بررسی فعالیت بتاگالاکتوزیداز لاکتوباسیل های جدا شده از شیر و پنیر به روش های بیوشیمیایی و PCR

زهره بهادری[1]، جمیله نوروزی[2]، عباس اخوان سپهی[3]، جهانگیر سبزواری[4]، رویا رضوی پور[5]

1- دانشجوی کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
2- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
3- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
4- کارشناس میکروبیولوژی
5- کارشناس ارشد میکروبیولوژی

یافته / دوره دوازدهم / شماره 1 /بهار 89 / مسلسل 43

چکیده

دریافت مقاله: 88/10/30، پذیرش مقاله: 88/11/21

Ø مقدمه: در برخی افراد مقدار ناکافی آنزیم بتاگالاکتوزیداز در لایه پرزدار مخاط روده کوچک ، سبب ایجاد اختلال عدم تحمل لاکتوز می گردد. این بررسی به منظور مشاهده وجود آنزیم بتاگالاکتوزیداز تولید شده توسط لاکتوباسیل های جدا شده از نمونه های لبنی (شیر و پنیر) بوده است.

Ø مواد و روش ها: نمونه های شیر و پنیر پاستوریزه و محلی از استان های لرستان، کرمانشاه، همدان، ایلام خریداری شد. لاکتوباسیل ها با کشت نمونه ها در محیط **MRS** و ویژگی های فنوتیپی شناسایی گردیدند. توانایی تولید بتاگالاکتوزیداز با روشهای **X-gal** و **ONPG** و وجود ژن بتاگالاکتوزیداز با روش **PCR** بررسی گردید.

Ø یافته ها: از نمونه های بررسی شده131 لاکتوباسیل (13 جنس) جدا شد. که در محیط های حاوی **X-gal** کلنی های سبز، (در زمان های متفاوت) معرف وجود بتاگالاکتوزیداز، بدست آمد. با آزمایش **ONPG**، تمام لاکتوباسیل ها فعالیت بتاگالاکتوزیدازی را نشان دادند که در 25 نمونه مقدار آنزیم بیشتر از بقیه به دست آمد. بیشترین مقدار را لاکتوباسیلوس دلبروکی پنیر محلی کرمانشاه با 2010 واحد میلر در میلی لیتر داشت. در سوش استاندارد لاکتوباسیلوس پلانتاروم **(RITCC 1273)** و 29 نمونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم ژن بتاگالاکتوزیداز بررسی و باند**bp** 399 مشاهده گردید.

Ø بحث و نتیجه گیری: با استفاده از لاکتوباسیل ها در فراورده های لبنی می توان به افراد فاقد تحمل لاکتوز کمک نمود. در ضمن لاکتوباسیل های با تولید بیشتر بتاگالاکتوزیداز، برای استفاده مناسب تر می باشند.

Ø واژه های کلیدی: بتاگالاکتوزیداز، لاکتوز، لاکتوباسیل، فراورده های لبنی

آدرس مکاتبه: تهران میدان فاطمی، خیابان کامران، پلاک 11، طبقه سوم غربی

پست الکترونیک: z5677i@gmail.com

مقدمه

باکتریهای اسید لاکتیکی که نیمی از محصولات نهایی تخمیر گلوکز در آنها اسید لاکتیک می باشد تحت عنوان لاکتوباسیل نامگذاری شده اند(1). لاکتوباسیل ها از اجزای اصلی فلور میکروبی محصولات لبنی، آغازگر محصولات لبنی تخمیری و انواع غذاهای تخمیری دیگر مانند سوسیس و کالباس شناخته شده اند. این باکتری ها در طعم فرآورده های غذایی دخالت دارند و به صورت پروبیوتیک های (حیات بخش) غذایی مورد استفاده قرار می گیرند (2و3).

لاکتوباسیل ها ،گرم مثبت به صورت میله های بلند، باریک و گاهی خمیده تا کوتاه هستند و اغلب به صورت باسیل های کوچک تر کورینه فرم یا کوکوباسیل مشاهده می شوند. بتاگالاکتوزیداز آنزیم درون سلولی بوده که توسط اکثر باکتری های لاکتوباسیل تولید می شود و به فراوانی در صنایع لبنی کاربرد دارد (4). سوبسترای معمول این آنزیم قند لاکتوز یا قند اصلی موجود در شیر و برخی از فرآورده های لبنی است که آن را به گلوکز و گالاکتوز تبدیل می کند که به آسانی توسط سلولهای اپیتلیال روده جذب می شوند(6و7). آنزیم مشابه بتاگالاکتوزیداز باکتری ها در بدن انسان، لاکتاز فلوریزین هیدرولاز (در نوک پرزهای روده) می باشد(8).

