بررسی فعالیت پروتئازی لاکتوکوکوس لاکتیس بر کاهش حساسیت زایی پروتئین های کازئین شیر گاو

ریحانه کردسدهی[۱]، اصغر طاهری کفرانی[۱*]، محمد ربانی خوراسگانی[۲]

۱) گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲۳ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۱/۱۶**

چکیده

مقدمه: شیر گاو عامل اولین و رایج ترین حساسیت غذایی در اوایل دوران کودکی با شیوع ۷/۵-۲ درصد می باشد. لخته رنینی شیر شامل چهار پروتئین اصلی αs_1، αs_2، β و k کازئین ها می باشد. محتوای کازئینی شیر گاو، نقش اساسی را در بروز حساسیت به شیر در کودکان ایفا می کند. سیستم پروتئولیتیک باکتری های اسید لاکتیک قادر به هیدرولیز اپی توپ های آلرژی زای پروتئین های شیر و در نتیجه آن کاهش حساسیت زایی کازئین ها می باشد. هدف از این پژوهش انتخاب بهترین سویه باکتری های اسید لاکتیک از نمونه های شیر گاو به منظور کاهش حساسیت زایی کازئین شیر گاو می باشد.

مواد و روش ها: در مطالعه حاضر پس از جداسازی ۳۰ نوع کلنی باکتری های اسید لاکتیک کوکسی شکل از ۲۰ نمونه شیر گاو بومی ایران، فعالیت پروتئولیتیکی آن ها بر روی هیدرولیز پروتئین های کازئین شیر گاو با استفاده از روش های SDS-PAGE و RP-HPLC بررسی شد. سپس از میان ۱۵ سویه جدا شده با فعالیت پروتئازی مناسب، توانایی اتصال αs_1-کازئین طبیعی(به عنوان مهم ترین کازئین آلرژی زا) و هیدرولیز شده توسط باکتری با بهترین فعالیت پروتئولیتیکی به IgE سرم کودکان دارای حساسیت به شیر گاو، به وسیله آزمون الایزای رقابتی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: پس از انجام تست های بیوشیمیایی شامل رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز، آزمون های مولکولی تشخیص گونه ای توسط تکثیر قطعه ژنی 16s rRNA صورت پذیرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس، توانایی هیدرولیز پروتئین های کازئین در شیر بدون چربی و سدیم کازئینات را داشته و باعث کاهش حساسیت‌زایی αs_1-کازئین به میزان ۲۷ برابر نسبت به پروتئین طبیعی می شود.

بحث و نتیجه گیری: سویه لاکتوکوکوس لاکتیس جدا شده از نمونه های شیر گاو می تواند به عنوان کشت آغازگر اصلی یا الحاقی در محصولات لبنی برای کاهش واکنش پذیری ایمنی پروتئین های کازئین شیر گاو استفاده شود.

