Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Bacteriocin production by Lactobacillus spp. And study on it's antimicrobial activity against some pathogenic microorganisms

Fatemeh Kheirollahi[1], Masoumeh Anvari[2*]

[1]Ph.D Student, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
[2]Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
*Corresponding author: anvari@iaurasht.ac.ir

Received: 22 July 2017 Accepted: 18 September 2017 First Published online: 4 July 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):53-60

Abstract

Background: Bacteriocins are antimicrobial proteins which prevent the growth of sensitive strains. The aim of study is to produce antimicrobial products using the lactic acid bacteria separated from low fat yogurt and survey on their antimicrobial activity.

Methods: At the first bactobacillus separated from two kinds of pasteurized yogurt of Gilan and then its effect on E.coli and a *staphylococcus aureus* was studied by disc and gel diffusion methods. Also effect of different physicochemical factors on bacteriocin production was evaluated، using Taguchi methodology.

Results: The greatest zone diameter and the highest rate of production and E.coli (17 mm). This diameter was observed in PH 5، inoculation size 20%, temperature 25°C, Glucose and yeast extract as the carbon and nitrogen sources. The result analysis of varians showed that carbon and nitrogen type had significant product.

Conclusion: The results in optimized MRS broth medium show that the best bacteriocin production in the optimized environment was 70% greater and it could be prev the bacterial growth property

Keyword: Probiotic, Bacteriocin, Optimization, Lactobacillus.

How to cite this article: Kheirollahi F, Anvari M. [Bacteriocin production by Lactobacillus spp. And study on it's antimicrobial activity against some pathogenic microorganisms]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 August- September; 41(3):53-60. Persian.

© 2019 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0)، which permits unrestricted use، distribution، and reproduction in any medium، provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

تولید باکتریوسین توسط اعضای جنس لاکتوباسیلوس و مطالعه عملکرد ضد میکروبی آن در برابر برخی میکروارگانیسم های بیماری زا

فاطمه خیراللهی[۱]، معصومه انوری[۲*]

[۱] دانشجوی دوره دکتری زیست شناسی، گرایش میکروبیولوژی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
[۲] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی رشت، ایران
[*]نویسنده مسئول؛ ایمیل anvari@iaurasht.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۶/۴/۳۱ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۷ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۴/۱۳
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. مرداد و شهریور ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳):۵۳-۶۰

چکیده

زمینه: باکتریوسینها مواد ضد میکروبی با ماهیت پروتئینی هستند که از رشد سویه‌های حساس جلوگیری می‌کنند. هدف از این تحقیق بررسی تولید محصولات ضد میکروبی توسط باکتریهای های اسید لاکتیک جدا شده از ماست پاستوریزه کم چرب و بررسی اثر ضدمیکروبی آنهاست.

روش‌کار: در این مطالعه ابتدا باکتریوسین توسط لاکتوباسیلوس جدا شده از دو نوع ماست پاستوریزه تولید و سپس اثر آن روی دو باکتری E.coli و *Staphylococcus aureus* با دو روش دیسک و ژل دیفیوژن علیه دو گونه باکتری گرم مثبت و منفی بررسی شد. همچنین اثر فاکتورهای مختلف فیزیکوشیمیایی در تولید باکتریوسین ارزیابی گردید.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که بیشترین قطر هاله و تولید باکتریوسین علیه باکتری E. coli (۱۷ میلی‌متر) در PH=۵ و میزان تلقیح ۲۰٪ و دمای °۲۵ سانتیگراد و منبع کربن و ازت کمکی به ترتیب گلوکز و عصاره مخمر مشاهده شد. آنالیز واریانس نتایج نشان داد. منبع کمکی ازت و کربن اثر معناداری در تولید داشته‌اند.

نتیجه‌گیری: مقایسه قطر هاله حاصل از باکتریوسین تولید شده در محیط MRS broth بهینه شده نشان داد که تولید باکتریوسین در محیط بهینه‌سازی شده تقریبا ۷۰ (تقریبا ۱/۵ برابر) درصد دارای افزایش می‌باشد و به خوبی از رشد باکتریهای بیماری‌زا جلوگیری می‌کند.

کلید واژه‌ها: پروبیوتیک، باکتریوسین، بهینه سازی، اعضای جنس لاکتوباسیلوس

نحوه استناد به این مقاله: خیراللهی ف، انوری م. تولید باکتریوسین توسط اعضای جنس لاکتوباسیلوس و مطالعه عملکرد ضد میکروبی آن در برابر برخی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی‌ـدرمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۳):۵۳-۶۰

