مجله دانشکده پزشکی اصفهان **مقاله پژوهشی**
سال سی‌ام/شماره ۲۰۲/هفته چهارم مهرماه ۱۳۹۱
تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۲۰ **تاریخ پذیرش:** ۹۱/۶/۲۵

خالص‌سازی، تعیین ماهیت و بررسی خاصیت ضد میکروبی اگزوپلی‌ساکارید کفیران به دست آمده از دانه‌های کفیر

مرضیه رضائی[۱]، سعیده زاغیان[۱]، دکتر گیتی امتیازی[۲]

چکیده

مقدمه: کفیر پروبیوتیکی است که دانه‌های ژله‌ای قابل رشدی تولید می‌کند و شامل مجموعه‌ای از باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها می‌باشد. این میکروارگانیسم‌ها به وسیله‌ی یک ماتریکس پلی‌ساکاریدی به نام کفیران احاطه شده‌اند. کفیران یک گلوکوگالاکتان منشعب محلول در آب است که دارای فعالیت‌های ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد توموری می‌باشد.

روش‌ها: دانه‌های کفیر به طور مداوم در شیر پاستوریزه کشت داده شدند. پس از شستشوی دانه‌ها با آب مقطر استریل با دو دمای ۵۰ و ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و جدا کردن دانه‌ها، نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و پلی‌ساکارید با اتانول سرد رسوب داده شد و پس از حل کردن در آب مقطر داغ استریل، در نهایت لیوفیلیزه گردید. میزان پروتئین موجود در نمونه اندازه‌گیری شد. فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ی کفیران در برابر چندین سویه‌ی معرف به روش انتشار چاهک بررسی شد. همچنین اثر آنزیم‌های پروتئولیتیک بر فعالیت ضد میکروبی کفیران بررسی گردید.

یافته‌ها: هر دو نمونه (خالص‌سازی در ۵۰ و ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) دارای اثر مهاری بر رشد باکتری‌های معرف بودند. واکنش برادفورد نشان داد عصاره‌ی به دست آمده دارای پروتئین بود، ولی فعالیت ضد میکروبی آن تا حدی در برابر آنزیم‌های پروتئولیتیک حفظ شد.

نتیجه‌گیری: در این تحقیق نشان داده شد که فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ی کفیران به محتوای پروتئینی موجود در آن نیز بستگی دارد.

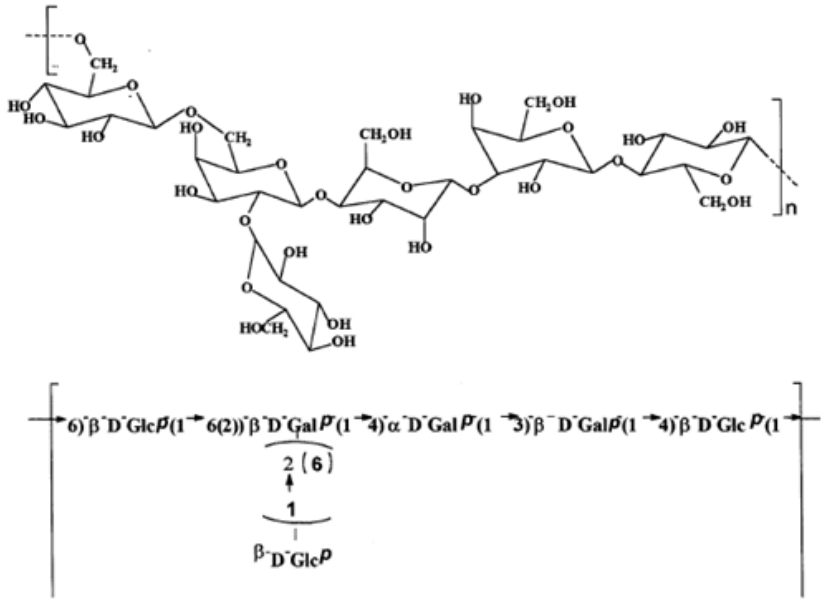
واژگان کلیدی: پروبیوتیک، دانه‌های کفیر، کفیران، فعالیت ضد میکروبی

مقدمه

پروبیوتیک‌ها شامل یک یا مجموعه‌ای از ارگانیسم‌های مختلف هستند که از طریق تأثیر بر فعالیت‌های متابولیسمی، بهبود عملکرد سیستم ایمنی و مقابله علیه فرایندهای بیماری‌زایی در ارتقای سلامت مؤثر هستند (۱).