واژه های کلیدی: حساسیت غذایی، کازئین، باکتری های اسید لاکتیک، الایزای رقابتی

* نویسنده مسئول: گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

Email: a.taheri@ast.ui.ac.ir

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

حساسیت غذایی یک پاسخ غیر طبیعی سیستم ایمنی به تعدادی از پروتئین های مواد غذایی می باشد. در کودکان بیشترین حساسیت های غذایی حساسیت به شیر گاو، تخم مرغ، بادام زمینی، گندم، سویا، آجیل ها، ماهی و حلزون صدف دار می باشد(۱). شیر گاو یک ماده غذایی با ارزش مخصوصاً برای نوزادان می باشد، اگر چه پروتئین های شیر گاو می توانند یکی از اصلی ترین آلرژن های غذایی بوده و باعث ایجاد واکنش های حساسیت در نوزادان شوند(۲). حساسیت به شیر گاو گستره ای در حدود ۷/۵-۰/۳ درصد از افراد جامعه را شامل می شود(۳). موقعی که سیستم ایمنی به دلیل واکنش با واسطه IgE درگیر می شود به آن آلرژی به پروتئین شیر گاو(CMPA) گفته می شود که با علایمی مثل راش های پوستی، حملات آسمی، خارش، اسهال و ناراحتی های دستگاه گوارشی همراه می باشد(۴). فراوان ترین آلرژن های شیر گاو شامل کازئین ها، بتالاکتوگلوبولین و آلفالاکتالبومین می باشند، که به ترتیب ۶۵ درصد، ۶۱ درصد و ۵۱ درصد از افراد به آن ها حساسیت دارند(۵). کازئین فسفوپروتئینی آب گریز با ساختار متخلخل و دارای مقادیر زیادی پرولین می باشد. αs_1-کازئین بیشترین نوع پروتئین کازئین موجود در شیر گاو بوده و به عنوان یکی از بزرگ ترین آلرژن های شیر گاو شناخته می شود که واکنش های شدید آلرژیک را ایجاد می کند(۶). تاکنون تلاش های زیادی به منظور کاهش حساسیت زایی پروتئین های شیر گاو صورت گرفته که شامل تعدادی از فناوری های فراوری مواد غذایی مثل گلیکوزیلاسیون، تیمار حرارتی و هیدرولیز آنزیمی می باشند ولی این روش ها تاکنون به طور کامل موثر واقع نشده اند(۷). مطالعات زیادی اهمیت و نقش بارز تخمیر مواد غذایی توسط باکتری های اسید لاکتیک مخصوصاً مواد غذایی لبنی را در کاهش واکنش های آلرژی نشان می دهد(۸). شیر اگر چه یک محیط رشد غنی بوده ولی مقادیر اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای کمی برای حمایت از رشد این باکتری ها دارد. به علت همین محدودیت، سیستم های پروتئولیتیکی یک نقش ضروری در متابولیسم نیتروژن باکتری های اسید لاکتیک در شیر ایفا می کنند(۹). پروتئولیز باعث شکسته شدن تعدادی از اپی توپ ها و کاهش حساسیت زایی پروتئین های شیر از جمله کازئین ها بتالاکتوگلوبولین، آلفالاکتالبومین و آلبومین سرم می شود(۱۰). به طور کلی بهره برداری از کازئین ها به وسیله باکتری های اسید لاکتیک بیشتر دیده می شود، زیرا کازئین فراوان ترین پروتئین موجود در شیر است. از طرفی کازئین به دلیل فقدان ساختارهای ثانویه، به عملکرد پروتئین های متصل به غشاء حساسیت دارد(۱۱). هر چند مطالعاتی جهت استفاده از باکتری های اسید لاکتیک برای کاهش حساسیت شیر گاو انجام شده است، تاکنون در ایران تنها در یک پژوهش توسط طاهری کفرانی و همکاران فعالیت پروتئولیتیکی باکتری های لاکتوباسیلوس جدا شده از نمونه های ماست های بومی ایران بر هیدرولیز و کاهش حساسیت زایی پروتئین های کازئین شیر گاو بررسی شده است. در نمونه های شیر گاو بومی ایران، باکتری های اسید لاکتیک با فعالیت پروتئولیتیکی بسیار خوب وجود دارند اما تاکنون اثر هیدرولیزی این باکتری ها بر پروتئین های حساسیت زای شیر گاو از جمله پروتئین های کازئین بررسی نشده است. از آن جایی که باکتری های اسید لاکتیک کوکسی شکل به عنوان اصلی ترین استارترها در تولید محصولات لبنی تخمیری استفاده می شوند، در این تحقیق برآنیم تا با ایزوله کردن این باکتری های پروبیوتیکی از نمونه های شیر گاو بومی ایران بهترین باکتری را از لحاظ فعالیت پروتئولیزی انتخاب کرده و اثر آن را بر کاهش حساسیت زایی پروتئین αs_1-کازئین از طریق کاهش اتصال این پروتئین به IgE سرم کودکان مبتلا به حساسیت به شیر گاو بسنجیم. در نتیجه با کاهش حساسیت زایی محصولات لبنی از جمله ماست با استفاده از این سویه به عنوان استارتر تولیدکننده، درصد زیادی از جمعیت به خصوص نوزادان و کودکان دارای حساسیت به شیر گاو می توانند از این ماده غذایی ارزشمند بهره مند گردند.

مواد و روش ها

باکتری های اسید لاکتیک مورد استفاده: باکتری های اسید لاکتیک از بیست نمونه شیر گاو استان اصفهان جدا سازی شدند. کشت نمونه های شیر بر روی محیط کشت اختصاصی MRS-آگار به صورت خطی انجام شد. پلیت ها در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ روز در شرایط هوازی و بی هوازی گرمخانه گذاری شد. پس از این مدت، کلنی های ظاهر شده بر روی پلیت ها پس از مشاهده فرم و رنگ ظاهری کلنی، با تست بیوشیمیایی رنگ آمیزی گرم ارزیابی شدند. پس از مشاهده در زیر میکروسکوپ، کلنی مربوط به باکتری هایی با فرم کوکسی و گرم مثبت مورد آزمایش کاتالاز(۳/۵ درصد) قرار گرفت و کلنی های کاتالاز منفی با خصوصیات ظاهری متفاوت که به تعداد ۳۰ کلنی مختلف بودند با کشت های متوالی خطی خالص سازی شدند.

بررسی هیدرولیز پروتئین های کازئین شیر گاو توسط کشت باکتری ها در محیط شیر-سیترات-آگار: از این محیط کشت با ترکیب اصلی شیر به منظور آزادسازی آنزیم های پروتئیناز باکتری های اسید لاکتیک جهت هیدرولیز پروتئین های شیر پیش از الکتروفورز استفاده می شود(۱۲). از کشت شبانه هر سویه باکتری در محیط MRS-براث جهت انتقال به این محیط استفاده شد. بدین ترتیب که پس از تغلیظ باکتری ها در محیط براث، ۲۰۰ میکرولیتر از این کشت غنی شده، بر روی پلیت حاوی محیط شیر-سیترات-آگار به صورت چمنی کشت داده شد. پلیت ها در جار بی هوازی و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شده تا کلنی هایی سفید بر روی محیط ظاهر شده و محیط از رنگ شیری به سفید تغییر کند، که نشان دهنده تولید آنزیم های هیدرولیزی توسط باکتری های اسید لاکتیک جهت استفاده از مواد مغذی موجود در محیط کشت می باشد.

آماده سازی نمونه ها پیش از الکتروفورز ژل SDS-PAGE کاهشی: کلنی های رشد یافته بر سطح محیط شیر-سیترات-آگار توسط بافر سالین(۰/۸۵ درصد NaCl) دو تا سه مرتبه با دور ۳۰۰۰ rpm در دمای محیط به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. سپس بافر فسفات را روی رسوب باکتری ریخته و در این مرحله، میزان کدورت یا جذب باکتری در ۶۰۰ نانومتر بایستی عددی بین ۳۰-۲۰ می شد. از سوی دیگر غلظت ۱۰ mg/ml از پروتئین سدیم کازئینات (ترکیب آلفا و بتا کازئین) تهیه شد. پروتئین کازئین را به نسبت یکسان با غلظت مشخصی از باکتری که در مرحله قبل تهیه شده بود، مخلوط کرده و سپس در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار دادیم. پس از هر یک از این دو زمان به منظور بررسی فعالیت پروتئولیتیکی سویه ها، الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید و کروماتوگرافی ستونی انجام شد.

