فصلنامه

شناخت و کاربرد گیاهان دارویی

سال اول، شماره ۴، بهار ۸۸صفحات ۶۰- ۵۱

بررسی تاثیر بیولوژیک گیاه دارویی شیرپنیر (*Galium verum*) بر تولید یک متابولیت میکروبی

مهسا یگانه*

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران

آنیتا خنافری

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروب شناسی، تهران، ایران

محمدرضا فلاحیان

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروب شناسی، تهران، ایران

انوشه شریفان

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران

محل انجام پژوهش: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۱۱ **تاریخ پذیرش:** ۸۹/۱۲/۳

چکیده

هدف از انجام این تحقیق، بررسی تاثیر زیستی شیرپنیر (*Galium verum* L.) بر روی تولید انتروسین توسط انتروکوک می‌باشد. پس از کشت انتروکوک ها با مشخصه PTCC ۱۳۹۳ و ATCC ۱۱۷۰۰ در محیط کشتBHI agar و سانتریفیوژ و جداسازی توده میکروبی، ترکیب ضدباکتری آن توسط روش دیالیز خالص سازی شد و به وسیله الکتروفورزSDS-PAGE، وزن مولکولی آن تخمین زده شد. میزان انتروسین تولید شده توسط روش لوری تعیین شد. اثر ضدباکتری انتروسین حاصل بر باکتری‌های شاخص گرم مثبت و گرم منفی به روش چاهک مورد بررسی قرار گرفت. سپس به منظور ارزیابی تاثیر بیولوژیک گیاه *Galium verum* بر روی تولید انتروسین، عصاره حاصله از گلبرگ‌های گیاه به نسبت ۵۰:۵۰ با سوسپانسیون تهیه شده از باکتری با میزان جذب نور یک ترکیب شد و تمامی مراحل، مجدداً تکرار گردید. نتایج حاصل از این تحقیق ثابت نمود که وزن مولکولی ترکیب استخراج شده ۴۵ کیلودالتون، مشابه با وزن مولکولی انتروسین است. واحد فعالیت، فعالیت کل، فعالیت اختصاصی این ترکیب پس از دیالیز افزایش یافت. واحد فعالیت، فعالیت کل، فعالیت اختصاصی و غلظت پروتئین در نمونه‌های حاوی عصاره *Galium verum* بیشتر از نمونه‌های شاهد (نمونه‌های حاوی انتروسین و فاقد *Galium verum* بود. با توجه به نتایج به دست آمده از این گیاه *Galium verum* می‌تواند بر روی میزان تولید انتروسین تاثیر سینرژیسمی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: اثر ضدباکتری، انتروسین، انتروکوک فکالیس، شیر پنیر

* نویسنده مسئول: Email: mahsayeganeh19@yahoo.com

مقدمه

Galium verum گیاهی از تیره روناس (Rubiaceae) است. این گیاه دارای اسیدهای آلی نظیر اسید گالی‌تانیک و اسید سیتریک همراه با نوعی ماده قرمز رنگ از گروه آلیزارین (Alizarine) می‌باشد. این گیاه دارای خواص درمانی بسیاری است. بخش‌های هوایی این گیاه دارای اثرات خفیف آرام بخش، مدر، قابض و ضدتشنج هستند. گیاه در درمان سنگ‌های صفراوی و سایر مشکلات ادراری موثر است (۱).

باکتری انتروکوک که بحث برانگیزترین باکتری از گروه باکتری‌های اسیدلاکتیک است، نقش بسزایی در مواد غذایی و سلامتی انسان ایفا می‌نماید. از این گذشته، تولید انتروسین (باکتریوسین تولید شده از انتروکوک‌ها) توسط انتروکوک‌ها که باعث جلوگیری از رشد سایر باکتری‌های بیماری‌زا و مولد فساد مواد غذایی می‌شود، نیز بخوبی ثابت شده است. انتروسین‌ها، پروتئین‌های فعال بیولوژیکی هستند که خصوصیات ضدمیکروبی در مقابل گونه‌های خیلی نزدیک، مربوط به ارگانیسم تولید کننده نشان می‌دهند (۲). به طور کلی، انتروسین‌ها، پروتئین‌های کوچکی هستند که شامل ۳۰ تا ۶۰ اسید آمینه با یک نقطه ایزوالکتریک بالا می‌باشند که در ارگانیسم تولید کننده، دارای طیف عمل، وزن مولکولی و خصوصیات بیوشیمیایی متنوع هستند (۳). از دیگر مزایای این پروتئین‌ها این است که آن‌ها غیر سمی هستند، بطور آسان هضم می‌شوند، هیچ باقیمانده‌ای در غذا باقی نمی‌گذارند، مقاوم به اسید و گرما هستند و می‌توانند برای افزایش سلامت و طول عمر بسیاری از مواد غذایی مورد استفاده قرارگیرند (۴).