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی میکروبی زنده هستند که با حفظ و یا بهبود تعادل میکروبی روده مصرف‌کنندگان، به نفع سلامت آنها عمل می‌کنند (۱). باکتری‌های پروبیوتیک با توجه به فواید سلامتی آنها، به طور فزاینده‌ای در طول دو دهه گذشته در ماست و شیر تخمیر شده استفاده شده‌اند. اولین مشاهدات از نقش مثبت میکروارگانیسمها اولین بار توسط دانشمند پرآوازه روسی الی مچنیکوف معرفی گردید، کسی که در اوایل قرن بیستم پیشنهاد کرد که امکان تغییر فلور روده‌ای و جایگزینی میکروب‌های مضر با میکروب‌های مفید وجود دارد. مچنیکوف استاد مؤسسه پاستور پاریس این نظریه را مطرح کرد که پدیده پیری در نتیجه فعالیت میکروب‌های عامل گندیدگی (پروتئولیتیک) که در روده بزرگ مواد سمی تولید می‌کنند، حاصل می‌شود. باکتریهای پروتئولیتیک مانند کلستریدیوم‌ها که بخشی از فلور طبیعی روده را تشکیل می‌دهند، از هضم پروتئین‌ها تولید مواد سمی می‌کنند که شامل: فنول‌ها، اندول‌ها و آمونیاک می‌گردد. بر اساس عقیده مچنیکوف این ترکیبات مسئول ایجاد مسمومیت روده بودند که باعث تغییرات فیزیکی مرتبط با پیری می‌شدند. در این زمان مشخص شده بود که شیرهای تخمیر شده با باکتریهای اسید لاکتیک به علت پایین آوردن PH در اثر تخمیر لاکتوز از رشد باکتریهای پروتئولیتیک ممانعت می‌کردند. بیفیدوباکتری‌ها نیز اولین بار از نوزادی که از شیر پستان تغذیه شده بود توسط هنری تیسیرجداسازی گردیدند. باکتری جداسازی شده باسیلوس بیفیدوس نام گرفت و بعداً به جنس بیفیدوباکتریوم تغییر نام داد. تیسیر متوجه گردید که بیفید و باکتری‌ها در فلور روده نوزادان تغذیه شده از شیر پستان غالب هستند و او همچنین فواید کلینیکی از درمان اسهال نوزادان با بیفیدوباکتری‌ها را مشاهده کرد و دریافت که جایگزینی بیفیدوباکتری‌ها با باکتریهای پروتئولیتیک باعث بیماری می‌گردد (۲). لاکتوباسیل‌ها مانند لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، و بیفیدوباکتری‌ها که اغلب به عنوان 'بیفیدوس' خطاب می‌شوند، شایع‌ترین آنها بوده‌اند (۳). شواهد علمی رو به رشدی برای حمایت از این مفهوم وجود دارد که حفظ میکروفلور روده‌ای سالم ممکن است حفاظت در برابر اختلالات گوارشی از جمله عفونت‌های دستگاه گوارش، بیماریهای التهابی روده، و حتی سرطان را فراهم کند (۴). باکتریوسینها پپتیدهای ضد میکروبی ساخته شده توسط ریبوزومها هستند که توسط باکتریها تولید شده و به طور معمول علیه سویه‌های مشابه ارگانیسم تولیدکننده خود فعالیت می‌کنند (۵). پروبیوتیک‌ها علاوه بر تولید باکتریوسین، قادر به تولید سایر متابولیت‌های دیگر با خاصیت ضد میکروبی هستند. این مواد شامل اسیدهای چرب آزاد، اتانول، دی استیل استن، اسید لاکتیک، ۲و۳- بوتان دی ال، استالدئید، بنزوئیک اسید و گلیکوپروتئین‌های با فعالیت بیولوژیک قوی می‌باشند. این مواد با اثر ممانعت کنندگی از رشد سایر میکروارگانیسم‌های واقع در محیط اکولوژیکی پروبیوتیک‌ها در دفاع غیر اختصاصی اهمیت دارند (۶). مطالعات بسیاری توسط پژوهشگران خارجی و داخلی در این زمینه انجام گرفته که از آن جمله می‌توان به بررسی Amel Rehaien و همکاران در سال ۲۰۱۴ اشاره کرد . بر روی انتروکوکوس فکالیس جدا شده از یک محصول لبنی خاص در تونس از نظر تحمل نمکهای صفراوی و مقاومت اسید و شیره گوارشی و خواص چسبندگی تحقیق نموده اند. از ویژگی‌های جالبی که باکتری نشان داد مدت و تحمل عبور از دستگاه گوارش و توانایی بقاء در PH های پایین و نمکهای صفراوی بود. علاوه بر این ژنوم این سویه برای شناختن ژنهای تولیدکننده انتروسین با روش PCR ارزیابی (۷). Mengfei Peng و همکاران در سال ۲۰۱۵ مصرف پری‌بیوتیک و پروبیوتیک به عنوان مکمل غذایی روزانه را روشی مطلوب برای کنترل عفونت های مزمن روده یا بهبود سلامت روده دانسته. با مطالعه اثر لاکتو باسیلوس کازئی بر رشد و حدت خواص پاتوژنهای روده ناشی از اشرشیاکلی EDL933 و سالمونلا تیفی موریوم LT2 و لیستریا مونوسایتوژنز LM2 مورد بررسی قرار دادند. کشت مخلوط لاکتوباسیلوس کازئی با هر یک از عوامل بیماری زا نشان داد که لاکتو باسیلوس کازئی به علت حذف یا مهار رشد ۹۹ درصد از پاتوژنها در ۴۸ ساعت شود (۸). Weerapong Woraprayote و همکاران در سال ۲۰۱۵ با مطالعه بر روی باکتری *Weissella hellenicaBCC7239* جدا شده از سوسیس تخمیر شده گوشت خوک در تایلند که دریافتند که این باکتری قادر است دو باکتریوسین جدید به نام ۷۲۹۳ A، B تولید نماید که هر دو آنها طیف ضد میکروبی وسیعی برای مهار چند پاتوژن گرم منفی غذا (سودوموناس آئروژینوزا، آئروموناس هیدروفیلا سالمونلا تیفی موریوم و اشرشیاکلی) داشتند. بیشترین میزان باکتریوسین درمحیط های کشت MRS و APT در دمای ۳۰ درجه بدون تکانش تولید شدند. باکتریوسین A۷۲۹۳ فعالیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به B۷۲۹۳ نشان داد. با این حال PH و مقاومت حرارتی باکتریوسین ۷۲۹۳ A کمتر بود. فعالیت ضد میکروبی هر دو پپتید نیز توسط حلال‌های آلی (اتانول، استون، استونیتریل وایزوپروپانول) و سورفاکتانت‌ها (توئین ۲۰، توئین ۸۰ و تریتون X-100)تحت تاثیر قرار نگرفت. باکتریوسین ها ۷۲۹۳ A، B7293 دارای اثر ضد باکتری در برابر هر دو نوع گرم مثبت و گرم منفی بدون لیز سلولی بود. از آنجایی که توده مولکولی آنها شبیه به باکتریوسینهای شناسایی شده قبلی بود هر دو باکتریوسین ۷۲۹۳ A، B می‌توانند باکتریوسین جدید باشند. بنابراین از هر دو باکتریوسین جدید می‌توان در برنامه‌های کاربردی و پیشگیری یا درمان عفونت‌های بیماریزا به عنوان غذا و مواد افزودنی به جای آنتی‌بیوتیک‌ها برای افزایش بهره وری مواد غذایی جانداران استفاده

