

تولید اگزوپلی ساکارید توسط *Bacillus pasteurii* و بررسی خواص ضدباکتریایی و ضداکسیدانی آن

لایق کریمی، مجتبی تاران*، مهدی ذبیحی

دانشکده علوم پایه، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

چکیده

سابقه و هدف: اگزوپلی ساکاریدها بیوپلی مرهایی هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها به محیط اطراف ترشح می‌شوند. هدف از این تحقیق تعیین شرایط برای تولید حداکثری اگزوپلی ساکارید توسط باکتری *Bacillus pasteurii* و بررسی خواص ضدباکتریایی و ضداکسیدانی آن بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه بر اساس روش تاگوچی و توسط نرم‌افزار Qulitek-4 برای تولید اگزوپلی ساکارید آزمایش طراحی شد. سپس از اگزوپلی ساکارید تولید شده غلظت‌های مختلفی تهیه و به منظور بررسی خواص ضدباکتریایی به اثر آن بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس و اشریشیاکلی پرداخته شد. به منظور بررسی فعالیت ضداکسیدانی ۴ غلظت از اگزوپلی ساکارید تهیه و توسط سه روش مهار فعالیت رادیکالی DPPH، رادیکالی سوپراکسیدانی و رادیکال هیدروکسیل اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بهترین شرایط برای بیش‌ترین میزان تولید اگزوپلی ساکارید پس از گذشتن ۴۸ ساعت از کشت باکتری با میزان غلظت نمک ۰/۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ساکارز ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حاصل از فعالیت ضدباکتریایی نشان داد که بیش‌ترین هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۴۰۰ $\mu\text{g/ml}$ بود. نتایج فعالیت ضداکسیدانی در هر سه روش به کار گرفته شده در این مطالعه نشان داد که در غلظت ۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از اگزوپلی ساکارید بیش‌ترین فعالیت مهار وجود دارد.

نتیجه‌گیری: با تعیین چند عامل کلیدی می‌توان بیش‌ترین میزان اگزوپلی ساکارید توسط باکتری باسیلوس پاستوری را تولید و به منظور فعالیت ضدباکتریایی و ضداکسیدانی از آن استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اگزوپلی ساکارید، *Bacillus pasteurii*، ضدباکتریایی، ضداکسیدانی

مقدمه

یک لایه لزج خارجی که سبب چسبندگی به دیگر سلول‌ها، تعامل‌های سلول-سلول (یکی از ویژگی‌های گونه‌های بیماری‌زا)، به شکل یک کپسول یا گلیکوکالیکس متصل به دیواره سلولی که سبب محافظت در برابر شرایط نامطلوب گردد و یا سبب پایداری مکانیکی دیواره سلولی، کنترل انتشار مولکول‌ها به سلول و خروج سایر متابولیت‌ها، تشکیل یک ماده ذخیره کننده انرژی و یا در برخی از میکروارگانیسم‌ها، پلی-ساکاریدها، نقشی آنزیمی پیدا می‌کنند (لیزازهای پلی-ساکاریدی) که سبب تجزیه پلی‌مرهای قندی به مونومرها شوند (۶). مهم‌ترین پلی‌ساکاریدهای تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها شامل: زانتان، ژلان، آلژینات، کوردلان، پلولان و بیوپولی‌مرهای کم‌تر صنعتی یا کم‌تر مورد مطالعه نظیر لوان، آلترنان، دکستران میکروبی، پلی‌ساکاریدهای

پلی‌ساکاریدها مولکول‌هایی با وزن مولکولی بالا هستند که از واحدهای قندی کوچک‌تری به نام مونوساکاریدها ساخته می‌شوند و از طریق پیوند گلیکوزیدی بهم متصل هستند (۹). نقش پلی‌ساکاریدها در سلول‌های باکتریایی می‌تواند به صورت

نویسنده مسئول :

دانشگاه رازی، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی
پست الکترونیکی: Mehdi.zabihi.1368@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱/۲۹

هتروپولی مرهای قندی خنثی، اورونیک اسید، قندهای غیر معمول یا ترکیبهای قند - پروتئین را تولید می کنند. برخی از اگزوپولی ساکاریدی های تولید شده توسط باسیلوس دارای فعالیت های امولسیون، فلوکولانت های زیستی، توانایی حذف فلزات سنگین و یا فعالیت های دارویی هستند (۱۳). هدف از این مطالعه تعیین چند عامل کلیدی برای تولید اگزوپولی ساکارید توسط سویه *B. pasteurii* و بررسی اثرهای زیستی از جمله فعالیت ضدباکتریایی و ضداکسیدانی آن بود.

مواد و روش ها:

تهیه سویه باکتری و محیط کشت

به منظور تولید اگزوپولی ساکاریدها، سویه باکتری *Bacillus pasteurii* PTCC 1645 از سازمان پژوهش های علمی - صنعتی ایران خریداری و تهیه گردید. باکتری پس از تهیه، بر روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۲۰٪ اوره کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری گردید. محیط کشت بر اساس روش لیو (Liu) و همکاران با اندکی تغییرهایی که شامل ۰/۰۵ گرم عصاره گوشت، ۰/۱۲۵ گرم $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ، ۰/۱۲۵ گرم KH_2PO_4 ، ۰/۰۱ $Na_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ، ۰/۰۲۵ گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۰۲۵ گرم $(NH_4)_2SO_4$ ، ۵*۱۰ میلی لیتر آب مقطر، تهیه شد (pH=۷) (۱۳).