هدف از انجام این تحقیق، بررسی نقش بیولوژیک *Galium verum* در تحریک تولید انتروسین توسط انتروکوکوس فکالیس (PTCC۱۳۹۳) می‌باشد و لزوم استفاده از این گیاه دارویی و سینرژیسم را توسعه می‌دهد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های میکروبی

سویه‌ای از باکتری *انتروکوکوس فکالیس* (*Enterococcus faecalis*) (PTCC **۱۳۹۳**) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و چهار باکتری بیماریزای جدا شده از نمونه‌های کلینیکی شامل باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس ارئوس* (*Staphylococcus aureus*) (PTCC ۱۱۱۳)، *لیستریا مونوسیتوژنز*(*Listeria monocytogenes*) (PTCC ۱۱۶۵) و باکتری‌های گرم منفی، *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) (PTCC ۱۱۵۴) و *کلبسیلا پنومونیه* (*Klebsiella pneumoniae*) (PTCC ۱۰۵۳) از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال تهیه شدند. انتخاب این سویه‌های بیماری‌زا 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 سویه انتروکوکوس، سویه باکتریایی لیوفیلیزه پودری در ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت Brain heart Heart Infusion) BHI broth broth) حل شد و بدین ترتیب، سوسپانسیونی از باکتری ایجاد شد. سپس، به منظور رشد باکتری، محیط حاوی باکتری، به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور $37\ ^{\circ}C$ قرار گرفت (۵).

شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی سوش انتروکوکوس

مشخصات ماکروسکوپی کلنی‌های انتروکوکوس، در عمق محیط کشت، از قبیل شکل، اندازه و مشخصات میکروسکوپی توسط رنگ‌آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند (۶).

تایید جنس انتروکوکوس با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی

به منظور تایید باکتری انتروکوکوس، از آزمون‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز و توانایی استفاده از قندهای لاکتوز، ساکارز، آرابینوز، سوربیتول، مانیتول و هیدرولیز اسید آمینه آرژنین استفاده شد (۵).

ارزیابی نمودار رشد

بـه مـنظور ارزیـابی نمـودار رشـد باکتری جدا شده از

کشت‌های ۲۴ ساعته، پس از رسیدن میزان جذب نور (OD) سوسپانسیون باکتری توسط طیف نورسنج در طول موج nm ۶۰۰، در محدوده ۱-۰/۸، سوسپانسیون حاصله به عنوان کشت تلقیح استفاده شد و به نسبت ۵٪ به محیط کشت BHI broth و حاوی ۱٪ سوکسینات آمونیوم افزوده شد. نمونه‌ها در انکوباتور $^{\circ}C$ ۳۷ و اتمسفر ۵٪ CO_2 گرمخانه گذاری شدند. میزان جذب نور (OD) نمونه‌ها توسط طیف نورسنج در طول موج nm ۶۰۰، هر ۲ ساعت یک‌بار تعیین و نمودار رشد باکتری‌ها رسم شدند (۶).

استخراج ترکیب ضدمیکروبی

از باکتری انتروکوکوس، کشت تلقیح مطابق با رسیدن میزان جذب نور (OD) نمونه در محدوده ۱-۰/۸ تهیه شد و به نسبت ۵٪ به محیط کشت BHI broth و حاوی ۱٪ سوکسینات آمونیوم انتقال داده شد. سویه مورد نظر تا زمان ۴۸ ساعت در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ گرمخانه گذاری شد. سپس، به منظور بررسی تاثیر ضدمیکروبی نمونه‌های ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعته، pH محیط کشت توسط دستگاه pH سنج و با افزودن محلول ۱ مولار NaOH، در محدوده ۷ تا ۷/۵ تنظیم شد. پس از خنثی‌سازی سوسپانسیون میکروبی محیط کشت، در شرایط استریل و در دمای $^{\circ}C$ ۴ و به مدت ۵۰ دقیقه در rpm ×۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد و توده سلولی تولید شده جداسازی گردید. جهت استخراج ترکیب ضدمیکروبی موجود در محیط کشت، فاز مایع حاصله از نمونه‌های سانتریفیوژ شده ۲۴ ساعته (مطابق با منحنی رشد در فاز لگاریتمی رشد قرار داشتند) به آرامی به ارلن استریل انتقال داده شد. ارلن به ظروف حاوی یخ بر روی همزن مغناطیسی انتقال داده شد و به نسبت ۵۰٪ حجم موجود در ارلن، سولفات آمونیوم افزوده شد. نمونه‌ها به مدت یک شب در یخچال $^{\circ}C$ ۴ قرار داده شدند تا سولفات آمونیوم به خوبی حل شود. محتویات ارلن شامل رسوبات حاصله و محلول حاوی رسوب به لوله‌های استریل منتقل شدند و در دمای $^{\circ}C$ ۴ به مدت ۵۰ دقیقه در rpm×۱۶۰۰۰ سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی جدا شده و رسوب حاصله در یک میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار و دارای pH ۷ حل گردید و محلول‌های رویی و رسوبات پروتئینی حاصله از لحاظ فعالیت ضدمیکروبی مورد سنجش قرار گرفتند و بخش دیگری از آن رسوبات برای انجام دیالیز کنار گذاشته شدند (۷).