فعالیت کم لاکتاز فلوریزین هیدرولاز سبب ایجاد اختلالاتی در اعمال گوارشی از جمله عدم تحمل لاکتوز می گردد که منجر به کاهش کیفیت زندگی و کاهش فعالیت های روزانه می شود(4). هدف از این بررسی، شناسایی لاکتوباسیل های تولید کننده آنزیم بتاگالاکتوزیداز موجود در شیر و پنیر بوده است. از این لاکتوباسیل ها به عنوان پروبیوتیک برای بهبود هضم لاکتوز فراورده های لبنی می توان استفاده کرد.

هدف از این پژوهش بررسی وجود ژن بتاگالاکتوزیداز در نمونه های لاکتوباسیلوس پلانتاروم بود که دارای وزن bp 399 می باشند.

مواد و روشها

در این مطالعه، 123 نمونه از شیر و پنیر پاستوریزه و محلی(غیر پاستوریزه) از کارخانه های مختلف و نواحی روستایی لرستان، کرمانشاه، همدان و ایلام خریداری شد و مورد بررسی قرار گرفت.

مقدار 2 گرم از نمونه های جامد(پنیر) وزن شد و در 5 میلی لیتر از محیط مایع MRS حل شد. از نمونه های مایع(شیر) 2 میلی لیتر با پیپت استریل برداشت شد و در 5 میلی لیتر از محیط مایع MRS حل شد. نمونه ها بعد از یکنواخت شدن در لوله ها، به جار بی هوازی منتقل شده و در دمای $37^{\circ}C$ به مدت 24 ساعت نگهداری شدند. سپس چندین لوپ از محیط مایع بر روی پلیت های حاوی محیط جامد MRS به صورت خطی کشت داده شدند سپس پلیت ها نیز در جار بی هوازی قرار داده شد و به مدت 48 ساعت در دمای $37^{\circ}C$ نگهداری شدند(9).

باکتری ها بر اساس ویژگی های فنوتیپی مانند رنگ آمیزی گرم، تست های اکسیداز و کاتالاز، الگوی تخمیر قندهای مختلف و رشد در دماهای مختلف شناسایی شدند. ابتدا (بعد از جداسازی کلنی ها در محیط MRS جامد) از تک کلنی های خالص برداشت شد و به روش گرم رنگ آمیزی شدند. سپس تست های اکسیداز و کاتالاز انجام گردید. آزمایش SIM برای مشاهده حرکت، تولید اندول و سولفید هیدروژن (SH_2) نیز انجام گرفت. آزمایش تخمیر قندهای مختلف شامل گلوکز، گالاکتوز، لاکتوز، مالتوز، ریبوز، آرابینوز، رامنوز، رافینوز، مانوز، گزیلوز، سوکروز، مانیتول، سوربیتول و سالیسین در محیط پایه قند (MRS

بدون گلوکز و عصاره گوشت) و توانایی رشد در دماهای مختلف 4 ، 15، 20، 25 ،30، 37 و 40 درجه سانتیگراد بعد از 3 الی 10 روز مورد بررسی قرار گرفت.

X-gal (5- برومو، 4- کلرو، 3- ایندولیل، بتا- دی- گالاکتوپیرانوزید)

مقدار40 میلی گرم از پودر را وزن کرده و در 2 میلی لیتر دی متیل فرمامید (DMF) حل شد. مقدار 60 میکرولیتر از محلول X-gal و10 میکرولیتر از محلول IPTG (ایزو- پروپیل- تایو بتا دی گالاکتوپیرانوزید) در سطح پلیت MRS جامد که از قبل تهیه شده بود پخش گردید. X-gal و IPTG از شرکت فرمنتاز (آلمان) خریداری شده بودند. یک کلنی از باکتری های جدا شده در سطح محیط مذکور کشت شد.

پلیت ها در جار بی هوازی و دمای $37^{\circ}C$ به مدت 6-1 روز نگهداری شدند. ایجاد کلنی های سبز رنگ، نشانه تولید بتاگالاکتوزیداز بود (10).

تمام باکتری ها در لوله های حاوی آب پپتون، بافر سدیم فسفات و ONPG تلقیح شدند. تولید رنگ زرد نشانه مثبت بودن تست ONPG بود (10).

