

دکتر جمیله نوروزی

چکیده

سابقه و هدف: باکتریهای لاکتک آغازگر تولید تعداد زیادی از غذاهای تخمیری انسان و حیوان هستند. این باکتری‌ها در بهود بافت طعم فرآورده‌های غذایی دخالت کرده و نقش عمدتی را نیز در جلوگیری از رشد ارگاتیزم‌های فاسدکننده غذا به عهده دارند. باکتریوسین، یکی از مهمترین مواد بازدارنده طبیعی است که توسط لاکتوباسیل پلاتنتازوم تولید می‌شود. هدف از این بررسی، تعیین بهترین شرایط رشد لاکتوباسیل پلاتنتازوم برای تولید بیشتر باکتریوسین آن بوده است.

مواد و روش‌ها: تحقیق به روش **exploratory** انجام شد. مقداری سوسیس و کالباس به طور تصادفی از کارخانه‌های مختلف خریداری شد. یک گرم از آن را در سرم فیزیولوژی ساخته و پس از رقت در محیط **MRS** کشت داده شد. باکتریها با تست‌های کاتالاز، اکسیداز و تست تخمیر قندها شناسایی شدند. رشد این باکتریها در حرارت‌ها، pH‌ها و محیط کشت‌های مختلف بررسی شد. بیشترین اثر بازدارنده‌گی مایع سطحی کشت این باکتریها بر روی تعدادی از باکتریهای گرم‌مشت و گرم‌منفی در حرارت‌ها، pH‌ها و محیط‌های مختلف به روش بلانک دیسک و نقطه‌گذاری نیز تعیین گردید.

یافته‌ها: از ۱۵ نمونه سوسیس و کالباس، در ۴ مورد لاکتوباسیل پلاتنتازوم جدا شد. حرارت مناسب رشد آنها درجه سانتیگراد در pH‌ها حدود ۴/۸ تا ۶/۴ در محیط کشت پایه (MRS) همراه با گلوکز ۲٪ بود. خاصیت ضدمیکروبی آنها در حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه پایدار بود و به وسیله الfa آمیلاز و لیزوزیم تغییر نکرد. این باکتریها در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد، بیشترین اثر بازدارنده‌گی را در برابر استافیلوکوک (۲۰ میلی‌متر) و لیستریا (۱۴٪، میلی‌متر) داشتند. بهترین شرایط برای تولید هاله عدم رشد، محیط کشت پایه (MRS) همراه با گلوکز ۲٪ در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد و pH حدود ۴/۸ تا ۶/۴ بود. اثر بازدارنده‌گی باکتریوسین (پلاتنتازین) این باکتریها، پس از حرارت دادن مایع سطحی به مدت ۱۰ دقیقه پایدار بود و حتی اثر آن کمی بیش از حالت قبل از حرارت بود.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: پایداری خاصیت ضدمیکروبی آنها در برابر حرارت بسیار سودمند است. زیرا در سیاری از مراحل نهیه غذا به حرارت نیاز می‌باشد. از کشت‌های آغازگر مناسب برای تولید مواد ضدمیکروبی قوی در غذاهای تخمیری توصیه می‌شود. با ایجاد تغییرات ژنتیکی می‌توان لاکتوباسیل‌هایی به دست آورد که باکتریوسین بیشتری تولید کنند.

