مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هفتم، شماره ۵، ویژه‌نامه زمستان ۱۳۹۱، صفحات ۳۸۰-۳۷۱

بررسی توان تولید نگهدارنده‌های بیولوژیک توسط باکتری‌های پروبیوتیک و تعیین حداقل غلظت باکتریواستاتیکی ترکیبات استخراج شده

مهسا یگانه[۱]، آنیتا خنافری [۲]، محمدرضا فلاحیان [۳]، انوشه شریفان [۴]

۱- نویسنده مسئول: کمیته تحقیقات دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: mahsayeganeh19@yahoo.com

۲ - دانشیار گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۳- مربی گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

چکیده

سابقه و هدف: هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی توان تولید نگهدارنده‌های بیولوژیک توسط باکتری‌های پروبیوتیک و تعیین حداقل غلظت باکتریواستاتیکی ترکیبات استخراج شده بود.

مواد و روش ها: پس از کشت *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس هایرائی* در محیط کشت BHI agar ، سانتریفیوژ و جداسازی توده میکروبی، ترکیبات پروتئینی توسط دیالیز خالص سازی شدند و میزان پروتئین تولید شده توسط لوری تعیین شد و وزن مولکولی توسط الکتروفورز SDS-PAGE تخمین زده شد. اثر ضد میکروبی ترکیبات موجود، توسط روش چاهک بررسی شد. فاکتورهای مربوط به فعالیت پروتئین، در قبل و بعد از دیالیز تعیین شدند. حداقل غلظت باکتریواستاتیکی ترکیبات ارزیابی شد.

یافته ها: نتایج این تحقیق، ثابت نمود که وزن مولکولی ترکیبات استخراج شده از سوش‌های فکالیس و هایرائی، به ترتیب، تقریباً ۴۵ و ۳۵ کیلودالتون بودند و بیشترین تاثیر ضد میکروبی و کمترین غلظت باکتریواستاتیکی ترکیب پروتئینی حاصل از سوش‌های فکالیس و هایرائی، به ترتیب، بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز* و *باسیلوس سرئوس* بوده است.

نتیجه گیری: ترکیبات ضد میکروبی استخراج شده از باکتری انتروکوک به عنوان یک نگهدارنده بسیار ایمن، از مواد غذایی در برابر باکتری‌ها محافظت نموده، لذا عمر نگهداری مواد غذایی را به میزان قابل توجهی افزایش می‌بخشند.

واژگان کلیدی: اثر ضد میکروبی، *انتروکوکوس فکالیس*، *انتروکوکوس هایرائی* ، نگهدارنده‌های بیولوژیک

مقدمه

نگهداری مواد غذایی در واقع بیانگر قرار دادن میکروارگانیسم در محیط نامطلوب به منظور جلوگیری از رشد، کوتاه کردن زمان زنده ماندن و یا مرگ آن‌ها می باشد. پاسخ احتمالی میکروارگانیسم‌ها به چنین شرایط نامطلوبی، تعیین می نماید که آن‌ها رشد می کنند یا خواهند مرد. استفاده از نگهدارنده‌های بیولوژیک مانند مواد ضد میکروبی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی، یک راه جایگزین، جهت کنترل لیستریا مونوسیتوژنز و سایرپاتوژن‌ها است. باکتری‌های اسید لاکتیک و یا محصولات ضد میکروبی حاصل از آن‌ها به طور سنتی به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی مواد غذایی با عملکرد افزایش عمر قفسه ای و ایمنی مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱). از یک دید کلی، نگهدارنده‌های بیولوژیک، به باکتری‌های اسید لاکتیک یا فرآورده‌های ضد باکتریایی تولید شده از آن‌ها مانند اسید استیک، اسید لاکتیک، پراکسید هیدروژن، آنزیم‌های ضد میکروبی، رئوترین، باکتریوسین، دی استیل، استالدئید و استوئین اطلاق می‌شود (۲) . باکتری‌های پروبیوتیک می‌توانند به عنوان سدهای میکروبی در مقابل پاتوژن‌های

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-17]

گوارشی – روده‌ای با جلوگیری از اتصال پاتوژن، تغییر سیستم ایمنی و تولید ترکیبات آنتی باکتریال عمل نمایند (۳). جنس انتروکوک به عنوان یک باکتری پروبیوتیک، قادر به تخمیر کربوهیدرات‌ها به اسید لاکتیک هستند و از اینرو موجب کاهش pH دستگاه گوارش و مهار رشد باکتری‌های پاتوژن می‌شوند. این میکروارگانیسم موجب افزایش هضم مواد غذایی می‌شوند و از طریق تولید نمودن آنتی توکسین‌ها سبب خنثی سازی انتروتوکسین‌های باکتری اشرشیاکلی می‌شوند . هم چنین این باکتری‌ها قادر به تولید انواع متعددی از آنتی بیوتیک‌ها و باکتریوسین‌ها نظیر اسیدوفیلین، اسیدولین، لاکتالین، نیسین و انتروسین می‌باشند و بدین طریق می‌توانند سبب نابودی باکتری‌های متعددی نظیر استافیلوکوک، سالمونلا، شیگلا می‌شوند (۴). مهم ترین مزیت پروتئین‌های ضد میکروبی استخراج شده از انتروکوک‌ها این است که آن‌ها غیر سمی هستند، آسان هضم می شوند، هیچ باقی مانده ای در غذا باقی نمی گذارند، مقاوم به اسید و گرما هستند و می توانند برای افزایش سلامت و طول عمر بسیاری از مواد غذایی مورد استفاده قرارگیرند(۵). هدف از انجام این تحقیق، بررسی توان تولید نگهدارنده‌های بیولوژیک توسط باکتری‌های پروبیوتیک و تعیین حداقل غلظت باکتریواستاتیکی ترکیبات استخراج شده است.

