

# بررسی نقش بیولوژیک عصاره‌ی زعفران در تحریک فعالیت ضد میکروبی انتروکوکوس هایرانی

مهسا یگانه<sup>۱\*</sup>، آیتا خنآفری<sup>۲</sup>، محمدرضا فلاحیان<sup>۳</sup>، انوشه شریفان<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

<sup>۲</sup> استادیار گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

<sup>۳</sup> مربی گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

<sup>۴</sup> استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹ / ۵ / ۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹ / ۸ / ۱۳

## چکیده

هدف از این تحقیق، بررسی نقش بیولوژیک عصاره‌ی زعفران در تحریک فعالیت ضد میکروبی انتروکوکوس هایرانی می‌باشد. پس از کشت انتروکوکوس هایرانی در محیط کشت BHI Broth، سانتریفیوژ و جداسازی توده‌ی میکروبی، ترکیبات ضد میکروبی توسط دیالیز خالص سازی شدند و وزن مولکولی ترکیبات استخراج شده، توسط الکتروفورز SDS-PAGE تخمین زده شد. عصاره‌ی زعفران با سوسپانسیون میکروبی ترکیب شد و غلظت پروتئین، واحد فعالیت و فعالیت کل نمونه‌ها تعیین گردید. اثر ضد میکروبی این نمونه‌ها با استفاده از روش چاهک ارزیابی شد و در ادامه حداقل غلظت باکتریواستاتیکی ترکیبات ضد میکروبی تعیین گردید. با بررسی تاثیر ضد میکروبی و ارزیابی کم‌ترین غلظت باکتریواستاتیکی انتروسین بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس، لیستریا مونوسیتوجنز و کلبسیلا پنومونیه، مشخص شد که بیش‌ترین تاثیر ضد میکروبی و کم‌ترین غلظت باکتریواستاتیکی انتروسین، بر روی لیستریا مونوسیتوجنز بوده است. با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، عصاره‌ی زعفران می‌تواند بر روی تولید انتروسین و اثر ضد میکروبی انتروکوکوس هایرانی، تاثیر سینرژیستی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: انتروسین، انتروکوکوس هایرانی، عصاره‌ی زعفران، لیستریا مونوسیتوجنز.

۱- مقدمه

امروزه، استفاده از مواد طعم دهنده در صنعت غذا رو به گسترش می‌باشد. برخی از این مواد که شامل عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی هستند، دارای اثر ضد میکروبی وسیعی علیه بسیاری از عوامل میکروبی می‌باشند. زعفران دارای مواد روغنی، املاح معدنی، موسیلاژ، آلورون، تانن، هتروزیدی به نام پیکروکروسین، ترکیبی به نام پیکروکروزینوزید، کروسین، گلوکوزیدی به نام آپی‌نین و اسانس است. عصاره‌ی حاصل از زعفران، دارای تاثیر ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بر ضد بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی می‌باشد. از این گذشته، برای ایجاد طعم زعفران در مواد غذایی مختلف، خصوصاً بستنی می‌توان از این ماده طعم دهنده‌ی گیاهی استفاده نمود (۳).  
 انتروسین‌ها، پروتئین‌های فعال بیولوژیکی هستند که خصوصیات ضد میکروبی در مقابل گونه‌های خیلی نزدیک، مربوط به ارگانسیم تولید کننده نشان می‌دهند (۸). به طور کلی، انتروسین‌ها، پروتئین‌های کاتیونی مشابه کوچک بوده که شامل ۳۰ تا ۶۰ امینو اسید با یک نقطه ایزوالکتریک بالا می‌باشند که در ارگانسیم تولید کننده، دارای طیف عمل، وزن مولکولی و خصوصیات بیوشیمیایی متنوع می‌باشند (۱۲). از دیگر مزایای این پروتئین‌ها این است که غیر سمی بوده، به آسانی هضم می‌شوند و می‌توانند برای افزایش سلامت و طول عمر مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند. بسیاری از انتروکوک‌های جدا شده از فرآورده‌های شیری، قادر به تولید انتروسین‌هایی با طیف ضد میکروبی وسیع بر ضد باکتری‌های بیماری‌زا و عامل فساد مواد غذایی می‌باشند (۱۰). با توجه به نقش زعفران به عنوان یک ترکیب طعم دهنده و رنگ دهنده در صنعت غذا و هم چنین حضور انتروکوک‌های پاتوژنیک به عنوان یک پروبیوتیک ایمن در مواد غذایی، هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی تحرک کنندگی عصاره‌ی زعفران جهت تولید انتروسین توسط انتروکوکوس‌های پاتوژن (PTCC ۱۲۳۹) بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سویه‌های میکروبی

به منظور بررسی توان تولید انتروسین، باکتری انتروکوکوس‌های پاتوژن<sup>۱</sup> (PTCC 1239)، به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. اثر ضد میکروبی عصاره‌های تخمیری و رسوبات پروتئینی حاصل از باکتری انتروکوکوس‌های پاتوژن بر روی شش باکتری جدا شده از نمونه‌های بالینی ارزیابی شد. شش باکتری بیماری‌زا شامل سه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس ارئوس<sup>۲</sup>، لیستریا مونوسیتوجنز<sup>۳</sup>، باسیلوس سرئوس<sup>۴</sup> و سه باکتری گرم منفی اشرشیاکلی<sup>۵</sup>، کلبسیلا پنومونیه<sup>۶</sup> و سالمونلا پاراتیفی<sup>۷</sup> بودند که در پلیت‌های کشت داده شده از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهیه شدند.