بررسی اثر هیدرولیز باکتری ها بر روی پروتئین سدیم کازئینات با استفاده از روش SDS-PAGE کاهشی: پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان انکوباسیون نمونه ها، نسبت یکسان از محلول حاوی باکتری و پروتئین کازئینات را با بافر نمونه(شامل ۲ گرم سدیم دودسیل سولفات، ۰/۳ گرم تریس-اسیدکلریدریک با pH ۶/۸، ۵/۷۴ میلی لیتر گلیسرول و ۰/۰۱۲۵ گرم بروموفنول بلو) حاوی ۵ درصد مرکاپتواتانول مخلوط می کنیم. مخلوط حاصل را پس از ورتکس با شتاب ۳۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ می کنیم. به مایع رویی ویال های سانتریفیوژ شده به نسبت یکسان بافر نمونه ۵ درصد مرکاپتواتانول اضافه کرده و به میزان ۱۵ میکرولیتر به چاهک های ژل تزریق کردیم.

غلظت ۱۰ mg/ml پروتئین سدیم کازئینات(ترکیب کازئین های آلفا و بتاکازئین) بدون باکتری نیز نقش نشان گر را در ژل الکتروفورز دارد. جریان به ازای هر ژل در قسمت متراکم کننده ۱۰ میلی آمپر و در قسمت تفکیک کننده ۲۰ میلی آمپر تنظیم شد. پس از اتمام الکتروفورز ژل به مدت ۱-۰/۵ ساعت در حجم مناسبی از محلول رنگ آمیزی کوماسی بلو قرار داده می شود. سپس ژل به مدت ۲-۱ ساعت در محلول رنگ بر قرار داده شده تا رنگ اضافه خارج شود(۱۳). حسن این روش این است که علاوه بر سادگی به ما در انتخاب بهترین سوش از باکتری های بومی ایران از لحاظ تخریب بیشتر پروتئین های

کازئین، جهت انجام آزمون کمی کروماتوگرافی کمک می کند.

بررسی اثر هیدرولیز باکتریایی بر روی پروتئین سدیم کازئینات با استفاده از روش کروماتوگرافی فاز معکوس: این روش کروماتوگرافی بر روی یک ستون نوکلئوزیل(۳۰۰ Å، C_{18}، ۳×۲۵۰ mm، ۱۰ µm) انجام شد. بدین منظور پس از گذشت زمان انکوباسیون سویه های پروتئولیتیک جدا شده از نمونه های شیر با پروتئین سدیم کازئینات، محلول حاصله به نسبت یکسان با اوره ۸ مولار ترکیب شد. پس از سانتریفیوژ ۵ دقیقه ای در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۰۰۰۰، سوپرناتانت حاصله به صورت مستقیم به ستون تزریق شد. ستون با محلول A (استونیتریل ۹۰ درصد و تری فلئورواستیک اسید ۰/۱ درصد) به تعادل رسید. هم چنین این ستون با سرعت ml/min ۰/۵ و در مدت زمان ۴۶ دقیقه توسط محلول B (آب، استونیتریل ۲۰ درصد و تری فلئورواستیک اسید ۰/۱ درصد) شستشو داده شد. دمای ستون و حلال ها بر روی ۳۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد. پیک نمونه ها توسط اندازه گیری جذب در طول موج ۲۲۰ و ۲۸۰ نانومتر ثبت شد که طول موج ۲۲۰nm سیگنال قوی تر و پیک های بهتری ارسال کرد.