خالص‌سازی ترکیبات ضدمیکروبی استخراج شده به روش دیالیز

برای این منظور از کیسه دیالیز، با اندازه KDa ۱۲۰۰۰ استفاده گردید. کیسه دیالیز درون بشر یک لیتری حاوی آب قرار داده شد و به منظور آماده‌سازی آن برای استفاده و زدودن مواد محافظت پوشاننده از روی کیسه، بشر به مدت ۴ ساعت در زیرجریان شیر آب قرار گرفت. سپس کیسه دیالیز به قطعه ۸ سانتی‌متری برای نمونه مورد نظر بریده شد و یک سمت آن توسط خود کیسه گره زده شد. رسوبات پروتئینی رسوب داده شده با سولفات آمونیوم، در بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار و ۷ pH ۷ حل شدند. محتویات فوق به درون کیسه دیالیز انتقال داده شد و سمت دیگر کیسه توسط چسب مسدود گردید. سپس در یک ارلن ۲۰۰ میلی‌لیتری، به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتراز بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار ریخته و ارلن مذکور در یخچال $^{\circ}C$۴ قرار گرفت. نمونه درون کیسه، در این بافر قرار داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در آن شناور گردید. پس از ۲۴ ساعت، بافر تعویض و مجدداً کیسه در بافر تازه، غوطه‌ور شد. پس از سه بار تعویض بافر و استفاده از معرف نسلر به منظور خروج سولفات آمونیوم، محتویات کیسه، به لوله‌های استریل منتقل گردیدند و جهت بررسی ویژگی‌های ضدمیکروبی، مورد سنجش قرار گرفتند. حجم نمونه قبل و بعد از دیالیز به دقت اندازه‌گیری و یادداشت گردیدند و از نمونه مورد نظر مقادیر یکسانی برای انجام آزمون لوری و اندازه‌گیری میزان پروتئین کنار گذاشته شد (۷).

بررسی تاثیر ضدمیکروبی باکتری انتروکوکوس به روش چاهک

از هر یک از ۹ باکتری بیماری‌زا، کشت تلقیح مطابق با رسیدن میزان جذب نور (OD) نمونه در محدوده ۱-۰/۸ تهیه شد. میزان ۰/۱ میلی‌لیتر از کشت تلقیح فوق

به محیط کشت BHI agar انتقال داده شد و به کمک سواب استریل، کشت یکنواخت و متراکمی تهیه شد. پس از تهیه چاهک، ۵۰ میکرولیتر از ترکیبات ضدمیکروبی جدا شده از انتروکوکسی به هر چاهک افزوده شد. به منظور انتشار بهتر ترکیبات ضدمیکروبی در محیط کشت، پلیت‌ها به مدت یک ساعت در یخچال $^{\circ}C$ ۴ سرماگذاری شدند. سپس پلیت‌ها به انکوباتور $^{\circ}C$ ۳۷ منتقل شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، قطر هاله عدم رشد مربوط به ترکیب ضدمیکروبی بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد (۸ و ۴).

تعیین اثر باکتریواستاتیکی نمونه‌های حاوی عصاره و فاقد عصاره

برای این منظور رقت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۰۶، ۰/۱، ۰/۰۵/۲، ۰/۷، ۱، ۱/۱، ۱/۲، ۱/۵، ۱/۷، ۲، ۲/۱،۷/۲ گرم بر لیتر در لوله‌های آزمایش، از نمونه‌های حاوی عصاره و فاقد عصاره تهیه شد و تاثیر ضدمیکروبی با استفاده از روش انتشار در آگار بررسی گردید. حداقل رقتی که باعث مهار سویه اندیکاتور می‌شود، به عنوان حداقل رقت باکتریواستاتیکی تعیین شد (۵).

محاسبه میزان پروتئین‌های استخراج شده

در هر مرحله، برای هر بخش حجم نهایی (total volume)، واحد فعالیت (activity unit)، فعالیت کل (total activity)، فعالیت اختصاصی (specific activity)، غلظت پروتئین (protein concentration)، پروتئین کل (total protein)، درصد بازیافت (recovery٪)، ضریب تخلیص (purification factor) و راندمان (yield) محاسبه شدند. تیتر بخش‌های فوق به عنوان معکوس بیشترین رقتی که قادر به مهار قطعی سویه‌های پاتوژن بود، بر حسب واحد فعالیت / میلی‌لیتر (activity /mL unit) بیان شد (۹).

ارزیابی و سنجش پروتئین استخراج شده توسط روش لوری

برای غلظت‌های، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴ گرم در لیتر از پروتئین سرم آلبومین گاوی در آب مقطر، پس از افزودن محلول کوماسی برلیانت بلو، منحنی استاندارد در طول موج ۶۰۰ nm رسم شد. میزان پروتئین موجود در نمونه پس از خواندن OD در طول موج ۶۰۰nm و مقایسه با منحنی استاندارد بر حسب $g\,L^{-1}$ تعیین شد (۲،۱۰).