۲-۲- تهیه کشت آغازگر

برای تهیه‌ی کشت آغازگر از سویه انتروکوکوس، سویه باکتریایی لیوفیلیزه پودری در ۵ میلی‌لیتر از آب مقطر استریل حل شد و بدین ترتیب، سوسپانسیونی از باکتری ایجاد شد. این سوسپانسیون، جهت رشد باکتری به مدت ۴۸ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷<sup>oC</sup> با دور ۱۵۰ rpm مدل IRC-1-7 قرار گرفت (۵).

۲-۳- شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی و انجام

آزمون‌های بیوشیمیایی بر روی سوش انتروکوکوس

به منظور تایید باکتری انتروکوکوس‌های پاتوژن، پس از کشت این باکتری در پلیت‌های حاوی محیط کشت BHI Agar<sup>۸</sup> (ساخت شرکت مرک آلمان) و گرمخانه‌گذاری نمونه‌ها در گرمخانه ۳۷<sup>oC</sup> و حاوی ۰.۵٪ گاز CO<sub>۲</sub>، مدل IRC-1-7 (CO<sub>۲</sub> مورد نیاز از طریق تنظیم میزان CO<sub>۲</sub> در انکوباتور حاوی کپسول CO<sub>۲</sub> فراهم شد)، مشخصات ماکروسکوپی کلنی‌های

- 1- Enterococcus hirae
- 2- Staphylococcus aureus
- 3- Listeria monocytogenes
- 4- Bacillus cereus
- 5- Escherichia coli
- 6- Klebsiella pneumoniae
- 7- Salmonella paratiph
- 8- Brain Hearth Infusion Agar

در محیط کشت، فاز مایع حاصل از نمونه‌های سانتریفیوژ شده ۲۴ ساعته (مطابق با منحنی رشد در فاز لگاریتمی رشد) به آرامی به ارلن استریل انتقال داده شد. ارلن به ظروف حاوی یخ بر روی همزن مغناطیسی منتقل شد و به نسبت ۵۰٪ حجم موجود در ارلن، سولفات آمونیوم (ساخت شرکت مرک آلمان) افزوده شد. برای رسوب ترکیبات ضد میکروبی با ماهیت پروتئینی در فاز لگاریتمی رشد از تیمار عصاره‌ی محیط کشت با سولفات آمونیوم استفاده شد. در این روش، حلالیت پروتئین‌ها با افزودن نمک‌ها، حلال‌های آلی و سایر ترکیباتی که حلالیت زیادی دارند، کاهش داده می‌شود (۱۴). نمونه‌ها به مدت یک شب در یخچال  $4^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند تا سولفات آمونیوم به خوبی حل شود. محتویات ارلن شامل رسوبات حاصل و محلول حاوی رسوب به لوله‌های استریل منتقل شدند و در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار Beckman model J2-21 با دور  $16000 \times \text{rpm}$  سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی جدا شد و رسوب حاصل در یک میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار (pH=7) حل گردید. سپس محلول‌های رویی و رسوبات پروتئینی حاصل از لحاظ فعالیت ضد میکروبی مورد سنجش قرار گرفتند و بخش دیگری از آن رسوبات برای انجام دیالیز کنار گذاشته شدند (۱۵).

## ۲-۶- خالص سازی رسوبات پروتئینی استخراج شده توسط

### روش دیالیز

جهت تخلیص ترکیبات پروتئینی رسوب کرده از روش دیالیز استفاده گردید. آزمایش‌های اولترافیلتراسیون نشان داده است که باکتریوسین‌ها قادر به عبور از غشاءهایی با cut-off های ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ کیلودالتون نیستند (۱۷). بدین منظور از کیسه‌ی دیالیز، Arthor H. Thomas Co., Cat No.3787-D  $42.1 \times 1.8 \text{ inch}$  با سایز 12000 KDa استفاده گردید. کیسه‌ی دیالیز، درون یک بشر یک لیتری حاوی آب قرار داده شد. برای پاک کردن مواد محافظ پوشاننده از روی کیسه، بشر به مدت ۴ ساعت در زیر جریان آب قرار گرفت. سپس، کیسه‌ی دیالیز به قطعه‌ی ۸ سانتی متری 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 pH=7 (ساخت شرکت مرک آلمان) حل شدند.

انتروکوکوس از قبیل شکل، اندازه و مشخصات میکروسکوپی، توسط رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند و توانایی مصرف دو قند لاکتوز و ساکارز و اسید آمینه آرژنین در آن‌ها بررسی شد (۶).

