضافه شد. ارلن ها به مدت ٤ شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور شیکر دار با دور ۱۵۰ دور در دقیقه گرمخانه گذاری گردید. بعد از گذشت مدت زمان مذکور، سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. مایع رویی جدا شده و به عنوان منبع مناکوئینون ۷ استفاده گردید. جهت انجام آزمون میزان تولید مناکوئینون ۷، ابتدا محلول‌های MTT (٤۰۰ ماکرومولار) و $NaBH_4$(۳۰۰ میلی مولار) به وسیله محلول ۷ میلی‌مولار هیدروکسید سدیم تهیه شد. جهت تهیه محلول ۷ میلی‌مولار هیدروکسید سدیم، ۳ میلی لیتر هیدروکسید سدیم در ۱۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید. در تهیه محلول MTT (٤۰۰ میکرو مولار) نیز یک میلی‌گرم MTT به ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۷ میلی‌مولار هیدروکسید سدیم اضافه شد و در تهیه $NaBH_4$(۳۰۰ میلی‌مولار)، به میزان یک میلی‌گرم $NaBH_4$ به یک میلی‌لیتر محلول ۷ میلی‌مولار هیدروکسید سدیم اضافه شد. آزمون سنجش غلظت مناکوئینون ۷ در یک پلیت ۹۶ چاهکی انجام شد. برای این منظور در هر چاهک ابتدا ۵۰ ماکرولیتر از نمونه مورد آزمون ریخته شد. سپس ۱۰۰ ماکرولیتر محلول MTT (٤۰۰ ماکرو مولار) و در نهایت ۵۰ ماکرولیتر از محلول $NaBH_4$ (۳۰۰ میلی‌مولار) به آن اضافه شد. سپس پلیت به مدت ۳۰ ثانیه با حرکت دورانی همزده شد. در نهایت بعد از ۲ دقیقه اینکوباسیون در دمای اتاق، میزان جذب نور در طول

موج ۵۴۰ نانومتر به وسیله دستگاه خوانش پلیت (micro plate reader, Biotech, USA) قرائت گردید. میزان جذب نور در طول موج ۵۴۰ نانومتر در برابر منحنی استاندارد رسم شده با استفاده از آمپول ویتامین K (Phytomenadione, vitamin K1, 10 mg/ml, Kanavit) به واحد غلظت تبدیل شد.

ز) بررسی توان تولید ناتوکیناز: برای بررسی قدرت سویه وحشی و سویه کلکسیونی در تولید آنزیم ناتوکیناز از روش پلیت کازئین استفاده شد (۱۸). برای این منظور ابتدا از کشت تازه‌ی هر دو سویه وحشی و کلکسیونی سوسپانسیون نیم مک فارلند استاندارد تهیه شد. جهت تهیه پلیت کازئین نیز از ۲ درصد آگار و ۵ درصد شیر فرادما استفاده شد. شیر فرادما بعد از اتوکلاو و قبل از سرد شدن کامل به محلول آگار اضافه شد. بعد از تهیه پلیت کازئین، در وسط پلیت چاهکی با قطر ۶ میلی‌متر تعبیه گردید. در مرحله بعد ۳۰ ماکرولیتر از استاندارد نیم مک فارلند از هر سویه در چاهک ریخته شد. سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. پس از طی مدت زمان مذکور، محیط‌های کشت از نظر ایجاد هاله شفاف در محیط آگار و همچنین قطر هاله ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت.

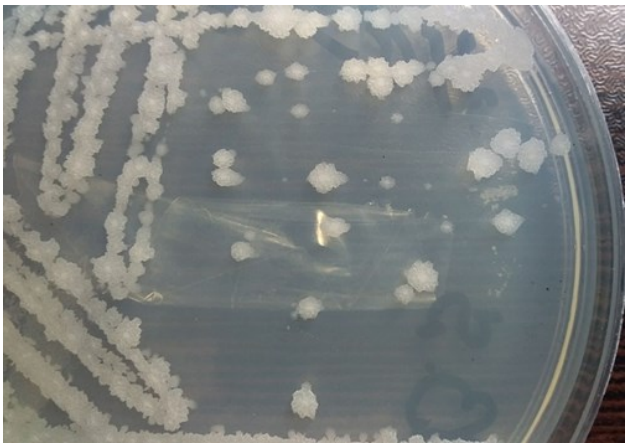
ح) آزمون‌های آماری: آزمون‌های بررسی توان تولید مناکوئینون ۷ و همچنین بررسی توان تولید ناتوکیناز برای هر سویه سه بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین ± انحراف از معیار گزارش گردید. همچنین نتایج با استفاده از نرم افزار تحلیل آماری SPSS مورد آنالیز واریانس (ANOVA) قرار گرفت. مقادیر p-value کمتر از ۰/۵ به عنوان اختلاف معنی دار بین دو سویه وحشی و کلکسیونی در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