کرد (۹). اما در ایران در مطالعه‌ای که توسط Mirdamadi و همکاران در سال ۱۳۹۰ در تهران انجام گرفت. ۲ سویه از باکتری-های لاکتیک از محصولات لبنی جدا کردند. آنها بااستفاده از رسوبدهی با ایزوپروپانول و آمونیوم سولفات و سپس دیالیز و کروماتوگرافی باکتریوسین را تخلیص نموده و بر روی ۸ سویه استاندارد باکتری گرم مثبت، گرم منفی و مخمر اثر داده شدند. نتایج حاصل نشان داد سویه های جدا شده بومی قادر به تولید مواد باکتریوسینی هستند که به میزان بیشتر علیه *Micrococcus Loteus*، *Staphylococcus epidermidis* و *Bacillus cereus* و به مقدار کمتر بر روی *Listeria monocytogenes* موثر می‌باشد. در بین میکروارگانیسم‌های شاخص *Micrococcus Loteus* به عنوان حساس‌ترین باکتری و *Candida albicans* به عنوان مقاوم‌ترین ارگانیسم شناخته شدند (۱۰). در تحقیقی دیگر که توسط الهه کیایی و همکاران در سال ۱۳۸۵ در گرگان انجام گرفت اثر ضد باکتریایی ۹۶ سویه باکتری اسید لاکتیک جدا شده از ۳۶ نمونه ماست محلی بر علیه ۷ گونه مهم پاتوژن‌های گوارشی به خصوص *Shigella dysenteriae*، *Yersinia enterocolitica*، E.coli و *Salmonella typhimurium* با دو روش انتشار در آگار به کمک دیسک و روش چاهک با استفاده از محلول رویی تهیه شده از محیط کشت باکتریها بررسی گردید. قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک و چاهک اندازه‌گیری شد و به منظور کاهش خطا، هر آزمون حداقل سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله عدم رشد روی محیط مولرهیتون آگار اندازه‌گیری و ثبت شد. نتایج به دست آمده نشان داد که بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به گونه‌های L. casei و L. lactis در روش چاهک بود و حداکثر میانگین قطر هاله عدم رشد آنها ۱۸ میلی‌متر ارزیابی شد. بیشترین و کمترین اثر مهاری علیه باکتری های پاتوژن به ترتیب روی یرسینیا انتروکولیتیکا و باسیلوس سرئوس مشاهده شد (۱۱). با توجه به اهمیت تولید باکتریوسین توسط اعضای جنس لاکتوباسیلوس و نقش مهم بالینی این ماده،این تحقیق با هدف تولید و بهینه سازی آن و همچنین بررسی اثر ضد میکروبی محصول تولید شده روی میکروارگانیسم های بیماری زا صورت پذیرفت.