## ۲-۴- ارزیابی منحنی رشد باکتری بر اساس جذب نور

به منظور ارزیابی نمودار رشد باکتری جدا شده از کشت ۲۴ ساعته، پس از رسیدن میزان جذب نور (OD) سوسپانسیون باکتری توسط طیف نورسنج مدل Genova Frequency 50/60 HZ Cat Ref در طول موج 600 nm، به محدوده‌ی ۰/۸-۱، سوسپانسیون حاصل به عنوان کشت تلقیح استفاده شد و به نسبت ۵٪ به محیط کشت BHI Broth (حاوی ۱٪ سوکسینات آمونیوم و آنزیم کاتالاز، ساخت شرکت مرک آلمان) افزوده شد. نمونه‌ها در گرمخانه  $37^{\circ}\text{C}$  (حاوی ۵٪  $\text{CO}_2$ ) گرمخانه گذاری شدند. میزان جذب نور نمونه‌ها توسط طیف نورسنج در طول موج 600 nm طی ۲۴ ساعت، هر ۲ ساعت یکبار و در فاصله‌ی زمانی ۲۴ ساعت تا ۴۸ ساعت، هر ۲۴ ساعت یکبار تعیین و نمودار رشد باکتری با استفاده از نرم افزار Excell رسم شدند (۶).

## ۲-۵- استخراج مواد ضد میکروبی تولید شده توسط

### انتروکوک

از باکتری انتروکوکوس، سوسپانسیون میکروبی با جذب نور در محدوده‌ی ۰/۸-۱ به عنوان کشت تلقیح تهیه شد و به نسبت ۵٪ به محیط کشت BHI Broth (حاوی ۱٪ سوکسینات آمونیوم) انتقال داده شد. سوپیه‌ی مورد نظر به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه  $37^{\circ}\text{C}$  (حاوی ۵٪  $\text{CO}_2$ ) گرمخانه‌گذاری شد. به منظور کنترل pH محیط کشت میکروبی در طی گرمخانه‌گذاری، pH محیط کشت در زمان‌های گوناگون توسط دستگاه pH سنج تعیین و با افزودن محلول ۱ مولار NaOH، در محدوده‌ی ۷ تا ۷/۵ قرار داده شد. پس از خنثی سازی، سوسپانسیون میکروبی، محیط کشت توسط دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار Beckman model J2-21، در دمای  $4^{\circ}\text{C}$ ، به مدت ۵۰ دقیقه در  $16000 \times \text{rpm}$  سانتریفیوژ شد و توده‌ی سلولی تولید شده جداسازی گردید. جهت استخراج ترکیب ضد میکروبی موجود

هاله عدم رشد مربوط به ترکیب ضد میکروبی بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد (۱۸).

#### ۲-۸- تعیین حداقل غلظت باکتریواستاتیکی

برای تعیین حداقل غلظت باکتریواستاتیکی<sup>۱</sup>، از روش رقیق‌سازی در محیط مایع<sup>۲</sup> استفاده شد. بدین منظور، رقت‌های ۰/۱، ۰/۰۳/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۰۷/۰۶، ۰/۰۹، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۰۶، ۰/۰۸، ۱، ۱/۲، ۱/۶ گرم بر لیتر از رسوبات پروتئینی با غلظت مشخص تهیه شدند. سپس، کشت ۲۴ ساعته هر یک از باکتری‌های بیماریزا، به لوله‌های حاوی رقت‌های مختلف رسوبات پروتئینی تلقیح شدند. لوله‌های حاوی رقت‌های متفاوت، از لحاظ کدورت (میزان OD) در مقایسه با لوله فاقد رسوبات پروتئینی در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از گرمخانه‌گذاری نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کنترل گردیدند. مقدار حداقل غلظت باکتریواستاتیکی، به عنوان حداقل غلظتی از رسوبات پروتئینی که مانع از رشد می‌شود، تعیین گردید (۲).

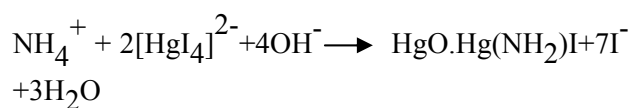
#### ۲-۹- ارزیابی و سنجش پروتئین استخراج شده توسط روش لوری

غلظت‌های ۰، ۱/۵، ۰، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴ گرم در لیتر از پروتئین سرم آلبومین گاوی در آب مقطر تهیه گردید و پس از افزودن محلول کوماسی برلیانت بلو، منحنی استاندارد در طول موج ۶۰۰ nm رسم شد. میزان پروتئین موجود در نمونه پس از خواندن جذب نور در طول موج ۶۰۰ nm و مقایسه با منحنی استاندارد بر حسب g/L تعیین شد (۴).