کفیر یک پروبیوتیک طبیعی است که از یک مجموعه‌ی هم‌زیستی میکروبی تشکیل شده است که دانه‌های ژله مانندی را که قابلیت رشد دارند، تولید می‌کنند. دانه‌های کفیر شامل باکتری‌های اسید لاکتیک، مخمر و باکتری‌های اسید استیک می‌باشد که به وسیله‌ی ماتریکس پروتئینی و پلی‌ساکاریدی در کنار هم نگه داشته می‌شوند (۵-۱). تحقیقات نشان می‌دهد مصرف کفیر در ارتقای سلامت مؤثر است و سبب بالا بردن سیستم ایمنی بدن، متعادل کردن فشار خون، درمان بیماری‌های گوارشی و کاهش سطح کلسترول سرم می‌شود و همچنین دارای فعالیت‌های ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد توموری می‌باشد (۶، ۴-۳، ۱). پلی‌ساکارید موجود در کفیر، کفیران نام دارد که یک گلوکوگالاکتان منشعب محلول در آب است و از مقادیر یکسان D-گلوکز و D-گالاکتوز تشکیل شده است (۷-۶، ۴-۲) (شکل ۱).

[۱] کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر گیتی امتیازی
Email: emtiazi@yahoo.com



شکل ۱. ساختار شیمیایی پلی‌ساکارید کفیران موجود در دانه‌های کفیر

تولید پلی‌ساکارید بیشتر توسط گونه‌های لاکتوباسیلوس کفیر و لاکتوباسیلوس کفیرانوفاسینس صورت می‌گیرد. فعالیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد توموری کفیر را به کفیران موجود در آن، نسبت می‌دهند (۸، ۳).

با افزایش سویه‌های بیماری‌زای مقاوم به چندین آنتی‌بیوتیک، گسترش عوامل ضد میکروبی جدید برای مقابله با آن، یک نیاز جدی می‌باشد. کفیر از جمله عوامل ضد میکروبی جدیدی است که قادر به مهار رشد باکتری‌ها و مخمرهای مختلف می‌باشد (۳). هدف از این تحقیق جداسازی و بررسی ماهیت عامل ضد میکروبی مؤثر موجود در کفیر بود.

روش‌ها

برای جداسازی پلی‌ساکارید کفیران از دانه‌های کفیر، پس از حرارت دادن به ۱۰ میلی‌لیتر شیر پاستوریزه‌ی دارای ۵ درصد چربی و خنک شدن در دمای اتاق، ۱۰ گرم از دانه‌های کفیر به آن افزوده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط نگهداری گردید. پس از گذشت زمان گرم‌خانه‌گذاری، دانه‌های کفیر با الک پلاستیکی از محصول تخمیر شده جدا و له شد و به دو قسمت تقسیم گردید (۶) (شکل ۲).

نمونه‌ها به ترتیب در آب مقطر استریل با دمای ۵۰ و ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک ساعت نگهداری شد تا علاوه بر حل شدن پلی‌ساکارید نمونه، آنزیم‌های هیدرولیزکننده غیر فعال گردد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، سانتریفیوژ شد تا سلول‌ها از نمونه حذف شود. پس از حذف سلول‌ها، پلی‌ساکارید موجود در مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ با افزودن دو حجم اتانول ۹۶ درجه (۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد) سرد شد و با نگهداری ۲۴ ساعته در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد رسوب داده شد. پس از آن نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ۴۰۰۰ دور

www.mui.ac.ir

در دقیقه و دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، سانتریفیوژ گردید و رسوب به دست آمده، در آب مقطر داغ حل شد. این مرحله دو بار تکرار شد و در نهایت پس از حل کردن رسوب در آب مقطر داغ، نمونه‌ی حاصل لیوفیلیزه گردید (۷، ۲).

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین موجود در نمونه، از روش برادفورد استفاده شد و پس از رسم منحنی استاندارد پروتئین با سرم آلبومین گاوی، میزان پروتئین موجود در نمونه اندازه‌گیری گردید (۹).