روش‌کار

کشت از دو نوع ماست کم چرب پاستوریزه شرکت های کاله و سارا با انتقال مستقیم نمونه ها توسط فیلدوپلاتین بر روی محیط MRS آگار استریل با تکنیک کشت خطی انجام شد. بعد از کشت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت در شرایط microaerophile در جارحاوی دی اکسیدکربن انجام گرفت. محیط MRS agar محیطی اختصاصی برای رشد و جداسازی باکتری های اسید لاکتیک است نیازهای پیچیده آنها را فراهم میسازد کشت داده شد این محیط دارای رنگ قهوه‌ای شفاف و حاوی استات سدیم است که رشد بسیاری از باکتریهای رقیب را سرکوب می‌کند. اگرچه بعضی از باکتری های لاکتیک مانند لوکونوستوک Leuconostoc و پدیوکوکوس Pediacoccus ممکن است رشد کنند. ۸۰ Polysorbate در این محیط سورفاکتانتی است که به جذب مواد مغذی توسط لاکتوباسیل‌ها کمک می‌کند. سولفات منیزیم و سولفات منگنز موجود در محیط برای ارائه کاتیون های مورد نیاز در سوخت و ساز بکار می‌روند. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون از نمونه‌ها لام تهیه شد و رنگ‌آمیزی گرم انجام گرفت. برای اثبات وجود لاکتوباسیلوس مورفولوژی نمونه‌ها زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. و برخی آزمایشات نظیر تست کاتالاز، حرکت، انعقاد شیر، تحمل فنل، تحمل Nacl انجام پذیرفت. با استفاده از این آزمایش می‌توان وجود آنزیم کاتالاز را در باکتری مشخص نمود. در صورتی که باکتری واجد آنزیم کاتالاز باشد، با اضافه کردن آب اکسیژنه به کلنی برداشته شده باکتری بر روی لام، واکنش انجام شده به صورت تولید آب و اکسیژن بوده که به صورت حباب‌هایی نمایان می‌گردد. در صورتی که باکتری فاقد آنزیم کاتالاز باشد، بعد از اضافه نمودن کلنی، هیچ-گونه تغییری ایجاد نمی‌گردد و در نهایت باکتری کاتالاز منفی می-باشد (۱۲). به منظور تست حرکت از محیط SIM استفاده و پس از کشت به مدت ۴۸ ساعت در جار میکروائروفیل گرمخانه‌گذاری و نتایج حرکت یا عدم حرکت باکتریها بررسی شد. مثبت بودن حرکت با تشکیل توده ابرمانند پس از تلقیح در محیط تأیید گردید. برای آزمایش انعقاد شیر در محیط Skim milk کشت انجام شد و پس از ۴۸ ساعت تحت شرایط میکروائروفیل گرمخانه‌گذاری انجام شد. به منظور تست تحمل فنل ۱ گرم فنل در ۱۰ میلی لیترآب مقطرحل شده و از محلول حاصله ۴۰۰ میکرولیتر به لوله-های حاوی MRS براث استریل افزوده شد تا فنل ۰/۴ ٪ تهیه شود. ۱۰۰ میکرولیتر باکتری به هرلوله افزوده شد و به مدت ۴۸ ساعت داخل انکوباتور ۳۷°C و در جار میکروائروفیل قرار گرفت. سپس نتایج به صورت ایجاد کدورت برای تست مثبت و عدم ایجاد کدورت لوله‌ها برای مورد منفی مشخص شدند. برای تست تحمل Nacl از رقت‌های ۱ تا ۱۰ درصد Nacl استفاده شد. ۱ میلی لیتراز هر غلظت به محیط MRS broth افزوده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری به محیط ها تلقیح کرده و لوله‌ها داخل جار بی هوازی و انکوباتور به ۳۷°C به مدت ۴۸ساعت قرار گرفتند. نتیجه تست با مشاهده ایجاد کدورت بررسی گردید. پس از بررسی اثر ضد میکروبی مستقیم به محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ سولفات آمونیوم (۴۰ درصد v/v) اضافه شد و روی همزن برقی به مدت سه ساعت در مجاور یخ همزده شد و پس از آن به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شد. روز بعد مایع داخل ارلن ها به مدت ۳۰ دقیقه در 6000(rpm) سانتریفیوژ شد محلول رویی دور ریخته شد و

رسوبات با دقت جمع‌آوری گردید. به رسوب حاصله بافر فسفات سدیم ۵٪ مولار با PH=۶ به حجم ۵۰۰ میکرولیتر اضافه گردید و رسوبات به خوبی حل شد. این ماده به عنوان باکتریوسین خالص شده برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. جهت بررسی اثر ضد میکروبی باکتریوسین به روش ژل دیفیوژن از باکتری‌های E.coli و *Staphylococcus aureus* استفاده شد. ابتدا از محیط کشت مایع، باکتری با کدورت استاندارد با سواپ استریل درسطح محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد و سپس چاهک هایی به قطر ۳–۵ میلی متر در مرکز پلیتها حفر گردید. برای جلوگیری از پخش شدن مواد در زیر پلیت، ته هر کدام از چاهک ها با یک قطره آگار مسدود گردید. سپس از محلول رسوبات حل شده در بافر فسفات سدیم به اندازه ۵۰ میکرولیتر در داخل چاهک‌ها ریخته وبه مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه کرده و سپس قطرهاله‌های عدم رشد بررسی گردید (۱۳). برای بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین به روش دیسک دیفیوژن آگار در مرحله اول دیسکهای بلانک تهیه شده، استریل شدند سپس با پنس استریل داخل محلول باکتریوسین (حل شده در بافر فسفات سدیم) قرار گرفتند تا کامل مرطوب شدند سپس این دیسک‌ها داخل یک پلیت خالی استریل گذاشته تا خشک شدند، سپس به طور جداگانه در مرکز پلیت حاوی محیط نوترینت آگار کشت داده شده با باکتری‌های E.coli و *Staphylococcus aureus* قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شده و سپس قطر هاله عدم رشد بررسی گردید. به منظور بهینه سازی تولید باکتریوسین از نرم افزار Minitab 16 و روش طراحی آزمایش تاگوچی استفاده گردید. در این روش ۵ فاکتور فیزیکوشیمیایی شامل دمای انکوباسیون، PH، منابع ازت و کربن کمکی و میزان تلقیح در ۴ سطح طراحی گردیدند و اثر ضد میکروبی باکتریوسین در سطوح منابع ازت، بررسی میزان تلقیح در تولید باکتریوسین و میزان فعالیت ضد باکتری باکتریوسین در PH های مختلف مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۳–۳). لازم به ذکر است که اندازه‌گیری تولید باکتریوسین در پیش آزمایشات پس از ۱۰ و ۲۴ و ۷۲ ساعت از شروع کشت انجام شد. پیش آزمایش نشان دهنده بیشترین تولید در ساعت دهم از شروع رشد میکرو ارگانیسم در محیط کشت مایع بود و به همین دلیل تمامی آنالیزها جهت بررسی میزان تولید در ساعت دهم از شروع کشت انجام شد و چون بیشترین قطر هاله عدم رشد در پیش آزمایشات متعلق به Ecoli بود آزمایشات بهینه‌سازی بر روی همین باکتری انجام شد. همچنین از بررسی اثر ضد میکروبی اولیه در پیش آزمایشات لاکتوباسیلی که بهترین اثر ضد میکروبی را نشان داد بررسی اثرمهاری در آزمایشات بهینه سازی صرفا روی همین باکتری انجام شد .