الف) فعال سازی استارتر ناتو: استارتر ناتو به صورت پودر نرم کرمی رنگ دریافت شد. پس از افزودن استارتر به دانه‌های سویا و اینکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، اسپورهای *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو شروع به جرمیناسیون کرده و به سلول‌های باکتریایی رویشی تبدیل شدند. رشد این سلول ها بر روی دانه‌های سویا موجب تخمیر دانه‌های سویا و شکل‌گیری یک بافت لزج و کشسانی (شبیه پنیر پیتزا) شد. در نتیجه این فرایند تخمیر، بافت دانه‌های سویا نیز به طور کامل نرم و اسفنجی شد (شکل ۱). این بافت لزج به‌عنوان منبعی غنی از *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو جهت جداسازی این باکتری مورد استفاده قرار گرفت.

شکل ۱: سویای تخمیر شده با استفاده از استارتر ناتو.

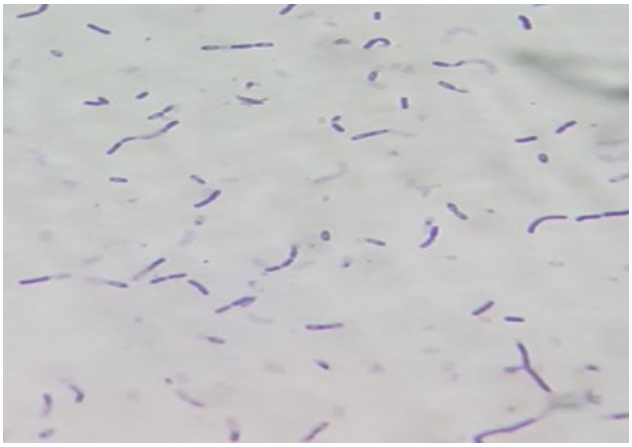
ب) جداسازی باسیلوس ناتو: رقیق‌سازی و کشت سوسپانسیون باکتریایی حاصل از تخمیر سویا، بر روی پلیت‌های نوترینت آگار حاوی شیر موجب پدیدار شدن کلنی‌هایی بر روی پلیت شد. در این میان کلنی‌های مشکوک به *باسیلوس سوبتیلیس ناتو* با قطر بین دو تا سه میلی‌متر، به رنگ سفید کرمی مات، با حاشیه مواج و رشته دار جداسازی شد (شکل ۲). ریخت شناسی مشابه برای جدایه‌های *باسیلوس سوبتیلیس* در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (۱۹). کلنی‌های جداسازی شده، بر روی محیط نوترینت آگار حاوی ۵ درصد شیر فرادما کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد. پس از مدت ۲۴ ساعت، اطراف کلنی‌ها هاله‌ی شفاف مشاهده شد (شکل ۳). ایجاد این هاله در اطراف کلنی‌ها به دلیل تولید و ترشح آنزیم کازئیناز توسط باکتری و تجزیه کازئین موجود در شیر می‌باشد. جهت اطمینان از خلوص جدایه‌ها، کلنی‌ها مورد کشت مجدد قرار گرفتند.



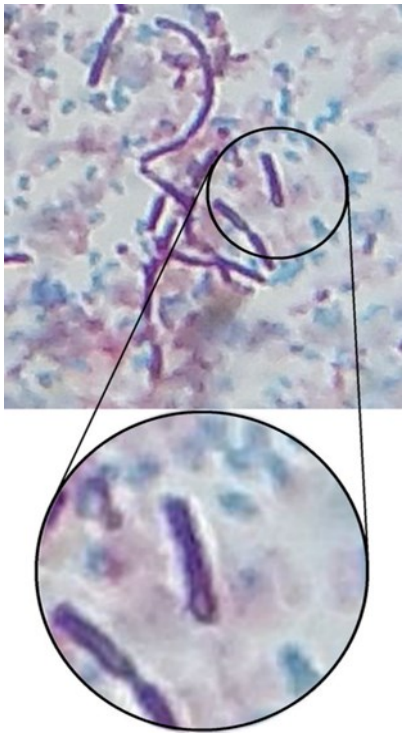
شکل ۲: کلنی‌های خالص جدا شده از سویای تخمیری آماده سازی شده با استفاده از استارتر ناتو.