از محیط مایع MRS-lac جهت تشخیص بتاگالاکتوزیداز استفاده شد. در این روش، تمام باکتری ها در محیط مایع MRS- lac به مدت 24 ساعت کشت شدند. کشت های 24 ساعتهٔ لاکتوباسیل ها بعد از سانتریفوژ (در دمای $5^{\circ}C$ و 12000×g دور در دقیقه) و دو بار شستشو به وسیلهٔ بافر فسفات، دوباره در محیط مایع MRS- lac کشت شدند. سپس، به وسیله اسپکتروفتومتر (با طول موج 600 نانومتر) غلظت محلول رویی اندازه گیری و یادداشت شد. برای اندازه گیری مقدار آنزیم درون سلولی، باکتری ها در معرض محلول تولوئن-استون (برای افزایش قابلیت نفوذ غشاء سلول باکتری جهت ورود ONPG) به مدت 7 دقیقه قرار داده شدند. مقدار 100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری های قابل نفوذ به یک میکروتیوپ 2 میلی لیتری منتقل شد و 900 میکرولیتر بافر فسفات و 200 میکرولیتر سوبسترای ONPG (4 میلی گرم در لیتر) به آن اضافه شد. سپس میکروتیوپ ها در داخل بن ماری $37^{\circ}C$ به مدت 15 دقیقه قرار داده شدند. محلول 1 میلی مولار کربنات سدیم به منظور توقف واکنش به هر لوله اضافه شد. پس از سانتریفوژ، میزان جذب محلول رویی در دو طول موج 420 و 550 نانومتر اندازه گیری و یادداشت شد. مقدار آنزیم با استفاده از فرمول میلر در یک میلی لیتر (یک واحد میلر= 1000 × [جذب طول موج550 نانومتر× (1/75 - جذب طول موج 420 نانومتر)] / زمان واکنش بر حسب دقیقه × حجم × جذب طول موج 600) محاسبه شد (9).

با استفاده از کیت آگارزژل استخراج DNA و براساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت (Metabion) استخراج DNA انجام شد. مقدار 1/5 میلی لیتر از کشت MRS مایع تازه ی باکتری ها که یک شب بدون تکان خوردن در دمای $۳۰^{\circ}C$ نگهداری شده بودند را در لوله های اپندروف استریل ریخته، در دور 13000 rpm برای مدت یک دقیقه و در دمای $4^{\circ}C$ سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد. و سلولها را که به صورت گلوله (حبه) درآمدند، دو بار به همین روش شسته شدند. سپس تمامی DNA تا حد امکان خالص شده و RNA و پروتئین آن حذف شد. بعد از مرحلهٔ نهایی خشک کردن رسوب DNA، رسوب در 100 میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل حل شد.

بدین منظور پرایمریها با الگوی F:5'-AAG TAA TAG CGC GTC GTC -3' و R:5'-TCT TAG CCT ATC AAG GTG ATG-3' طراحی شد(11) پرایمرها در سیستم

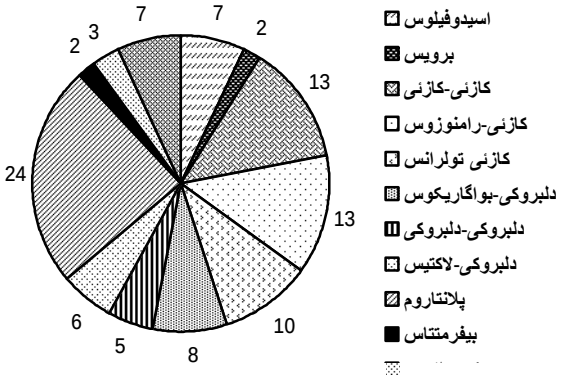
بلاست (BLAST) در سایت NCBI بررسی و پس از تأیید، تهیه گردید.

پس از آماده سازی پرایمرها برای ژن استخراج شده مطابق برنامه PCR زیر انجام شد PCR ها در 25 میکرولیتر مخلوط واکنش ، شامل: 1 میکرولیتر محلول DNA باکتری به دست آمده از روش استخراجDNA بالا، 1 میکرولیتر dNTP، 2/5 میکرولیتر Buffer Complete، 1 میکرولیتر F. Primer، 1 میکرولیتر R. Primer، 0/3 میکرولیتر Taq DNA پلی مراز و 18/2 میکرولیتر آب مقطر دو بار استریل بود. بعد از شروع تخریب (دناتوره کردن) نمونه ها به مدت 5 دقیقه در دمای 94°C، 30 چرخه تکثیر کامل شد، هر کدام از این چرخه ها شامل تخریب در هر چرخه 30 ثانیه در دمای 95°C، جفت شدن پرایمرها 1 دقیقه در دمای 52°C، پلی مریزه شدن (Extension) یک دقیقه در دمای 72°C بود. مرحله پلی مریزه شدن نهایی 5 دقیقه در دمای 72°C بکار گرفته شد. محصول های PCR طبق روش استاندارد به درون چاهک های روی ژل آگارز منتقل شدند. از مارکر با وزن مولکولی 1kb GeneRuler^{TM} DNA ladder که از شرکت Metabion خریداری شده بود، استفاده گردید. محصول PCR با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز 1% و رنگ آمیزی ژل آگارز با اتیدیوم بروماید به مدت 10 دقیقه و بعد از رنگ بری با آب مقطر به مدت 1 دقیقه، روی دستگاه UV مشاهده شد.