برای بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ی کفیران ۲۰ میکرولیتر از عصاره‌ی کفیران به دست آمده در دو دمای مختلف، به صورت نقطه‌ای به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار دارای چاهک که پیش از آن با 10^6 کلنی در هر میلی‌لیتر از سویه‌های معرف باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس آرئوس، سودوموناس آئروژینوزا، لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیاکلی به صورت چمنی تلقیح شده بودند، قرار گرفت. این پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس پلیت‌ها برای ایجاد هاله‌ی عدم رشد مورد بررسی قرار گرفتند (۱۰، ۳).

برای بررسی اثر آنزیم‌های پروتئولیتیک بر فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ی کفیران استخراج شده، از آنزیم‌های پپسین (pH = ۳)، پروتئیناز K و تریپسین (pH = ۷) در غلظت نهایی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده گردید. به ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ی استخراج شده به طور جداگانه ۲۰ میکرولیتر از محلول آنزیم‌های پروتئیناز K، تریپسین و پپسین اضافه شد. سپس این محلول‌ها به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعد با حرارت دادن محلول‌ها در ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، آنزیم‌ها غیر فعال گردیدند. سپس فعالیت ضد میکروبی این محلول‌ها در برابر سویه‌های معرف به روش انتشار چاهک مورد بررسی قرار گرفت (۱۰).

یافته‌ها

عصاره‌ی کفیران استخراج شده در هر دو روش دارای اثر مهاری بر باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس آرئوس و لیستریا مونوسیتوژنز بود، ولی اثری در مهار رشد باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا نداشت. همچنین

شکل ۲. دانه‌های فندقی شکل کفیر پس از رشد مناسب در شیر و در حالت عبور از صافی برای جداکردن دانه‌ها از محصول پروبیوتیک تخمیر یافته

نمونه‌ی تیمار شده در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نسبت به ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد اثر بیشتری در مهار رشد باکتری‌های به کار رفته داشتند. از طرفی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ی کفیران تا حدودی در برابر آنزیم‌های پروتئولیتیک حفظ شد. نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است.

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین موجود در نمونه، از روش برادفورد استفاده شد. نتایج نشان داد که با وجود روشی که برای استخراج پلی‌ساکارید به کار رفت، همچنان میزان قابل توجهی پروتئین در نمونه وجود داشت.

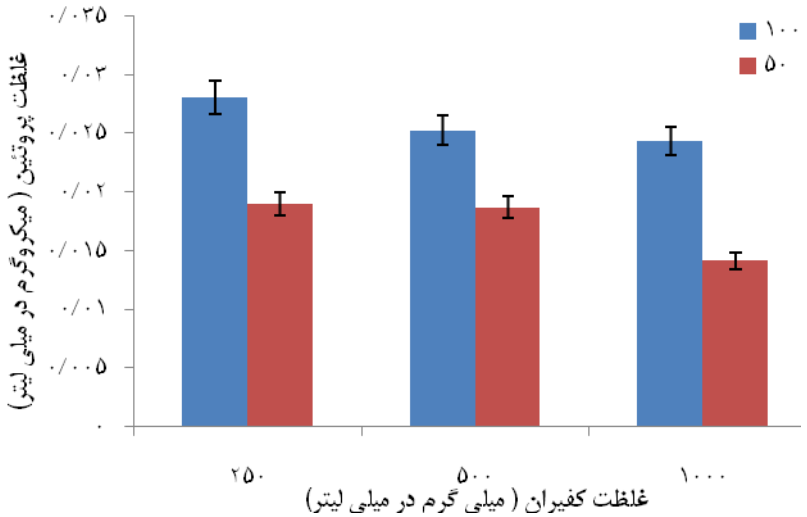
در روش استخراج عصاره‌ی کفیران در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، میزان پروتئین بیشتری نسبت به دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در نمونه وجود داشت که البته این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود. نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است.

بحث

از آن جایی که کفیر خاصیت ضد میکروبی دارد، بسیاری از دانشمندان تحقیقاتی برای بررسی مکانیسم اثر آن انجام داده و این خاصیت را به کفیران، پلی‌ساکارید موجود در آن، نسبت داده‌اند (۸، ۳).