شکل ۳: ایجاد هاله‌ی شفاف در اطراف کلنی‌های باکتری باسیلوس سوبتیلیس ناتو(سویه وحشی) در محیط نوترینت آگار حاوی ۵ درصد شیر.

ج) رنگ آمیزی گرم و اسپور: رنگ‌آمیزی گرم انجام شده بر روی باکتری و سپس بررسی و مشاهده آن در زیر میکروسکوپ نوری تائید کننده وجود سلول‌های باکتریایی میله‌ای شکل گرم مثبت بود که به رنگ بنفش مشاهده شد (شکل ٤). این سلول‌های باکتریایی به صورت زنجیره‌ای آرایش یافته بودند. در اسلایدهای آماده‌سازی شده با رنگ آمیزی اسپور نیز در سلول‌ها یک اسپور داخلی بیضوی شکل کشیده در بخش نزدیک به انتهای باکتری قابل تشخیص بود. شکل‌گیری اسپور تا حد کمی موجب ایجاد بادکردگی در بخش انتهایی سلول رویشی شده بود (شکل ۵). همه این ویژگی‌ها با ویژگی‌های اندوسپور در باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* همخوانی دارد (۱۹).



شکل ٤: تصویر میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر) از جدایه *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو(سویه وحشی) رنگ آمیزی شده به روش گرم، باکتری‌های میله‌ای شکل گرم مثبت قابل مشاهده می‌باشند.



شکل ۵: تصویر میکروسکوپ نوری بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر از جدایه *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو آماده سازی شده به روش رنگ‌آمیزی اسپور (سویه وحشی).

د) نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی سویه وحشی جداسازی شده: ویژگی‌های فیزیولوژیک جدایه باکتریایی به‌دست آمده توسط آزمون‌های بیوشیمیایی مورد آزمون قرار گرفت. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی به صورت خلاصه در جدول ۱ آورده

شده است.

جدول ۱: نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو.

آزمون	نتیجه	آزمون	نتیجه
کاتالاز	+	ووگس پروسکوئر VP	+
تخمیر قند D–گلوکز	+	هیدرولیز نشاسته	+
تخمیر قند D–مانیتول	+	مایع سازی ژلاتین	+
تحمل نمک ۵ درصد	+	هیدروژن سولفید	–
تحمل نمک ۷ درصد	+	مصرف سیترات	+
تحمل نمک ۹ درصد	+	احیاء نیترات	+

۱) *آزمون مصرف سیترات:* باکتری در محیط سیمون سیترات کشت داده شد. بعد از ۵ روز گرمخانه‌گذاری و رشد باکتری، رنگ آبی در لوله‌های آزمایش مشاهده گردید. ایجاد رنگ آبی در محیط‌های کشت نشان دهنده مثبت بودن آزمون مصرف سیترات می‌باشد.

۲) *آزمون هیدرولیز نشاسته:* باکتری بر روی پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار همراه با یک درصد نشاسته قابل انحلال کشت خطی داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری و پدیدار شدن کلنی‌های باکتری، محلول لوگل به پلیت اضافه شد. اطراف کلنی‌ها هاله شفاف ایجاد شد که نشان دهنده مثبت بودن آزمون هیدرولیز نشاسته می باشد.

۳) *آزمون هیدرولیز ژلاتین:* باکتری در محیط نیمه جامد نوترینت ژلاتین کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری لوله‌های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در دمای یخچال قرار داده شد. محیط کشت نیمه جامد نوترینت ژلاتین به حالت مایع تبدیل شد. مایع شدن محیط کشت در لوله تلقیح شده نشان دهنده مثبت بودن تست هیدرولیز ژلاتین می‌باشد.

۴) *آزمون تولید سولفید هیدروژن:* باکتری بر روی محیط کشت تریپل شوگر آیرون آگار (Triple sugar iron agar) شیب دار کشت داده شد. پس از گرمخانه‌گذاری به مدت ۵ روز، رشد باکتری بررسی شده و هیچگونه تغییر رنگ در محیط کشت مشاهده نشد. عدم تغییر رنگ محیط کشت نشان دهنده منفی بودن آزمون تولید سولفید هیدروژن می باشد.