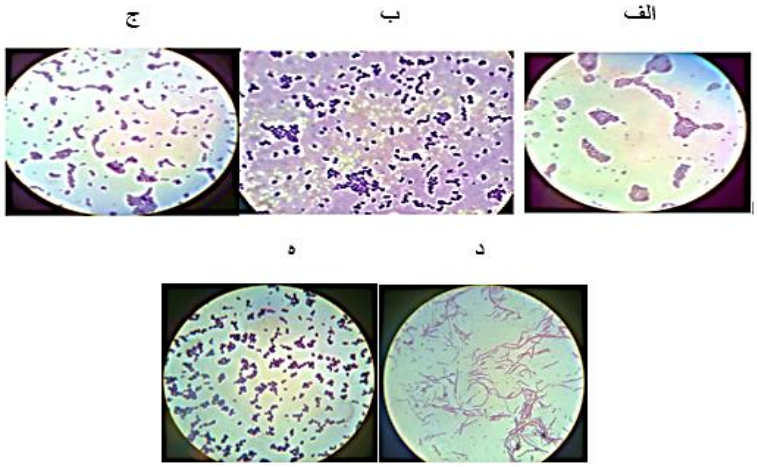
بررسی میزان کاهش حساسیت زایی پروتئین کازئین توسط سویه ای با بهترین فعالیت پروتئولیتیکی به وسیله آزمون الایزای رقابتی: مخزن سرمی از سرم ۱۰ کودک دارای حساسیت به شیر گاو تهیه شد. از صفحه ای شامل ۹۶ چاهک سفید ته صاف، جهت انجام آزمایش استفاده گردید. به هر یک از چاهک ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از پروتئین αs_1-کازئین طبیعی با غلظت µg/ml ۵ اضافه شد. در روز بعد، صفحه الایزا سه مرتبه توسط بافر شستشو PBS/T شامل بافر سدیم فسفات و توین ۲۰ شستشو داده شد و پس از آن ۲۵۰ میکرولیتر از بافر اشباع حاوی پلی ونیل الکل (PBS/T/PVA) به هر کدام از چاهک ها اضافه گردید. به چاهک ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلولی شامل مخلوطی از سرم افراد بیمار دارای حساسیت نسبت به شیر گاو و غلظت های مختلف رقابت کننده ها(کازئین طبیعی و هیدرولیز شده) افزوده شد. سرم ها به نسبت ۱۰:۱ در بافر اشباع رقیق شده بودند، تا رقیق شدن نهایی آن ها ۲۰:۱ شود. محدوده غلظت نهایی رقابت کننده ها در حضور سرم بیماران ۰/۰ تا µg/ml ۲۵۰ بود. سپس صفحه ها سه مرتبه شستشو داده شده و به هر یک از چاهک ها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنتی بادی ضد IgE انسانی پلی کلونال جفت شده با فسفاتاز قلیایی اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پیوند شدن آنتی بادی ثانویه بعد از ۳ مرتبه شستشو با افزایش ۴-متیلیوم بلیفریل فسفات دنبال شد. نشر فلورسانس پس از ۹۰ دقیقه قرار دادن صفحه الایزا در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد توسط دستگاه اندازه گیری فلورسانس میکرو صفحه FL_x800 اندازه گیری شد. طول موج تهییج ۳۶۰ نانومتر اختیار گردید و فلورسانس در طول موج نشر ۴۴۰ nm خوانده شد(۱۳).

شناسایی مولکولی سویه پروتئولیتیک توسط تکثیر قطعه ژنی 16s rDNA: جهت استخراج DNA باکتری های اسید لاکتیک از روش جوشاندن استفاده شد. به منظور تعیین غلظت و خلوص DNA استخراج شده، میزان DNA و نسبت میزان جذب A260/A280 نمونه های استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. هم چنین جهت ارزیابی یکپارچگی و سلامت DNA استخراجی، نمونه ها بر روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفتند. از توالی های آغازگر عمومی 27F و 1492R جهت PCR استفاده شد. آغازگرها پس از رقیق کردن به نسبت ۱ به ۱۰ با غلظت نهایی pmoles/µl ۱۰ بر طبق پروتکل شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفت. واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با شرایط زیر انجام گرفت: بافر(µl ۲/۵)، $MgCl_2$(µl ۱)، dNTP (µl ۰/۵) پرایمرهای رفت و برگشت هر کدام(µl ۰/۵)، آنزیم Taq پلی مراز(µl ۰/۵)، الگو(µl ۲) و در نهایت تا حجم ۲۵ میکرولیتر آب مقطر تزریقی اضافه شد. واکنش با چرخه های واسرشته سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه با مرحله واسرشته سازی در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱

دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در ۴۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و سرانجام یک چرخه بسط نهـایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. از ژل آگارز ۱ درصد جهت بررسی محصولات تکثیر یافته و آشکار سازی محصولات در الکتروفورز استفاده شد. سپس محصول به دست آمده از PCR سویه های مورد نظر جهت تعیین توالی و شناسایی گونه باکتریایی به شرکت زیست ویژن ایرانیان ارسال شد.

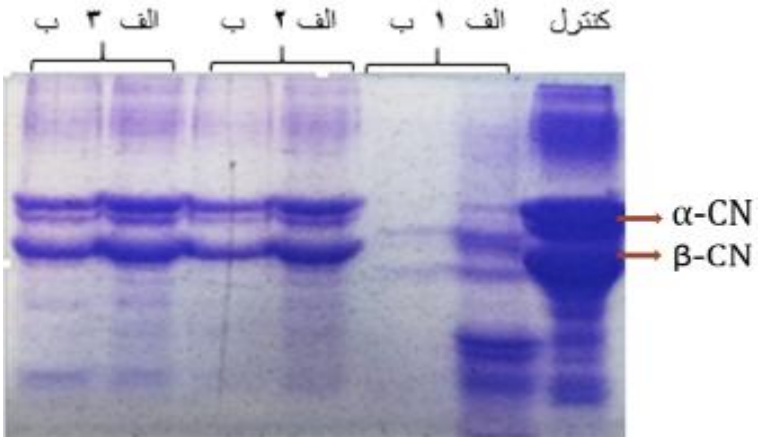
یافته های پژوهش

سویه های خالص شده به فرم های مختلف از جمله کوکسی و باسیل بودند. لازم به ذکر است که در میان نمونه های شیر، مخمرها و لاکتوباسیلوس ها نیز جدا شدند. در نهایت از این نمونه های شیر گاو تهیه شده، در کل ۳۰ نمونه کلنی باکتری کاتالاز منفی با فرم های کوکسی و کوکوباسیل جدا و برای انجام آزمایشات بعدی انتخاب شدند(شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱. تصویر میکروسکوپی سویه های جدا شده از نمونه های شیر گاو ایرانی که توسط رنگ آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ۱۰۰ برابر تهیه شده اند. نمونه های(الف تا ج): سویه های باکتری با فرم های کوکسی جدا شده از نمونه های شیر، (د): نمونه ای از سویه های لاکتوباسیلوس های جدا شده و (ه) نمونه ای از تصویر میکروسکوپی مخمر نمونه های شیر

