

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

مهسا یگانه^۱، آنیثا خانفاری^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 میکروبی شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۳- مربی گروه میکروبی 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 روش‌ها: پس از کشت *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس هایرائی* در محیط کشت BHI agar، سانتی‌فیوژ 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.

یافته‌ها: 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 مونوسیتوزنز و باسیلوس سرئوس بوده است.

نتیجه‌گیری: 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 می‌بخشد.

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

مقدمه

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، رتوتین، باکتریوسین، دی استیل، استالید و استوتین اطلاق می‌شود (۲). باکتری‌های پروبیوتیک می‌توانند به عنوان سدهای میکروبی در مقابل پاتوژن‌های

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 می‌باشد. پاسخ احتمالی میکروارگانیسم‌ها به چنین شرایط نامطلوبی، تعیین می‌نماید که آن‌ها رشد می‌کنند یا خواهند مرد. استفاده از نگهدارنده‌های بیولوژیک مانند مواد ضد میکروبی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی، یک راه جایگزین، جهت کنترل لیستریا مونوسیتوزنز و سایر پاتوژن‌ها است. باکتری‌های اسید لاکتیک و یا محصولات ضد میکروبی

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 باکتری‌ها، محیط‌های حاوی باکتری‌ها، به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (۶).

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، ۰.۵٪ از کشت تلقیح به ارلن حاوی محیط BHI broth و حاوی ۰.۱٪ سوکسینات آمونیوم و آنزیم کاتالاز افزوده شد. سپس، ارلن‌های حاوی سوش‌های ۱۲۳۹ یا ۱۳۹۳ در انکوباتور شیکردار با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند و ارلن‌های حاوی سوش ۱۳۹۴ در انکوباتور حاوی ۰.۵٪ از گاز دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، 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).

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 *انتروکوک*‌ها این است که آن‌ها غیر سمی هستند، آسان هضم می‌شوند، هیچ باقی مانده‌ای در غذا باقی نمی‌گذارند، مقاوم به اسید و گرما هستند و می‌توانند برای افزایش سلامت و طول عمر بسیاری از مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند (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 روش‌ها

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

مواد شیمیایی: سوکسینات آمونیوم، سولفات آمونیوم، پراکسید هیدروژن، گلوکز، گالاتوز، 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 آکرلامید 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

استخراج مواد ضد میکروبی توسط انتروکوک‌ها

کشت و گرماگذاری باکتری‌ها: ارلن‌های حاوی سوش‌های ۱۳۹۳ یا ۱۲۳۹ در انکوباتور شیکر دار با دور ۱۵۰ rpm 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 CO₂ دار خارج شدند و در دستگاه سانتریفوژ یخچال دار با دور ۱۶۰۰۰ rpm 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 7-7.8 رسانده شد (۹).

رسوب پروتئین‌ها توسط سولفات آمونیوم: چند میلی‌لیتر از محلول رویی، پس از سانتریفوژ از توده سلولی جدا گردید. مقدار 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 ۱۶۰۰۰ rpm، 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 دیالیز کنار گذاشته 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 KDa cut off با منافذ دارای 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 میلی‌لیتر از بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار ریخته و ارلن مذکور در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نمونه‌های درون کیسه‌ها، در این بافر قرار داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در آن 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 کیسه‌ها، 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 کشت BHI 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. چاهک‌هایی به فاصله معین از یکدیگر به قطر ۳ میلی‌متر ایجاد شد. توسط سمپلر و سر سمپلر

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 میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتئین سرم آلبومین گاوی، در آب 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).

اندازه‌گیری 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 تخلیص، در صد بازیافت، فعالیت اختصاصی، میزان پروتئین کل محاسبه و ثبت گردید. رقت‌های ۱/۵۰، ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/۳۰۰، ۱/۴۰۰، ۱/۵۰۰، از باکتریوسین و آنتی‌بیوتیک تهیه شدند. تیتیر 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

حساب U/mL: برای رسم منحنی میزان تولید ترکیبات ضد

میکروبی بر حسب U/mL، واحد فعالیت این ترکیبات بر

حساب (U/mL) در زمان‌های متفاوت، محاسبه شد و

منحنی میزان تولید، با قرار دادن واحد فعالیت در زمان‌های

متفاوت، رسم گشت.