۵) *آزمون تحمل نمک:* باکتری در محیط کشت نوترینت براث با غلظت‌های افزایش یابنده نمک کلرید سدیم (۵ ، ۷ و ۹ درصد) کشت داده شد. پس از گرمخانه‌گذاری به مدت ۵ روز، رشد باکتری و یا عدم رشد باکتری به صورت بروز کدورت مورد بررسی قرار گرفت. بروز کدورت در محیط‌های کشت حاوی ۵، ۷ و ۹ درصد نمک مشاهده شد. ایجاد کدورت نشان دهنده مثبت بودن آزمون تحمل نمک در درصدهای مذکور می‌باشد.

۶) *آزمون کاتالاز:* با افزودن مقدار کمی آب اکسیژنه به تعدادی کلنی باکتری حل شده در یک قطره نرمال سالین بر روی لام، حباب شدید تولید شد. ایجاد حباب شدید نشان دهنده نتیجه مثبت آزمون کاتالاز می باشد.

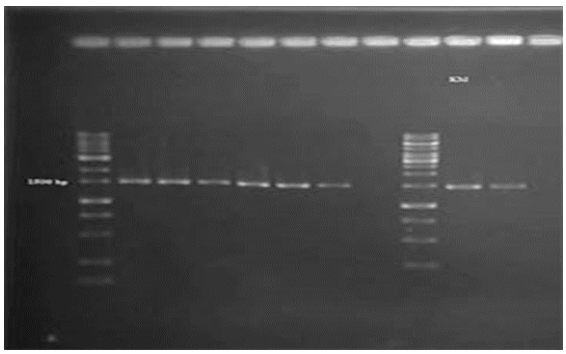
۷) *آزمون ووگس پروسکوئر:* باکتری در محیط MR-VP کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری و رشد باکتری، مقداری از معرف باریت A (آلفا نفتول) و سپس مقداری از معرف باریت B (هیدروکسید پتاسیم) به لوله آزمایش اضافه شده و به خوبی مخلوط شد. بعد از حدود سی دقیقه رنگ قرمز ایجاد شد. ایجاد رنگ قرمز نشان دهنده نتیجه مثبت آزمون ووگس پروسکوئر بود.

۸) *آزمون تخمیر قندهای گلوکز و مانیتول:* باکتری در محیط اکسیداسیون–احیا (Oxidation-fermentation, OF) و در لوله آزمایش کشت داده شد. سطح لوله ها به ضخامت ۱ سانتی‌متر با پارافین ذوب شده پوشانده شد. پس از ۵ روز گرمخانه‌گذاری، رشد باکتری و تغییر رنگ محیط کشت به سمت رنگ زرد مورد توجه قرار گرفت. ایجاد رنگ زرد نشان دهنده نتیجه مثبت آزمون و تخمیر قندهای گلوکز و مانیتول بود.

۹) *آزمون احیای نیترات:* باکتری در محیط نیترات براث کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، مقدار یکسانی از معرف نیترات ۱ (سولفانیلیک اسید) و نیترات ۲ (آلفا نفتیل آمین) به لوله‌های آزمایش اضافه گردید. پس از مخلوط سازی مناسب در عرض ۱ تا ۳ دقیقه در لوله‌ها رنگ قرمز ایجاد شد. ایجاد رنگ قرمز نشان دهنده نتیجه مثبت آزمون

احیا نیترات بود.

ه) شناسایی مولکولی: الکتروفورز محصول PCR نشان داد که توالی تکثیر شده دارای اندازه‌ای در حدود ۱۵۰۰ جفت باز می باشد (شکل ٦). توالی‌یابی انجام گرفته به روش Sanger بر روی این قطعه تکثیر شده ارائه دهنده توالی با طول ۱۳٦۷ نوکلئوتید بود. جهت جلوگیری از خوانش‌های نا صحیح تنها محدوده ای از توالی‌یابی مورد استناد قرار گرفت که در هردو خوانش پیشرو (Forward) و خوانش برگشت (Reverse) هم پوشانی داشته باشد. لذا توالی با طول ۸۳۷ نوکلئوتیدی با شماره پذیرش PQ459382 و تحت آدرس مکان یاب منبع یکسان (URL) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/PQ459382.1) در پایگاه اطلاعاتی NCBI به ثبت رسید. همچنین فایل Notepad توالی در قالب موارد مکمل در دسترس می باشد. آنالیز این توالی با استفاده از نرم افزار بلاست نشان داد که این توالی دارای ۹۹/۹۳ درصد مشابهت با توالی ثبت شده برای ژن 16S rRNA در باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* می‌باشد.