مواد و روش ها

محیط‌های کشت میکروبی: BHI agar & BHI broth، ساخت شرکت Merck بود.

مواد شیمیایی: سوکسینات آمونیوم، سولفات آمونیوم، پراکسید هیدروژن، گلوکز، گالاکتوز، مانیتول، لاکتوز، رافینوز، آرژنین، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، سدیم دی هیدروژن فسفات، معرف نسلر، سولفات مس، سدیم پتاسیم تارتارات، معرف فولین ، کربنات سدیم، سرم آلبومین گاوی، ژل آکریلامید 18.5%. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق، ساخت شرکت Merck بودند.

سویه‌های میکروبی: دو سویه از باکتری (PTCC ۱۳۹۳ *Enterococcus faecalis* و *Enterococcus hirae* ۱۲۳۹ (PTCC) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و ۶ سویه تست استرین شامل سه باکتری گرم مثبت و سه باکتری گرم منفی (*استافیلوکوکوس ارئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *باسیلوس سرئوس*، *اشرشیاکلی*،*کلبسیلا پنومونیه*، *سالمونلا پاراتیفی*) از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال تهیه شدند. انتخاب این سویه‌های تست استرین بر اساس طیف گرم مثبت و گرم منفی بودن باکتری‌ها و کوکسی و باسیل بودن آن‌ها صورت گرفت.

تهیه کشت آغازگر: برای تهیه کشت آغازگر از سویه‌های انتروکوکوس، هر یک از سویه‌های باکتریایی لیوفیلیزه پودری در ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت BHI broth حل شدند و بدین ترتیب ، سوسپانسیونی از باکتری‌ها ایجاد شد. سپس، به منظور رشد باکتری ها، محیط‌های حاوی باکتری ها، به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (۶).

شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی سوش‌های انتروکوک:

شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی سوش‌های انتروکوک: پس از کشت این باکتری‌ها در پلیت‌های حاوی محیط کشت BHI agar، مشخصات ماکروسکوپی کلنی‌های انتروکوک، در عمق محیط کشت، از قبیل شکل، قوام، رنگ و اندازه و مشخصات میکروسکوپی توسط رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند (۷) .

ارزیابی منحنی رشد باکتری بر اساس OD: در ابتدا، چند کلنی از سوش‌های انتروکوکوس، به محیط کشت BHI broth ، افزوده شد (تهیه کشت تلقیح)و میزان جذب نور (OD) نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. پس از رسیدن میزان OD نمونه به ۱، ۵٪ از کشت تلقیح به ارلن حاوی محیط BHI broth و حاوی ۱٪ سوکسینات آمونیوم و آنزیم کاتالاز افزوده شد. سپس، ارلن‌های حاوی سوش‌های ۱۲۳۹ یا ۱۳۹۳ در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰rpm و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند و ارلن‌های حاوی سوش ۱۳۹۴ در انکوباتور حاوی ۵٪ از گاز دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶،۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ ساعت، از محیط حاوی باکتری نمونه برداری کرده و میزان OD خوانده و یادداشت نموده و منحنی رشد باکتری‌ها بر حسب OD، از طریق قرار دادن ODها در محور عمودی و زمان‌ها در محور افقی رسم شدند (۸).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-17]

استخراج مواد ضد میکروبی توسط انتروکوک‌ها

کشت و گرماگذاری باکتری‌ها: ارلن‌های حاوی سوش‌های ۱۳۹۳ یا ۱۲۳۹ در انکوباتور شیکر دار با دور ۱۵۰rpm و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ارلن‌های حاوی سوش ۱۳۹۴ در انکوباتور حاوی گاز دی‌اکسید کربن ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرماگذاری شدند (۹) .

سانتریفوژ نمونه‌ها: ارلن‌ها به ترتیب در زمان‌های متفاوت از شیکر انکوباتور و انکوباتور CO_2 دارخارج شدند و در دستگاه سانتریفوژ یخچال دار با دور rpm ۱۶۰۰۰ و زمان ۵۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. پس از سانتریفوژ، جرم سلولی باکتری رسوب کرد و محلول رویی جدا شد. فراکسیون‌های حاصله پس از تعدیل pH، از لحاظ فعالیت ضد میکروبی توسط روش‌های دیسک و چاهک مورد سنجش قرار گرفتند (۹).

اندازه‌گیری و تعدیل pH : به منظور سنجش pH و تعدیل نمونه، توسط دستگاه pH متر، میزان pH نمونه‌ها اندازه‌گیری شد و pH نمونه‌های دارای $pH<7$ ، توسط افزوده شدن ۱ تا ۲ قطره از NaOH ۱ مولار به 7.8 -7 رسانده شد (۹).

رسوب پروتئین‌ها توسط سولفات آمونیوم: چند میلی‌لیتر از محلول رویی، پس از سانتریفوژ از توده سلولی جدا گردید.مقداری سولفات آمونیوم(تا حد اشباع شدن) در ۴ درجه سانتی‌گراد و بر روی همزن مغناطیسی به محلول رویی افزوده شد. نمونه‌ها به مدت یک شب، در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا انحلال سولفات آمونیوم به خوبی صورت گیرد. محتویات ارلن شامل رسوبات حاصله و محلول حاوی رسوب در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ دقیقه و در ۱۶۰۰۰rpm، سانتریفوژ گردیدند. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله در یک میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار و دارای pH= ۷ حل گردید و فراکسیون‌های حاصله از لحاظ فعالیت ضد میکروبی توسط روش‌های دیسک و چاهک مورد سنجش قرار گرفتند و بخش دیگری از فراکسیون‌ها برای انجام دیالیزکنارگذاشته شدند (۱۰) .