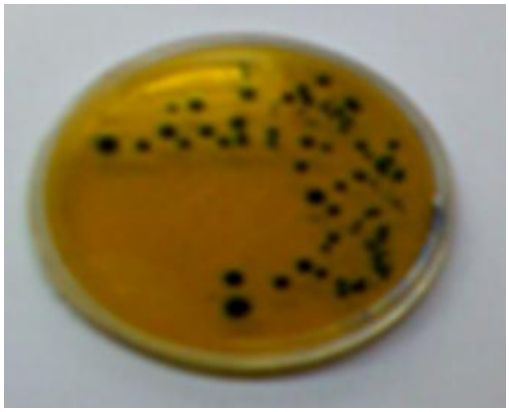
یافته ها

از 123 نمونه شیر و پنیر، 131 لاکتوباسیل از 13جنس، جدا شد (نمودار1). نتیجه آزمایش توانایی رشد در دماهای مختلف لاکتوباسیل های جدا شده را نشان می داد، تمامی این باکتری ها در دمای 4°C توانایی رشد ندارند ولی بیشترین رشد در دمای 25°C مشاهده شد.

با آزمایش X-gal، حضور آنزیم بتاگالاکتوزیداز در این باکتریها با تولید کلنی های سبز رنگ در زمانهای متفاوت (24 ساعت تا 6 روز) ثابت گردید. به این صورت که در 49% از باکتری ها که تولید کننده سریع آنزیم بودند کلنی های سبز پررنگ (دارای یا فاقد هاله اطراف کلنی) بعد از 24 ساعت نگهداری در 37 درجه سانتیگراد مشاهده شد. در 51% از باکتری ها که تولید کننده تأخیری آنزیم بودند کلنی های سبز بعد از 2 تا 6 روز نگهداری در 37°C دیده شدند (شکل 1).



نمودار شماره 1- لاکتوباسیل های جدا شده از نمونه های شیر و پنیر

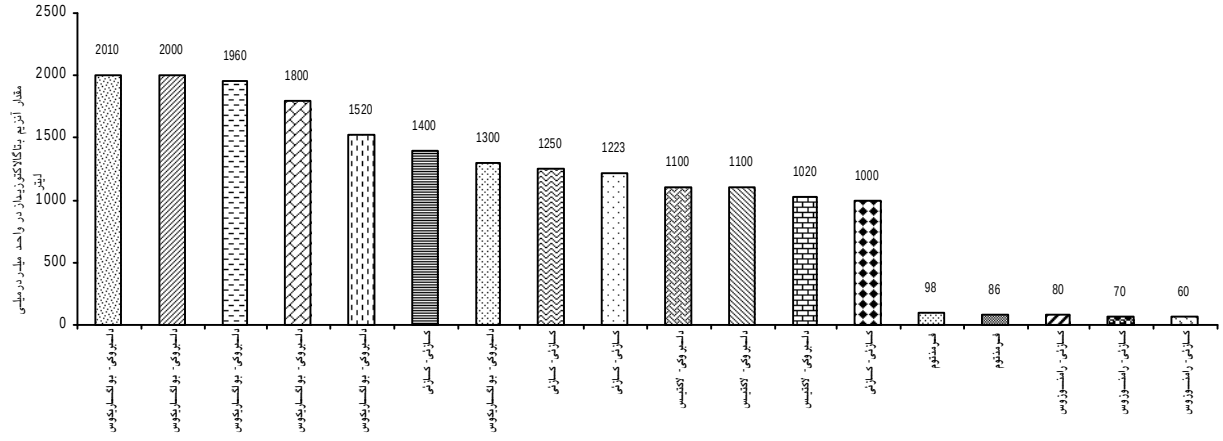


شکل شماره 1- کلنی های دارای آنزیم (کلنی سبز) در محیط MRS حاوی X-gal

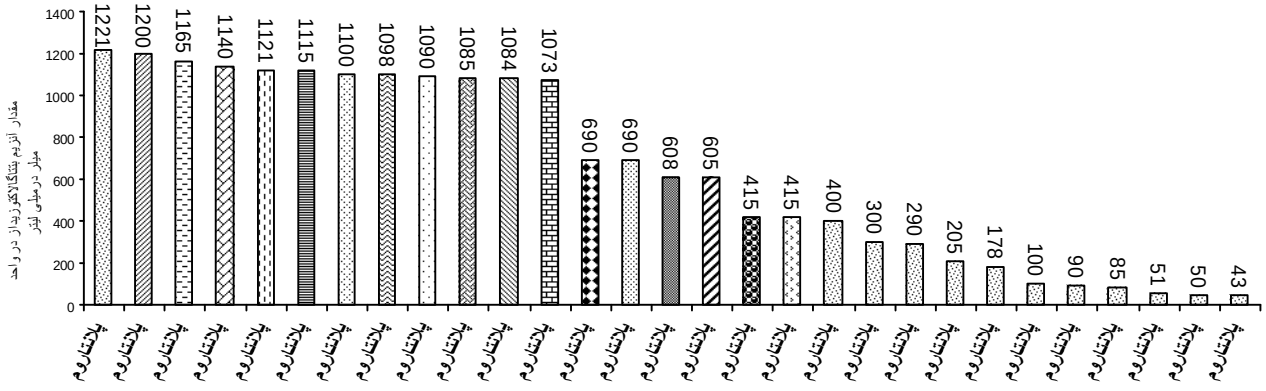
در آزمایش ONPG، پیدایش رنگ زرد بعد از 24-1 ساعت، نشان دهندۀ نتیجۀ مثبت یعنی وجود آنزیم ONPG