شکل ٦: الکتروفورز، قطعه استخراج شده از DNA به طول ۱۳٦۷ نوکلئوتید.

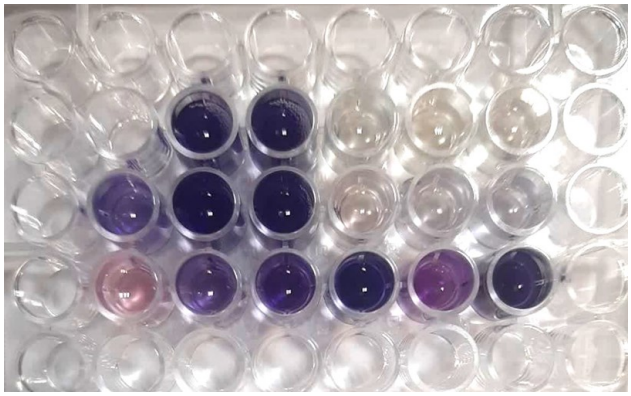
و) تهیه و نگهداری اسپور باسیلوس سوبتیلیس ناتو: بررسی‌های میکروسکوپی انجام شده بر روی سوسپانسیون حاصل از فرایند جداسازی اسپور *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو نشان داد که در سوسپانسیون حاصل فقط اسپورها باقی مانده‌اند. با بررسی چندین فیلد میکروسکوپی از نقاط مختلف اسلاید، هیچگونه سلول رویشی و یا بقایای آن‌ها مشاهده نشد.

این مشاهده بیانگر آن است که فرایند تهیه اسپور توانسته به صورت کامل سلول‌های رویشی را حذف نمونه و یک سوسپانسیون خالص از اسپورهای *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو بدست دهد. در دستورالعمل‌های تهیه اسپور باکتریایی یک مرحله تیمار با آنزیم لیزوزیم جهت لیز کامل سلول‌های رویشی پیشنهاد شده است (۲۰). اما با بررسی‌های میکروسکوپی انجام گرفته و حصول اطمینان از عدم وجود باکتری‌های رویشی در سوسپانسیون اسپور به‌دست آمده، لزومی برای تیمار با آنزیم لیزوزیم احساس نشد. لذا تیمار بیشتر با لیزوزیم انجام نگرفت. شمارش اسپور با استفاده از لام نئوبار مشخص نمود که تعداد ٦×١٠^{٧} اسپور در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه شده وجود دارد. همچنین کدورت سوسپانسیون اسپور در طول موج ٦۰۰ نانومتر برابر با ۰/۲ به‌دست آمد.

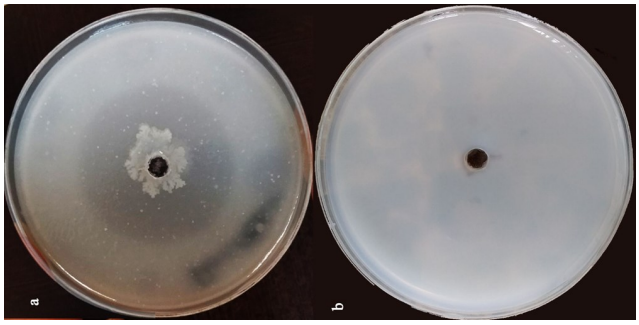
ز) بررسی توان تولید مناکوئینون ۷: در مطالعات گذشته میزان تولید مناکوئینون ۷ توسط باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری شده است. اما روش رنگ‌سنجی نیز برای تعیین غلظت دقیق این ترکیب نیز توسعه یافته است (۱۷). این روش بر مبنای احیای MTT به فرمازان بنفش رنگ و سپس خوانش میزان جذب نور در طول موج ٥٤۰ نانومتر انجام می‌شود (شکل ۷). جهت تبدیل میزان جذب نور به غلظت مناکوئینون ۷ از منحنی استاندارد ترسیم شده با استفاده از آمپول ویتامین K بهره برده شد (شکل م-۱٥). میزان تولید مناکوئینون ۷ در سویه وحشی و سویه کلکسیونی به‌ترتیب ٤۱۲/٦ ± ۳۸۰٦/۸ و ٤۳٥/۲ ± ۳۹۱۸/۸ محاسبه گردید. بر مبنای آزمون‌های آماری، اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان تولید مناکوئینون ۷ بین دو سویه مشاهده نشد.