فرایند دیالیز

آماده سازی کیسه دیالیز و انجام عمل دیالیز: از کیسه دیالیز، با مشخصات ARTHOR H.THOMAS Co., Cat.3787-D ,1×1. 8 inch با منافذ دارای KDa cut off 12000 استفاده شد. کیسه دیالیز درون یک بشر یک لیتری حاوی آب قرار داده شد و به منظور آماده سازی آن برای استفاده و زدودن مواد محافظت پوشاننده از روی کیسه، بشر به مدت ۴ ساعت بر روی جریان شیر آب قرار گرفت. سپس، کیسه دیالیز توسط قیچی به قطعات ۸ سانتی‌متری بریده شد و یک سمت آن توسط خود کیسه گره زده شد. رسوبات پروتئینی رسوب داده شده با سولفات آمونیوم، در ۱ میلی‌لیتر از بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار حل گردیدند. محتوبات فوق به درون کیسه دیالیز ریخته شد و درب آن توسط چسب مسدود گردید. کیسه‌ها نام گذاری شدند. سپس در یک ارلن ، چندین میلی‌لیتراز بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار ریخته و ارلن مذکور در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌های درون کیسه ها، در این بافر قرار داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در ان شناور گردیدند. پس از ۲۴ ساعت، بافر تعویض و مجدداً کیسه‌ها در بافر تازه، غوطه ور شدند. پس از سه بار تعویض بافر و استفاده از معرف نسلر به منظور اطمینان از خروج سولفات آمونیوم موجود در محیط، محتویات کیسه ها، به لوله‌های استریل منتقل گردیدند و جهت بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی، مورد سنجش قرار گرفتند. حجم نمونه‌ها قبل و بعد از دیالیز به دقت اندازه‌گیری و یادداشت گردیدند و از همه نمونه‌ها مقادیر یکسانی برای انجام تست لوری و اندازه‌گیری میزان پروتئین کنار گذاشته شد (۱۰) .

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های تخمیری و رسوبات پروتئینی در قبل و بعد از دیالیز توسط روش تهیه چاهک و روش دیسک

آماده سازی سویه‌های تست استرین یا نشانگر: به منظور بررسی حساسیت سویه‌های نشانگر در مقابل مقادیر یکسان ماده ضد میکروبی، نیازمند سوسپانسیون میکروبی یکسانی برای کلیه تست استرین‌ها هستیم. از باکتری‌های تست استرین ۲۴ ساعته، سوسپانسیونی با OD= ۱ در محیط کشت BHI broth تهیه گردید و توسط آغشته نمودن سوآپ‌ها در سوسپانسیون باکتری، ،باکتری‌ها به صورت متراکم در سطح پلیت‌های حاوی محیط کشتBHI agar کشت داده شدند(۱۱) .

بررسی اثر ممانعت کننده رشد با روش تهیه چاهک: از پیپت پاستورهای استریل جهت ایجاد چاهک در BHI agar استفاده گردید. چاهک هایی به فاصله معین از یکدیگر به قطر ۳ میلی متر ایجاد شد. توسط سمپلر و سر سمپلر

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-17]

استریل ، ۵۰ میکرولیتر از ترکیبات ضد میکروبی استخراج شده در این چاهک‌ها ریخته شدند و حدود یک ساعت، پلیت‌ها در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد، سرماگذاری شدند.در این زمان انتشار مایع باکتریوسینی در آگار صورت گرفت، اما رشد باکتریایی متوقف ماند. سپس، پلیت‌ها به آرامی به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، قطر هاله‌های عدم رشد مربوط به هریک از فراکسیون‌ها توسط کولیس دورنیه اندازه‌گیری و در جداول مربوطه ثبت گردید (۱۱) .

روش دیسک: در این روش، بر روی پلیت حاوی باکتری بیماریزای کشت داده شده به صورت متراکم، دیسک‌های Blank (شاهد) استریل گذاشته شد. سپس، توسط سر سمپلر استریل ، ترکیبات ضد میکروبی استخراج شده را بر روی دیسک‌ها ریختیم. سپس، پلیت‌ها به آرامی به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، قطر هاله‌های عدم رشد مربوط به هریک از فراکسیون‌ها توسط کولیس دورنیه اندازه‌گیری و در جداول مربوطه ثبت شد (۱۲) .

تعیین حداقل غلظت باکتریواستاتیکی (Minimum Inhibitory Concentration) (MIC) :

ساخت رقت‌های مختلف رسوب پروتئین: برای تعیین MIC ، از روش رقیق سازی در محیط مایع (**Broth Dilution Technique**) استفاده شد. برای این منظور،رقت‌های ۰.۰۰۲، ۰.۰۰۱، ۰.۰۰۳، ۰.۰۰۵، ۰.۰۰۶،۰.۰۰۷، ۰.۰۰۹، ۰.۰۱، ۰.۰۲، ۰.۰۵، ۰.۴،۰.۰۶، ۰.۸، ۱، ۱.۲، ۱.۶ گرم بر لیتر ازرسوبات پروتئینی با غلظت مشخص تهیه شدند.سپس، کشت۲۴ ساعته هریک از باکتری‌های بیماریزا، به لوله‌های حاوی رقت‌های مختلف رسوبات پروتئینی تلقیح شدند. لوله‌های حاوی رقت‌های متفاوت، از لحاظ کدورت (میزان OD) باکتری بیماریزا در مقایسه با لوله فاقد رسوبات پروتئینی در فواصل زمانی ۲۴،۴۸ و ۷۲ ساعت از گرماگذاری نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کنترل شدند. مقدار MIC، به عنوان حداقل غلظتی از رسوبات پروتئینی که مانع از رشد می شود تعریف و بیان شد (۱۳) .