بود. لاکتوباسیل هایی که میزان بیشتری آنزیم تولید می کردند رنگ زرد با غلظت بیشتر تولید کردند. نتایج آزمایش ONPG با آزمایش X-gal تقریبا یکسان بود. مقدار آنزیم بتاگالاکتوزیداز با روش Miller & Vinderola در لاکتوباسیل های جدا شده از شیر حدود 43/1-1400/1 واحد میلر در یک میلی لیتر (Miller Unit/ml) و در لاکتوباسیل های جدا شده از پنیر حدود 85/3-2010/2 واحد میلر در یک میلی لیتر بود. بیشترین مقدار آنزیم در لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونهٔ بولگاریکوس (2010 واحد میلر در یک میلی لیتر) جدا شده از پنیر محلی کرمانشاه و کمترین مقدار آنزیم در لاکتوباسیلوس کازئی زیر گونه رامنوزوس جدا شده از شیر محلی کرمانشاه (60/3 واحد میلر در یک میلی لیتر) و لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از شیر محلی همدان (43/1 واحد میلر در یک میلی لیتر) مشاهده شد(نمودار 2و 3).

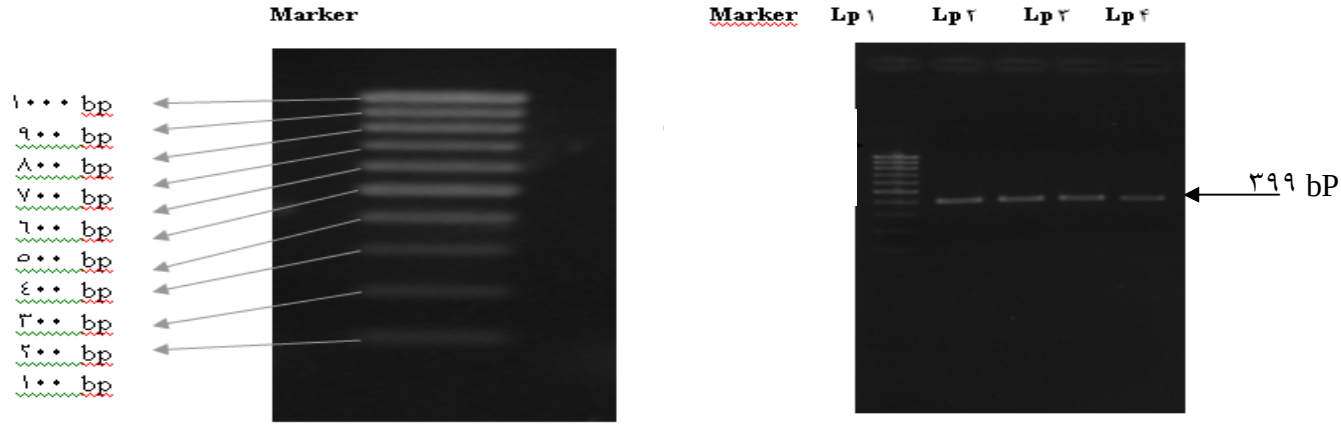
از30 نمونه سوش استاندارد لاکتوباسیلوس پلانتاروم (RITCC 1273) و 29 لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده، استخراج DNA انجام شد. از نمونه های ژنومی استخراج شده بعد از PCR با برنامه و مقادیر لازم ذکر شده نتیجه بصورت شکل2 حاصل گردید باند bp399 نشان دهنده ژن بتاگالاکتوزیداز بوده است.



نمودار شماره 2- بیشترین و کمترین مقدار آنزیم بتاگالاکتوزیداز جدا شده از لاکتوباسیل های موجود در شیر و پنیر محلی چهار استان لرستان، کرمانشاه، همدان و ایلام



نمودار شماره 3- مقدار آنزیم بتاگالاکتوزیداز موجود در لاکتوباسیلوس پلانتاروم های جدا شده از شیر و پنیر محلی (استان های لرستان، کرمانشاه، همدان و ایلام)



شکل شماره 2- باند Lp1 399bp(لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از شیر لرستان)،Lp2 (لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از پنیر کرمانشاه)، Lp3 (لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از شیر ایلام)و Lp4(لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از پنیر همدان) نشان دهنده ژن بتاگالاکتوزیداز در این لاکتوباسیل ها می باشد

بحث و نتیجه گیری

اولین وظیفه کشت آغازگر تبدیل تخمیری قند شیر به تولیدات اسیدی است که به ماندگاری، طعم، مزه و ساختار محصول لبنی تخمیری کمک می کند(12).