ح) بررسی توان تولید ناتوکیناز: قدرت سویه‌های وحشی و کلکسیونی *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو جهت تولید آنزیم ناتوکیناز به روش پلیت کازئین مورد مقایسه قرار گرفت. برای این منظور پس از تلقیح سویه‌ها در پلیت کازئین و بعد از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری، رشد باکتری‌ها موجب ایجاد هاله شفاف در محیط آگار می‌گردد. هاله ایجاد شده به دلیل ترشح آنزیم

ناتوکیناز و هیدرولیز کازئین موجود در پلیت کازئین می‌باشد. همان‌طور که در تصویر۸ نشان داده شده است، سویه وحشی *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو قادر به رشد بر روی پلیت کازئین بوده و توانسته است آنزیم ناتوکیناز را به میزان قابل توجهی ترشح نماید. هاله ایجاد شده توسط این سویه ۰/۷ ± ۱۲/۵ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. این در حالی بود که سویه کلکسیونی *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو قادر به رشد و ایجاد کلنی قابل رویت بر روی پلیت کازئین نبود. قطر هاله شفاف ایجاد شده توسط این سویه برابر با ۰/۷ ± ۷/۵ اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که قطر چاهک ایجاد شده در آگار برابر ٦ میلی‌متر بوده است. آزمون‌های آماری نشان داد که میزان تولید ناتوکیناز توسط سویه وحشی *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو به صورت معنی‌داری (p-value کمتر از ۰/۵) از میزان ناتوکیناز تولید شده توسط سویه کلکسیونی بیشتر بوده است.



شکل ۷: طیف رنگی ایجاد شده در آزمون اندازه گیری مناکوئینون ۷.



شکل ۸: ایجاد هاله شفاف (ناحیه هیدرولیز کازئین) در محیط کازئین آگار به دلیل تولید ناتوکیناز به وسیله سویه جداسازی شده (a) رشد محدود سویه کلکسیونی در محیط مذکور (b).

بحث

باسیلوس سوبتیلیس ناتو به دلیل دارا بودن قدرت بالا در تولید مناکوئینون ۷ و همچنین آنزیم نانوکیناز به‌عنوان یک سویه میکروبی ارزشمند در علوم و فناوری‌های دارویی مطرح است. در این مطالعه با وارد نمودن استارتر ناتو از خارج از کشور غذای تخمیری ژاپنی ناتو تهیه گردید. با هدف جداسازی *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو کلنی‌های خالص جداسازی شده از ناتو با آزمون‌های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند. شناسایی مولکولی به روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA انجام گرفت و توالی به‌دست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI به ثبت رسید. توان *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو جداسازی شده از غذای تخمیری ناتو جهت تولید مناکوئینون ۷ و همچنین ناتوکیناز با توان سویه کلکسیونی ذخیره شده در مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران مورد مقایسه قرار گرفت. بر مبنای آزمون‌های آماری، اختلاف معنی‌داری از لحاظ میزان تولید مناکوئینون ۷ بین دو سویه مشاهده نشد. به‌طور معمول فرایند تولید مناکوئینون ۷ توسط باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو در یک بازه چهار الی پنج روزه به حداکثر خود می‌رسد. لذا در فرایندهای تولیدی توسط این باکتری مدت زمان تولید چهار الی پنج روز در نظر گرفته می‌شود (٤ و ٥). با توجه به اینکه تولید و ترشح مناکوئینون ۷ در *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو در مراحل نهایی رشد اتفاق می‌افتد (۲۱)، لذا بعد از گذشت ٤ شبانه‌روز از گرمخانه‌گذاری، رشد نهایی دو سویه مورد آزمون (سویه وحشی و سویه کلکسیونی) به هم نزدیک شده و احتمالاً به همین دلیل میزان تولید مناکوئینون ۷ توسط هر دو سویه تقریبا با هم برابر گردیده است.

میزان تولید ناتوکیناز توسط سویه وحشی *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو به صورت معنی‌داری از میزان ناتوکیناز تولید شده توسط سویه کلکسیونی بیشتر بوده است. ناتوکیناز توسط ژن ۱۱٤۳ جفت بازی apr N که در ابتدا به نام سوبتیلیسین NAT نامیده می‌شد سنتز می‌شود (۲۲). یکی از دلایلی که می‌توان برای کاهش تولید ناتوکیناز در سویه کلکسیونی در نظر گرفت احتمال بروز جهش در ژن apr N این سویه می‌باشد. علاوه بر