اندازه‌گیری فعالیت و سایر فاکتورهای ترکیبات ضد میکروبی: در هر مرحله، برای هر فراکسیون، مقادیر حجم نهایی، غلظت پروتئین، واحد فعالیت، فعالیت کل، راندمان، ضریب تلخیص، در صد بازیافت، فعالیت اختصاصی، میزان پروتئین کل محاسبه و ثبت شد. رقت‌های ۱/۵۰، ۱/۱۰۰ ، ۱/۱۵۰، ۱/۲۰۰ ، ۱/۲۵۰ ، ۱/۳۰۰، ۱/۳۵۰، ۱/۴۰۰، از ترکیبات ضد میکروبی تهیه شدند. تیتیر فراکسیون‌های فوق، به عنوان معکوس بیشترین رقتی که قادر به مهار قطعی سویه اندیکاتور بود، به صورت واحد فعالیت بیان گردید (۹)

اندازه‌گیری پروتئین محلول: برای اندازه‌گیری پروتئین محلول از روش لوری استفاده شده است (۱۴). ابتدا منحنی استاندارد برای غلظت‌های ۰، ۰.۵، ۱، ۱.۵، ۲، ۲.۵، ۳، ۳.۵، ۴ میلی گرم در میلی‌لیترپروتئین سرم آلبومین گاوی، درآب مقطر ترسیم گشت. منحنی استاندارد رسم شده بر اساس غلظت پروتئین بر OD به دست آمده در آزمایشات لوری بود. سپس، میزان پروتئین موجود در نمونه‌ها، پس از خواندن OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر و مقایسه با منحنی استاندارد تعیین شد (۱۵).

اندازه گیری فعالیت کل و فعالیت اختصاصی و ضریب تخلیص و درصد بازیافت و میزان پروتئین کل و راندمان: در هر مرحله، برای هر فراکسیون، مقادیر حجم نهایی، غلظت پروتئین، واحد فعالیت، راندمان، ضریب تلخیص، در صد بازیافت، فعالیت اختصاصی، میزان پروتئین کل محاسبه و ثبت گردید. رقت‌های ۱/۵۰، ۱/۱۰۰ ، ۱/۲۰۰ ، ۱/۱،۴۰۰/۳۰۰ ، ۱/۵۰۰ از باکتریوسین و آنتی‌بیوتیک تهیه شدند. تیتر فراکسیون‌های فوق، به عنوان معکوس بیشترین رقتی که قادر به مهار قطعی سویه اندیکاتور بود، به صورت واحد فعالیت بیان شد (۹).

محاسبات بر اساس فرمول‌های زیر بودند:

درصد بازیافت= میزان پروتئینی فراکسیون÷ میزان پروتئین کل عصاره خام × ۱۰۰

پروتئین کل= غلظت پروتئین فراکسیون÷ حجم نهایی

فعالیت کل= حجم نهایی × واحد فعالیت

فعالیت اختصاصی= واحد فعالیت ÷ غلظت پروتئین

ضریب تخلیص= فعالیت اختصاصی فراکسیون خالص شده ÷ فعالیت اختصاصی عصاره خام

راندمان= فعالیت کل فراکسیون خالص شده ÷ فعالیت کل عصاره خام × ۱۰۰

رسم منحنی میزان تولید ترکیبات ضد میکروبی بر حسب U/mL: برای رسم منحنی میزان تولید ترکیبات ضد میکروبی بر حسب U/mL، واحد فعالیت این ترکیبات بر حسب (U/mL) در زمان‌های متفاوت، محاسبه شد و منحنی میزان تولید، با قرار دادن واحد فعالیت در زمان‌های متفاوت، رسم گشت.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-17]

الکتروفورز: به منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های حاصل در این تحقیق، از تکنیک الکتروفورزSDS-PAGE با تکنیک رنگ آمیزی کماسی بلو استفاده گردید .

یافته‌ها

آزمون‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی: در نتیجه آزمون‌های میکروسکوپی، کلنی‌های انتروکوکوس در زیر میکروسکوپ به صورت کلنی‌های کروی شکل بنفش رنگ مشاهده شدند و در نتیجه آزمون‌های ماکروسکوپی، کلنی‌های انتروکوکوس بر روی پلیت‌های BHI agar، به صورت کلنی‌های ریز سرسوزنی مشاهده شدند.

تعیین منحنی رشد باکتری‌ها و اندازه گیری pH محلول رویی پس از سانتریفیوژ: منحنی رشد باکتری‌ها و منحنی میزان **pH** محلول رویی پس از سانتریفیوژ برای نمونه‌های مورد بررسی تعیین گشت. مدت فاز لگاریتمی در باکتری‌های ۱۳۹۳، ۲۴- ۰ ساعت بود و در ساعت ۲۴ به حداکثر رشد خود (یعنی حداکثر فاز لگاریتمی رشد) رسید. پس از تلقیح اولیه، میزان کدورت، پس از یک تاخیر کوتاه (Lag phase) در حدود ۸ ساعت، به تدریج افزایش یافته و متقارن با آن، میزان pH نیز با همان میزان تاخیر شروع به کاهش می‌نماید و در ساعت ۲۴، پس از تلقیح اولیه به حداقل میزان pH خود و حداکثر میزان کدورت می‌رسد. همچنین، مدت فاز لگاریتمی در باکتری ۱۲۳۹، ۴۸- ۰ساعت بود و در ساعت ۴۸ به حداکثر رشد خود (یعنی حداکثر فاز لگاریتمی رشد) رسید. میزان کدورت پس از یک تاخیر کوتاه (Lag phase) در حدود ۸ ساعت، پس از تلقیح اولیه به تدریج افزایش یافته و متقارن با آن، میزان pH نیز به همان میزان تاخیر شروع به کاهش می‌نماید و در ساعت ۴۸، پس از تلقیح اولیه به حداقل میزان pH خود و حداکثر میزان کدورت می‌رسد.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های تخمیری بر ضد سویه‌های تست استرین: نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد عصاره‌های تخمیری *انتروکوکس فکالیس* و *انتروکوکس هایرائی* پس از گذشت ۲۴ ساعت گرما گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در جدول ۱ آورده شده است (جدول ۱).