یافته‌ها

پس از ۴۸ ساعت تشکیل کلنی‌ها حاکی از این بود که باکتری ها در محیط MRS رشد کرده‌اند. کلنی‌ها به رنگ سفید و گرد با سطحی صاف و به اندازه حدود ۲ تا ۳ میلی‌متر بودند. خصوصیات میکروسکوپی بر اساس رنگ‌آمیزی گرم نشان داد که باکتری به شرح ذیل است. گرم مثبت، میله‌ای شکل، آرایش نا مشخص، طول باکتری‌ها، بین ۱۰–۵ میکرومتر، غیراسپورزا. در مجموع ۵ سویه باکتریایی جدا شده و از سویه های جداسازی شده ۵ کلنی انتخاب گردید و جهت شناسایی آزمایشات ادامه یافت. برای باکتری‌های جدا شده از ماست‌ها، تست‌های شناسایی لاکتوباسیل ها انجام گردید. جهت تست کاتالاز پس از اضافه کردن آب اکسیژنه به کلنی برداشته شده از باکتری برای همه نمونه‌ها حباب گاز تشکیل شد و مشخص گردید که باکتری دارای آنزیم کاتالاز و کاتالاز مثبت است. برای تست حرکت پس از طی زمان انکوباسیون نتایج بررسی شد. در تمامی لوله‌ها در اطراف محل تلقیح با آنس، توده ابر مانند تشکیل شده بود و مثبت بودن حرکت هم بدین صورت اثبات گردید. برای تست انعقاد شیر پس از طی زمان انکوباسیون، لوله‌ها از نظر نتایج بررسی شدند. باکتری‌ها در انتهای لوله تشکیل لخته داده بودند و تست انعقاد شیر مثبت بود، و جهت تست تحمل فنل تمام لوله های کشت داده شده برای این منظور، پس از پایان زمان انکوباسیون بررسی شدند. هیچ کدام از لوله‌های حاوی فنل و نمونه، کدورت نداشتند و این تست برای همه باکتریها منفی بود.

در تست Nacl در غلظت ۱ تا ۱۰ درصد تحمل Nacl مبنای تشخیص بهترین رشد از نظر ظاهری کدورت لوله‌ها بوده است که نشان دهنده رشد باکتری میباشد. برای بررسی رشد در کشت مایع کدورت ایجاد شده در محیط **MRS** براث نشانه رشد باکتری‌ها بود. نتایج مربوط به تولید باکتریوسین با اندازه گیری وزرن رسوب (طبق پروتکل استاندارد)و نتایج مرتبط با مهار رشد با اندازه گیری هاله عدم رشدمشخص گردید. در فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین به روش ژل دیفیوژن مرحله میزان عدم رشد سویه‌های لاکتوباسیل علیه سویه‌های بیماریزا بررسی گردید (جدول شماره ۱).

جدول ۱: نتایج قطر هاله عدم رشد لاکتوباسیلوسهای جدا شده از ماست بر باکتریهای بیماریزا

سویه لاکتوباسیلوس جداسازی شده	قطر هاله عدم رشد استافیلوکوک اورئوس(بر حسب میلی متر)	قطر هاله عدم رشد اشرشیاکولی(بر حسب میلی متر)
L1	۸	۱۰
L2	۴	۵

جدول۲: آنالیز واریانس داده‌ها

منبع	DF	Seq SS	P-valu
منبع کربن کمکی	۳	۰/۲۱۷۱۲۱	۰/۰۰۶
منبع ازت کمکی	۳	۰/۱۲۲۴۱۴	۰/۰۱۷
تلقیح	۳	۰/۰۱۳۸۴۷	۰/۱۰۹
دما	۳	۰/۰۴۵۶۰۴	۰/۰۸۶
PH	۳	۰/۱۲۳۵۱۴	۰/۴۸

همانطور که مشاهده می‌شود دو فاکتور منبع کربن کمکی و منبع ازت کمکی اثر معناداری در تولید باکتریوسین نشان داد..