وازگان کلیدی: لاکتوباسیل پلاتنتازوم، باکتریوسین، باکتریهای لاکتک

مقدمه

بیفیدویاکتیریوم برای سلامت انسان مفید هستند. این باکتریها به مقدار فراوان در لبیات وجود دارند (۹). یکی از گونه‌های باکتریهای لاکتیک، لاکتوباسیل پلاتارتوم است؛ ساپروفتی که اغلب در ارتباط با گیاه و مواد تخمیری شده می‌باشد (۱۰). این باکتری در محافظت فرآورده‌های غذاهای تخمیری مانند سبزیجات (۱۱)، گوشت و فرآورده‌های گوشتی (۱۲)، شراب قرمز (۱۳)، سوسیس (۱۴ و ۱۵)، خمیر ترش (۱۶)، شیر (۱۷)، پنیر (۱۸)، خیار تخمیر شده (۱۹)، زیتون (۲۰). آناناس و عصاره گریپ فوروت (۲۱)، علوفه (۲۲ و ۲۳) و غیره، نقش عمده‌ای دارد. در برخی از موارد، لاکتوباسیل پلاتارتوم به عنوان آغازگر کشت در طی تهیه غذا مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۴). حال سنوال این است که بهترین شرایط رشد باکتریهای لاکتیک کدام است؟! به منظور تعیین بهترین شرایط رشد لاکتوباسیل پلاتارتوم برای تولید بیشتر باکتریوسین این تحقیق انجام شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق به روش اکسپلوراتوری انجام گرفت. جداسازی لاکتوباسیل با استفاده از روش Rekhif و همکارانش (۲۵) انجام شد. در این بررسی، مقداری سوسیس و کالباس به طور تصادفی از کارخانه‌های مختلف خریداری شد. ابتدا یک گرم از نمونه در داخل هاون همراه با یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل سائیده شد. سپس ۴ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به آن اضافه گردید، به طوری که حجم کل آن، ۵ میلی‌لیتر شد و به مدت ۱۸ ساعت در حرارت اتاق نگهداری گردید. سپس از مایع سطحی آن رفتهای $1/10$ ، $1/100$ و $1/1000$ تهیه گردید و یک میلی‌لیتر از هر کدام در محیط MRS حاوی آگار، کشت داده شد. شناسایی

تولید مواد آنتاگونیستی توسط باکتریهای لاکتیک، مدل‌های است که شناخته شده است. اولین مورد به وسیله Rogers در سال ۱۹۲۸ گزارش شد که فعالیت آنتاگونیستی لاکتوباسیل لاکتیس را در برابر لاکتوباسیل بولگاریکوس نشان داد (۱). بعدها مشخص شد که این ماده از جنس پلی پپتید بوده و نیسین (Nisin) نامیده شد (۲). طیف ضدباکتری نیسین به صورت اثر بازدارندگی آن بر روی استافیلوکوک، استافیلوکوک، گونه‌های مختلف باسیلوس، کلوستریدیوم و لاکتوباسیل بوده است (۳). امروزه، نیسین به عنوان محافظت کننده غذا و اثر بازدارندگی آن بر روی رشد اسپور مجاز شناخته شده است (۴). ماده بازدارنده دیگری به نام دیپلوکوکسین در لاکتوباسیل لاکتیس زیرگونه Cremoris شرح داده شده است. فعالیت این ماده، طیف اثر باریکی داشته و فقط اثر بازدارندگی در برابر لاکتوباسیل‌های لاکتیس دارد (۵).

خصوصیاتی مانند فعالیت ضدتوموری و ضدکلسترول، واکنشهای شیمیابی احیای نیترات، بهبودی اینمنی فرد و کاهش اختلالات گوارشی را به مصرف فرآورده‌های تخمیری لبیات نسبت داده‌اند (۶ و ۷). Yap و Gillilan در سال ۲۰۰۰ نوعی لاکتوباسیل (لاکتوباسیل لاکتیس نژاد RM25) را به عنوان عامل نگهدارنده بیولوژیکی برای غذاهایی که در بخشال نگهداری می‌شوند گزارش کردند (۸). Shah در سال ۲۰۰۰ گزارش داد که برخی از باکتریهای پروبیوتیک مانند لاکتوباسیل کازهای، لاکتوباسیل اسیدوفیلوس و

گردید. باکتریها به شکل میله‌ای گرم مثبت و به اشکال مختلف به صورت تک تک، دونایی، چندتایی و گاهی زنجیره‌ای فاقد اسپور بودند (شکل ۱). این باکتریها در هنگام جداسازی اولیه، باریک و کاملاً کشیده بودند اما پس از مدتی در کشت آزمایشگاهی به صورت کوتاه و ضخیم درآمدند. تست کاتالاز با $\% ۳$ آب اکسیژن و تست اکسیداز با دیسک اکسیداز، منفی بود. هیدرولیز اسکولین در محیط کشت صفر - اسکولین، پس از ۲۴ ساعت (و حتی بعد از ۲ ساعت) منفی بود. کلیه این باکتریها در شکل (۲) نشان داده است.