میزان تولید ترکیب ضدمیکروبی بر حسب UmL^{-1}

برای تعیین میزان تولید ترکیب ضدمیکروبی بر حسب UmL^{-1}، واحد فعالیت این ترکیب (UmL^{-1}) در زمان‌های متفاوت، محاسبه شد و منحنی میزان تولید رسم گردید.

تعیین وزن مولکولی انتروسین استخراج شده توسط الکتروفورز

به منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین‌های حاصل در این تحقیق، از تکنیک الکتروفورز SDS - PAGE با تکنیک رنگ آمیزی کوماسی بلو، استفاده گردید. الکتروفورز روی ژل پلی آکریل‌امید ۱۸/۵٪، در حضور عوامل پلیمریزه کننده آمونیوم پرسولفات ۱۰٪ و TEMED انجام گرفت. ژل به مدت ۱۰ دقیقه در جریان ۶۰ ولت قرار داده شد و سپس الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۰ ولت انجام شد. رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بلو و رنگ‌زدایی با محلول ۷٪ اسید استیک انجام شد و باندهای پروتئینی نمایان شدند (۱۰).

آماده‌سازی عصاره از گلبرگ‌های *Galium verum* و بررسی تاثیر این عصاره بر روی رشد و تولید انتروسین

عصاره گیاه *Galium verum* توسط حرارت ملایم در بن‌ماری و عبور محتویات حرارت دیده از کاغذ صافی در طی چند مرحله، استخراج گردید. سپس، این عصاره به نسبت ۵۰:۵۰ با سوسپانسیون حاوی باکتری *انتروکوکوس فکالیس* و دارای میزان جذب نور ۱-۰/۸، مخلوط گردید. بر طبق روش‌های ذکر شده فوق، مراحل تعیین منحنی رشد و سنجش pH و بررسی تاثیر ضدمیکروبی و تعیین

میزان تولید انتروسین برای نمونه‌های حاوی عصاره گیاه *Galium verum* و *انتروکوکوس فکالیس* تکرار گردید. لازم به ذکر است که تمام مراحل ذکر شده فوق با ۳ بار تکرار انجام گردیدند.

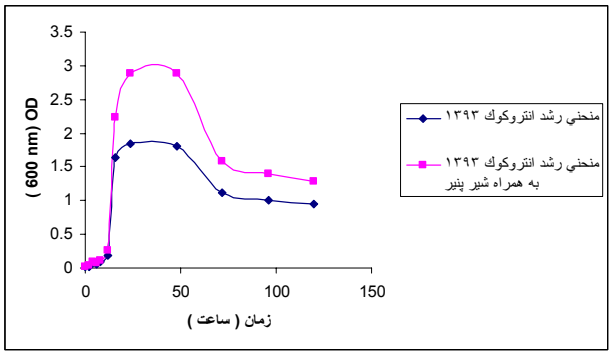
نتایج

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. به منظور تایید باکتری *انتروکوکوس فکالیس*، آزمون‌های بیوشیمیایی بر روی سوش مولد باکتریوسین انجام شدند. با توجه به نتایج به دست آمده در جدول ۱، باکتری فکالیس، قادر به مصرف قند مانیتول می‌باشد و دارای آنزیم تجزیه کننده آرژنین است و بدین ترتیب، می‌تواند از این اسید آمینه به عنوان منبع ازت استفاده نماید (جدول ۱).

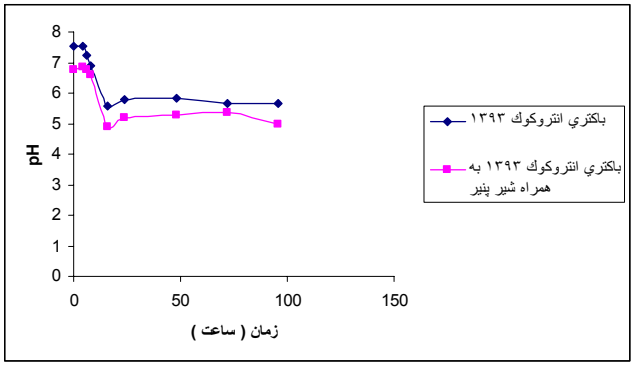
جدول ۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شده بر روی باکتری *انتروکوکوس فکالیس*

نام باکتری	مانیتول	سوربیتول	آرابینوز	آرژنین دهیدرولاز	حرکت	پیگمان زرد	لاکتوز	ساکارز
انتروکوکوس فکالیس	+	–	–	+	–	+	–	–

نتایج حاصل از منحنی رشد باکتری، نشان داد که باکتری تحت شرایط کار در این پژوهش (۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت، گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰rpm)، در حدود ساعت ۱۶ به حداکثر میزان رشد خود(فاز لگاریتمی رشد) می‌رسد. میزان کدورت پس از یک تاخیر کوتاه (Lag phase) در حدود چهار ساعت پس از تلقیح اولیه به تدریج افزایش یافته و مقارن با آن، pH نیز با همان میزان تاخیر، شروع به کاهش می‌نماید (نمودار ۱و۲) .