جدول۳: نتایج آزمایشات ۱۶ گانه بهینه سازی تولید باکتریوسین توسط سویه لاکتوباسیلوس

شماره بستر	PH	دمای انکوباسیون (درجه سانتی گراد)	میزان تلقیح ٪(v/v)	نوع منبع ازت کمکی	نوع منبع کربن کمکی	قطرهاله عدم رشد(میلی متر)
۱	۴	۲۵	٪۵	۰	۰	۷
۲	۵	۳۰	٪۱۰	پپتون	۰	۹
۳	۶	۳۵	٪۱۵	عصاره مخمر	۰	۱۰
۴	۷	۴۰	٪۲۰	سولفات آمونیوم	۰	۸
۵	۷	۳۵	٪۱۰	۰	گلوکز	۹
۶	۶	۴۰	٪۵	پپتون .	گلوگز	۹
۷	۵	۲۵	٪۲۰	عصاره مخمر	گلوکز	۱۷
۸	۴	۳۰	٪۱۵	سولفات آمونیوم	گلوکز	۱۰
۹	۵	۴۰	٪۱۵	۰	زایلوز	۱۱
۱۰	۴	۳۵	٪۲۰	پپتون	زایلوز	۹
۱۱	۷	۳۰	٪۵	عصاره مخمر	زایلوز	۱۲
۱۲	۶	۲۵	٪۱۰	سولفات آمونیوم	زایلوز	۶
۱۳	۶	۳۰	٪۲۰	۰	گالاکتوز	۸
۱۴	۷	۲۵	٪۱۵	پپتون	گالاکتوز	۱۰
۱۵	۴	۴۰	٪۱۰	عصاره مخمر	گالاکتوز	۱۳
۱۶	۵	۳۵	٪۵	سولفات آمونیوم	گالاکتوز	۱۲

در پیش آزمایشات بدون بهینه‌سازی بیشترین قطر هاله عدم رشد توسط سوش لاکتوباسیلوس L1 جدا شده از ماست سارا برای باکتری اشرشیاکلی اندازه ۱۰ میلی‌متر و برای استافیلوکوک قطر هاله ۸ میلی‌متر بود. نتایج در روش دیسک دیفیوژن آگار بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون مورد بررسی قرار گرفت هاله عدم رشد مشاهده نشد. همان‌طور که در جدول شماره ۳ مشاهده گردید بهترین شرایط برای تولید باکتریوسین در بستر شماره ۷ بوده است. لذا بهترین تولید در PH =۵ و دمای ۲۵° و میزان تلقیح ۲۰٪ (V/V) بوده وگلوکز و عصاره مخمر به ترتیب به عنوان بهترین منبع کربن کمکی و منبع ازت کمکی بوده است که در تولید ایفای نقش کرده اند .در این شرایط قطر هاله عدم رشد برای باکتری به ۱۷ میلی متر می رسد که در مقایسه با آزمایشات بدون بهینه سازی به طور قابل توجهی بالاتر است و نشان از افزایش تولید باکتریوسین دارد.

بحث

این تحقیق با هدف بررسی توانایی میکروارگانیسمهای پروبیوتیک تولیدکننده باکتریوسین مورد استفاده در صنایع لبنی و عوامل تاثیرگذار بر تولید آنها انجام شده است. طی روش طراحی آزمایش تاگوچی با مطالعه اثر پنج فاکتور در چهار سطح به ترتیب مشخص گردید که فاکتورهای منبع کربن کمکی، منبع ازت کمکی در تولید باکتریوسین اثر معنادار داشته و PH و میزان تلقیح و دمای انکوباسیون اثر معناداری در تولید نداشته است. تاگوچی یک روش در طراحی آزمایش است که مزایایی نسبت به روش‌های سنتی دارد. روشهای سنتی بهینه‌سازی فرایندهایی زمان بر هستند و واکنش میان متغیرهای متقابل فیزیکو شیمیایی قابل بررسی نیست اما تاگوچی تاثیرات منبع کربن و ازت کمکی، در صد تلقیح، درجه حرارت و PH را به صورت منفرد و متقابل بر تولید باکتریوسین توصیف می‌کند (۱۴). در میان بسترهای مورد آزمایش بستر ۷ بیشترین قطر هاله عدم رشد را بر باکتری E. coli نشان داد که ۱۷ میلی‌متر بود. این میزان قطر هاله عدم رشد درPH=۵ و میزان تلقیح ۲۰٪ و دمای ۲۵° سانتی‌گراد ومنبع کربن و ازت کمکی به ترتیب گلوکز و عصاره مخمر نشان داده شد. PH فاکتوری مهم برای رشد باکتری‌هاست انواع مختلف لاکتوباسیلها قادرند PH بین ۹-۱ را تحمل کنند اما رشد مطلوب آنها معمولا در PH بین ۲ تا ۵ انجام می‌شود (۱۵). گرچه تحلیل آماری نشان داد که بهترین PH اثر معناداری در تولید باکتریوسین ندارد اما بررسی اثر تک فاکتور نشان داد که بهترین PH برای تولید بیشترین میزان باکتریوسین PH=۵ است. بر اساس نظر poolman و koning مصرف ترکیبات