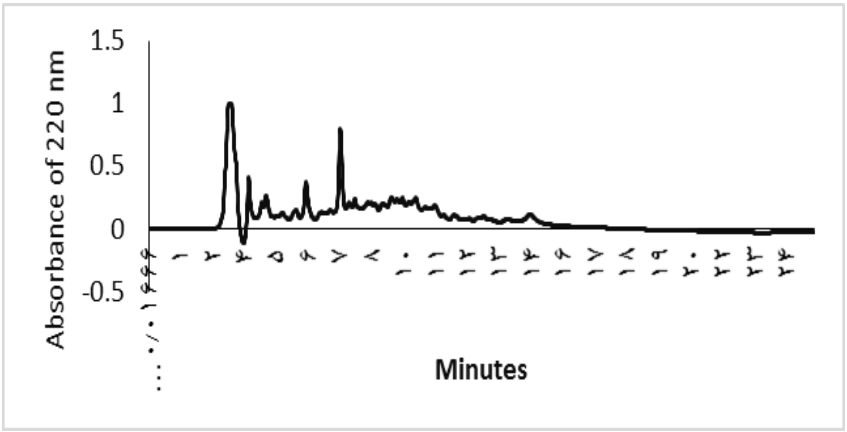
نتایج حاصل از هیدرولیز باکتریایی پروتئین های کازئین شیر گاو با استفاده از روش SDS-PAGE کاهشی: کاهش تراکم باندها در ژل الکتروفورز، نشان دهنده هیدرولیز توسط پروتئازهای باکتریایی می باشد. نتایج حاصل از هیدرولیز پروتئین های کازئین شیر گاو، پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی و با نمونه کنترل که پروتئین های کازئین شیر گاو بدون حضور پروتئاز باکتریایی می باشد، مقایسه شد. نتایج هیدرولیزات های حاصل از باکتری های اسید لاکتیک با فرم کوکسی جدا شده از شیر گاو نشان می دهد که اکثر سویه ها توانایی هیدرولیز پروتئین های کازئین شیر گاو را داشته ولی در مورد یک سویه پس از ۲۴ ساعت هیدرولیز نسبتاً زیاد و پس از گذشت ۴۸ ساعت هیدرولیز نسبتاً کامل مشاهده می شود. با توجه به کاهش چشم گیر تراکم باندهای هیدرولیزات این سویه باکتری در مقایسه با نمونه پروتئین کازئین طبیعی به عنوان کنترل، این سویه به منظور بررسی دقیق تر برای HPLC انتخاب شد(شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲. نتیجه SDS-PAGE کاهشی ۱۲ درصد حاصل از هیدرولیز پروتئین های کازئین شیر گاو توسط باکتری های کوکسی اسید لاکتیک جدا شده از نمونه شیر گاو بومی ایران: ستون اول مربوط به پروتئین های کازئین شیر گاو به عنوان نشان‌گر می باشد. این باکتری ها به مدت(الف) ۲۴ و (ب) ۴۸ ساعت با پروتئین های کازئین انکوبه شده تا میزان اثر آن ها بر این پروتئین در ژل الکتروفورز نمایان شود. نمونه ۱ مربوط به سویه جدا شده از نمونه شیر گاو با بهترین فعالیت پروتئولیتیکی پس از گذشت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت می‌باشد. نمونه های ۲ و ۳ مربوط به دیگر باکتری های کوکسی اسید لاکتیک جدا شده از شیر گاو با فعالیت پروتئولیتیکی کم می باشند که هر کدام در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت با پروتئین سدیم کازئینات شیر گاو انکوبه شده اند

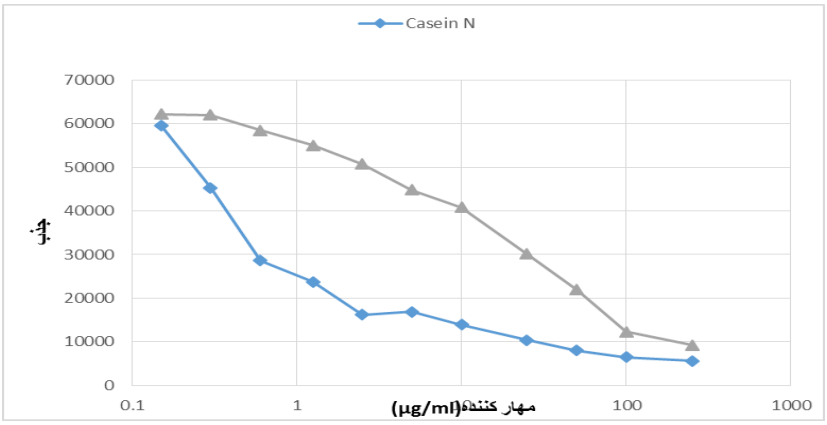
نتایج کروماتوگرافی فاز معکوس حاصل از هیدرولیز باکتریایی پروتئین‌های کازئین شیر گاو: در روش کروماتوگرافی فاز معکوس ستون به صورت غیر قطبی (آب‌گریز) می باشد و پپتیدهای حاصل از هیدرولیز باکتریایی، بر اساس میزان آب گریز بودن خود به ستون متصل می شوند. کروماتوگرام نمونه های استاندارد و هیدرولیز شده در طول موج ۲۲۰ نانومتر ترسیم و برحسب($mAU^2/1000$) می باشد. کروماتوگرام حاصل از نمونه استاندارد پروتئین های کازئین شیر گاو در شکل شماره ۳ آورده شده است. کروماتوگرام ها با استفاده از نرم افزار کروم گیت ترسیم شدند. کروماتوگرام حاصل از هیدرولیز پروتئین های کازئین توسط باکتری اسید لاکتیک جدا شده از شیر گاو با بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی پس از گذشت زمان ۲۴ ساعت در شکل شماره ۴ نشان داده شده است. هیدرولیز باکتریایی منجر به شکست پیک پروتئین های کازئین شیر گاو به پپتیدهایی با ارتفاع کمتر و تعداد بیشتر می شود. در نمونه های هیدرولیز شده، از زمان حدود ۱۵–۴ دقیقه پیک های مربوط به هیدرولیزات دیده می شود. سویه باکتری اسید لاکتیک جدا شده با تاثیر بر نواحی متعدد پروتئین های کازئین سبب ایجاد شکست های متعدد در این پروتئین و در نتیجه تولید پپتیدهایی با ترکیب اسید آمینه ای متعدد می شود.