با مشاهده قطر هاله‌های عدم رشد اندازه گیری شده بر حسب میلی‌لیتردر جداول ۱ این چنین استنباط می‌شود که تاثیر ضد میکروبی عصاره‌های تخمیری باکتری‌های *انتروکک فکالیس* و *انتروکک هایرائی* بر روی باکتری‌های گرم مثبت، بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود.

ارزیابی اثر ضد میکروبی رسوبات پروتئینی حاصل از باکتری‌ها در قبل و بعد از دیالیز: نتایج حاصل از اثر ضد میکروبی رسوبات پروتئینی باکتری‌های ۱۳۹۳ و ۱۲۳۹، در قبل و بعد از دیالیز در جدول ۲ آورده شده است (جدول ۲) همان طوری که در جدول ۲ مشاهده می شود، به دلیل حذف سایر ترکیبات ضد میکروبی پروتئینی در اثر فرایند دیالیز، میزان تاثیر ضد میکروبی رسوبات پروتئینی بعد از دیالیز، کاهش یافته و در برخی از موارد، ثابت مانده است.

تعیین حداقل غلظت باکتریواستاتیکی: تعیین حداقل غلظت باکتریواستاتیکی پروتئین‌های ضد میکروبی گونه‌های فکالیس و هایرائی روی چهار باکتری بیماریزا تعیین گشت (جدول ۳) .

تعیین منحنی استاندارد تست لوری: تعیین منحنی استاندارد تست لوری در نمودار ۱ آورده شده است.

تعیین منحنی میزان تولید ترکیبات ضد میکروبی برحسب U/mL: منحنی میزان تولید ترکیبات ضد میکروبی با گذشت زمان بر حسب **U/mL** در نمودار۲ آورده شده است (نمودار۲) .

تعیین میزان و فعالیت و سایر فاکتورهای پروتئین در نمونه‌های مورد بررسی: تعیین میزان و فعالیت پروتئین در جدول ۴ آورده شده است (جدول ۴) .

نتایج حاصل از الکتروفورز رسوبات پروتئینی دو سوش انتروکوکوس: پس از انجام الکتروفورز مشاهده شد که وزن مولکولی ترکیبات استخراج شده از سوش‌های۱۳۹۳ و ۱۲۳۹، به ترتیب، ۴۵ و ۳۵ کیلودالتون بود.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-17]

جدول ۱. نتایج قطر هاله عدم رشد عصاره های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکس هایرائی* پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری

قطر هاله عدم رشد (mm) انتروکوک	*لیستریا مونوسیتوژنز*	*استافیلوکک ارئوس*	*باسیلوس سرئوس*	*کلبسیلا پنومونیه*	*سالمونلا پاراتیفی*	*اشرشیاکلی*
انتروکک فکالیس	۳۰	۲۴	۳۳	۱۳	–	۱۸
انتروکک هایرائی	۳۹	۳۰	۳۳	۱۸	۱۷	۲۳

جدول ۲. نتایج اثر ضد میکروبی رسوبات پروتئینی باکتری ها به همراه عصاره های گیاهی پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در قبل و بعد از دیالیز

قطر هاله عدم رشد (mm) انتروکوک و عصاره های گیاهی	*استافیلوکوکوس ارئوس*		*لیستریا مونوسیتوژنز*		*باسیلوس سرئوس*		*کلبسیلا پنومونیه*	
نمونه های قبل و پس از دیالیز	۱	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۲
انتروکوک فکالیس	۱۰	۱۰	۱۲	۸	۱۴	۱۴	۱۰	۱۰
انتروکوک هایرائی	۱۸	۱۴	۲۵	۲۳	۱۱	۱۱	۱۴	۱۲

۱- رسوب پروتئین ها قبل از دیالیز
۲- رسوب پروتئین ها پس از دیالیز

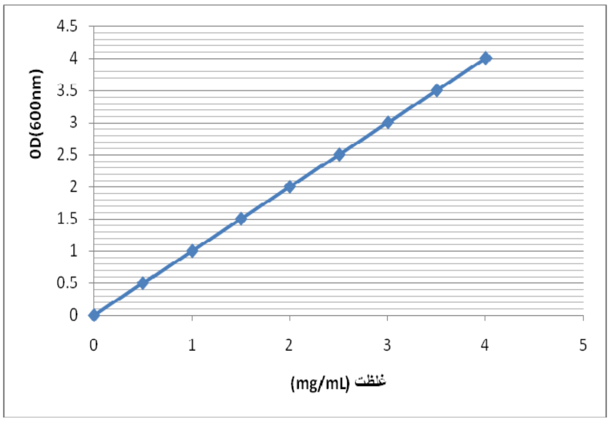
جدول ۳. حداقل غلظت باکتریواستاتیکی

حداقل غلظت باکتریواستاتیکی (g/L) انتروکوک	*استافیلوکوکوس ارئوس*	*لیستریا مونوسیتوژنز*	*باسیلوس سرئوس*	*کلبسیلا پنومونیه*
انتروکوک فکالیس	۱/۲	۰/۷	۰/۷	۲/۲
انتروکوک هایرائی	۱/۵	۰/۵	۱/۵	۲