جدول ۱. مقایسه‌ی اثر ضد میکروبی پلی‌ساکارید استخراج یافته از دانه‌های کفیر بین سویه‌های مختلف، قبل و بعد از تیمار توسط آنزیم

	استخراج شده در ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد		استخراج شده در ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد	
سویه	تیمار شده با آنزیم	تیمار نشده با آنزیم	تیمار شده با آنزیم	تیمار نشده با آنزیم
اشریشیاکلی	–	–	–	–
باسیلوس سرئوس	+	++	+	++
سودوموناس آئروژینوزا	–	–	–	–
لیستریا مونوسایتوژنز	+	+	+	++
استافیلوکوکوس آرئوس	+	++	+	++



شکل ۳. مقایسه‌ی میزان پروتئین بین اگزوپلی‌ساکارید استخراج یافته در دو دمای ۵۰ و ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به روش برادفورد

با توجه به این نکته که تیمار حرارتی نمونه‌ها به عنوان یک مرحله‌ی اولیه‌ی استخراج پلی‌ساکارید، در بازیافت کامل اگزوپلی‌ساکارید از پپتیدها بسیار حایز اهمیت است (۲)، در این تحقیق از روش تیمار حرارتی در دو دمای مختلف برای استخراج پلی‌ساکارید استفاده شد که در هر دو روش مقدار قابل ملاحظه‌ای پروتئین در نمونه‌ها وجود داشت و خاصیت ضد میکروبی آن حتی با تیمار حرارتی بالا، تا حدی ثابت ماند.

اگر چه Piermaria و همکاران با استفاده از روش استخراج مشابه، نشان دادند که میزان پروتئین موجود در نمونه‌ی کفیران استخراج شده کمتر از ۰/۰۱ درصد می‌باشد، ولی در این تحقیق حضور پروتئین در پلی‌ساکارید استخراج شده بسیار قابل ملاحظه بود (۷).

Rimada و Abraham نشان دادند که میزان استخراج اگزوپلی‌ساکارید از محیط کشت دانه‌های کفیر به میزان زیادی به روش جداسازی اگزوپلی‌ساکارید وابسته است. جداسازی اگزوپلی‌ساکارید با یک مرحله‌ی تیمار حرارتی، اگزوپلی‌ساکارید بیشتری نسبت به تیمار بدون حرارت به دست می‌دهد. استفاده از تیمار حرارتی علاوه بر این که باعث جدا شدن و حل شدن پلی‌ساکاریدهای متصل به دیواره‌ی سلولی میکروارگانیسم‌ها و پروتئین‌های محصول تخمیری می‌گردد، آنزیم‌های احتمالی را که به طور بالقوه قادر به تجزیه‌ی پلیمرها هستند، نیز غیر فعال می‌کند (۲).

عصاره‌ی کفیران موجب مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس آرئوس و لیستریا مونوسیتوژنز شد ولی بر باکتری‌های گرم منفی آزمایش شده، بدون اثر بود.

بر خلاف یافته‌های به دست آمده در این پژوهش، Rodrigues و همکاران گزارش دادند که عصاره‌ی کفیران استخراج شده از دانه‌های کفیر، اثر مهاری کمی بر روی سویه‌های گرم منفی اشریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا دارد (۳).

با توجه به این که میکروارگانیسم‌های موجود در دانه‌ی کفیر به وسیله‌ی ماتریکس پروتئینی و پلی‌ساکاریدی در کنار هم نگه داشته می‌شوند، این امکان وجود دارد که پروتئین همراه پلی‌ساکارید نیز، در اعمال فعالیت ضد میکروبی دخالت داشته باشد. از آن جایی که تیمار عصاره‌ی کفیران با آنزیم‌های پروتئولیتیک تا حدی مهار رشد باکتری‌های معرف را کاهش داده است، نمی‌توان ماهیت پروتئینی عامل ضد میکروبی را نادیده گرفت.