#### ۲-۱۰- محاسبه‌ی میزان پروتئین‌های استخراج شده

در هر مرحله، برای هر بخش، این موارد محاسبه شدند: حجم نهایی<sup>۳</sup>، واحد فعالیت<sup>۴</sup>، فعالیت کل<sup>۵</sup>، فعالیت اختصاصی<sup>۶</sup>،

محتویات فوق به درون کیسه‌ی دیالیز انتقال داده شد و سمت دیگر کیسه توسط چسب مسدود گردید. سپس در یک ارلن ۲۰۰ میلی‌لیتری، به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ مولار ریخته و ارلن مذکور در یخچال ۴°C قرار گرفت. نمونه‌ی درون کیسه، در این بافر قرار داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در آن شناور گردید. پس از ۲۴ ساعت، بافر تعویض و مجدداً کیسه در بافر تازه غوطه ور شد. پس از دیالیز جهت تأیید روند آزمایش از معرف نسلر (ساخت شرکت مرک آلمان) استفاده گردید. ایجاد رنگ قرمز آجری در اثر افزودن معرف نسلر به محلول مورد نظر نشان دهنده‌ی وجود یون‌های آمونیوم در محلول فوق می‌باشد که ناشی از ایجاد ترکیب زیر است:



حساسیت تست نسلر تا ۰.۳ μg NH<sub>3</sub> در ۲ μl نمونه می‌باشد (۷). پس از سه بار تعویض بافر و استفاده از معرف نسلر، به منظور خروج سولفات آمونیوم محتویات کیسه به لوله‌های استریل منتقل شده و جهت بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی، مورد سنجش قرار گرفتند. حجم نمونه قبل و بعد از دیالیز به دقت اندازه‌گیری و یادداشت گردید. از نمونه‌ی مورد نظر، مقادیر یکسانی برای انجام آزمون لوری و اندازه‌گیری میزان پروتئین کنار گذاشته شد (۱۳).

#### ۲-۷- بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره‌های تخمیری و رسوبات پروتئینی قبل و بعد از دیالیز توسط روش چاهک

سوسپانسیون میکروبی با جذب نور (OD) در محدوده‌ی ۰.۸-۱ 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 تهیه‌ی چاهک‌هایی به قطر ۳ میلی‌متر توسط پیست پاستور در درون پلیت‌ها، ۵۰ میکرولیتر از ترکیبات ضد میکروبی جدا شده از انتروکوکسی به هرچاهک افزوده شد. به منظور انتشار بهتر ترکیبات ضد میکروبی در محیط کشت BHI Agar، پلیت‌ها به مدت یک ساعت در یخچال ۴°C سرماگذاری شدند. سپس، پلیت‌ها به گرمخانه ۳۷°C منتقل شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، قطر

1- Minimum Inhibitory Concentration  
2- Broth Dilution Technique  
3- Total volum  
4- Total unit  
5- Total activity (حجم نهایی × واحد فعالیت)  
6- Specific activity  
(فعالیت اختصاصی: واحد فعالیت ÷ غلظت پروتئین)

## ۳- نتایج و بحث

## ۳-۱- آزمون های میکروسکوپی و ماکروسکوپی

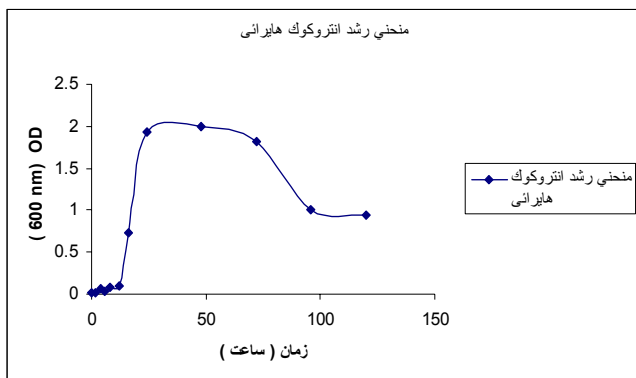
در مشاهدات میکروسکوپی، کلنی های انتروکوکوس هایرائی در زیر میکروسکوپ به صورت کروی شکل و بنفش رنگ مشاهده شدند. مشاهدات ماکروسکوپی این باکتری بر روی پلیت‌های BHI Agar، کلنی های ریز سرسوزنی را نشان داد.

## ۳-۲- آزمون های بیوشیمیایی

نتایج حاصل از آزمون های بیوشیمیایی، نشان داد که انتروکوکوس هایرائی، قادر به مصرف قند لاکتوز و ساکارز نیست و به دلیل داشتن آنزیم آرژنین دهیدرولاز، توانایی استفاده از اسید آمینه آرژنین را دارد.

## ۳-۳- تعیین منحنی رشد باکتری

میزان کدورت پس از یک تاخیر کوتاه (Lag phase) در حدود ۸ ساعت پس از تلقیح اولیه، به تدریج افزایش یافته و بعد از ۴۸ ساعت از تلقیح اولیه، به حداکثر رسید (شکل ۱). بر این اساس، فاز رشد لگاریتمی باکتری انتروکوکوس هایرائی، در فاصله‌ی زمانی ۴۸-۸ ساعت تعیین گردید.