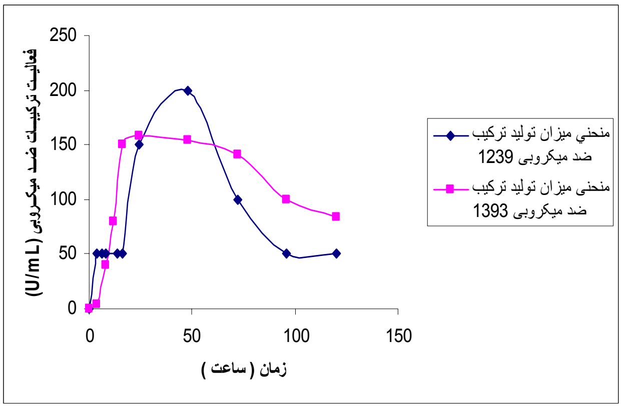
جدول ۴. میزان و فعالیت پروتئین و سایر فاکتورها

سویه ها فاکتورها	*انتروکوک فکالیس*			*انتروکوک هایرائی*		
	مایع تخمیر	قبل از دیالیز	پس از دیالیز	مایع تخمیر	قبل از دیالیز	پس از دیالیز
حجم نمونه(mL)	۱۰۰	۳۵	۲۵	۱۰۰	۳۵	۲۵
واحدفعالیت (Unit/mL)	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	۵۰	۱۰۰	۱۵۰
فعالیت کل (Unit)	۵۰۰۰	۳۵۰۰	۳۷۵۰	۵۰۰۰	۳۵۰۰	۳۷۵۰
غلظت پروتئین (mg/mL)	۲/۲۰	۱/۶	۰/۶	۲	۱/۵	۰/۵
پروتئین کل (mg)	۲۲۰	۵۶	۱۵	۲۰۰	۵۲/۵	۱۲/۵
فعالیت اختصاصی (U/mg)	۲۲/۷۳	۶۲/۵	۲۵۰	۲۵	۶۶/۶۷	۳۰۰
راندمان (٪)	–	۷۰	۷۵	–	۷۰	۷۵
درصد بازیافت (٪)	–	۲۵/۴۵	۶/۸۲	–	۲۶/۲۵	۶/۲۵
ضریب تخلیص	–	۲/۷۵	۱۰/۱	–	۲/۶۷	۱۲

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-17]



نمودار ۱. منحنی استاندارد تست لوری



نمودار ۲. منحنی میزان تولید ترکیبات ضد میکروبی توسط سوش های ۱۲۳۹ و ۱۳۹۳ بر حسب U/mL

بحث

نتایج قطر هاله عدم رشد دو باکتری *انتروکوک فکالیس* و *انتروکوک* هایرائی نشان داد که بیشترین تاثیر ضدمیکروبی گونه فکالیس بر روی *باسیلوس سرئوس* و بیشترین تاثیر ضد میکروبی گونه هایرائی بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز* بوده است. Sabiaو همکاران، در سال ۲۰۰۱ تاثیر محلول رویی فیلتره شده خام حاصل از *Enterococcus casseliflavus* IM416K1 را بر روی *Listeria Monocytogenes* بررسی کردند و قطر هاله عدم رشد به دست آمده، ۱۵ -۱۰ میلی‌متر گزارش شد که در مقایسه، عصاره حاصل از گونه فکالیس با ایجاد قطر هاله عدم رشد ۳۳ میلی متر بر روی همین باکتری قوی تر بوده است (۱۶).

جهت رسوب ترکیبات ضدمیکروبی با ماهیت پروتئینی در فاز لگاریتمی رشد از تیمار عصاره محیط کشت با سولفات آمونیوم استفاده شد. سولفات آمونیوم یک روش شناخته شده برای رسوب دهی و بازیابی پروتئین‌ها است و به طور گسترده برای بازیافت پروتئین‌ها استفاده می‌شود. در این روش، حلالیت پروتئین‌ها با افزودن نمک ها، حلال‌های آلی و سایر ترکیباتی که حلالیت زیادی دارند، کاهش داده می‌شود. رسوب دهی را به عنوان روش کاهش دهنده حجم، به منظور تغلیظ محصول نیز به کار می‌برند. هم چنین می‌توان، پیش از مراحل تخلیص نهایی، از روش رسوب دهی به عنوان یک مرحله برای جداسازی محصولات جانبی نامطلوب مانند اسیدهای نوکلئیک، رنگدانه‌ها و دیگر اجزای باقی مانده از محصول حاصل از تخمیر استفاده نمود (۱۷).

پس از تیمار با سولفات آمونیوم و رسوب دادن مایع حاصله توسط سانتریفوژ، سه فاز تشکیل می گرد. این فازها شامل، فاز سبک رویی (حاوی لیپیدها و سایر مواد سبک موجود در محیط که ممکن است ترکیبات ضد میکروبی نیز در آن به دام افتاده باشند)، فاز آبی (مایع حاصل از سانتریفوژ پروتئین‌های رسوب داده شده توسط سولفات آمونیوم است) و فاز رسوب سنگین زیرین (حاوی پروتئین‌ها) بودند. جهت تخلیص ترکیبات پروتئینی راسب شده از روش دیالیز استفاده شد. آزمایشات اولترافیلتراسیون نشان داده است که باکتریوسین‌ها قادر به عبور از غشاء هایی با cut-offهای ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ کیلودالتون نیستند (۱۸).