تولید اگزوپولی ساکارید و طراحی آزمایش

برای تولید اگزوپولی ساکارید توسط سویه باکتری باسیلوس پاستوری آزمایش های مختلفی توسط نرم افزار Qualitek-4 و با استفاده از روش تاگوچی طراحی شد. تاگوچی مجموعه ای از جداول را به عنوان جدول آرایه های متعامد تهیه می کند که بر اساس مراحل و وضعیت های مختلف آزمایش ها است. در این تحقیق برای ۳ عامل در ۳ سطح، تاگوچی ۹ مرحله آزمایش را در قالب جدول (جدول شماره ۲) پیشنهاد می کند که در ستون به نوع عامل مورد نظر و ردیف ها به سطوح هر یک از عوامل اشاره دارد. در این تحقیق ۳ عامل زمان (در سه سطح ۲۴-۴۸-۷۲ ساعت)، غلظت ساکارز (در سه سطح ۱ گرم - ۱/۵ گرم - ۲ گرم) و غلظت نمک (در سه سطح ۰/۰۵ گرم - ۰/۱ گرم - ۰/۱۵ گرم) به عنوان متغیر جهت بررسی بهترین شرایط برای تولید اگزوپولی ساکارید از باکتری *B. pasteurii* تعیین شد (جدول شماره ۱). محیط کشت تهیه

باکتری های اسید لاکتیک پلی ساکاریدهای قارچی مانند زایموزان و... هستند که از نظر خصوصیت های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی با هم متفاوت بوده و در برنامه های کاربردی تجاری و صنعتی مختلفی مورد استفاده قرار می گیرند. در مقایسه با پلی ساکاریدهای جدا شده از منابع گیاهی که برای اهداف مشابه نیز استفاده می شوند، پلی ساکاریدهای میکروبی دارای مزایای بهتری مانند: پروسه های تولید در مقیاس بزرگ یا در فضا و زمان تولید نسبتا محدود، به خوبی قابل کنترل است، ویژگی های شیمیایی پایداری دارند و میزان در دسترس بودن منابع در بازار زیاد است (۱۷).

پلی ساکاریدهای میکروبی به دو شکل تولید می شوند، پلی ساکاریدهای کپسولی^۱ و اگزوپولی ساکاریدها^۲ اگزوپولی ساکاریدهای (EPS) میکروبی پلی مرهای محلول و نامحلولی هستند که توسط میکروارگانیسم ها به محیط اطراف ترشح می شوند (۱۹). اگزوپولی ساکاریدها در بخش های مختلفی نظیر مواد غذایی و دارویی به کار برده می شوند. به علت ویژگی های فیزیکی و رئولوژیکی موجود در ساختار اگزوپولی ساکاریدها، به طور گسترده ای در صنایع غذایی به عنوان یک ماده دارای ویسکوزیته، پایدار کننده، ژله ای و یا عامل امولسیون کاربرد دارد (۴-۱۰). بر اساس مطالعه های جدید اگزوپولی ساکاریدی های تولید شده توسط باکتری ها، به عنوان فلوکولانت های زیستی، جذب کننده های زیستی، عامل حذف فلزات سنگین، عامل دارویی و... شناخته می شود (۲۱). در سال های اخیر توجه به کاربردهای بیولوژیکی اگزوپولی ساکاریدی های به دلیل فعالیت ضدتوموری، ضدویروسی، ضدالتهابی و تحریک کننده سیستم ایمنی بسار زیاد شده است (۲). در سال های اخیر پلی ساکاریدها از باکتری ها، مخمرها، قارچ ها و گیاهان گزارش شده اند که دارای فعالیت های ضداکسیدانی اند و می توانند به عنوان ضداکسیدان های طبیعی مورد استفاده قرار گیرند (۲۳). باسیلوس ها یک گروه مهم از باکتری ها است که مزایای متعددی نسبت به سایر باکتری ها دارد که شامل رشد آسان، حفظ و نگهداری بهتر است که آن را برای کارهای تولیدات صنعتی مناسب نموده است. تعداد زیادی از سویه های باسیلوس نشان داده اند که به هیچ وجه بیماری زا نیستند و علاوه بر این اگزوپولی ساکاریدهای تولید شده توسط این باکتری ها دارای طیف وسیعی از فعالیت های بیولوژیکی و ویژگی های تکنیکی نیز هستند (۸). گونه باسیلوس و سویه های آن اگزوپولی ساکاریدی های نوع لاوان β -1,3-Glucan و

¹ Capsule polysaccharides

² Exopolysaccharides

تغییر، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی-گراد قرار داده شدند تا از باکتری جدا گردند. سپس به منظور خالص سازی هر دو نمونه اگزوپلی ساکاریدی‌های متصل به سلول و ترشح شده به داخل محیط کشت نمونه‌ها در دستگاه سانتریفیوژ ۴ درجه سانتی-گراد به مدت ۱۰ دقیقه و در دور rpm ۱۰۰۰۰، سانتریفیوژ شدند (۷). مایع رویی جداسازی شده و رسوب دور ریخته شد. جهت رسوب اگزوپلی ساکاریدی به هر کدام از نمونه‌ها ۱ حجم اتانول ۹۶٪ اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و با دور rpm ۶۰۰۰ سانتریفیوژ گردید، مایع رویی دور ریخته شده و رسوب پس از خشک شدن وزن گردید (۲۲).