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 (MIC) (Minimum Inhibitory Concentration):

ساخت رقت‌های مختلف رسوب پروتئین: برای تعیین MIC، از روش رقیق‌سازی در محیط مایع (Broth Dilution Technique) استفاده شد. برای این منظور، رقت‌های ۰.۰۲، ۰.۰۱، ۰.۰۳، ۰.۰۵، ۰.۰۷، ۰.۰۶، ۰.۰۹، ۰.۱، ۰.۲، ۰.۵، ۰.۴، ۰.۶، ۰.۸، ۱، ۱.۲، ۱.۶ گرم بر لیتر از رسوبات پروتئینی با غلظت مشخص تهیه شدند. سپس، کشت ۲۴ 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 می‌شود 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 تخلیص، در صد بازیافت، فعالیت اختصاصی، میزان

در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جدول ۱ آورده شده است (جدول ۱).

با مشاهده قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شده بر حسب میلی‌لیتر در جداول ۱ این چنین استنباط می‌شود که تاثیر ضد میکروبی عصاره‌های تخمیری باکتری‌های *انتروکوک فکالیس* و *انتروکوک 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 می‌شود، 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 بر حسب U/mL: منحنی میزان تولید ترکیبات ضد میکروبی با گذشت زمان بر حسب U/mL در نمودار ۲ آورده شده است (نمودار ۲).

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 سوش‌های ۱۳۹۳ و ۱۲۳۹، به ترتیب، ۴۵ و ۳۵ کیلودالتون بود.

الکتروفورز: به منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های حاصل در این تحقیق، از تکنیک الکتروفورز SDS-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 اندازه‌گیری 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، ۴۸-۰ ساعت 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 *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس هایرائی* پس از گذشت ۲۴ ساعت گرما گذاری

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

قطر هاله عدم رشد (mm)	لیستریا مونوسیٹوژنز	استافیلوکوک ارئوس	باسیلوس سرئوس	کلسیلا پنومونیه	سالمونلا پاراتیفی	اشرشیاکلی	انتروکوک
انتروکوک فکالیس	۳۰	۲۴	۳۳	۱۳	-	۱۸	
انتروکوک 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)	استافیلوکوکوس ارئوس	لیستریا مونوسیٹوژنز	باسیلوس سرئوس	کلسیلا پنومونیه	انتروکوک و عصاره های گیاهی
نمونه های قبل و پس از دیالیز	۱	۲	۱	۲	۱
انتروکوک فکالیس	۱۰	۱۰	۸	۱۲	۱۴
انتروکوک هایرائی	۱۸	۱۴	۲۳	۲۵	۱۱