شکل شماره ۳. نمودارکروماتوگرافی فاز معکوس پروتئین های کازئین طبیعی شیر گاو



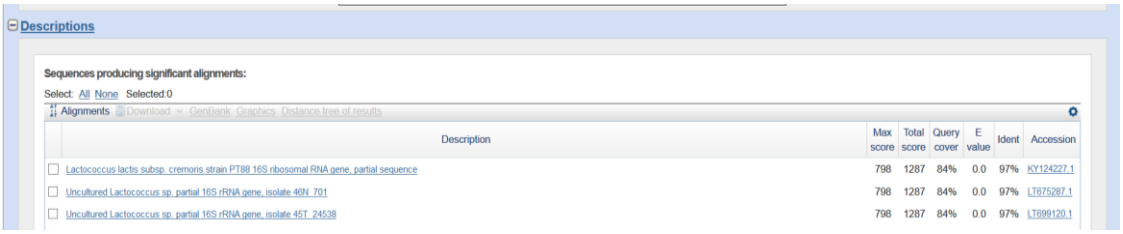
شکل شماره ۴. نمودار کروماتوگرافی فاز معکوس پروتئین های کازئین شیر گاو هیدرولیز شده توسط باکتری اسید لاکتیک جدا شده از نمونه شیر گاو با بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی

نتیجه آزمون الایزای رقابتی بر روی پروتئین αs_1-کازئین هیدرولیز شده و طبیعی: آزمایشات الایزای رقابتی با استفاده از کل پروتئین های کازئین انجام شده است، اما آن چه که مربوط به پیوند شدن به IgE است پروتئین آلرژی زای αs_1-کازئین می باشد. نتایج این آزمون در شکل شماره ۵ نشان داده شده است. همان طور که ملاحظه می شود، αs_1-کازئین هیدرولیزات نسبت به پروتئین طبیعی دارای یک جا به جایی به سمت غلظت های بیشتر مهارکننده است. این نشان دهنده عدم تمایل اتصال αs_1-کازئین هیدرولیزات به IgE سرم افراد بیمار نسبت به پروتئین طبیعی و به تبع آن کاهش حساسیت زایی می باشد. مقادیر IC_{50} مشاهده شده برای αs_1-کازئین طبیعی برابر ۰/۴۳ و برای αs_1-کازئین هیدرولیزات در حضور باکتری جدا شده از شیر گاو با بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی ۱۱/۶ می باشد. بنا بر این میزان اتصال به مهارکننده برای پروتئین هیدرولیز شده با باکتری جدا شده از شیر گاو به میزان ۲۷ برابر نسبت به پروتئین طبیعی کاهش نشان می دهد، یعنی به همین میزان باعث کاهش آلرژی شده است.



شکل شماره ۵. نمودار الایزای رقابتی: مقایسه مهار اتصال IgE اختصـــاصی علیه αs1-کازئین طبیعی(منحنی آبی رنگ) و αs1-کازئین هیدرولیز شده(منحنی مشکی رنگ) توسط باکتری اسید لاکتیک جدا شده از نمونه شیر گاو. همان‌طور که ملاحظه می گردد، کازئین های هیدرولیزات در غلظت بالاتری از مهار کننده نسبت به کازئین طبیعی به IgE متصل می شوند.

نتیجه شناسایی مولکولی سویه پروتئولیتیک انتخاب شده با استفاده از تکثیر ژن 16srDNA: با توجه به این که سویه جدا شده با بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی از نمونه های لبنی بومی بوده و جنس و گونه آن مشخص نمی باشد، پس از اطمینان از گرم مثبت و کاتالاز منفی بودن به تشخیص جنس و گونه آن ها اقدام گردید. توالی های ارسال شده به فرمت FASTA تبدیل شده و نتایج حاصل از تعیین توالی سپس با استفاده از ابزار BLASTn با سایر توالی های شناخته شده موجود در بانک اطلاعاتی NCBI مقایسه شد. جنس و گونه پیشنهادی در شـــکل شـــماره ۶ ملاحـــظه می گردد. سویه باکتـــری جـــدا شـــده از شـــیر گاو ۹۷ درصد شباهـــت با گونه لاکتوکوکوس لاکتـــیس را نشـان می دهد.