در بررسی حاضر با کشت شیر های محلی در محیط MRS مایع و سپس کشت در محیط جامد، لاکتوباسیل های متنوعی جدا شد که نشانگر مناسب بودن شرایط موجود برای رشد لاکتوباسیل ها در شیر های محلی بود. اما لاکتوباسیل ها با کشت شیر های پاستوریزه در محیط MRS مایع حتی بعد از غنی کردن محیط با عصارهٔ مخمر و سپس کشت در محیط جامد، رشد نکردند. احتمالاً به دلیل حرارت پاستوریزاسیون، باکتری های موجود در شیر از بین رفته بودند یعنی به حرارت حساس بوده اند. چون لاکتوباسیل های متنوعی از شیر های محلی جدا شدند بنابراین شرایط برای رشد لاکتوباسیل ها مناسب بوده و امکان جداسازی لاکتوباسیل ها از شیر خام بیشتر است . نتایج حاصل از این بررسی با نتایج مطالعات قبلی از جمله اکولانتی و همکارانش، در سال 2005، که بر روی یک نوع پنیر ایتالیایی تهیه شده از شیر خام بدون هیچ گونه کشت آغازگر انجام شد، مشابه است. آنها توانستند 304 باکتری از پنیر تهیه شده از شیر خام جدا کنند که از این تعداد، 207 باکتری مربوط به چهار گونه انتروکوک (168 نمونه)، لاکتوباسیلوس (25 نمونه لاکتوباسیل، که لاکتوباسیل های غالب شامل لاکتوباسیلوس برویس 13 نمونه و لاکتوباسیلوس پلانتاروم 10نمونه)، لاکتوکوکوس (13 نمونه) و لوکونستوک (1 نمونه) بودند(13). در بررسی حاضر، جداسازی لاکتوباسیل ها از نمونه های پنیر محلی و پاستوریزه با هم متفاوت بود، چون کشت اولیه نمونه های محلی دارای مخمر فراوان بودند، ابتدا نمونه ها در سرم رینگر (سرم فیزیولوژی0/85%) همگن شدند و پس از چند ساعت در محیط MRS مایع(24ساعت) کشت شده، سپس به محیط جامد منتقل شدند. این عمل موجب تسهیل جداسازی لاکتوباسیل ها از نمونه های محلی گشت. جداسازی لاکتوباسیل ها از نمونه های پاستوریزه نیز به دلیل دستکاری ژنتیکی آغازگرهای پنیر پاستوریزه و در نتیجه توانایی تقسیم سلولی محدود و رشد آهسته، ابتدا نمونه های پنیر پاستوریزه در سرم رینگر(0/85%) همگن شده و سپس 48 ساعت در MRS مایع کشت شدند سپس به محیط جامد

برده شدند. با این کار، لاکتوباسیل ها جداسازی شدند. گروهی از محققان فرانسوی برای جداسازی لاکتوباسیل ها از پنیر، ابتدا پنیر را در شیر حل کرد و دو بار در محیط مایع MRS کشت دادند. بررسی حاضر با مطالعهٔ انجام شده توسط محققان فرانسوی(14) تا حدودی متفاوت بود.

در این تحقیق رشد لاکتوباسیل ها در دمای 4 درجهٔ سانتیگراد منفی بود. در دمای 15 درجهٔ سانتیگراد نیز رشدی در لاکتوباسیلوس های اسیدوفیلوس، دلبروکی زیر گونهٔ بولگاریکوس، دلبروکی زیر گونهٔ لاکتیس و فرمنتوم مشاهده نشد که نتایج این بررسی با تمامی تحقیق های انجام شده مطابقت دارد(15، 16).