از روی خصوصیات مورفولوژی، باسیل گرم مثبت کشیده، تستهای یووشیمیابی مانند تست اکسیداز منفی، کاتالاز منفی، تخمیر قندها (مانیتول، گلوکز، رافینوز، گزیلوز، گالاکتوز، رایبوز، ساکارز، لакتوز) این باسیل شناسایی شد. این باکتریها، ژلتین را ذوب کردند و در حرارت ۲۰ ، ۲۵ ، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیگراد رشد کردند، اما حرارت مناسب رشد آنها، ۲۵ درجه سانتیگراد بود. بیشترین اثر بازدارندگی در حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد بود، به طوری که اثر بازدارندگی آن حدود ۲۰ میلی‌متر در برابر استافیلکوک و حدود ۱۴ میلی‌متر در برابر لیستریا در pH حدود $۴/۸$ تا $۶/۲$ در محیط پایه (MRS) حاوی گلوکز $\% ۲$ بود. در حرارت ۱۰ درجه سانتیگراد، عدم ممانعت از رشد مشاهده نگردید. در حرارت ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه پایدار بود و به وسیله آلفا آمیلاز و لیزوزیم غیرفعال نگردید. بنابراین به نظر می‌رسد که جنس آن پلی پپتید مقاوم به حرارت باشد. اثر بازدارندگی باکتریهای به دست آمده به روش بلانک و نقطه‌گذاری در شکل ۳ و ۴ نشان داده شده است.

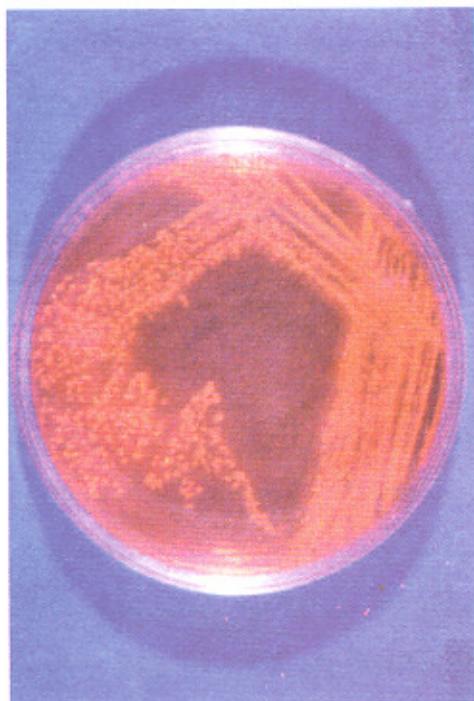
مقدماتی لاكتوباسیل با انجام تست کاتالاز و اکسیداز انجام گرفت. سپس، با استفاده از تست تخمیر قندهای مختلف مانند گلوکز، لاكتوز، ساکارز، رایبوز، گالاکتوز، گزیلوز، آرایبوز، رافینوز، مانیتول و تستهای دیگری نظیر حرکت لاكتوباسیل پلاتارتوم شناسایی گردید.