آنالیز FT-IR

Fourier transform infrared spectroscopy روشی است که اطلاعاتی در مورد نحوه ارتعاش و حرکت مولکول‌ها به ما می‌دهد، از این رو به‌عنوان یک تکنیک مهم برای شناسایی خصوصیت‌های یک ماده به کار می‌رود. در این پژوهش عمده-ترین گروه‌های ساختاری و عاملی اگزوپلی ساکاریدی به‌وسیله اسپکتروسکوپی با استفاده از روش KBr آنالیز شد. نمونه‌های اگزوپلی ساکاریدی در داخل پلیت‌های KBr با نسبت ۱:۱۰۰ قرار داده شدند. نمونه‌ها در دستگاه FT-IR (Bruker) Tensor 27 ساخت کشور آلمان در ناحیه فرکانس 400 cm^{-1} تا ۴۰۰۰ قرار داده شدند و نتایج به‌صورت نمودار و پیک مورد بررسی قرار گرفت (۲۰).

بررسی فعالیت ضد باکتریایی

برای بررسی فعالیت ضد میکروبی و باکتریایی، ۴ غلظت مختلف ($400\text{ }\mu\text{g/ml}$ - $300\text{ }\mu\text{g/ml}$ - $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ - $100\text{ }\mu\text{g/ml}$) از اگزوپلی ساکارید تهیه شد و بعد از استریل کردن به مدت ۲۴ ساعت به دیسک-های خالی منتقل شدند، سپس این دیسک‌ها به پلیت‌هایی که باکتری‌های اشریشیاکلی (*E. coli* ATCC 25922) از گرم منفی‌ها و استافیلوکوکوس ارئوس (*S. aureus* ATCC 43300) از گرم مثبت‌ها به‌صورت چمنی کشت داده و اضافه شدند. با کمک محلول نیم مک‌فارلند رقت مناسب از کشت ۲۴ ساعته از باکتری‌ها تهیه و سپس بر روی محیط کشت مولر-هینتون آگار کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد نگهداری شدند، سپس هاله عدم رشد باکتری‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج حاصله، با

شده و به ۹ ارلن ۲۵۰ ml اضافه و سپس در دمای $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید، سپس ۲۰٪ اوره به‌وسیله فیلترهای ۰/۲ میکرونی به محیط کشت اضافه شد. پس از اتوکلاو کردن، در شرایط به‌طور کامل استریل، به هر کدام از ارلن‌ها به‌وسیله لوپ، باکتری‌ها اضافه و سپس ارلن‌ها در انکوباتور شیکردار، در دمای $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ و چرخش rpm ۱۲۰ گرمخانه‌گذاری شدند. نمونه‌برداری از ارلن‌ها پس از گذشتن زمان‌های ۲۴ - ۴۸ - ۷۲ ساعت انجام و نتایج گزارش گردید (۱۸).

جدول ۱- عوامل و سطوح مورد بررسی

عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳
زمان (ساعت)	۲۴	۴۸	۷۲
ساکارز	۱	۱/۵	۲
غلظت نمک	۰/۰۵	۰/۱	۰/۱۵

جدول ۲- نه آزمایش طراحی شده مطابق روش تاگوچی

شماره ارلن (۲۵۰ ml)	زمان (ساعت)			غلظت ساکارز	غلظت نمک
	۲۴	۴۸	۷۲		
۱	۲۴	۱	۰/۱۵		
۲	۲۴	۱/۵	۰/۱		
۳	۲۴	۲	۰/۰۵		
۴	۴۸	۱	۰/۰۵		
۵	۴۸	۱/۵	۰/۱۵		
۶	۴۸	۲	۰/۱		
۷	۷۲	۱	۰/۱		
۸	۷۲	۱/۵	۰/۱۵		
۹	۷۲	۲	۰/۰۵		

استخراج و خالص سازی اگزوپلی ساکاریدی‌های متصل به سلول و اگزوپلی ساکاریدی‌های که توسط باکتری به محیط کشت ترشح می‌شوند

برای جداسازی اگزوپلی ساکاریدی‌های متصل به باکتری بر اساس روش Garcîagaribay and Marshall با اندکی

ΔA_1 تفاوت مقدار جذب در هر ۳۰ ثانیه برای غلظت‌های مختلف نمونه است. ΔA_0 تفاوت مقدار جذب در هر ۳۰ ثانیه بدون نمونه است (۵).

انجام مهار فعالیت رادیکال هیدروکسیل نیز بر اساس روش Fang و همکاران انجام شد که یک مخلوط واکنش حاوی ۰/۲ میلی‌لیتر brilliant green (۰/۴۵ mM)، ۰/۵ میلی‌لیتر FeSO_4 (۰.۵ mM) و H_2O_2 (۳.۰%w/v) و ۰/۵ میلی‌لیتر از رقت‌های مختلف اگزوپلیساکارید ($\mu\text{g/ml}$ ۲۰۰-۱۰۰۰-۸۰۰-۴۰۰) در لوله‌های آزمایش پوشیده شده در فویل آلومینیومی قرار داده شدند و در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفوژ شد و جذب در ۶۲۴ نانومتر اندازه‌گیری گردید. مهار فعالیت رادیکال هیدروکسیل توسط معادله زیر تعیین شد

$$\text{Hydroxyl RSA \%} = [(A_0 - A_1) / (A - A_1)] * 100$$

A_0 جذب نوری محلول با غلظت‌های مختلف نمونه است. A_1 جذب نوری محلول در غیاب نمونه است. A جذب نوری محلول در غیاب سیستم نمونه‌ها و H_2O_2 است (۵).