نمودار ۱- منحنی رشد باکتری *انتروکوکوس فکالیس* برحسب OD قبل و بعد از افزودن شیر پنیر



نمودار ۲- روند تغییرات pH باکتری *انتروکوکوس فکالیس* در نمونه شاهد و نمونه حاوی *Galium verum* با گذشت زمان

تاثیر ضدمیکروبی قابل ملاحظه عصاره تخمیری فاقد *Galium verum* سوش مولد باکتریوسین (نمونه شاهد)، پس از ۸، ۱۶، ۲۴ ساعت گرماگذاری بر روی شش باکتری گرم مثبت و گرم منفی مشاهده شد. تاثیر ضدمیکروبی از ساعت ۸ تا ۲۴ (در طول فاز لگاریتمی و در ابتدای فاز سکون) افزایش نشان داد. با افزودن *Galium verum*، تاثیر ضدمیکروبی عصاره تخمیری باکتری، از ساعت ۸ تا ۲۴، به همان ترتیب نمونه شاهد، افزایش و کاهش نشان داد و تاثیر ضدمیکروبی حاصله، از ساعت ۸ تا ۲۴، نسبت به نمونه شاهد بیشتر بود.

حداقل غلظت باکتریواستاتیکی و باکتریوسایدی نمونه‌های حاوی *Galium verum* بیشتر از نمونه‌های شاهد بود و در هر دو نمونه، میزان رقت مورد نیاز برای از بین بردن سویه‌های مقاوم به انتروسین، نسبت به سویه‌های حساس بیشتر بود (جدول ۲).

جدول ۲- حداقل غلظت باکتریواستاتیکی و باکتریوسایدی عصاره ($g\ L^{-1}$)

	استافیلوکوکوس ارئوس	*لیستریا مونوسیتوژنز*	*باسیلوس سرئوس*	*کلبسیلا پنومونیه*
انتروکوک فکالیس	۱/۲	۰/۷	۰/۷	۲/۲
انتروکوک فکالیس و *Galium verum*	۱/۱	۰/۱	۰/۱	۲/۱

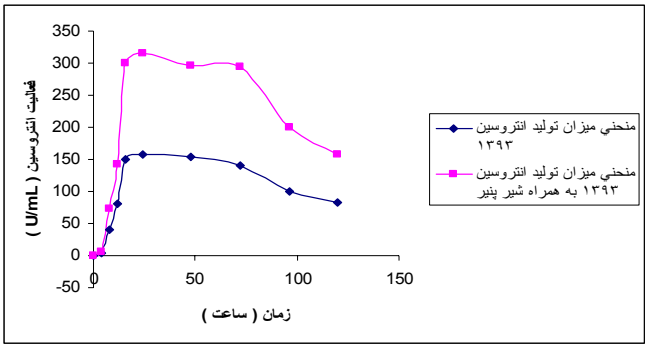
فرایند دیالیز به عنوان یک فرایند مهم خالص‌سازی انتروسین، با حذف سایر ترکیبات ضدمیکروبی موجود در محیط کشت موجب کاهش و در برخی از موارد ثابت ماندن اثر ضدمیکروبی می‌شود (جدول ۳).

جدول۳- نتایج تاثیر ضد میکروبی رسوبات پروتئینی در قبل و بعد از دیالیز

	استافیلوکوکوس ارئوس		*لیستریا مونوسیتوژنز*		*باسیلوس سرئوس*		*کلبسیلا پنومونیه*	
انتروکک فکالیس	۱۰ **a**	۱۰ **b**	۱۴ **a**	۱۴ **b**	۱۲ **a**	۸ **b**	۱۰ **a**	۱۰ **b**
انتروکوک فکالیس و شیر پنیر	۱۸	۱۷	۱۸	۱۸	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶

اعداد نوشته شده در ستون **a** مربوط به نمونه‌های قبل از دیالیز و اعداد نوشته شده در ستون **b** مربوط به نمونه‌های بعد از دیالیز هستند.

از طریق تعیین واحد فعالیت انتروسین بر حسب UmL^{-1} در زمان‌های متفاوت، میزان تولید انتروسین بر حسب UmL^{-1} به دست آمد و میزان تولید در ساعت‌های ۸ تا ۲۴ (در طول فاز لگاریتمی و در ابتدای فاز سکون) افزایش یافت و در ساعت ۴۸ (در اواسط فاز سکون) کاهش یافت. میزان تولید انتروسین بر اساس UmL^{-1}، در ۴ ساعت اولیه رشد (Lag phase)، تقریباً صفر است. یعنی از آن‌جاییکه رشدی صورت نگرفته، در نتیجه انتروسینی هم تولید نشده است. اما به تدریج، شروع به افزایش می‌کند و در ساعت ۱۶، پس از تلقیح اولیه، یک افزایش شدید در میزان تولید روی می‌دهد. این زمان، دقیقاً مقارن با افزایش تعداد باکتری و به عبارتی، همزمان با فاز لگاریتمی رشد است. این امر نشان‌دهنده تولید انتروسین در فاز لگاریتمی رشد است (نمودار ۳).