-۱ رسوب پروتئین ها قبل از دیالیز

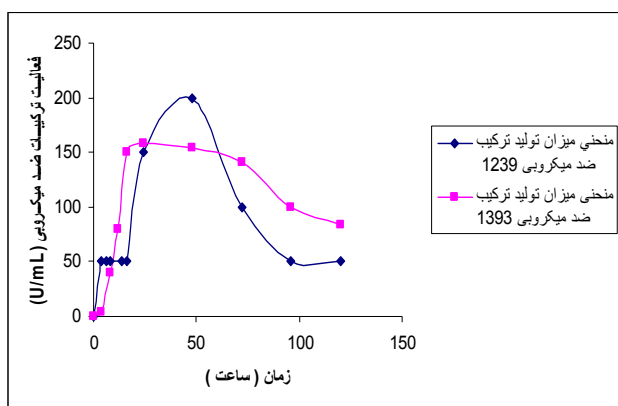
-۲ رسوب پروتئین ها پس از دیالیز

جدول ۳. حداقل غلظت باکتریواستاتیکی

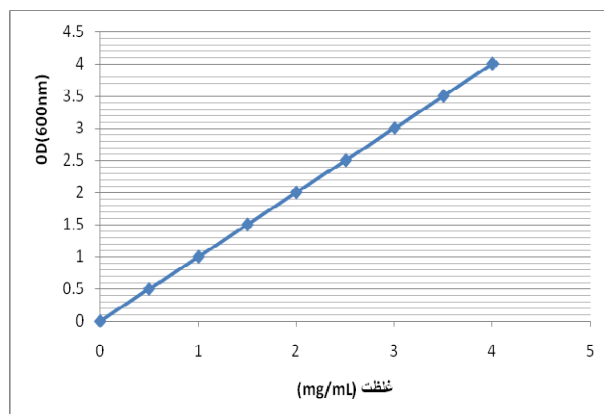
حداقل غلظت باکتریواستاتیکی (g/L)	استافیلوکوکوس ارئوس	لیستریا مونوسیٹوژنز	باسیلوس سرئوس	کلسیلا پنومونیه	انتروکوک
انتروکوک فکالیس	۱/۲	۰/۷	۰/۷	۲/۲	
انتروکوک هایرائی	۱/۵	۰/۵	۱/۵	۲	

جدول ۴. میزان و فعالیت پروتئین و سایر فاکتورها

فاکتورها	سویه ها	انتروکوک فکالیس	انتروکوک هایرائی
حجم نمونه (mL)	۱۰۰	۳۵	۲۵
واحد فعالیت (Unit/mL)	۵۰	۱۰۰	۱۵۰
فعالیت کل (Unit)	۵۰۰۰	۳۵۰۰	۳۷۵۰
غلظت پروتئین (mg/mL)	۲/۲۰	۱/۶	۰/۶
پروتئین کل (mg)	۲۲۰	۵۶	۱۵
فعالیت اختصاصی (U/mg)	۲۲/۷۳	۶۲/۵	۲۵۰
راندمان (%)	-	۷۰	۷۵
درصد باز یافت (%)	-	۲۵/۴۵	۶/۸۲
ضریب تخلیص	-	۲/۷۵	۱۰/۱



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

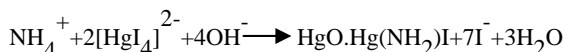


نمودار ۱. منحنی استاندارد تست لوری

بحث

پس از تیمار با سولفات آمونیوم و رسوب دادن مایع حاصله توسط سانتریفوژ، سه فاز تشکیل می‌گردد. 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 غشاء‌هایی با cut-off‌های ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ کیلودالتون نیستند (۱۸).

پس از دیالیز جهت تأیید 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



حساسیت تست نسلر تا ۰.۳ μg NH₃ در ۲ μl 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

نتایج قطر هاله عدم رشد دو باکتری *انتروکوک فکالیس* و *انتروکوک هایرائی* نشان داد که بیشترین تاثیر ضد میکروبی گونه فکالیس بر روی *باسیلوس سرئوس* و بیشترین تاثیر ضد میکروبی گونه هایرائی بر روی *لیستریا مونوسیژنوز* بوده است. Sabia و همکاران، در سال ۲۰۰۱ تاثیر محلول رویی فیلتره شده خام حاصل از *Enterococcus casseliflavus* IM416K1 را بر روی *Monocytogenes Listeria* 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 میلی‌متر بر روی همین باکتری قوی تر بوده است (۱۶).

جهت رسوب ترکیبات ضد میکروبی 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 نمک‌ها، 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. هم‌چنین 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).

نتیجه گیری

بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک، انواع متعددی از پروتئین‌های ضد میکروبی را تولید می‌نمایند. این ترکیبات در مواد غذایی تخمیری و غیر تخمیری متعدد می‌توانند به عنوان نگهدارنده به کار برده می‌شوند (۲۰). در حال حاضر، بسیاری از پروتئین‌های ضد میکروبی استخراج شده از انتروکوک‌ها که به عنوان باکتریوسین‌ها قلمداد می‌شوند، به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. ضرورت استخراج باکتریوسین‌های تولید شده از سوش‌های انتروکوک، افزودن آن‌ها به عنوان کشت‌های استارتر طبیعی به مواد غذایی و در نتیجه، بهبود ایمنی و کیفیت مواد غذایی می‌باشد (۲۱). هزاران سال است که انسان‌ها، بدون هیچ عارضه جانبی، در مواد غذایی تخمیر شده، سلول‌های باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌هایشان را مصرف می‌نمایند (۲۲). در این تحقیق، توان تولید پروتئین‌های ضد میکروبی توسط دو سوش انتروکوکوس ارزیابی شد و با توجه به تولید بیشینه این ترکیبات در فاز لگاریتمی رشد مشخص شد که پروتئین‌های ضد میکروبی تولید شده از انتروکوک‌ها، جزء متابولیت‌های اولیه هستند. با توجه به توان تولید دو سوش ارزیابی شده انتروکوکوس در این تحقیق برای تولید پروتئین‌های ضد میکروبی، به عنوان نگهدارنده‌های بیولوژیک، برای نگهداری طولانی مدت مواد غذایی می‌توان از این ترکیبات ضد میکروبی در انواع مختلف فرآورده‌های غذایی خصوصاً در فرآورده‌های شیری و گوشتی استفاده نمود و میزان استفاده از نگهدارنده‌های سرطازای شیمیایی را به مقدار قابل ملاحظه‌ای کاهش داد. این ترکیبات ضد میکروبی 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.