این یکی دیگر از عواملی که در محیط جامد سبب تولید بیشتر ناتوکیناز توسط *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو میشود، ترشح γ-PGA توسط این سویه می‌باشد. γ-PGA رطوبت را در محیط جامد حفظ می‌کند به همین دلیل سبب افزایش استفاده از مواد مغذی توسط باکتری شده و در نهایت تولید ناتوکیناز را در شرایط تخمیر در حالت جامد تحریک می‌کند (۲۲). لذا احتمال دیگر در خصوص کاهش تولید ناتوکیناز توسط سویه کلکسیونی در محیط جامد می‌تواند کاهش ترشح γ-PGA توسط این سویه باشد. کاهش ترشح γ-PGA می‌تواند به دلیل بروز جهش در یکی از ژن‌های pgs B ، pgs C، pgs A و یا pgs E که مرتبط با سنتز γ-PGA می‌باشند اتفاق افتاده باشد. ضعف سویه کلکسیونی *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو در تولید آنزیم دارویی ناتوکیناز ممکن است به دلیل نگهداری طولانی مدت این سویه در کلکسیون‌های میکروبی خارج از کشور و کلکسیون‌های داخلی باشد که منجر به ایجاد تغییرات ژنتیکی در این باکتری شده است. تغییرات فیزیولوژیک در سویه کلکسیونی *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو را می‌توان در ریخت شناسی کلنی این سویه نیز مشاهده نمود. باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* به طور معمول بر روی محیط‌های کشت جامد (مانند آگار مغذی) کلنی‌های خشن، مات، سفید تیره یا کمی زرد، چین دار و با لبه های دندانه دار ایجاد می نماید. این ساختار کلنی در سویه وحشی جداسازی شده از سویای تخمیری به خوبی مشاهده شد (شکل ۲). اما سویه کلکسیونی *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو از نظر ریخت شناسی کلنی دچار انحرافاتی از مشخصه های فوق شده است. در واقع کلنی‌های این سویه به صورت مات، سفید تیره یا کمی زرد، با سطح صاف و لبه های گرد تشکیل می‌شوند. این تغییرات در ریخت شناسی کلنی می‌تواند نشانه‌ای در جهت تائید احتمال بروز موتاسیون در سویه کلکسیونی باشد.

به نظر می‌رسد بروز موتاسیون در سویه کلکسیونی *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو و ضعیف شدن این سویه در نتیجه پاساژهای متوالی و نگهداری‌های طولانی مدت در کلکسیون‌های میکروبی ضعیف نباشد.