آنالیز آماری

به منظور دستیابی به نتایج آماری دقیق‌تر داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند. در صورتی که آنالیز یک طرفه واریانس (آنووا) از مدل خطی عمومی یک تفاوت معنادار داشته باشد سطح معنادار $p < 0.05$ مورد توجه است و همه آنالیزهای آماری با استفاده نرم‌افزار آماری SPSS ورژن ۱۶ انجام شدند.

یافته‌ها

نتایج نهایی تولید اگزوپلیساکارید

پس از نمونه‌برداری از ارلن‌ها، میزان تولید اگزوپلیساکارید تولید شده مورد آزمایش، مورد بررسی قرار گرفت و در جدول شماره یک به نمایش در آمده است. بر اساس این نتایج، ارلن شماره ۴ پس از گذشت ۴۸ ساعت بیش‌ترین مقدار اگزوپلیساکاریدی را تولید نمود که میزان آن ۳۰/۶۶ گرم / لیتر بود.

آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و وانکومایسین با غلظت (μg ۲۰۰-۴۰۰-۸۰۰-۱۰۰۰) مقایسه و ارزیابی شد (۱۲).

بررسی فعالیت ضداکسیدانی

به منظور بررسی فعالیت ضداکسیدانی ۴ غلظت از اگزوپلیساکارید (۲۰۰-۴۰۰-۸۰۰-۱۰۰۰ $\mu\text{g/ml}$) تهیه گردید و بر اساس روش Fang و همکاران مهار فعالیت رادیکالی DPPH، مهار فعالیت رادیکالی سوپراکسیدانی و مهار فعالیت رادیکال هیدروکسیل اندازه‌گیری و نتایج با آسکوربیک اسید (ویتامین C) مقایسه شد.

مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH به وسیله اگزوپلیساکاریدی بر اساس روش فانگ Fang و همکاران انجام شد که به طور مختصر به صورت زیر است. ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف اگزوپلیساکارید ($\mu\text{g/ml}$ ۲۰۰-۴۰۰-۸۰۰-۱۰۰۰) با ۰/۵ میلی‌لیتر محلول اتانولی DPPH اضافه و به طور کامل مخلوط شدند، سپس در لوله‌های آزمایشی که با فویل آلومینیومی پوشیده شده بود ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس در طول موج ۵۱۷ نانومتر جذب آن گرفته شد. مهار فعالیت‌های رادیکالی (RSA) DPPH با توجه به فرمول زیر محاسبه گردید:

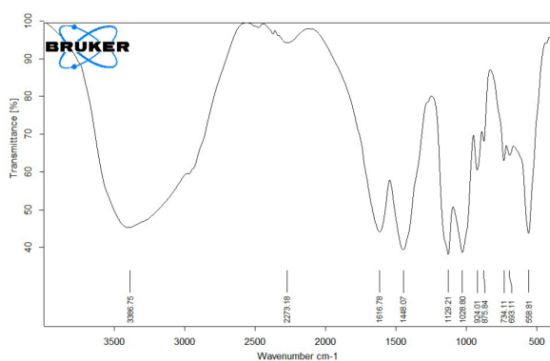
$$\text{DPPH RSA \%} = [(A_0 - A_1) / A_0] * 100$$

A_1 جذب نوری محلول با غلظت‌های مختلف نمونه است. A_0 جذب نوری محلول DPPH بدون نمونه است (۵).

مهار فعالیت رادیکالی سوپراکسیدانی با کمی تغییر به صورت زیر انجام شد. بر انجام این روش ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات (50 mM, pH 8.34) با ۰/۴ میلی‌لیتر از رقت‌های مختلف اگزوپلیساکارید ($\mu\text{g/ml}$ ۲۰۰-۴۰۰-۸۰۰-۱۰۰۰) مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر پیروکالول (۳ mM) از پیش گرم شده را در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اضافه و محلول مخلوط را سپس در جذب ۳۲۵ نانومتر به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. مهار فعالیت رادیکال آنیون سوپراکسید با توجه به فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{Superoxide anion RSA \%} = [(\Delta A_0 - \Delta A_1) / \Delta A_0] * 100$$

وجود پیک‌ها نشان دهنده پلی‌ساکاریدی بودن و خالص بودن ماده سنتز شده هست. وجود پیک په‌ن ناحیه $3396/75 \text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده گروه‌های هیدروکسل O-H است. هم‌چنین وجود پیک در ناحیه $2273/18 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه‌های C-H است. وجود پیک در ناحیه $1616/78 \text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده وجود C=O و گروه‌های کربوکسیل در این ترکیب است. پیک در ناحیه $1449/07 \text{ cm}^{-1}$ نشان دهنده وجود گروه‌های COO^- است و هم‌چنین پیک در ناحیه 900 cm^{-1} تا 1200 cm^{-1} نشان دهنده وجود گروه‌های C-O و C-O-C است (۲۰).