نمودار ۳- منحنی میزان تولید انتروسین بر حسب UmL^{-1}

تعیین حجم نمونه، واحد فعالیت، فعالیت کل، فعالیت اختصاصی، غلظت پروتئین و پروتئین کل، ضریب تخلیص، راندمان و درصد بازیافت در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های حاوی عصاره شیر پنیر، در قبل و بعد از دیالیز، به دست آمد (جدول ۴ و ۵).

جدول ۴ - تعیین فاکتورهای مربوط به فعالیت رسوبات پروتئینی در نمونه‌های شاهد، در قبل و بعد از دیالیز

فاکتور / سویه	*انتروکوک فکالیس*		
	مایع تخمیر	قبل از دیالیز	پس از دیالیز
حجم نمونه (ml)	۱۰۰	۳۵	۲۵
واحدفعالیت (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 بازیافت (٪)	-	۲۵/۴۵	۶/۸۲
ضریب تخلیص	-	۲/۷۵	۱۰/۱

جدول ۵- تعیین تعیین فاکتورهای مربوط به فعالیت رسوبات پروتئینی در نمونه‌های حاوی عصاره Galium verum، قبل و بعد از دیالیز

فاکتور / سویه	*انتروکوک فکالیس و Galium verum*		
	مایع تخمیر	قبل از دیالیز	پس از دیالیز
حجم نمونه (ml)	۱۰۰	۳۵	۲۵
واحدفعالیت (Unit/ml)	۱۵۰	۲۰۰	۲۵۰
فعالیت کل (Unit)	۱۵۰۰۰	۷۰۰۰	۶۲۵۰
غلظت پروتئین (mg/ml)	۳/۱	۲/۴	۱/۴
پروتئین کل (mg)	۳۱۰	۸۴	۳۵
فعالیت اختصاصی (U/mg)	۴۸/۳۹	۸۳/۳۳	۱۸۷/۵۷
راندمان	-	۴۶/۶۷	۴۱/۶۷
درصد بازیافت (٪)	-	۲۷/۱۰	۱۱/۲۹
ضریب تخلیص	-	۱/۷۲	۳/۶۹

پس از انجام روش الکتروفورز SDS-PAGE و مقایسه نمونه با انتروسین استاندارد شده به عنوان مارکر و تعیین وزن مولکولی انتروسین استخراج شده در محدوده ۴۵ کیلودالتون، تولید این ماده توسط سوش مورد نظر و خلوص ماده پروتئینی تولید شده توسط باکتری تایید شد.

بحث

به دلیل گرم مثبت بودن باکتری انتروکوک و تاثیر ماده ضدمیکروبی بر روی سویه‌های منسوب به سویه تولید کننده، تاثیر ضدمیکروبی انتروکوک بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی بود. بیشترین اثر ضدمیکروبی مشاهده شده در زمان ۲۴ ساعت، مربوط به باکتری *باسیلوس سرئوس* بود. این باکتری که عمده‌ترین عامل مسمومیت غذایی می‌باشد، نقش بسیار مهمی در فساد مواد غذایی ایفا می‌نماید. لذا با کاربرد انتروسین به عنوان یک نگهدارنده ایمن، می‌توان از آن، به عنوان یک ترکیب قوی برای انهدام کامل *باسیلوس سرئوس* مولد مسمومیت‌های غذایی در صنعت غذا استفاده نمود. مقاوم‌ترین باکتری به انتروسین گونه فکالیس، باکتری *کلبسیلا پنومونیه* بود. با توجه به تولید بیشینه باکتریوسین‌ها و سایر ترکیبات ضدمیکروبی در اواخر فاز لگاریتمی، تاثیر ضدمیکروبی (قطر هاله عدم رشد) از ساعت ۸ تا ۲۴ افزایش یافت. با افزودن *Galium verum*، تاثیر ضدمیکروبی عصاره تخمیری باکتری، از ساعت ۸ تا ۲۴، به همان ترتیب نمونه شاهد، افزایش نشان داد و تاثیر ضدمیکروبی حاصله، از ساعت ۸ تا ۲۴، نسبت به نمونه شاهد بیشتر بود.

Sabia و 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 میلی‌مترگزارش گردید. نتایج حاصل از تاثیر ضدمیکروبی عصاره این باکتری با تاثیر ضدمیکروبی عصاره حاصل از*انتروکوک فکالیس* در این تحقیق برابر بود (۱۱).