شکل ۱- منحنی رشد انتروکوکوس هایرائی

## ۳-۴- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های تخمیری به

## همراه عصاره‌ی زعفران بر ضد سوبه‌های بیماریزا

نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد عصاره‌های تخمیری انتروکوکوس هایرائی پس از گذشت ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نشان داد که تاثیر ضد میکروبی عصاره های تخمیری سوش هایرائی، بر روی باکتری‌های گرم مثبت، بیش تر از باکتری‌های گرم منفی است و

غلظت پروتئین<sup>۱</sup>، پروتئین کل<sup>۲</sup>، درصد بازیافت<sup>۳</sup>، ضریب تخلیص<sup>۴</sup> و راندمان<sup>۵</sup>. تیترا بخش های فوق به عنوان معکوس بیش ترین رقی که قادر به مهار قطعی سوبه های بیماریزا بود، بر حسب واحد فعالیت / میلی لیتر (Activity Unit / ml) بیان شد (۱۵).

## ۲-۱۱- میزان تولید ترکیب ضد میکروبی

برای تعیین میزان تولید ترکیب ضد میکروبی بر حسب U/mL، واحد فعالیت این ترکیب (U/mL) در زمان های متفاوت، محاسبه و منحنی میزان تولید، رسم شد.

## ۲-۱۲- الکتروفورز

به منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین های حاصل در این تحقیق، از تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE با تکنیک رنگ آمیزی کماسی بلوا استفاده گردید (۴).

## ۲-۱۳- آماده‌سازی عصاره‌ی زعفران و بررسی تاثیر این

## عصاره بر روی رشد و تولید انتروسین

۵۰ گرم زعفران با ۲۰۰ میلی لیتر از آب مقطر مخلوط گردید و توسط حرارت ملایم (۱۰۰ °C) در بن ماری استخراج شد. محتویات حرارت دیده طی چند مرحله از کاغذ صافی عبور داده شدند و عصاره‌ی تقریباً خالص به دست آمد. سپس، این عصاره به نسبت ۵۰:۵۰ با سوسپانسیون حاوی باکتری انتروکوکوس هایرائی و (با جذب نور ۱-۸/۰) مخلوط گردید. طبق روش‌های ذکر شده، مراحل تعیین منحنی رشد و سنجش pH و بررسی تاثیر ضد میکروبی و تعیین میزان تولید انتروسین برای نمونه‌های حاوی عصاره‌ی زعفران و انتروکوکوس هایرائی تکرار گردید. کلیه‌ی آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excell رسم شدند.

1- Protein concentration

2- Protein total (غلظت پروتئین فراکسیون ÷ حجم نهایی)

3- Recovery

(میزان پروتئینی فراکسیون ÷ میزان پروتئین کل عصاره خام × ۱۰۰)

4- Purification factor

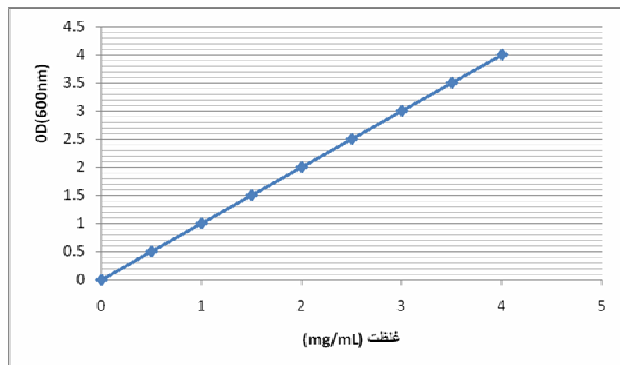
(فعالیت اختصاصی فراکسیون خالص شده ÷ فعالیت اختصاصی عصاره خام)

5- Yeild

(فعالیت کل فراکسیون خالص شده ÷ فعالیت کل عصاره خام × ۱۰۰)

### ۳-۶- تعیین منحنی استاندارد تست لوری

غلظت پروتئین رسوبات استخراج شده از باکتری ها، پس از خواندن OD در طول موج ۶۰۰ nm و مقایسه با منحنی استاندارد بر حسب g/L تعیین شد (شکل ۲).



شکل ۲- منحنی استاندارد تست لوری

### ۳-۷- تعیین حجم نمونه، واحد فعالیت، فعالیت کل، فعالیت

اختصاصی، غلظت پروتئین و پروتئین کل، ضریب تخلیص، راندمان و درصد بازیافت نمونه‌های شاهد و نمونه‌های

#### حاوی عصاره زعفران

مقادیر مربوط به حجم نمونه، واحد فعالیت، فعالیت کل، فعالیت اختصاصی، غلظت پروتئین و پروتئین کل، ضریب تخلیص، راندمان و درصد بازیافت نمونه‌های شاهد و نمونه‌های حاوی عصاره زعفران در جدول ۴ و ۵ آورده شده است. با مقایسه نتایج به دست آمده از این تحقیق با نتایج حاصل از تحقیق Jianhua Xie و همکاران در سال ۲۰۰۹، بر روی فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین‌های حاصل از باکتری‌های *Bacillus CGMCC1.354*، *E.Coli IVDC C83901*، *Bacillus subtilis CGMCC1.769*، *subtilis*، *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 این رو، باکتریوسین‌های حاصل از انتروکوک هائیرائی، دارای فعالیت بیش‌تری (۳۷۵۰ U) نسبت به کلیه باکتریوسین‌های فوق بوده‌اند. این اختلاف به علت قوی‌تر بودن تاثیر ضد میکروبی باکتریوسین انتروکوک هائیرائی و مناسب بودن ماده شیمیایی سولفات آمونیوم برای استخراج این باکتریوسین‌ها بوده است (۱۱).