شکل ۱- آنالیز FT-IR پلی ساکارید تولید شده

بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی

به‌منظور بررسی فعالیت آنتی‌باکتریایی ۴ غلظت مختلف ($400-300-200-100 \mu\text{g/ml}$) از اگزوپلی‌ساکارید تهیه شد و میزان تأثیر آنتی‌باکتریال آن بر دو سویه از باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس و اش‌ریشیاکلی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن با آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و وانکومایسین با غلظت ($300 \mu\text{g/ml}$) مقایسه و در جدول شماره ۶ به نمایش در آمد. در هر دو باکتری بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد مربوط به غلظت $400 \mu\text{g/ml}$ بود. برای باکتری اش‌ریشیاکلی بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد تشکیل شده ۱۶ میلی‌متر بود که کمابیش برابر با آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (۱۷ میلی‌متر) است. برای باکتری استافیلوکوکوس ارئوس بیش‌ترین هاله عدم رشد تشکیل شده ۱۸ میلی‌متر بود که برابر با هاله عدم رشد تشکیل شده در اثر آنتی‌بیوتیک وانکومایسین (۱۸ میلی‌متر) است. به‌طور کلی با افزایش غلظت اگزوپلی‌ساکارید میزان تأثیر فعالیت آنتی‌باکتریال آن نیز افزایش پیدا کرده است. در این مطالعه میزان تأثیر غلظت اگزوپلی‌ساکارید در مقدار $100 \mu\text{g/ml}$ کم‌تر از بقیه غلظت‌ها است ولی در سایر غلظت‌ها تفاوت معناداری وجود ندارد ($P < 0.05$).

جدول ۳- نتایج نهایی تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط باکتری *B. pasteurii*

شماره آزمایش	میزان تولید (g/ml)
۱	۱۲/۶۶
۲	۱۷/۳۳
۳	۱۳/۳۳
۴	۳۰/۶۶
۵	۱۲
۶	۱۰/۶۶
۷	۶/۶۶
۸	۵/۳۳
۹	۶/۶۶

تأثیر هر یک از عوامل و سطوح آن‌ها برای تولید اگزوپلی‌ساکارید

تأثیر هر یک از سطوح و عامل‌های مختلف بر تولید اگزوپلی‌ساکارید در جدول شماره ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴- اثر سطوح مختلف عوامل بر تولید اگزوپلی‌ساکارید

عامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۱ - سطح ۲
زمان	۱۴/۴۳۹	۱۷/۷۷۳	۶/۲۱۶	۳/۳۳۳
ساکارز	۱۶/۶۵۹	۱۱/۵۵۳	۱۰/۲۱۶	-۵/۱۰۶
غلظت نمک	۱۸/۲۱۶	۹/۵۵	۱۰/۶۶۳	-۸/۶۶۶

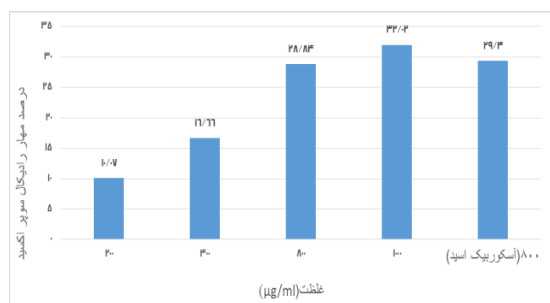
بر اساس نتایج به‌دست آمده از جدول شماره ۴ بهترین سطح مناسب برای تولید اگزوپلی‌ساکارید در جدول شماره ۵ نشان داده شده است. بر اساس این جدول بیش‌ترین سهم مربوط به عامل غلظت نمک با مقدار $5/406$ که در سطح ۱ قرار دارد. هم‌چنین کم‌ترین سهم مربوط به عامل ساکارز با میزان $3/849$ می‌باشد که در سطح ۱ قرار گرفته است. مطابق این جدول برای عامل زمان با سهم $4/963$ بهترین حالت سطح ۲ هست.

جدول ۵- تعیین سطوح مناسب برای تولید اگزوپلی‌ساکارید

عامل	سطح	سهم
زمان	۲	۴/۹۶۳
ساکاروز	۱	۳/۸۴۹
غلظت نمک	۱	۵/۴۰۶

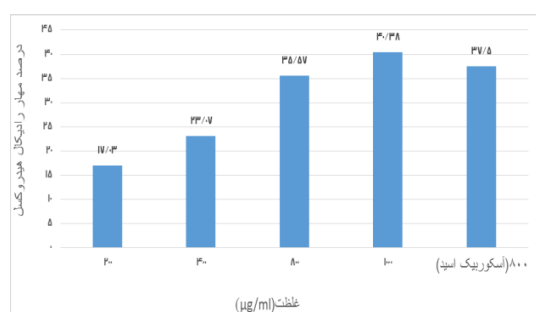
نتایج حاصل از آنالیز FT-IR

شکل شماره ۱ نتیجه FT-IR برای نمونه سنتز شده را که از فرکانس $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ در بر می‌گیرد نشان می‌دهد،



شکل ۳: درصد مهار رادیکال سوپراکسید اگزوپلیساکارید تولید شده توسط سویه *B. pasteurii* مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف از معیار بوده و تفاوت میانگین ها در سطح معنی $P < 0.05$ دار در نظر گرفته شده است.