جهت شناسایی باکتری های دارای آنزیم بتاگالاکتوزیداز، فاویر و همکارانش از روش X-gal استفاده کرده بودند(17). در این مطالعه نیز به منظور شناسایی وجود آنزیم بتاگالاکتوزیداز، سوبستراهای رنگی X-gal و ONPG به کار رفت. در این بررسی تمام 131 لاکتوباسیل جدا شده از شیر و پنیر در محیط MRS حاوی X-gal کلنی های سبز ایجاد کردند. از بین این تعداد، 64 لاکتوباسیل (49%) فعالیت آنزیمی سریع و قوی در مدت 24 ساعت نگهداری در دمای 37 درجهٔ سانتیگراد را داشتند. نتایج حاصل از این بررسی مبنی بر استفاده از روش X-gal و مشاهدهٔ کلنی های سبز رنگ در شناسایی تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز با نتایج مطالعات قبلی(17) مشابه بود. تمام باکتری ها در لوله های حاوی آب پپتون، بافر سدیم فسفات و ONPG بعد از 24-1 ساعت تولید رنگ زرد با غلظت های متفاوت کردند تولید رنگ زرد نشانه مثبت بودن تست ONPG بود (9). در این بررسی، همه لاکتوباسیل های جدا شده در آزمایش اندازه گیری مقدار آنزیم بتاگالاکتوزیداز با روش میلر و سوبسترای ONPG نیز دارای آنزیم بتاگالاکتوزیداز بودند، 64 لاکتوباسیل (49%) دارای فعالیت آنزیمی سریع و قوی با روش X-gal بودند. همچنین با سوبسترای ONPG سریع نیز رنگ زرد پررنگ در ساعت های اولیه(1-24 ساعت) تولید کردند، در روش میلر نیز مقدار آنزیم بیشتری داشتند که از بین آنها 25 لاکتوباسیل بیشترین مقدار آنزیم را در اندازه گیری مقدار آنزیم با روش میلر تولید کردند که شامل 3 گونه لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونهٔ لاکتیس،4 گونه کازئی زیر گونهٔ کازئی، 6 گونه لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونهٔ بولگاریکوس، و 12 گونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم بودند. مقدار آنزیم در لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونهٔ بولگاریکوس جدا شده از پنیر محلی کرمانشاه از همه بیشتر بود (2010/2 واحد میلر در میلی لیتر) که با نتایج ویندرولا و همکارانش که بیشترین مقدار آنزیم بتاگالاکتوزیداز در بین سویه های لاکتوباسیلوس را لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونهٔ بولگاریکوس (در محدودهٔ 2053-518 واحد میلر در میلی لیتر) تهیه شده از صنایع لبنی محلی داشت، همخوانی دارد (9). از آنجا که لاکتوباسیلوس پلانتاروم، معمولاً به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار می گیرد، تغییرات زیستی عمده ای را در غذاهای تخمیری بر عهده دارد و به عنوان مکمل های پروبیوتیک (به عنوان کشت های کمکی) در تولیدات لبنی و دیگر غذاها بکار می روند (11). همچنین در این بررسی، بیشترین نمونه استخراج شده لاکتوباسیلوس پلانتاروم با 29نمونه بود، مقدار آنزیم بتاگالاکتوزیداز نیز در این نمونه ها بین 43-1221 متغیر بود. برخی از کلنی های مربوط به لاکتوباسیلوس پلانتاروم حتی بعد از 6-2 روز نگهداری در دمای 37 درجه سانتیگراد، رنگ سبز پر رنگ نداشتند. تصور بر این بود که این سویه ها دارای نقص تولید آنزیم و یا فاقد ژن بتاگالاکتوزیداز باشند، به همین دلیل، بتاگالاکتوزیداز لاکتوباسیلوس پلانتاروم با روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه ای که توسط فرناندز و همکارانش بر روی

لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از فرآورده های لبنی انجام شد،دو کلنی متمایل به سبز از دو واریته لاکتوباسیلوس پلانتاروم در مقایسه با رنگ سبز تیره را فاقد آنزیم تصور کردند. اما با بررسی های بعدی در مورد ویژگی های پلاسمیدی و تخمیر لاکتوز و نتایج ONPG مثبت، وجود کپی کروموزومی آنزیم بتاگالاکتوزیداز در این سویه ها ثابت شد (18). ژنگ و همکارانش، توالی ژنومی کامل لاکتوباسیلوس پلانتاروم JDM1 را ارائه دادند.ژنوم کامل لاکتوباسیلوس پلانتاروم JDM1 شامل یک کروموزوم حلقوی منفرد با 3197759 bp و دو پلاسمید PLP200 با 2062bp و PLP9000 با 9254bp می باشد (11). در بررسی حاضر طراحی پرایمر برای ژن بتاگااکتوزیداز، با استفاده از توالی ژنومی کامل لاکتوباسیلوس پلانتاروم JDM1 ارائه شده توسط ژنگ و همکارانش صورت گرفت. با انجام PCR نمونه های پلانتاروم و دیدن باند bp399 آنزیم بتاگالاکتوزیداز، وجود کپی کروموزومی آنزیم در این سویه ها ثابت شد. بنابر نتایج حاصل از مطالعه حاضر مبنی بر تولید کلنی های متمایل به سبز که مشابه با مطالعهٔ فرناندز و همکارانش بود و نیز با مشاهده باند bp399 ژن بتاگالاکتوزیداز ثابت شد که کلنی های متمایل به سبز نیز دارای کپی کروموزومی آنزیم بتاگالاکتوزیداز هستند.