پس از دیالیز جهت تائید روند آزمایش از معرف نسلر استفاده گردید. ایجاد رنگ قرمز آجری در اثر افزودن معرف نسلر به محلول مورد نظر نشان دهنده وجود یون‌های آمونیوم در محلول فوق می‌باشد، که ناشی از ایجاد ترکیب زیر می‌باشد

$$NH_4^+ + 2[HgI_4]^{2-} + 4OH^- \longrightarrow HgO.Hg(NH_2)I + 7I^- + 3H_2O$$

حساسیت تست نسلر تا 0.3µg NH_3 در 2µl نمونه می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که حداقل غلظت مورد نیاز برای جلوگیری از رشد و نابودی باکتری‌های مورد بررسی با میزان مقاومت باکتری‌ها به ترکیبات ضد میکروبی، رابطه معکوس وجود دارد. میزان حداقل غلظت باکتریواستاتیکی برای باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی بود. با مقایسه نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-17]

بررسی حداقل غلظت باکتریواستاتیکی فنـی تـوئین بـر روی باکتری‌ها توسط دکتر متواضع در سال ۱۳۷۹، مشاهده شـد کـه حـداقل غلظـت باکتریواسـتاتیکی فنـی تـوئین بـر روی *اسـتافیلوکوکوس ارئـوس* و *کلبسـیلا پنومونیـه* g/L ۰/۰۲۵ اسـت. دلیـل کمتـر بـودن قابـل ملاحظـه حـداقل غلظـت باکتریواستاتیکی آنتی بیوتیک فنی توئین نسبت به ترکیبات ضد میکروبی سوش‌های ۱۲۳۹ و ۱۳۹۳، قوی تر بودن تـاثیر ضد میکروبی فنی توئین برای مهار رشـد بـاکتری‌هـای فـوق است (۱۹) .

براساس منحنی‌های میزان تولید ترکیبات ضـدمیکروبی براساس U/mL ، میزان تولیـد ایـن ترکیبـات، در ۴ سـاعت اولیه رشد (Lag phase) ، تقریباً صفر بود، بعبـارت دیگـر از آن جایی که رشدی صورت نگرفته، در نتیجه متابولیتی هـم تولید نشده است. اما به تدریج، با افزایش رشد بـاکتری ایـن متابولیـت‌هـا نیـز افـزایش مـی‌یابنـد. در مـورد ترکیبـات ضدمیکروبی باکتریهای ۱۳۹۳و ۱۲۳۹ به ترتیب در طی ۱۶ و ۲۴ ساعت پس از تلقیح اولیه، یک افزایش شدید در میزان تولید روی داد. این زمـان، دقیقـاً مقـارن بـا افـزایش تعـداد باکتری و به عبارتی، همزمـان بـا فـاز لگـاریتمی رشـد بـود. بعبارت دیگر، تولیـد ایـن ترکیبـات در فـاز لگـاریتمی رشـد صورت گرفته است. بنابراین، می‌توان گفت که تولید ترکیبات ضدمیکروبی در باکتری‌های ۱۳۹۳و ۱۲۳۹، از شـمای تولیـد یک متابولیت اولیه پیروی می‌کند. بـا ورود بـاکتری بـه فـاز سکون(رکود)، میزان این ترکیبات تولید شده، تقریباً ثابـت ماند و سپس، به تدریج کاهش یافت. این کاهش می‌تواند در اثر تاثیر آنزیم‌های پروتئازی باشد که از سلول‌های مـرده آزاد می‌شود. زیرا ترکیبات پروتئینی به pH اسیدی مقاوم هستند و بهترین فعالیت آن‌ها در محدوده اسیدی است. ایـن یافتـه، به خصوص در مواد غـذایی، در هنگـامی کـه از کشـت‌هـای آغـازگر در صـنایع لبنـی اسـتفاده مـی‌شـود، دارای اهمیـت می‌باشد. چون پروتئازهای سلولی می‌توانند بـه سـرعت ایـن ترکیبات را تجزیه نمایند.

نتیجه گیری

بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیـک، انـواع متعـددی از پروتئین‌های ضدمیکروبی را تولید می‌نمایند. این ترکیبات در مواد غذایی تخمیری و غیر تخمیری متعـدد مـی تواننـد بـه عنوان نگهدارنده به کار برده می‌شوند(۲۰). در حـال حاضـر، بسـیاری از پـروتئین‌هـای ضـد میکروبـی اسـتخراج شـده از انتروکوک‌ها که به عنوان باکتریوسین‌ها قلمداد می شوند، به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی مورد استفاده قرار می گیرند.

ضـرورت اسـتخراج باکتریوسـین‌هـای تولیـد شـده از سوش‌های انتروکوک، افـزودن ان‌هـا بـه عنـوان کشـت‌هـای استارتر طبیعی به مواد غذایی و در نتیجـه، بهبـود ایمنـی و کیفیت مواد غذایی می‌باشد (۲۱). هـزاران سـال اسـت کـه انسان‌ها ، بدون هیچ عارضه جانبی، در مـواد غـذایی تخمیـر شده، سـلول‌هـای بـاکتری‌هـای اسـید لاکتیـک و متابولیـت هایشان را مصرف می‌نمایند(۲۲) . در این تحقیق، توان تولید پروتئین‌هـای ضـدمیکروبی توسـط دو سـوش انتروکوکـوس ارزیابی شد و با توجه به تولید بیشینه این ترکیبـات در فـاز لگاریتمی رشد مشخص شد که پـروتئین‌هـای ضـدمیکروبی تولید شده از انتروکوک ها، جزء متابولیت‌های اولیه هسـتند. با توجه به توان تولید دو سوش ارزیابی شده انتروکوکوس در این تحقیق برای تولید پروتئین‌های ضدمیکرو بی، به عنـوان نگهدارنده‌های بیولوژیک، برای نگهداری طولانی مـدت مـواد غذایی می‌توان از این ترکیبات ضدمیکروبی درانـواع مختلـف فرآورده‌های غذایی خصوصاً در فرآورده‌های شیری و گوشتی استفاده نمود و میزان استفاده از نگهدارنـده‌هـای سـرطانزای شـیمیایی را بـه مقـدار قابـل ملاحظـه ای کـاهش داد. ایـن ترکیبات ضد میکروبی به عنوان یک نگهدارنده بسـیار ایمـن، از مواد غذایی در برابر باکتری‌ها محافظـت نمـوده، لـذا عمـر نگهداری مـواد غـذایی را بـه میـزان قابـل تـوجهی افـزایش می‌بخشند.