رادیکال هیدروکسیل اکسیدانی قویی است و کمابیش می تواند با تمام مولکول های زیستی واکنش نشان دهد (۳). مهار فعالیت رادیکال هیدروکسیل به وسیله اگزوپلیساکاریدی جدا شده از باکتری *B. pasteurii* بر اساس نمودار ۴ است که در آن درصد مهار فعالیت این رادیکال در غلظت $1000 \mu\text{g/ml}$ (۴۰/۳۸٪) از غلظت $800 \mu\text{g/ml}$ آسکوربیک اسید (۳۷/۵٪) اندکی بیش تر بود.



شکل ۴- درصد مهار رادیکال هیدروکسیل اگزوپلیساکارید تولید شده توسط سویه *B. pasteurii* مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف از معیار بوده و تفاوت میانگین ها در سطح معنی $P < 0.05$ دار در نظر گرفته شده است.

بحث

در سال های اخیر پیشرفت های بسیاری در زمینه استفاده از مواد پلی مری حاصل شده است. در میان انواع پلی مرها، اگزوپلیساکاریدها به دلیل ویژگی های مطلوبی که دارند از اهمیت بالایی برخوردار هستند. به تازگی استفاده از میکروارگانیسم ها برای تولید اگزوپلیساکاریدها به دلیل کارایی بهتر هم چون خواص ضدسرطانی و ضد میکروبی در مقایسه با اگزوپلیساکاریدهای جانداران و گیاهان در حال افزایش است (۱۴). به همین منظور در این تحقیق برای حداکثری اگزوپلی-

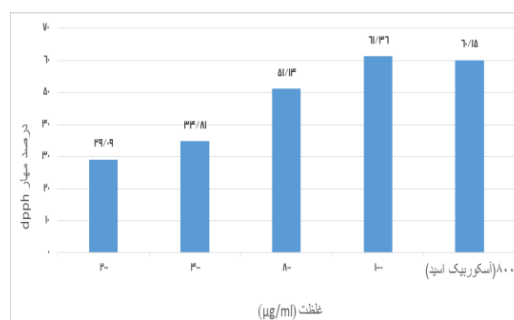
جدول ۶- تأثیر غلظت های مختلف بر عدم رشد باکتری ها

غلظت اگزوپلی- ساکارید $\mu\text{g/ml}$	<i>E. coli</i> ATCC 25922 قطر هاله عدم رشد (میلی متر)	<i>S. aureus</i> ATCC 43300 قطر هاله عدم رشد (میلی متر)
۱۰۰	10.8 ± 0.3	11.2 ± 0.3
۲۰۰	14.1 ± 0.4	15.7 ± 0.3
۳۰۰	15.5 ± 0.5	16.2 ± 0.8
۴۰۰	16.5 ± 0.6	18.5 ± 0.1
تترا سایکلین	17.7 ± 0.3	-
وانکومایسین	-	18.7 ± 0.5

مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف از معیار بوده و تفاوت میانگین ها در سطح معنی $P < 0.05$ دار در نظر گرفته شده است.

بررسی فعالیت ضد اکسیدانی

رادیکال DPPH روشی برای سنجش فعالیت ضد اکسیدانی، ضد اکسیدان ها است (۲۴). به طور خلاصه فعالیت ضد اکسیدانی اگزوپلیساکاریدی جدا شده از باکتری *B. pasteurii* به صورت نمودار ۲ است. بیش ترین میزان مهار فعالیت آنتی اکسیدانی در غلظت $1000 \mu\text{g/ml}$ (۶۱/۳۶٪) بود که کمابیش برابر با غلظت $800 \mu\text{g/ml}$ از آسکوربیک اسید (۶۰/۱۵٪) است.



شکل ۲- درصد مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH اگزوپلیساکارید تولید شده توسط سویه *B. pasteurii* مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف از معیار بوده و تفاوت میانگین ها در سطح معنی $P < 0.05$ دار در نظر گرفته شده است.

در بین تمام رادیکال های آزاد موجود برای ترکیب های زیستی، رادیکال آزاد سوپراکسید خطرناک ترین نوع است (۳). بیش ترین میزان فعالیت مهاری رادیکال سوپراکسید توسط اگزوپلیساکارید جدا شده از سویه باکتری *B. pasteurii* مربوط به غلظت $1000 \mu\text{g/ml}$ (۳۲/۰۲٪) است (نمودار ۳) که در مقایسه با میزان فعالیت مهاری غلظت $800 \mu\text{g/ml}$ آسکوربیک اسید (۲۹/۴۰٪) اندکی بیش تر است.

Shengjie و همکارانش در سال ۲۰۱۴ با بررسی فعالیت ضدباکتریایی غلظت‌های مختلف اگزوپلی‌ساکاریدهای جداسازی شده از باکتری‌های *Bifidobacterium* و *Lactobacillus* بر روی باکتری‌های بیماری‌زای اشریشیاکلی و استافیلوکوکوسارثوس اثر مہاری این اگزوپلی‌ساکاریدها را بررسی نمودند و نشان دادند که بیش‌ترین هاله عدم تشکیل شده برای غلظت ۳۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر است که برابر ۱۵/۶۷ میلی‌متر برای اشریشیاکلی و ۱۶ میلی‌متر برای استافیلوکوکوسارثوس بود (۱۱).