پپتیدی در آب پنیر (که یکی از شاخص‌های رشد محسوب می‌شود) به PH بستگی دارد. PH بهینه برای گونه lactis ۶/۵ تعیین شده است. بدان گونه که در مقادیر بالاتر یا پائین تر از این مقدار رشد بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد (۱۶). باتوجه به این که تولید باکتریوسین‌ها از ساعت ابتدایی فاز لگاریتمی آغاز می‌شود و تا قبل از رسیدن به نقطه اوج آن پایان می‌یابد (حداکثر تا ۱۰ ساعت از شروع کشت) PH تاثیرگذار بر رشد اثر مستقیم بر تولید باکتریوسین‌ها خواهد داشت. **مژگانی** و همکاران در تحقیق خود در خصوص بررسی ویژگیهای باکتریوسین لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس در یافتند که گرچه این باکتریوسین در PH های بین ۳تا۱۱ فعال بوده اما بهترین فعالیت ضد میکروبی خود را در PH بین ۵ تا ۶ نشان داد (۱۷). بنابراین به نظر می‌رسدکه هم بهینه PH تولید و هم بهینه فعالیت باکتریوسین در این محدوده است. علاوه بر موارد ذکر شده به نظر میرسد PH های پایین‌تر از ۵ و بالاتر از ۷ باعث تغییر در ساختار پروتئینها بویژه باکتریوسین‌ها می‌گردند (۱۸). در این تحقیق گرچه میزان تلقیح اثر معنی‌داری بر تولید باکتریوسین نشان نداد اما بررسی اثر تک فاکتورها نشان داد در میان در صدهای تلقیح مورد آزمایش بیشترین میزان هاله عدم رشد در۲۰٪ (V/V)تلقیح مشاهده گردید. درجه حرارت از سایر فاکتورهای تاثیرگذار بر تولید باکتریوسین مورد بررسی در این تحقیق بود. آنالیز آماری نشان داد که بین درجه حرارت در میزان تولید باکتریوسین (قطر هاله عدم رشد) رابطه معنادار وجود ندارد (P>۰/۰۵). ولی مطالعه اثر تک فاکتورها توسط نرم افزار نشان داد در درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی گراد بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد حاصال می گردد. تحقیقات مختلف نشان داده است که بهینه رشد برای انواع پروبیوتیکهای لبنی و غیر لبنی در محدوده ۳۰-۳۵°c است و در درجه حرارت‌های بالاتر از آن بقای ارگانیسم‌ها کاهش می‌یابد. در تحقیق انجام شده توسط Ana Lúcia و همکاران در رابطه با تولید نوشابه آب سیب پروبیوتیک توسط لاکتوباسیلوس کازئی که در محدوده دمایی ۱۰°c تا ۴۱ انجام شد، بهترین نتیجه (از نظر بیومس تولیدی و بقای آن) در حرارت ۳۰°c حاصل گردید. در ارتباط متقابل PH و درجه حرارت آنها دریافتند که در مقادیر مختلف PH بهترین درجه حرارت رشد در محدوده ۳۰°c تا۳۵ می‌باشد (۱۹). بدیهی است درجه حرارت‌های بسیار پایین از طریق تاثیر بر تبادلات مولکولی و کند کردن انتقال مواد غذایی باعث کندی رشد باکتریها می‌گردند. در مورد پروبیوتیک‌ها نگهداری طولانی مدت در دماهای سردخانه (۴°c) بتدریج ماندگاری آنها را کاهش می‌دهد و لذا زمان نگهداری همواره محدود است. از سویی دیگر درجه حرارتهای بالا از طریق تقلیب یا ایجاد دگرگونی در ساختار پروتئینها به رشد میکرو ارگانیسم‌ها آسیب وارد می‌سازد.در خصوص بهینه سازی تولید با استفاده از منابع کربن آنالیز آماری نشان داد که بین انواع منابع مختلف کربن کمکی و تولید باکتریوسین رابطه معنادار وجود دارد (P<۰/۰۵). و قند گلوکز بهترین منبع کربن کمکی در تولید باکتریوسین است. محققان مختلف اثر منابع کربن کمکی را بر رشد لاکتوباسیلوسها و تولید بیومس مورد بررسی قرار داده‌اند. منبع ازت از ضروریات رشد میکروارگانیسمها به منظور ساخت پروتئینها و بازهای آلی است. تحقیق حاضر نشان داد که میان نوع منبع ازت کمکی و تولید باکتریوسین رابطه معنادار وجود دارد (P<۰/۰۵). بهترین منابع ازت کمکی در این تحقیق عصاره مخمر بوده که استفاده از آن منجر به تولید بیشترین میزان باکتریوسین گردید.در این شرایط قطر هاله عدم رشد باکتریوسین تولیدی توسط سویه لاکتوباسیلوس (L1)در برابر باکتری اشرشیاکلی ۱۷ میلی متربود.

نتیجه‌گیری

در تحقیق انجام شده ابتدا باکتریوسین توسط لاکتوباسیلوس جدا شده از ماست تولید و سپس تولید باکتریوسین با استفاده از روش طراحی آزمایش تاگوچی (Minitab16) بهینه سازی گردید. و سپس اثرآن روی دو باکتری E.coli و *Staphylococcus aureus* با دو روش دیسک و ژل دیفیوژن بررسی گردید. نتایج اولیه نشان-دهنده اثر مهاری باکتریوسین تولیدی بود. سپس با روش تاگوچی بهینه‌سازی گردید و بهترین شرایط تولید بستر شماره آزمایش ۷ از میان بسترهای ۱۶ گانه آزمایشی بود. این شرایط شامل PH=۵ و میزان تلقیح ۲۰٪(V/V) و دمای ۲۵° سانتی‌گراد و منبع کربن و ازت کمکی به ترتیب گلوکز و عصاره مخمر بوده و قطر هاله آن برابر ۱۷ میلی‌متر حاصل گردید. مقایسه قطر هاله حاصل از باکتریوسین تولید شده در دو محیط MRS براث و MRS براث بهینه شده نشان داد که تولید باکتریوسین در محیط بهینه‌سازی تقریبا ۷۰ درصد دارای افزایش می‌باشد .