نتیجه‌گیری

با خرید استارتر ناتو از شرکت‌های بین‌المللی و تهیه غذای تخمیری ناتو و سپس کشت سوسپانسیون رقیق‌شده آن، با موفقیت سویه وحشی *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو جداسازی شد. در ادامه نیز با روش‌های رنگ‌آمیزی و آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی سویه جداسازی شده به‌عنوان *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو شناسایی گردید. سویه جداسازی شده از نظر تولید ترکیبات زیست فناوری دارویی بسیار قوی‌تر از سویه‌ی کلکسیونی موجود در ایران می‌باشد. با توجه به نقش بسیار مهم ویتامین k و ناتوکیناز در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های قلبی و عروقی در ادامه تلاش خواهد شد تا سویه جداسازی شده در این پژوهش در کلکسیون‌های میکروبی داخلی سپرده‌گذاری شده تا در اختیار پژوهشگران و فناوران قرار گیرد. دسترسی به سویه‌های میکروبی ارزشمند صنعتی بزرگترین مانع در جهت توسعه محصولات زیست فناوری میکروبی است. امید است که با سپرده گذاری سویه وحشی *باسیلوس سوبتیلیس* ناتو در کلکسیون‌های میکروبی داخلی و دسترسی پژوهشگران به این سویه ارزشمند گامی کوچک در جهت توسعه محصولات دارویی برداشته شود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله پژوهشی کلیه نکات اخلاقی اعم از سرقت ادبی، عدم انتشار دوگانه و تحریف داده‌ها را رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شیراز مورد حمایت مالی قرار گرفته است. همچنین نویسندگان از حمایت‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم کمال تشکر را دارند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Nagata C, Takatsuka N, Kawakami N, Shimizu H. A prospective cohort study of soy product intake and stomach cancer death. British journal of cancer. 2002 Jul;87(1):31-6..
2. Afzaal M, Saeed F, Islam F, Ateeq H, Asghar A, Shah YA, Ofoedu CE, Chacha JS. Nutritional health perspective of natto: A critical review. Biochemistry Research International. 2022;2022 (1):5863887.
3. Berenjian A, Mahanama R, Talbot A, Biffin R, Regtop H, Valtchev P, Kavanagh J, Dehghani F. Efficient media for high menaquinone-7 production: response surface methodology approach. New Biotechnology. 2011 Oct 1;28(6):665-72.
4. Ebrahiminezhad A, Varma V, Yang S, Berenjian A. Magnetic immobilization of Bacillus subtilis natto cells for menaquinone-7 fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology. 2016 Jan;100:173-80.
5. Ebrahiminezhad A, Varma V, Yang S, Ghasemi Y, Berenjian A. Synthesis and application of amine functionalized iron oxide nanoparticles on menaquinone-7 fermentation: a step towards process intensification. Nanomaterials. 2015 Dec 25;6(1):1.
6. Weng Y, Yao J, Sparks S, Wang KY. Nattokinase: an oral antithrombotic agent for the prevention of cardiovascular disease. International journal of molecular sciences. 2017 Feb 28;18(3):523.
7. Fujita M, Hong K, Ito Y, Fujii R, Kariya K, Nishimuro S. Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 1995 Oct 15;18(10):1387-91.
8. Chen H, McGowan EM, Ren N, Lal S, Nassif N, Shad-Kaneez F, Qu X, Lin Y. Nattokinase: a promising alternative in prevention and treatment of cardiovascular diseases. Biomarker insights. 2018 Jul 3;13:1177271918785130.
9. Zhang B, Chai J, He L, Dusanbieke M, Gong A. Nattokinase produced by natto fermentation with Bacillus subtilis inhibits breast cancer growth. Int. J. Clin. Exp. Med. 2019 Jan 1;12 (12):13380-7.
10. Kou Y, Feng R, Chen J, Duan L, Wang S, Hu Y, Zhang N, Wang T, Deng Y, Song Y. Development of a nattokinase–polysialic acid complex for advanced tumor treatment. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2020 Mar 30;145:105241.
11. Tuan NA, Huong NT. Optimization of the fermentation medium to receive the highest biomass yield by Bacillus subtilis natto and the initial test of nattokinase yield. Optimization. 2014 Dec;4(12).
12. Wei Q, Wolf-Hall C, Chang KC. Natto characteristics as affected by steaming time, Bacillus strain, and fermentation time. Journal of food Science. 2001 Jan;66(1):167-73.
13. Mohammadi A, AKHAVAN SA, Hosseinidoost R. Evaluation of antifungal activity of iturin producing Bacillus subtilis strains.
14. Garrity G. Bergey's manual® of systematic bacteriology: volume 2: the Proteobacteria, part B: the Gammaproteobacteria. Springer Science & Business Media; 2007 Dec 14.

15. 15. Parhamfar M, Abtahi H, Parhamfar M. Optimization of culture conditions for the production of phytase enzyme by Bacillus subtilis soil isolates. Journal of Microbial World. 2017 Jan 1;9(4):315-25.
16. Shavali M, Doosti A. Construction of glucanase gene of Bacillus subtilis in Escherichia coli. Journal of Microbial World. 2016 Jan 1;8(4): 264-70.
17. Fukuda M, Qianjun L, Kishikawa N, Ohyama K, Kuroda N. Development of ultrafast colorimetric microplate assay method for uسbiquinone utilizing the redox cycle of the quinone. Microchemical Journal. 2019 Nov 1;150:104104.
18. Chandrasekaran SD, Vaithilingam M, Shanker R, Kumar S, Thiyur S, Babu V, Selvakumar JN, Prakash S. Exploring the in vitro thrombolytic activity of nattokinase from a new strain Pseudomonas aeruginosa CMSS. Jundishapur journal of microbiology. 2015 Oct;8(10).
19. Pandav PV, Ahire RS, Patil SR, Pawar SB. Process development for high density cultivation yield for Bacillus subtilis. Int J Rec Adv Multidiscip Top. 2021;6(7):2582-7839.
20. Ribes S, Ruiz-Rico M, Barat JM. Efficient reduction in vegetative cells and spores of Bacillus subtilis by essential oil components-coated silica filtering materials. Journal of Food Science. 2021 Jun;86(6):2590-603.
21. Ikeda H, DOI Y. A vitamin-K2-binding factor secreted from Bacillus subtilis. European journal of biochemistry. 1990 Aug;192(1):219-24.
22. Li M, Zhang Z, Li S, Tian Z, Ma X. Study on the mechanism of production of γ-PGA and nattokinase in Bacillus subtilis natto based on RNA-seq analysis. Microbial Cell Factories. 2021 Apr 9;20(1):83