میزان فعالیت مہاری که برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط سه روش مہار فعالیت رادیکالی DPPH، مہار فعالیت رادیکالی سوپراکسید و مہار فعالیت رادیکال هیدروکسیل اگزوپلی‌ساکارید تولید شده در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت نشان داد که با افزایش میزان غلظت فعالیت مہاری افزایش یافته است به طوری که برای غلظت ۲۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر میزان فعالیت مہاری بسیار پایین بوده و با افزایش غلظت اگزوپلی‌ساکارید به ۱۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر میزان فعالیت مہاری نیز افزایش یافته است. در مطالعه‌های مشابهی که توسط آقای Wang و همکارانش انجام داده‌اند ثابت کردند که با افزایش غلظت‌های مختلف اگزوپلی‌ساکارید درصد مہار فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش می‌یابد که این نتایج با این مطالعه به‌طور کامل هم‌خوانی دارد (۲۰). Shengjie و همکارانش در سال ۲۰۱۴ با بررسی فعالیت مہاری غلظت‌های مختلف اگزوپلی‌ساکارید جداسازی شده از باکتری‌های *Bifidobacterium* و *Lactobacillus* نشان دادند که با افزایش غلظت اگزوپلی‌ساکارید میزان فعالیت مہاری نیز افزایش می‌یابد هم‌چنین نشان داده شد که نوع اگزوپلی‌ساکارید تولید شده توسط گونه‌های مختلف باکتریایی میزان فعالیت مہاری متفاوتی را از خود نشان می‌دهند (۱۱). هم‌چنین طی تحقیقی که توسط Abdhul در سال ۲۰۱۴ بر روی اگزوپلی‌ساکارید تولید شده توسط باکتری انتروکوکوس صورت گرفت نشان داده شد که با افزایش میزان غلظت اگزوپلی‌ساکارید میزان مہار رادیکالی نیز افزایش می‌یابد (۱). فعالیت ضداکسیدانی اگزوپلی‌ساکاریدها ممکن است تحت تأثیر ترکیب‌های مونوساکاریدها، وزن مولکولی یا روش‌های خالص‌سازی آن‌ها باشد برای مثال تحقیق‌ها ثابت کرده است که اگزوپلی‌ساکاریدهای با وزن مولکولی پایین‌تر اثر ضداکسیدانی بالاتری نسبت به اگزوپلی‌ساکاریدهای با وزن مولکولی بالا دارند (۲۰).

ساکارید با استفاده از باکتری *B.pasteuri* PTCC 1645 آزمایش طراحی شد و سپس ویژگی‌های زیستی این بیوپلی‌مر بررسی گردید. میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید بسته شرایط و ترکیب محیط کشت و هم‌چنین شرایط گرما گذاری می‌تواند متفاوت باشد. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این تحقیق افزودن ساکارز به محیط کشت با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نمک ۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و پس از گذشت مدت زمان ۴۸ ساعت باعث تولید ۳۰/۶۶ g/L اگزوپلی‌ساکارید شد. با توجه به این‌که باکتری‌ها از مواد آلی مانند ساکارز به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند افزودن آن باعث افزایش تولید حداکثری در میزان اگزوپلی‌ساکارید می‌گردد. در نتایج مشابهی که در سال ۱۹۹۷ توسط Li و همکارانش جهت بهینه‌سازی تولید اگزوپلی‌ساکاریدی از باکتری *Bacillus polymyxa* صورت گرفت بیش‌ترین میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید ۵۴ g/L تولید شد و آن‌ها در تحقیق خود دریافتند که افزایش غلظت ساکارز بیش‌ترین میزان تولید اگزوپلی‌ساکارید را در پی دارد (۱۵). با توجه به این‌که باکتری‌ها برای فعالیت حداکثری خود به مقداری نمک نیاز دارند افزودن مقدار کمی نمک به محیط کشت باعث افزایش تولید اگزوپلی‌ساکارید می‌گردد البته باید این نکته را در نظر گرفت که افزایش بیش از حد نمک باعث از بین رفتن باکتری می‌شود (۱۳). باکتری‌ها تولید خود را به‌طور معمول در انتهای فاز لگاریتمی و مراحل آخر رشد خود تکمیل می‌کنند بر همین اساس بعد از گذشت ۴۸ ساعت و نزدیک به انتهای فاز لگاریتمی باکتری حداکثر تولید اگزوپلی‌ساکارید را داشته است. در مطالعه‌های مشابهی که توسط Moreno و همکارانش در سال ۱۹۹۹ صورت گرفته است نشان داده شده که تولید اگزوپلی‌ساکاریدی در بیش‌تر باکتری‌ها پس از توقف رشد، افزایش می‌یابد (۱۶). این مسئله تأیید می‌نماید که تولید اگزوپلی‌ساکاریدی بعد از فاز لگاریتمی صورت می‌گیرد، زمانی که باکتری وارد فاز سکون (۴۸ ساعت بعد از کشت) می‌شود. در این تحقیق میزان هاله عدم رشد ایجاد شده مطابق نتایج به‌دست آمده که برای غلظت‌های مختلف نشان‌داده شده است بیش‌ترین هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۴۰۰ μg/ml هست که برای استافیلوکوکوسارثوس ۱۸ میلی‌متر و برای اشریشیاکلی ۱۶ میلی‌متر بود. در این تحقیق از آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و وانکومایسین (۳۰۰ μg) به‌عنوان شاهد استفاده شد که میزان هاله عدم رشد تشکیل شده برای اشریشیاکلی ۱۷ میلی‌متر است که برابر غلظت ۴۰۰ μg/ml است و برای استافیلوکوکوسارثوس ۱۸ میلی‌متر بود.