قدردانی

بدین ترتیب نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت که در طول انجام پایان‌نامه کارشناسی ارشد همکاریهای لازم را مبذول داشتند ابراز می‌دارند. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده رابط با کد شناسایی ۶۱۳۳۰۵۰۷۹۴۱۰۱۴ دانشگاه آزاد واحد رشت می‌باشد. ملاحظات اخلاقی شامل مقاله فوق نمی‌باشد.

این مقاله منابع مالی ندارد.

منافع متقابل: نویسندگان این مقاله اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مولفان: ف . خ و م. الف طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشته و مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده‌اند.

References

1. Fullera R. Probiotics in man and animals. A FRC Institute of Food Research, Reading Laboratory، Shinjeld, Reading RG2 9AT. *Journal of Applied Bacteriology* 1989; **66**: 365-378.
2. CarmenCollado M, Meriluoto J, Salminen S. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International* 2007; **40**(5): 629-636. doi: 10.1016/j.foodres.2006.11.007
3. Daly C, Davis R. The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health. *Agric Food Sci* 1998; **7**(2): 251-265. doi: 10.23986/ afsci.72862
4. Salminen J S, Ouwehand A, Isolauri E. Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal* 1998; **8**(5-6): 563-572. doi: 10.1016/S0958-6946 (98)00077-6
5. Bierbaum G, Sahl H-G. Lantibiotics: Mode of Action، Biosynthesis and Bioengineering. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2009; **10**(1): Page: [2-18] Pages: 17. doi: 10.2174/138920109787048616
6. Gorbach S L. Lactic acid bacteria and human health. *Annl Med* 1990; **22**(1): 37-41. doi: 10.3109/07853899 009147239
7. Malmsten M. Antimicrobial Peptides. *Ups J Med Sci* 2014; **119**(2): 199-204. doi: 10.3109/03009734.2014. 899278
8. Mengfei Peng. *Recent International Journal of Food Microbiology Articles. Microbiological Research* 2014; **170**: 35-36. doi: 10.1016/j.micres.2014.09.004
9. Weerapong Woraprayote, Laphaslada P, Amonlaya T. *Kyushu* 2015; **12**: 176-184. doi: 10.1016/j.foodcont. 2015.02.036
10. Mirdamadi S, Tangestani M. Screening and characterization of bacteriocins produced by some Strains of Lactobacillus spp isolated from Iranian Dairy products. *Internet Journal of Nanotechnology* 2011; **3**: 55-69. doi:10. 5580/28a1
11. Kiaee A, Mozaffar A. Antagonistic effect of *lactic bacteria* present in yoghurt against pathogenic *bacteria. Journal of* Gorgan *University of* Medical *Sciences* 2006; **1**: 28-33. doi: 10.18869/acadpub.mlj. 9.5.4
12. Hoque M Z, Akter F, Hossain K M. Isolation، Identification and Analysis of Probiotic Properties of Lactobacillus Spp. *Selective Regional Yoghurts* 2015. doi: 10.3923/pjn.2015. 67.74
13. Kumar A, Rajput G, Dhatwalia V K, Srivastav G. Phytocontent screening of Mucuna seeds and exploit in opposition to pathogenic microbes. *Journal of Biological and Environmental Sciences* 2015; **3**(9). doi: 10.3844/ ojbsci.2015.111.112
14. Mukherjee A K, Rai S K. A statistical approach for the enhanced production of alkaline protease showing fibrinolytic activity from a newly isolated Gram-negative Bacillus sp. strain AS-S20-I. *New Biotechnology* 2011; **28**: 182-189. doi: 10.1016/j.nbt. 2010.11.003
15. Chowdhury A, Nur J, Fakruddin M, Billah M, Morshed Ahmed M. Screening of Lactobacillus SPP. from buffalo Yoghurt for Probiotic and Antibacterial activity. *J bacterial Parasitol* 2012; **3**: 8. doi: 10.4172/ 2155-9597.1000156
16. Konings WN1, Kok J, Kuipers O P, Poolman B. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr Opin Microbiol* 2000; **3**(3): 276-282. doi: 10.1016/ S1369-5274 (00)00089-8
17. Mojgani N, Kahaniyan E, Amelli M. Detection and characterization of bacitracin RN78 produced by lactobacillus acidoPHilus strain isolated from a cheese sample. *Pajouhesh-Va-Sazandegi* 2005; **71**.
18. Astaneie F, Afshari M, Mojtahedi A. Total antioxidant capacity and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in blood and saliva of insulin-dependent diabetic patients، Jour. *Arch Med Res* 2005; **36(**4): 376-381. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.03.007
19. Ana Lúcia F P, Tatiane C M, Sueli R. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with Lactobacillus case. *In AGRIS since* 2014; **44**(5): 1276-1283. doi: 10.1016 /j.foodres.2010.11.035