بهترین شرایط رشد این باکتری در pHهای ۲ تا ۴ ، ۴ تا ۴۵ ، محیط پایه (MRS) حاوی قندهای گوناگون شامل گلوکز، لاكتوز، ساکارز، رایبوز، گالاکتوز، گزیلوز، آرایبوز، رافینوز، مانیتول، برخی از محیطهای موجود در آزمایشگاه مانند نوتریت آگار، BHI و غیره مورد بررسی قرار گرفت. تولید بیشتر باکتریوسین در حرارت‌های مختلف pHهای ۲ تا ۸ و محیط حاوی قندهای فوق ارزیابی شد. اثر آن بر روی باکتریهای لیستریا مونوستیوئنز، استافیلکوک اورثوس، اشتریشیاکلی، سالمونلاتاینی، و باسیلوس سرئوس به روش بلانک دیسک و نقطه‌گذاری، قبل و بعد از حرارت تعیین گردید. فعالیت ضدبیکروبی باکتریهای به دست آمده پس از افزودن آلفا آمیلاز و لیزوزیم نیز مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی لاكتوباسیل پلاتارتوم بر اساس کتاب برجی در سال ۱۹۸۹ انجام گرفت (۲) و خصوصیات مورفولوژی مطابق استاندارد و با سوش استاندارد موسسه واکسن و سرم سازی رازی مقایسه گردید و میزان بازدارندگی آن در برابر میکروارگانیسم موجود تعیین گردید.

یافته‌ها

از تمام نمونه‌های مورد بررسی، لاكتوباسیل به دست آمد اما فقط ۴ تا از آنها، لاكتوباسیل پلاتارتوم بودند. از لاكتوباسیل پلاتارتوم‌های رشد کرده لام تهیه شد و به روش گرام رنگ‌آمیزی



شکل ۲ - گلندی لاکتوباسیل پلانتاروم



شکل ۱ - شکل مکروسکوپی لاکتو باسیل پلانتاروم



شکل ۴ - انر بازدارندگی به روش نقطه گذاری



شکل ۳ - انر بازدارندگی به روش بلانک دیسک

بحث

از ۱۵ نمونه سوسیس و کالباس، ۱۵ لاکتوباسیل بر اساس رنگ آمیزی گرام و تستهای کاتالاز و اکسیداز به دست آمد. شناسایی بیشتر با آزمایشها تخمیری قندها و تستهای دیگر نشان داد که فقط ۴ باکتری به دست آمده دو باکتری از سوسیس و دو باکتری از کالباس لاکتوباسیل پلاتارتوم بوده‌اند. در صنعت گوشت از باکتریهای لاکتیک به طور گسترده‌ای به عنوان آغازگر برای تخمیر سوسیس استفاده می‌کنند (۲۷). این باکتریها در بهتر شدن طعم غذا و اثر بازدارندگی میکروبی سوسیس‌های تخمیر شده دخالت دارند. در هنگام ساختن سوسیس، در حالت طبیعی گاهی آلودگی ماده خام رخ می‌دهد. بنابراین، نقش عمده باکتریهای لاکتیک، رقابت با فلور طبیعی مانند باکتریهای فاسد‌کننده غذا و گاهی پانوزنهایی مانند استافیلوکوک اورئوس و لیستریا مونوسبیتوژنر است.

نتایج حاصل از مطالعه ما در مورد اثر بازدارندگی و همچنین پایداری باکتریوسین در برابر حرارت با گزارش‌های موجود مطابقت دارد (۲۸-۳۰). باکتریوسین‌های شناخته شده لاکتوباسیل پلاتارتوم به حرارت پایدار هستند و طیف ضدمیکروبی در برابر باکتریهای مختلف دارند. به نظر می‌رسد که حرارت، فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین‌ها را پایدار می‌سازد. پایداری باکتریوسین‌ها در برابر حرارت بسیار سودمند است، زیرا در بسیاری از مراحل تهیه غذا به حرارت نیاز می‌باشد. پس

Reference:

1. Rogers La. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. J Bacterol 1928; 16: 321.
2. Mattick a t R, Hirsch a. Further observations on an inhibitory substances (nisin) from lactic Streptococci. Lancet 1947; 5-7.