عصاره زعفران، موجب افزایش فعالیت ضد میکروبی سوش هائیرائی می‌شود (جدول ۱). تاثیر ضد میکروبی عصاره تخمیری انتروکوک هائیرائی، از ساعت ۸ تا ۴۸ به دلیل وجود باکتری در فاز لگاریتمی افزایش یافت. Sabia و همکاران، در سال ۲۰۰۱ تاثیر محلول رویی فیلتر شده خام حاصل از *Enterococcus casseliflavus IM416K1* را بر روی لیستریا مونوسیتوجنز بررسی کردند. این محققین قطر هاله عدم رشد به دست آمده را ۱۵-۱۰ میلی متر گزارش کردند. با مقایسه نتایج حاصل از تاثیر ضد میکروبی عصاره این باکتری با تاثیر ضد میکروبی عصاره حاصل از انتروکوک هائیرائی، مشاهده شد که انتروکوک هائیرائی تاثیر ضد میکروبی بیش‌تری بر ضد باکتری لیستریا مونوسیتوجنز داشته است (۱۶).

### ۳-۵- تاثیر عصاره زعفران بر روی اثر ضد میکروبی

رسوبات پروتئینی حاصل از باکتری ها در قبل و بعد از دیالیز پس از فرایند دیالیز، به دلیل حذف برخی از ناخالصی‌های موجود در محیط کشت، خصوصاً سولفات آمونیوم، تاثیر ضد میکروبی کاهش و در برخی از نمونه‌ها ثابت باقی ماند (جدول ۲).

### ۳-۶- تاثیر عصاره زعفران بر روی حداقل غلظت

#### باکتریواستاتیکی رسوبات پروتئینی استخراج شده

میزان حداقل غلظت باکتریواستاتیکی رسوبات پروتئینی استخراج شده برای باکتری‌های گرم مثبت بیش‌تر از گرم منفی بود (جدول ۳).

طبق نتایج مشاهده شده در جدول ۲، میان حداقل غلظت مورد نیاز برای جلوگیری از رشد باکتری‌های مورد بررسی با میزان مقاومت باکتری‌ها به ترکیبات ضد میکروبی، رابطه‌ی معکوس وجود دارد. با مقایسه نتایج به دست آمده با نتایج حاصل از تاثیر ضد میکروبی رسوبات پروتئینی استخراج شده به همراه عصاره زعفران، تاثیر زعفران بر افزایش فعالیت ضد میکروبی انتروکوک هائیرائی کاملاً مشخص شد.

جدول ۱- نتایج قطر هاله‌ی عدم رشد عصاره‌ی انتروکوکوس هایرائی در نمونه‌ی شاهد و نمونه‌ی حاوی عصاره‌ی زعفران در طی دوره‌ی گرمخانه‌گذاری

قطر هاله‌ی عدم رشد (mm)		لیستریا مونوسیتوژنز				استافیلوکوک آرئوس				باسیلوس سرئوس				کلبسیلا نومونیه				سالمونلا پاراتیفی				اشرشیاکلی			
		گرمخانه‌گذاری (h)				گرمخانه‌گذاری (h)				گرمخانه‌گذاری (h)				گرمخانه‌گذاری (h)				گرمخانه‌گذاری (h)				گرمخانه‌گذاری (h)			
		۸	۱۶	۲۴	۴۸	۸	۱۶	۲۴	۴۸	۸	۱۶	۲۴	۴۸	۸	۱۶	۲۴	۴۸	۸	۱۶	۲۴	۴۸	۸	۱۶	۲۴	۴۸
انتروکوک هایرائی		۱۹	۲۴	۳۹	۴۱	۱۰	۱۸	۳۰	۳۳	۱۸	۲۲	۳۳	۳۵	-	۷	۱۸	۲۰	-	۷	۱۷	۱۹	-	۷	۲۳	۲۷
انتروکوک هایرائی و زعفران		۲۷	۳۵	۴۵	۴۷	۲۳	۲۹	۳۹	۴۰	۲۸	۳۳	۴۱	۴۵	-	۱۲	۲۶	۲۹	-	۱۲	۲۱	۳۶	۱۰	۱۵	۳۰	۳۴

جدول ۲- تاثیر عصاره‌ی زعفران بر روی اثر ضد میکروبی رسوبات پروتئینی باکتری‌ها پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در قبل و بعد از دیالیز

قطر هاله عدم رشد (mm)		استافیلوکوکوس آرئوس		لیستریا مونوسیتوژنز		باسیلوس سرئوس		کلبسیلا پنومونیه	
		قبل از	پس از	قبل از	پس از	قبل از	پس از	قبل از	پس از
		دیالیز	دیالیز	دیالیز	دیالیز	دیالیز	دیالیز	دیالیز	دیالیز
انتروکوک هایرائی		۱۸	۱۴	۲۵	۲۳	۱۱	۱۱	۱۴	۱۲
انتروکوک هایرائی و زعفران		۲۴	۲۳	۳۲	۳۰	۱۶	۱۴	۱۸	۱۸