نتیجه گیری

در این مطالعه برای تولید بیشترین میزان اگزوپلیساکارید به دست آمده از سویه باکتری *B.pasteuri* چند عامل کلیدی در نظر گرفته شد و نتایج نشان داد افزایش ساکارز به عنوان منبع کربن و افزودن مقدار کمی نمک باعث تولید اگزوپلیساکارید در انتهای فاز لگاریتمی می شود. سپس به بررسی خواص آنتیباکتریال و آنتی اکسیدانی اگزوپلیساکارید پرداخته شد و نتایج به دست آمده نشان داد که از این اگزوپلیساکارید می توان به عنوان مواد ضدباکتریال و ضد اکسیدان در موارد به خصوص سی اسفاده نمود.

منابع

1. Abdhul K, Ganesh M, Shanmughapriya S, Kanagavel M, Anbarasu K, Natarajaseenivasan K. Antioxidant activity of exopolysaccharide from probiotic strain *Enterococcus faecium* (BDU7) from Ngari. *Int J Biol Macromol*. 2014; 70: 450-454.
2. Arena A, Maugeri TL, Pavone B, Iannello D, Gugliandolo C, Bisignano G. Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. *Int Immunopharmacol*. 2006; 6(1): 8-13.
3. Borgio JF, Bency BJ, Ramesh S, Amuthan M. Exopolysaccharide production by *Bacillus subtilis* NCIM 2063, *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 2862 and *Streptococcus mutans* MTCC 1943 using batch culture in different media. *Afric J Biotechnol*. 2009; 8(20).
4. Degeest B, De Vuyst L. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Appl Environ Microbiol*. 1999; 65(7): 2863-2870.
5. Fang Y, Liu S, Lu M, Jiao Y, Wang S. A novel method for promoting antioxidant exopolysaccharides production of *Bacillus licheniformis*. *Carbohydr Polym*. 2013; 92(2): 1172-1176.
6. Freitas F, Alves VD, Reis MA. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol*. 2011; 29(8): 388-398.
7. Garcia-Garibay M, Marshall VM. Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J Appl Microbiol*. 1991; 70(4): 325-328.
8. Han Y, Liu E, Liu L, Zhang B, Wang Y, Gui M, Wu R, Li P. Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061. *Carbohydr Polym*. 2015; 115: 230-237.
9. Hussain A, Zia KM, Tabasum S, Noreen A, Ali M, Iqbal R, Zuber M. Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. *Int J Biol Macromol*. 2017; 94: 10-27.
10. Laws A, Gu Y, Marshall V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol Adv*. 2001; 19(8): 597-625.
11. Li S, Huang R, Shah NP, Tao X, Xiong Y, Wei H. Antioxidant and antibacterial activities of exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 and *Lactobacillus plantarum* R315. *J dairy Sci*. 2014; 97(12): 7334-7343.
12. Li S, Shah NP. Antioxidant and antibacterial activities of sulphated polysaccharides from *Pleurotus eryngii* and *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. *Food Chem*. 2014; 165: 262-270.
13. Liu C, Lu J, Lu L, Liu Y, Wang F, Xiao M. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Bioresour Technol*. 2010; 101(14): 5528-5533.
14. Mahdhi A, Leban N, Chakroun I, Chaouch MA, Hafsa J, Fdhila K, Mahdouini K, Majdoub H. Extracellular polysaccharide derived from potential probiotic strain with antioxidant and antibacterial activities as a prebiotic agent to control pathogenic bacterial biofilm formation. *Microb Pathogen*. 2017.
15. Manca MC, Lama L, Improta R, Esposito E, Gambacorta A, Nicolaus B. Chemical composition of two exopolysaccharides from *Bacillus thermoantarcticus*. *Appl Environ microbiol*. 1996; 62(9): 3265-3269.
16. Moreno J, Vargas-García C, Lopez MJ, Sánchez-Serrano G. Growth and exopolysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* in media containing phenolic acids. *J appl microbiol*. 1999; 86(3): 439-445.
17. Reshetnikov SV, Tan KK. Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. *Int J Med Mush*. 2001; 3(4): 61-94.
18. Salehghamari E, Amoozegar MA. Optimization of lipase production in *Salinivibrio* sp. SA2 by Taguchi design. *Nova Biol Rep*. 2017; 3 (4): 288-294. [Full text in Persian]

19. Suresh Kumar A, Mody K, Jha B. Bacterial exopolysaccharides—a perception. *J basic Microbiol.* 2007; 47(2): 103-117.
20. Wang J, Zhao X, Yang Y, Zhao A, Yang Z. Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *Int J Biol Macromol.* 2015; 74: 119-126.
21. Wang Y, Ahmed Z, Feng W, Li C, Song S. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *Int J Biol Macromol.* 2008; 43(3): 283-288.
22. Xu R, Shen Q, Ding X, Gao W, Li P. Chemical characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide fraction isolated from *Bifidobacterium animalis* RH. *Eur Food Res Technol.* 2011; 232(2): 231-240.
23. Yin JY, Nie SP, Zhou C, Wan Y, Xie MY. Chemical characteristics and antioxidant activities of polysaccharide purified from the seeds of *Plantago asiatica* L. *J Sci Food Agric.* 2010; 90(2): 210-217.
24. Zheng Y, Ye ZL, Fang XL, Li YH, Cai WM. Production and characteristics of a biofloculant produced by *Bacillus* sp. F19. *Bioresour Technol.* 2008; 99(16): 7686-7691