3. Hurst a. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In: Branen Al, Davidson Pm (eds). *Antimicrobiols in foods*. Maecel Dekker, Newyork, USA 1983; 327-51
4. daeschel MA. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology* 1989; 43: 164-97
5. Babel F J. Antibiosis by lactic cultures bacteria *J Dairy Sci* 1997; 60: 815-21.
6. fermandes cF, Shahani K M, Amer M A. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacilic fermented dairy products. *REMS Microbiol* 1987; 46: 343-56.
7. Sissons J W. Potential of probiotic organisms to prevent diarrhoea and promote digestion in farm animals; A review. *J Sci Food agric* 1989; 49: 1-13.
8. Yap PS, Gililand S.E. Comparison of newly isolated strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* for hydrogen peroxide production at 50 C. *J Dairy Sci* 2000; 83: 628 -38
9. . shah NP. Symposium: Probiotic bacteria; Selective enumeration and Survival in dairy foods. *J Dairy Sci* 2000; 83: 894-907
10. Daeschel MA, Fleming Hp. Selection of lactic acid bacteria for use in vegetable fermentation *Food Microbiol* 1984, 303 - 13
11. Fleming Hp, Etchells JI , Costilow RL. Microbiol inhibiton by an isolate of pediococcus from cucumber brines. *Appl Microbiol* 1985; 30: 1040-42
12. Garriga M, Hugas M, Aymerich T, et al. Bacteriocinogenic activity of lactobacili from fermented sausages. *J Appl Bacteriology* 1993; 75: 142-48
13. Navarro L, Zarazaga m, Saenz J, et al. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *J Appl Microbiol* 2000; 88(1) : 44-51.
14. Bacus JN, Brown WL. The lactobacillii : meat products . In: SE Gililand (Ed): *Bacterial starter cultures of foods*. CRC press, Boca Raton (Florida), 1985: 47-74.

15. Ehmann A, Eijsink VG, et al. Gene cluster encoding plataricin 1.25 beta and other bacteriocin like peptides in *Lactobacillus plantarum* TMW 1.25 . *Biochim Biophys Acta* 2000; 1490(3): 355-61.
16. Todorov S, Onno B, Sorokine O, et al. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST31 isolated from sourdough. *Int J Food Microbiol* 1999; 48(3): 167-77.
17. Rekhif N, Atribi A, Lefebvre G. Characterization and partial purification of plantaricin LC 74. a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LC 74 *Biotechnol Letters* 1994; 771-76
18. Gonzalez B, Arca P, Mayo B, et al, detection and partial Characterization of plataricinc, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin, *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 2158-63
19. Atribi A Michel Rm Lefebvre G detection of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different foods. *Microbes* 1993; 75: 117-23.
20. Jimenez- Diaz R, Rios sanchez Rm, Desmazeaud M, et al plantaricin s and T new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LOCO 10 isolated from a green olive fermentation *appl Environ Microniol* 1993; 59: 1416-24
21. Kelly WJ, Asmundson Rv Huang CM. Characterization of plantaricin Kw30, bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Bacteriol* 1996; 81: 657-62.
22. Beck T. The microbiology of silage fermentation. In: Mc Cullough M E, ed *Fermentation fo silage-a review National food Ingredients Associaton*. West Des Moines, 1978: 61-115
23. West CA, Warmer P J. Plantaricin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. *FEMS Microbiol Letter* 1988; 49: 163-65.

24. Olasupo N A. Bacteriocins of *Lactobacillus plantarum* strains from fermented foods. *Folia Microbiol Praha* 1996; 41(2): 130-6.
25. Rekhif N, atrih a Lefebvre G Activity of plantaricin SA6, A bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* SA6 isolated from fermented sausage. *J Appl Bacteriol* 1995; 78: 349-58
26. Kanlder O, Weiss N. Regular , non-
Manual of systematic bacteriology. 1986: 1208-60
27. Hammes W P starter kulturen in der fleischwirtschaft. *Chem Microbiol Technol Lebensm* 1986; 9: 131-43
28. daeschel M a Mc Kenny Mc, Mc donald C. Bactericidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *food Microbiology* 1990; 7: 91-98.
29. Lewus C B, Kaiser a, and Montville t J. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat . *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 1683-8.
30. Rekhif N, atrih A, Lefebvre G. Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* aTCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid strains. *Current Microbiology Curr Microbiol* 1994; 28: 237-41.