جدول ۳- تاثیر عصاره‌ی زعفران بر روی حداقل غلظت باکتریواستاتیکی رسوبات پروتئینی استخراج شده

حداقل غلظت باکتریواستاتیکی (g/l)				
کلبسیلا	باسیلوس	لیستریا	استافیلوکوکوس	
پنومونیه	سرئوس	مونوسیتوجنز	ارئوس	
۲	۱/۵	۰/۵	۱/۵	انتروکوک هایرائی
۱/۵	۱	۰/۳	۱	انتروکوک هایرائی و زعفران

جدول ۴- تعیین حجم نمونه، واحد فعالیت، فعالیت کل، فعالیت اختصاصی، غلظت پروتئین و پروتئین کل، ضریب تخلیص، راندمان و درصد بازیافت در نمونه‌های شاهد

انتروکوک هایرائی			
پس از دیالیز	قبل از دیالیز	مایع تخمیر	فاکتورهای مورد بررسی
۲۵	۳۵	۱۰۰	حجم نمونه (ml)
۱۵۰	۱۰۰	۵۰	واحد فعالیت (Unit/ml)
۳۷۵۰	۳۵۰۰	۵۰۰۰	فعالیت کل (Unit)
۰/۵	۱/۵	۲	غلظت پروتئین (mg/ml)
۱۲/۵	۵۲/۵	۲۰۰	پروتئین کل (mg)
۳۰۰	۶۶/۶۷	۲۵	فعالیت اختصاصی (U/mg)
۷۵	۷۰	-	راندمان (%)
۶/۲۵	۲۶/۲۵	-	درصد بازیافت (%)
۱۲	۲/۶۷	-	ضریب تخلیص



جدول ۵- تعیین حجم نمونه، واحد فعالیت، فعالیت کل، فعالیت اختصاصی، غلظت پروتئین و پروتئین کل، ضریب تخلیص، راندمان و

درصد بازیافت در نمونه های حاوی عصاره‌ی زعفران

انتروکوک هایرائی و زعفران			فاکتورهای مورد بررسی
پس از دیالیز	قبل از دیالیز	مایع تخمیر	
۲۵	۳۵	۱۰۰	حجم نمونه (mL)
۲۰۰	۱۵۰	۱۰۰	واحد فعالیت (Unit/mL)
۵۰۰۰	۵۲۵۰	۱۰۰۰۰	فعالیت کل (Unit)
۰/۹	۱/۸	۲,۵	غلظت پروتئین (mg/mL)
۲۲/۵	۶۳	۲۵۰	پروتئین کل (mg)
۲۲۲/۲۲	۸۳/۳۳	۴۰	فعالیت اختصاصی (U/mg)
۵۰	۵۲/۵	-	راندمان (%)
۹	۲۵/۲	-	درصد بازیافت (%)
۵/۵۵	۲/۰۸	-	ضریب تخلیص

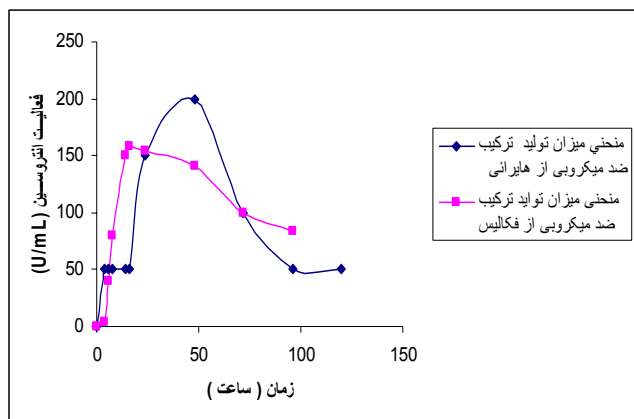
نتایج به دست آمده حاکی از آن است که تولید ترکیبات ضد میکروبی انتروکوک هایرائی به ترتیب پس از ۲۴ ساعت از تلقیح اولیه، یک افزایش شدید نشان می‌دهد. این زمان، دقیقاً مقارن با افزایش تعداد باکتری و به عبارتی، همزمان با فاز لگاریتمی رشد بود. به عبارت دیگر، تولید این ترکیبات در فاز لگاریتمی رشد صورت گرفته است. با ورود باکتری به فاز رکود، میزان این ترکیبات، تقریباً ثابت ماند و سپس به تدریج کاهش یافت. بنابراین، می‌توان گفت که تولید ترکیبات ضد میکروبی توسط باکتری انتروکوک هایرائی، از شمای تولید یک متابولیت اولیه پیروی می‌کند (۱). با مشاهده منحنی میزان تولید انتروسین در نمونه‌ی حاوی زعفران، نقش آن به عنوان یک ترکیب ترکیب ضد میکروبی سالم، در تحریک تولید انتروسین مشخص می‌شود.