با توجه به تراکم بالای باکتری در ساعت ۲۴، عصاره ۲۴ ساعته محیط کشت، تحت تیمار با سولفات آمونیوم قرار گرفت. سولفات آمونیوم یک روش شناخته شده برای رسوب‌دهی 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. رسوب‌دهی را برای تفکیک پروتئین‌ها از یکدیگر یا به عنوان روش کاهش‌دهنده حجم، به منظور تغلیظ محصول به کار می‌برند. هم‌چنین می‌توان، پیش از مراحل تخلیص نهایی، از آن به عنوان یک مرحله برای جداسازی محصولات جانبی نامطلوب مانند اسیدهای نوکلئیک، رنگدانه‌ها و دیگر اجزای باقی‌مانده از محصول حاصل از تخمیر استفاده نمود (۱۲). رسوبات پروتئین حاصله پس از حل شدن در بافر پتاسیم فسفات، به منظور خالص‌سازی، مورد فرایند دیالیز قرار گرفتند. آزمایشات اولترافیلتراسیون نشان داده است که باکتریوسین‌ها قادر به عبور از غشاءهایی با cut-offهای ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ کیلودالتون نیستند. گرایش باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری انتروکوکوس به پروتئین‌های دیگر در موارد فوق از محققان دیگر گزارش گردیده است، که موجب عدم توانایی باکتریوسین‌ها در عبور از غشاءهایی با cut-off هایی با وزن‌مولکولی کم می‌شود. در این تحقیق، به منظور خلوص بیشتر مایع پروتئینی، یک مرحله دیالیز در حضور بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ M , pH ۷ انجام گرفت. در زمان دیالیز، تعویض بافر باید تا زمانی ادامه یابد که اطمینان حاصل شود که تمام یون‌های آمونیوم از مایع پروتئینی درون کیسه خارج گردیده‌اند و فقط پروتئین‌ها باقی مانده‌اند. برای تائید این موضوع از معرف نسلر استفاده گردید. ایجاد رنگ قرمز آجری در اثر افزودن معرف نسلر به محلول مورد نظر نشان‌دهنده وجود یون‌های آمونیوم در محلول فوق می‌باشد که ناشی از ایجاد ترکیب $NH_4^+ + 2\ [HgI_4]^{2-} + 4OH^- \rightarrow HgO.Hg\ (NH_2)\ I + 7I^- + 3H_2O$ می‌باشد. حساسیت تست نسلر تا ۰/۳NH_3 µg در ۲ میکرولیتر نمونه می‌باشد (۱۳). چنانچه نتایج نشان می‌دهد، پس از دیالیز، به دلیل حذف سولفات آمونیوم و برخی از ناخالصی‌های موجود در محیط، تاثیر ضدمیکروبی، تقریباً ثابت و در برخی از نمونه‌ها به طور جزئی کاهش می‌یابد. با

مقایسه نتایج به دست آمده از این تحقیق با نتایج حاصل از تحقیق Jianhua Xie و همکاران در سال ۲۰۰۹، بر روی فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین‌های حاصل از باکتری‌های *E.Coli* IVDC C83901، *Bacillus subtilis* CGMCC1.354، *Bacillus subtilis* CGMCC1.769، *Staphylococcus aureus* IVDC 6538، مشاهده شد که واحد فعالیت باکتریوسین حاصل از باکتری‌های فوق، به ترتیب **۱۵۳,۹U**، **۰U**، **۰U**، **۴۲۲,۷U** بوده است. از این‌رو باکتریوسین حاصل از *انتروکوک فکالیس*، دارای فعالیت بیشتری(**۳۷۵۰U**) نسبت به کلیه باکتریوسین‌های فوق بوده است. دلیل این اختلاف به علت قوی‌تر بودن تاثیر ضدمیکروبی باکتریوسین‌های *انتروکوک فکالیس* مناسب بودن ماده شیمیایی سولفات آمونیوم برای استخراج این باکتریوسین‌ها بوده است (۱۴). بدلیل تولید بیشینه انتروسین در فاز لگاریتمی، می‌توان گفت که تولید انتروسین از شمای تولید یک متابولیت اولیه پیروی می‌کند. با ورود باکتری به فاز سکون(رکود)، میزان انتروسین تولید شده، تقریباً ثابت است و سپس به تدریج کاهش می‌یابد. این کاهش می‌تواند در اثر تاثیر آنزیم‌های پروتئازی باشد که از سلول‌های مرده آزاد می‌شود. زیرا خود انتروسین به pH اسیدی مقاوم است و بهترین فعالیت آن در محدوده اسیدی است. این یافته، به خصوص در مواد غذایی، در هنگامی که از کشت‌های اغازگر در صنایع لبنی استفاده می‌شود، دارای اهمیت می‌باشد. چون پروتئازهای سلولی می‌توانند به سرعت انتروسین را تجزیه نمایند (۱۵). با مشاهده منحنی میزان تولید انتروسین در نمونه‌های حاوی شیر پنیر، نقش *Galium verum* به عنوان یک ماده طعم‌دهنده و ضدمیکروبی سالم، در تشدید میزان تولید انتروسین کاملا مشخص شد.