با توجه به این که میکروارگانیسم غالب در دانه‌های کفیر، باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که می‌توانند آنتی‌بیوتیک یا پپتیدهای کوچک مقاوم به حرارت را تولید کنند که دارای فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های دیگر هستند (۱۳-۱۱)، می‌توان قسمتی از فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ی استخراج شده را به این پروتئین‌ها نسبت داد. بنابراین در روش استخراج پلی‌ساکارید با اتانول سرد، همیشه احتمال حضور پپتیدهای مقاوم به حرارت در کفیران وجود دارد که می‌تواند به خواص ضد میکروبی آن کمک کند. بنابراین نمی‌توان بدون کروماتوگرافی با افینیتی بالا خاصیت ضد میکروبی کفیران را تنها به پلی‌ساکاریدهای آن نسبت داد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت گروه زیست شناسی دانشکده‌ی علوم دانشگاه اصفهان انجام گردید. بدین‌وسیله از مسؤولان این دانشکده تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1. Farnworth ER. Kefir-a complex probiotic, Food Science and Technology Bulletin: Functional. Foods 2005; 2(1): 1-17.
2. Rimada PS, Abraham AG. Comparative study of different methodologies to determine the exopolysaccharide produced by kefir grains in milk and whey. Le Lait 2003; 83(1): 79-87.
3. Rodrigues KL, Caputo LR, Carvalho JC, Evangelista J, Schneedorf JM. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. Int J Antimicrob Agents 2005; 25(5): 404-8.
4. Rizk S, Maalouf K, Baydoun E. The antiproliferative effect of kefir cell-free fraction on HuT-102 malignant T lymphocytes. Clin Lymphoma Myeloma 2009; 9(Suppl 3): S198-S203.
5. Yokoi H, Watanabe T, Fuji Y. Isolation and Characterization of Polysaccharide-Producing Bacteria from Kefir Grains. Journal of Dairy Science 1990; 73(7): 1684-9.
6. Piermaria JA, de la Canal ML, Abraham AG. Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. Food Hydrocolloids 2008; 22(8): 1520-7.
7. Piermariaa JA, Pinottia A, Garciaa MA, Abraham AG. Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. Food Hydrocolloids 2009; 23(3): 684-90.
8. Micheli L, Uccelletti D, Palleschi C, Crescenzi V. Isolation and characterisation of a ropy Lactobacillus strain producing the exopolysaccharide kefiran. Appl Microbiol Biotechnol 1999; 53(1): 69-74.
9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
10. Zaghian S, Shokri D, Emtiazi G. Co-production of a UV-stable bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) and indole-3-acetic acid hormone (IAA) and their optimization by Taguchi design in Bacillus pumilus. Annals of Microbiology 2011.
11. Daba H, Pandian S, Gosselin JF, Simard RE, Huang J, Lacroix C. Detection and activity of a bacteriocin produced by Leuconostoc mesenteroides. Appl Environ Microbiol 1991; 57(12): 3450-5.
12. Nes IF, Yoon SS, Diep DB. Ribosomally Synthesiszed Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. Food Sci Biotechnol 2007; 16(5): 675-90.
13. Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA. Characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum F1 and Lactobacillus brevis OG1. African Journal of Biotechnology 2003; 2(8).

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 202, 4th week, October 2012 Received: 9.6.2012 Accepted: 15.9.2012

Purification, Characterization, and Determination of Antimicrobial Activity of Kefiran

Marzieh Rezaei MSc[1], Saeedeh Zaghian MSc[1], Giti Emtiazi PhD[2]

Abstract

Background: Kefir is a probiotic organism that produces jellylike grains as during growth. The grains contain both lactic acid bacteria and yeasts. These microorganisms are surrounded by a polysaccharide matrix named kefiran. Kefiran is a water-soluble branched glucogalactan which has been reported to have antibacterial, antimycotic, and antitumor activity.

Methods: Kefir grains were constantly cultured in pasteurized milk. They were then harvested and washed with 100°C and 50°C distilled water. The mixture was centrifuged and the polysaccharide in the supernatant was precipitated by addition of cold ethanol. The precipitate was finally dissolved in hot distilled water and lyophilized. The samples were tested for estimation of proteins by Bradford method. Antimicrobial activities of kefiran extract were evaluated using the well diffusion method with several indicator strains. The effects of proteolytic enzymes on the antimicrobial activity of the extract were also determined.

Findings: Both extracts (purified at 100°C and 50°C) had inhibitory effects on the growth of indicator bacteria. Although Bradford test showed the existence of proteins in the extract, the antimicrobial effects of the extract were resistant to proteolytic enzymes.

Conclusion: Antimicrobial activity of kefiran extract may depend on its protein component.

Keywords: Probiotic, Kefir grains, Kefiran, Antimicrobial activity

[1] Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
[2] Professor, Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Gii Emtiazi PhD, Email: emtiazi@yahoo.com