References

1.Lindgren SE, Dobrogosz W2.J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. Journal of FEMS Microbiology Review 1990; 87:149-164.

2. Malekzadeh F, Soudi M, Malek zadeh Sh. Microbial Biotechnology. University of Tehran 2009 .p.35-65 [in persian].

3.De vuyst L , Vandamme E.J. Nisin a lantibiotic produced by *Lactobacoccus lactis* subsp. Lactis properties, biosynthesis, fermentation and

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-17]

application. Blackic Academic Press Glasgow 1994; 151-222.

4.Schrezenmeir J , de Vrese M. Probiotics, prebiotics and synbioticsapproaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73(suppl) 2001; 361S-4S.

5.Lethbridge AB . Natural rumen proteins of weapon against antibiotic resistance. Lethbridge research center advance 2003; 20, Canada, Agriculture.

6.Kandler O , Nobert W. Bergeys Mannual of systematic Bacteriology 1989; 2:1208-1234 .

7.Baron Ellen J.o, Finegold Sydney M. Diagnostic microbiology, 8th ed.USA: Bailey & Scott; 1990.

8. Khanafari A. Evaluation of antimicrobial effect of extract and pigment of three plants on aerobic bacteria(dissertation). Tehran: Islamic Azad U niversity of North Branch of Tehran,Faculty of basic of sciences; 1375 (in persian).

9.Ogunbanwo S.T , Sanni A.I , Onilude A.A. Characterization of bacteriocin produced by. *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* og1. African Journal of Biotechnology 2003; 2: 219-227.

10.Klaenhammer T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Journal of FEMS Microbiology Review 1993; 12: 39-86.

11.Yamazaki S. Protective effect of *Bifidobacterium* monassociation against lethal activity of *E.coli*. Journal of bifidobacteria microflora 1982; 1: 55-60.

12.Bruno MEC , Montville TJ. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. Journal of Applied Environmental Microbiology 1993; 59: 3003-3010.

13. Khanafari A, Hosseini F. practical Microbiology and biochemical principles of reactions 1385 (in persian).

14.Padmanabha Reddy V , Christopher M.D , Sankara Reddy I. Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus*. Tamilnadu Journal Vet Animal Science 2006; 2(4):142-144.

15.Aroutcheva Alla A, Simoes Jose A. Sebastian Faro Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerellavaginalis* .Infect Dis Obstet Gynecol. Journal of Microbiology 2001; 9: 33–39.

16.Sabia C , Niederhäusern S , Messi P , Manicardi G , Bondi M. Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a natural antagonist for control of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages (“cacciatore”). International Journal of Food Microbiol 2003; 87:173-179.

17.Krijsman J. Product recovery in bioprocess technology. Butterworth Heinemann, Oxford 1992; 106-115

18.Toba T ، Samant S.K, Yoshioka E ، Itoh T . Reutericin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA 6. Journal of Applied Microbiol 1991; 13: 281 – 286

19 Motavaze K. Evaluation of minimum inhibitory concentration of fenny toin (dissertation). Tehran: Islamic Azad University of North Branch of Tehran, Faculty of basic of sciences; 1375 (in persian).

20.Cleveland J, Montville TJ , Nes IF, Chikindas T. Bacteriocins safe natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology 2001; 71:1-20

21.Maisnier-Patin S, Forni E , Richard J. Purification, partial characterization and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. International journal of Food Microbiol 1996; 30: 255.

22.Yang R , Ray B. (). Factors influencing production of bacteriocins by acid lactic acid bacteria. Journal of Food Microbiol 1994; 11: 281.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-17]

Evaluation of potential of the biological preservators production by probiotic bacteries and determination of extracted compounds minimum inhibitory concentration

*Yeganeh M[*1], Khanafari A[2] , Fallahian MR[3], Sharifan A[4]*

*1- *Corresponding author: Students` Research Committee, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email:mahsayeganeh19@yahoo.com*

2-Associated Prof. Dept. of Microbiology, Faculty of Basic of Sciences Islamic AzadUniversity, North branch of Tehran, Tehran, Iran

3-Instructor of microbiology Prof. Dept. of Microbiology, Faculty of Basic of Sciences Islamic AzadUniversity, North branch of Tehran, Tehran, Iran

4- Assistant Prof. Dept. of Food Science & Technology, Faculty of agriculture and natural resources, Islamic Azad University, Sciences and Researches branch of Tehran, Tehran, Iran

.

Abstract

Background and Objective: The Object of present research was evaluation of potential of the biological preservators production by probiotic bacteries and determination of extracted compounds minimum inhibitory concentration.

Materials and Methods: After the culture of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus hirae* in the BHI agar medium culture, centrifuging and isolation of microbial mass, these strains antimicrobial compounds were purified by dialyze and produced protein amount was determined by lowry test and molecular weight was estimated by SDS-PAGE electrophoresis. Antimicrobial effect of present compounds were evaluated by well diffusion method. Related factores to protein activity were determined before and after dyalisis. compounds minimum inhibitory concentration were evaluated.

Results: The results of this research proved that the molecular weight of extracted compounds of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus hirae* strains were, approximately, 45 KDa, 35KDa ,respectively. It was similar to molecular weight of enterocin. The most of antimicrobial effect and the least of inhibitory concentration produced bacteriocin of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus hirae* strains were for *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*, respectively.

Conclusion: Antimicrobial compounds from *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus hirae* protect as a very safety maintenance from foodstuff against bacteria, So They can enhance shelf life of foodstuff remarkably.

Keywords: Antimiicrobial effect, *Enterococcus faecalis* , *Enterococcus hirae*, biological preservators

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-12-17]