با بررسی اثر ضدمیکروبی حداقل غلظت باکتریواستاتیکی و باکتریوسایدی انتروسین بر روی باکتری‌های پاتوژن مشاهده شد که مقاوم‌ترین باکتری به انتروسین گونه فکالیس، باکتری *کلبسیلا پنومونیه* بود. عصاره گیاه *Galium verum*، به دلیل اثر سینرژیسمی بر تولید انتروسین، موجب کاهش حداقل غلظت باکتریواستاتیکی شده است. حداقل غلظت باکتریوسایدی نیز نتایج مشابهی را نشان داد. بنا بر نتایج به دست آمده، تاثیر انتروسین و ترکیب انتروسین و عصاره *Galium verum* بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی بود و در میان باکتری‌های گرم مثبت، تاثیر انتروسین و ترکیب انتروسین و عصاره *Galium verum* بر روی باکتری *باسیلوس سرئوس* بیشتر از سه باکتری گرم مثبت دیگر بود. با مقایسه نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت باکتریواستاتیکی فنی‌توئین بر روی باکتری‌ها توسط دکتر متواضع در سال ۱۳۷۹، مشاهده شد که حداقل غلظت باکتریواستاتیکی فنی‌توئین بر روی *استافیلوکوکوس ارئوس* و *کلبسیلا پنومونیه* ۰/۰۲۵ است. دلیل کمتر بودن قابل ملاحظه حداقل غلظت باکتریواستاتیکی فنی‌توئین نسبت به انتروسین گونه فکالیس و ترکیب انتروسین و *Galium verum* ، قوی‌تر بودن فنی‌توئین برای مهار باکتری‌های فوق می‌باشد (۱۶).

با توجه به نقش *Galium verum* در افزایش واحد فعالیت، فعالیت کل، غلظت انتروسین و میزان پروتئین کل، تاثیر سینرژیسمی این گیاه در تحریک تولید انتروسین، مشخص می‌شود. لذا در صنعت غذا برای بیشتر نمودن تولید انتروسین و نگهداری طولانی مدت غذا می‌توان از ترکیب شیرپنیر و انتروسین در فرآورده‌های شیری و گوشتی استفاده نمود و میزان استفاده از نگهدارنده‌های سرطان‌زای شیمیایی را به مقدار قابل ملاحظه‌ای کاهش داد. *Galium verum*، علاوه بر ایجاد طعم، بو و رنگ منحصر به فرد و بسیار مطبوع در مواد غذایی، به عنوان یک نگهدارنده بسیار ایمن، از مواد غذایی در برابر باکتری‌ها محافظت نموده، لذا عمر نگهداری مواد غذایی را به میزان قابل‌توجهی افزایش می‌دهد و با توجه به تاثیر سینرژیسمی آن در تحریک تولید انتروسین، می‌تواند نقش بسزایی در افزایش تولید انتروسین ایفا نماید و از جهتی دیگر در راستای افزایش مدت ماندگاری مواد غذایی عمل نماید.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله کمال قدردانی خود را از مسئولین محترم سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و مجتمع

آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران ابراز می‌نماییم.

منابع

۱-عیدی، ا، عیدی، م، (۱۳۸۵). گیاهان دارویی ایران، چاپ اول، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، صفحه ۱۳۸.

2- Bruno, M, Momntville, T.J, (1996). Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol 59, 3003-3010.

3- Kaiser, AL, Montville, T.J, (1993). Purification of bacteriocin and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* scolta cell and lipid vesicle. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4525-4535.

4- Pilar, C, Trine, N, Luis, M. C, Ingolf, F.N, Pablo, E, Hernández, H. H, (1997). Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A, Jurnal of microbiology. 143, 2287-2294.

5- Kandler, O, Nobert, W, (1989). Bergeys mannual of systematic, 2nd ed, Springer, New York.

6- Baron Ellen, JO, Finegold Sydney, M, (1990). Diagnostic microbiology, 8th ed, Bailey & Scott, USA.

7- Klaenhammer, T.R, (1993), Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Journal of FEMS Microbiol Review 12, 39-86.

8- Yamazaki, S, Kamimuura,H, Momose, H, (1982). Protective effect of *bifidobacterium* monoassociation against lethal activity of *E.coli*. Journal of *Bifidobacterium* microflora, 1, 55-60.

9- Ogunbanwo, S.T, Sanni, A.I, Onilude, A.A, (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. Afr Journal of Biotechnol, 8, 219-227.

10- Aroutcheva Alla, A, Simoes Jose , A, Sebastian Faro, A, (2001). Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerella vaginalis*. Infect Dis Obstet Gynecol, Journal of Microbiol 9, 33–39.

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

۱۲- خنافری، آ، حسینی، ف، (۱۳۸۵)، میکروب شناسی عملی و اصول بیوشیمیایی واکنش‌ها، چاپ سوم، انتشارات پورسینا، تهران.

۱۳- خنافری، آ، (۱۳۷۵) ، بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره و رنگدانه حاصل از سه گیاه گردو، زعفران و روناس بر روی باکتری‌های هوازی، پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی- میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.

14- Jianhua , X , Rijun, Z , Changjiang, Sh ,Yaoqi, G, (2009). Isolation and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus subtilis* LFB112 that exhibits antimicrobial activity against domestic animal pathogens, *Biotechnology*, 8 (20), 5611-5619.

۱۵- آقا قزوینی، ش، (۱۳۸۵)، بررسی تاثیر ضدمیکروبی لاکتوکوکوس لاکتیس و مقایسه آن با پیوسین، پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی- علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.

۱۶- متواضع، ک، (۱۳۷۹). بررسی حداقل غلظت باکتریواستاتیکی و باکتریوسایدی فنی‌توئین، پایان-نامه کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی- میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.