با استفاده ازباکتری های پروبیوتیک تولید کنندهٔ آنزیم بتاگالاکتوزیداز می توان ارزش غذائی و قابلیت هضم فرآورده های لبنی را بالا برد و به افراد مبتلا به اختلال عدم تحمل لاکتوز کمک نمود. در این مطالعه از 14 نمونهٔ شیر پاستوریزه هیچ لاکتوباسیلی جدا نشد که ممکن است به دلیل حساس بودن برخی لاکتوباسیل ها به حرارت پاستوریزاسیون باشد. بنابراین پیشنهاد می شود در فراورده های پروبیوتیک از لاکتوباسیل های مقاوم به حرارت و یا از آنزیم خالص بتاگالاکتوزیداز در این محصولات استفاده شود. در این مطالعه، همه لاکتوباسیل های جدا شده با استفاده از روش X-gal و ONPG دارای آنزیم بتاگالاکتوزیداز بودند، با توجه به نتایج حاصل که 6 گونه لاکتوباسیلوس دلبروکی تولید کنندهٔ قوی و سریع آنزیم بتاگالاکتوزیداز بودند استفاده بیشتر از این گونه در محصولات تخمیری، برای کمک به افراد فاقد تحمل لاکتوز توصیه می گردد. با انجام PCR، وجود ژن بتاگالاکتوزیداز در لاکتوباسیل پلانتاروم هایی که آنزیم کم یا ضعیف تولید می کردند به اثبات رسید، احتمالا" دلیل بیان کم ژن بتاگالاکتوزیداز در برخی سویه ها، وجود برخی عوامل در مواد لبنی از جمله گلوکز باشد گلوکز بر روی اپرون لاکتوز اثر منفی دارد، چون در محیط دارای لاکتوز (MRS-lac) تولید بتاگالاکتوزیداز افزایش یافت(9)، با توجه به این نتایج توصیه می شود، شرایط برای افزایش بیان بتاگالاکتوزیداز مناسب گردد. یعنی قند گلوکز که یکی از مهمترین عوامل کنترل منفی بیان اپرون لاکتوز می باشد ودر هنگام هیدرولیز لاکتوز تولید می شود را باید به طریقی از مواد لبنی خارج کرد.

References

1. Winn J, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger, P.C. Woods GL, Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th edition, 2006;P: 838.
2. Robinson RK, The microbiology of milk and milk products, Microbiology of handbook, Inc, New York Dairy, 2002.
3. Chammas GI, Saliba R, Corrieu G, Beal, C, characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented milk "laban"., International Journal of Food Microbiology. 2006; 110: 52-61
4. Vos DP, Garripy G, Jones D, Krieg RN, Gang W, Rainey AF, Schleifer HK, Withman B, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2009; 3:pp:754-757.
5. Karasova P, Spiwok V, Mala S, Karlova B, Russell NJ, Beta-galactosidase activity in Psychrophic microorganism & their potential use in food industry, Czech Journal food science.,2002;20, 43-47.
6. Troelesen JT, Adult-type hypolactasia & regulation of lactase expression. Biochimica. Et. Biophysica., 2005;1723, 19-32.
7. Heyman MB, Committee on Nutrition Lactose intolerance in infants, children & adolescents, Pediatrics, 2006;118: 1279-1286.
8. Vasiljevic T, Jelen P, Production of β-galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria, Innovative Food Science & Emerging Technologies., 2001;2:75-85.
9. Vinderola CG, Reinheimer JA, Lactic acid starter and probiotic bacteria, a comparative " in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance, Food Research International., 2003; 36: 895-904.
10. Nowroozi J, Molecular biological methodes in bacteria, Tehran: Andishe Rafie., 2004; 108-115.(In Persian)
11. Zhang ZY, Liu C, Zhu Y-Z, Zhong Y, Zhu YQ, Zheng HJ, Zhao GP, Wang SY, Guo XK, Complete genom sequence of Lactobacillus plantarum JDM1, Journal of Bacteriolog., 2009;191(15): 5020-5021.
12. Hebert EM, Raya RR, Tailliez P, Giori GS de, Characterization of natural isolates of Lactobacillus strains to be used as starter cultures in dairy fermentation, International of Journal Food Microbiology. 2000;59: 19-27.
13. Aquilanti L, Dell'Aquila L, Zannini E, Zocchetti A, Clementi F, Resident lactic acid bacteria in raw milk Canestrato Pugliese cheese, Letters in Applied Microbiology ISSN 0266-8254. 2006;43: 161-167.
14. Miteva V, Ivanova I, Budakov I, Pantev A, Stefanova T, Danova S, Moncheva P, Mitev V, Dousset X, Boyava P, Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by a Lactobacillus delbrueckii strain 1043, Journal Applied Microbiology. 1998;85: 603–614.
15. Schillinger U, Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic

and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage, International Journal Food Microbiology. 1999; 47: 79-87.

16. Nowroozi J, Rahbar Roshandel N, Gheytanchi E, Study of β-D-galactosidase enzyme activity produced by Lactobacilli in milk & cheese, 2007;pp:27-31.(In Persian)
17. Favier C, Neut C, Mizon C, Cortot A, Clombel JF, Mizon J, Faecal β-D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease, Dig. Dis. Sci. 1997; 42: 817-822.
18. Fernandez M, Margolles A, Suarez JE, Mayo B, Duplication of the β-galactosidase gene in some Lactobacillus plantarum strains, International Journal Food Microbiology.1999;48:113-123.