### ۳-۱۰- نتایج حاصل از الکتروفورز رسوبات پروتئینی

پس از انجام الکتروفورز، مشاهده شد که باندهای پروتئینی به دست آمده، دارای وزن مولکولی مشابهی با باکتریوسین‌ها بوده‌اند. از این رو، می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات پروتئینی استخراج شده از انتروکوک هایرائی، باکتریوسین باشند. وزن مولکولی ترکیبات استخراج شده، ۳۵ کیلودالتون بود.

### ۳-۹- تاثیر عصاره‌ی زعفران بر میزان تولید ترکیبات ضد میکروبی

با توجه به منحنی‌های تولید ترکیبات ضد میکروبی، میزان تولید این ترکیبات در ۴ ساعت اولیه‌ی رشد (Lag phase)، تقریباً صفر بوده است. به عبارت دیگر، از آن جا که در این مرحله، رشدی صورت نگرفته، در نتیجه، متابولیتی هم تولید نشده است. اما به تدریج، با افزایش رشد باکتری، این متابولیت‌ها نیز افزایش می‌یابند (شکل ۳).



شکل ۳- تاثیر عصاره‌ی زعفران بر روی میزان تولید ترکیبات

ضد میکروبی توسط انتروکوک هایرائی

۴- نتیجه گیری

بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک، انواع متعددی از باکتریوسین‌ها را تولید می‌نمایند. این باکتریوسین‌ها در مواد غذایی تخمیری و غیر تخمیری متعدد به عنوان نگه دارنده به کار برده می‌شوند (۹). با توجه به نقش سینرژیستی زعفران در افزایش غلظت و میزان انتروکوسین تولید شده و در نتیجه، تحریک تولید انتروکوسین توسط انتروکوکوس هائیرائی، استفاده از این ماده‌ی طعم دهنده و رنگ دهنده برای افزایش ماندگاری مواد غذایی می‌تواند بسیار سودمند باشد.

۵- سپاس گزاری

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران که در انجام این تحقیق، مساعدت فرمودند، سپاس گزاری می‌گردد.

۶- منابع

۱- آقازوینی، ش. ۱۳۸۵. بررسی تاثیر ضد میکروبی لاکتوکوکوس لاکتیس و مقایسه آن با پیوسین. پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی- علوم و صنایع غذایی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.  
۲- خنفری، آ. و حسینی، ف. ۱۳۸۵. میکروبی شناسی عملی و اصول بیوشیمیایی واکنش‌ها. انتشارات پورسینا، تهران.  
۳- عیدی، ا. و عیدی، م. ۱۳۸۵. گیاهان دارویی ایران. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران. صفحه‌ی ۲۱۵.

4- Aroutcheva Alla , A. and Simoes Jose, A . 2001. Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerellavaginalis* . *Infect Dis Obstet Gynecol. Microbiology*, 9: 33-39.  
5- Aymerich,T. Artigas, M.G. Garriga, M. Monfort, J.M. and Hugas, M. 2008. Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocin A and B by *Enterococcus faecium* CTC492, *Applied Microbiology*, 8: 686-694.

6- Baron Ellen, J.o. and Finegold Sydney, M. 1990. Diagnostic microbiology. Bailey & Scott, USA, pp.112-115.  
7- Brummer ,W. and Gunzer ,G. 1987. Laboratory techniques of enzymes recovery. *Biotechnology*, 7a: 213-279.  
8- Bruno ,M.E.C. and Montville ,T.J. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 3003-3010.  
9- Cleveland, J. Montville ,T.J. Nes, I.F. and Chikindas,T. 2001. Bacteriocins safe natural antimicrobials for food preservation. *Food Microbiology*, 71:1-20.  
10- Hugas, M. Garriga, M. and Aymerich, M. T. 2003. Functionalty of enterococci in meat products. *Food Microbiology*, 88: 223-233.  
11- Jianhua , X. Rijun, Z. Changjiang, Sh . and 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 : 5611-5619.  
12- Kaiser, A.L . and Montville, T.J. 1996. Purification of bacteriocin and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* scolta cell and lipid vesicle. *Appl. Environ. Microbiol*, 62: 4525-4535.  
13- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*, 12: 39-86.  
14- Krijnsman, J. 1992. Product recovery in bioprocess technology. Butterworth Heinemann, Oxford, London..  
15- Ogunbanwo, S.T. Sanni, A.I. and Onilude, A.A. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* og1. *Biotechnology*, 2: 219-227.  
16- Sabia, C. Niederhäusern, S. Messi , P. Manicardi, G . and Bondi ,M. 2003 . Bacteriocin-producing *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1, a natural antagonist for control of *Listeria monocytogenes* in Italian sausages (“cacciatore”). *Food Microbiology*, 87: 173-179.  
17- Toba, T· Samant, S.K. Yoshioka, E· and Itoh, T· 1991 . Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA 6. *Applied Microbiol*, 13: 281 - 286  
18- Yamazaki, S. 1982. Protective effect of *Bifidobacterium monassociation* against lethal activity of *E.coli*. *Bifidobacteria Microflora*, 1: 55-60.