بررسی حداقل غلظت باکتریواستاتیکی فنی توئین بر روی باکتری‌ها توسط دکتر متواضع در سال ۱۳۷۹، مشاهده شد که حداقل غلظت باکتریواستاتیکی فنی توئین بر روی *استافیلوکوکوس ائروس* و *کلبسیلا پنومونیه* 0.25 g/L است. دلیل کمتر بودن قابل ملاحظه حداقل غلظت باکتریواستاتیکی آنتی بیوتیک فنی توئین نسبت به ترکیبات ضد میکروبی سوش‌های ۱۳۹۳ و ۱۲۳۹، قوی تر بودن تاثیر ضد میکروبی فنی توئین برای مهار رشد باکتری‌های فوق است (۱۹).

بر اساس منحنی‌های میزان تولید ترکیبات ضد میکروبی بر اساس U/mL، میزان تولید این ترکیبات، در ۴ ساعت اولیه رشد (Lag phase)، تقریباً صفر بود، بعبارت دیگر از آن جایی که رشدی صورت نگرفته، در نتیجه متابولیتی هم تولید نشده است. اما به تدریج، با افزایش رشد باکتری این متابولیت‌ها نیز افزایش می‌یابند. در مورد ترکیبات ضد میکروبی باکتریهای ۱۳۹۳ و ۱۲۳۹ به ترتیب در طی ۱۶ و ۲۴ ساعت پس از تلقیح اولیه، یک افزایش شدید در میزان تولید روی داد. این زمان، دقیقاً مقارن با افزایش تعداد باکتری و به عبارتی، همزمان با فاز لگاریتمی رشد بود. بعبارت دیگر، تولید این ترکیبات در فاز لگاریتمی رشد صورت گرفته است. بنابراین، می‌توان گفت که تولید ترکیبات ضد میکروبی در باکتری‌های ۱۳۹۳ و ۱۲۳۹، از شمای تولید یک متابولیت اولیه پیروی می‌کند. با ورود باکتری به فاز سکون (رکود)، میزان این ترکیبات تولید شده، تقریباً ثابت ماند و سپس، به تدریج کاهش یافت. این کاهش می‌تواند در اثر تاثیر آنزیم‌های پروتئاز باشد که از سلول‌های مرده آزاد می‌شود. زیرا ترکیبات پروتئینی به pH اسیدی مقاوم هستند و بهترین فعالیت آن‌ها در محدوده اسیدی است. این یافته، به خصوص در مواد غذایی، در هنگامی که از کشت‌های آغازگر در صنایع لبنی استفاده می‌شود، دارای اهمیت می‌باشد. چون پروتئازهای سلولی می‌توانند به سرعت این ترکیبات را تجزیه نمایند.

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

- application. Blackie Academic Press Glasgow 1994; 151-222.
4. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics and synbiotics approaching 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 Manual 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 University 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. Krijnsman J. Product recovery in bioprocess technology. Butterworth Heinemann, Oxford 1992; 106-115
 18. Toba T, Samant S.K, Yoshioka E, Itoh T. Reuterin 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.

Evaluation of potential of the biological preservatives production by probiotic bacteria and determination of extracted compounds minimum inhibitory concentration

Yeganeh M^{*1}, Khanafari A², Fallahian MR³, Sharifan A⁴

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 preservatives production by probiotic bacteria 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 factors to protein activity were determined before and after dialysis. 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: Antimicrobial effect, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, biological preservatives