شکل شماره ۶. نتیجه توالی یابی باکتری دارای بیشترین فعالیت پروتئولیتیکی جدا شده از نمونه شیر گاو

بحث و نتیجه‌گیری

حساسیت به شیر گاو می تواند ناشی از واکنش به یکی از پروتئین های موجود در شیر باشد. در این بین پروتئین های کازئین از مهم ترین حساسیت زاهای شیر هستند(۱۴). مطالعات انجام شـــده جـــهت کاهش حساسیت زایی پروتئین های کازئین موجود در شیر گاو شامل تیمارهای حرارتی، روش های فرآوری غذایی غیر حرارتی از جمله تیمار با اشعه ماورای بنفش،

فراصوت با شدت بالا و یا ترکیبی از روش های مختلف مانند قنددار کردن و تیمار حرارتی می باشد. هر چند استفاده از این روش ها به منظور کاهش دادن حساسیت زایی مواد غذایی در سال های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است اما مقاومت و پایداری مصرف کننده و تجهیزات بزرگ مورد استفاده و هزینه بالای آن ها استفاده از این روش ها را در صنایع غذایی محدود کرده است(۱۵). در این بین استفاده از باکتری های اسید لاکتیک به منظور کاهش حساسیت به شیر گاو نقش موثرتری را به خود اختصاص داده اند. این باکتری ها با منشاء طبیعی محصولات لبنی و با فواید فراوان برای سلامتی انسان، جایگاه ویژه ای در این پژوهش دارند. در صنعت لبنیات از سویه های مختلف باکتری های اسید لاکتیک برای تخمیر و فرآوری محصولات لبنی استفاده می شود. در گزارشات علمی پیشین نیز، نقش تخمیر در کاهش حساسیت زایی محصولات لبنی و کاهش اتصال آنتی بادی IgE اثبات شده است(۸،۹،۱۶).

نتایج پژوهش های چوبرت و همکاران در مورد هیدرولیز پروتئین های اصلی محصولات لبنی توسط باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از ماست های سنتی بلغارستان نشان می دهد که در طی فرآیند تخمیر، پروتئین های شیر از جمله کازئین توسط اسید لاکتیک تولید شده اسیدی شده و به وسیله پروتئازها و پپتیدازهای باکتریایی هیدرولیز می شوند. این پروتئولیز سبب کاهش تعداد اپی توپ ها و در نتیجه کاهش حساسیت زایی پروتئین هیدرولیز شده می شود(۸). ال-قایش و همکاران دریافتند که پس از هیدرولیز αs_1-کازئین توسط Lactobacillus fermentum IFO 3956، تشخیص و اتصال IgE به این پروتئین از مخزن سرمی ۱۸ بیمار دارای حساسیت به شیر گاو به مقدار قابل توجهی کاهش می یابد(۱۳).

نتایج به دست آمده از تحقیق دیگری که توسط احمدوا و همکاران انجام شد نشان داد که هیدرولیز توسط Lactobacillus helveticus A75 باعث کاهش ۶-۵ برابری اتصال IgE به αs_1-کازئین و β-کازئین هیدرولیزات نسبت به پروتئین طبیعی می شود(۱۷). در سال ۲۰۱۳ جینگ شی و همکاران نشان دادند که تخمیر شیر بدون چربی توسط باکتری Lactobacillus casei N115 طی ۲۸ ساعت می تواند آلرژی زایی پروتئین های اصلی شیر از جمله آلفا کازئین و بتاکازئین را به میزان قابل توجهی کاهش دهد. میزان این کاهش در مورد پروتئین αs_1-کازئین در حدود ۵۷/۴۷ درصد بوده است(۱۸). در سال ۲۰۱۵ جینگ یاو و همکاران نشان دادند که تخمیر توسط باکتری Lactobacillus casei 1134 به میزان قابل توجهی می تواند آلرژی زایی پروتئین های حساسیت زای شیر گاو از جمله کازئین ها را کاهش دهد(۱۹). نتایج ارائه شده در این پژوهش، به صورت اولیه هیدرولیز پروتئین های کازئین شیر گاو توسط گونه باکتری اسید لاکتیک لاکتوکوکوس لاکتیس جدا شده از شیر گاو را تایید کردند. اثر پروتئولیزی این باکتری ها توسط آزمون های SDS-PAGE و کروماتوگرافی فاز معکوس نیز به اثبات رسید. با توجه به نتایج آزمون الایزای رقابتی، فعالیت پروتئولیتیکی مناسب این باکتری منجر به کاهش ۲۷ برابری حساسیت پروتئین αs_1-کازئین هیدرولیز شده نسبت به پروتئین طبیعی شده و از این رو این سویه باکتریایی را کاندیدای بالقوه ای برای کاهش حساسیت به شیر گاو معرفی می کند.

باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس احتیاجات غذایی زیادی داشته و به منابع نیتروژنی وابسته می باشد، بنا بر این پروتئین های کازئین شیر اصلی ترین منبع اسیدهای آمینه برای رشد این گونه در شیر می باشند. سیستم پروتئولیتیکی این باکتری ها از سرین پروتئینازهای خارج سلولی متصل به دیواره سلولی و پپتیدازهای مختلف تشکیل شده که اسیدهای آمینه ضروری برای رشد را با فعالیت خود بر روی پروتئین های کازئین شیر گاو و تجزیه آن تولید می کنند(۲۰). لاکتوکوکوس لاکتیس به عنوان اصلی ترین کشت های آغازگر در محصولات لبنی تخمیری از جمله پنیر و تولیدکننده ترکیبات معطر استفاده شده که اهمیت صنعتی و اقتصادی این باکتری را نشان می دهد(۲۱). در این پژوهش سویه لاکتوکوکس لاکتیس جدا شده از شیر گاو خاصیت کاهش دهندگی حساسیت به پروتئین کازئین شیر گاو

را به صورت تجربی نشان داد. این سویه می تواند به عنوان کشت استارتر اصلی یا الحاقی برای تولید محصولات لبنی با آلرژی زایی کاهش یافته به کار رود. پپتیدهایی که پس از فعالیت هیدرولیتیکی سویه لاکتوکوکوس بر روی پروتئین های کازئین شیر تولید می شوند هم چنین می توانند به عنوان اجزای تشکیل دهنده فرموله های خاص غذایی لبنی به کار روند. تعیین توالی و بررسی مولکولی ژن یا ژن های مواد آنزیم پروتئاز هنوز صورت نگرفته که می تواند به عنوان یک پیشنهاد برای ادامه کارهای تحقیقاتی بعدی در آینده ارائه گردد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهش دانشگاه اصفهان به خاطر حمایت مالی از اجرای این پژوهش قدردانی می شود. این مقاله بخشی از پایان نامه تحصیلی برای اخذ مدرک کارشناسی ارشد زیست فناوری میکروبی از دانشگاه اصفهان تحت عنوان بررسی اثر باکتری های کوکسی اسید لاکتیک جدا شده از نمونه های شیر گاو و شتر بومی ایران بر کاهش حساسیت زایی پروتئین های کازئین شیر گاو می‌باشد.

References

1.Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Muraro A, Werfel T, Cardona V, et al. The epidemiology of food allergy in Europe a systematic review and metaanalysis. Allergy 2014;69:62-75, Doi: 10.1111/all.12305.

2.Barzegar S, Rosita A, Pourpak Z, Bemanian MH, Shokouhi R, Mansouri M, et al. Common causes of anaphylaxis in children: the first report of anaphylaxis registry in Iran. World Allergy Org J 2010;3:9-13, Doi: 10.1097/WOX.

3.Crittenden RG, Bennett LE. Cows milk allergy a complex disorder. J Am College Nut 2005;24:582-91. Doi:10.1080/07315724.

4.Host A, Halken S. A prospective study of cow milk allergy in Danish infants during the first 3 years of life. Allergy 1990;45:587-96. Doi: 10.111/j.1398-9995.

5.Jarvinen KM, Chatchatee P, Bardina L, Beyer K, Sampson HA. IgE and IgG binding epitopes on α-lactalbumin and β-lactoglobulin in cow's milk allergy. Int Arch Allergy Immun 2001;126:111-118, Doi: 10.1159/000049501.

6. Schulmeister U, Hochwallner H, Swoboda I, Focketejkl M, Geller B, Nystrand M, et al. Cloning expression and mapping of allergenic determinants of α_{S1} casein a major cows milk allergen. J Immun 2009;182:7019-29. Doi: 10.4049.

7.Verhoeckx KC, Vissers YM, Baumert JL, Faludi R, Feys M, Flanagan S, et al. Food processing and allergenicity. Food Chem Toxicol 2015;80:223-40. Doi: 10.1016.

8. Tzvetkova I, Dalgalarrondo M, Danova S, Iliev I, Ivanova I, Chobert J, et al. Hydrolysis of major dairy proteins by lactic acid bacteria from Bulgarian yogurts. J Food Biochem 2007;31:680-702. Doi: 10.1111.

9.Donkor ON, Henriksson A, Vasiljevic T, Shah NP. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. Lait 2007; 87:21-38, Doi: 10.1051/lait: 2006023.

10. Ghaish S, Ahmadova A, Hadji I, El Mecherfi KE, Bazukyan I, Choiset Y, et al. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. Trends Food Sci Technol 2011;22:509-516. Doi:10.1016.

11. Deutsch SM, Molle D, Gagnaire V, Piot M, Atlan D, Lortal S. Hydrolysis of sequenced β-casein peptides provides new insight into peptidase activity from thermophilic lactic acid bacteria and highlights intrinsic resistance of phosphopeptides. Appl Environ Microb 2000; 66:5360-5367. Doi: 10.1128.

12. Pescuma M, Hebert EM, Mozzi F, Valdez G. Hydrolysis of whey proteins by Lactobacillus acidophilus, Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii

ssp. bulgaricus grown in a chemically defined medium. J Appl Microb 2007; 103:1738-1746. Doi: 10.1111.

13. Ghaish S, Rabesona H, Choiset Y, Sitohy M, Haertle T, Chobert JM. Proteolysis byLactobacillus fermentum IFO3956 isolated from Egyptian milk products decreases immune reactivity of αs_1 casein. J Dairy Res 2011; 78:203-210. Doi: 10.1017/S0022029911000100.

14.Caira S, Addeo F, Pinto G, Picariello G, Chianese L, Cuollo M, et al. Allergenicity of milk proteins. Intech Open Access Publisher 2012; 2:123-7. Doi: 10.5772/52086.

15. Bu G, Luo Y, Chen F, Liu K, Zhu T. Milk processing as a tool to reduce Cow's milk allergenicity a mini review. Dairy Sci Technol 2013; 93:211-23. Doi: 10.1007/s13594-013-0113-x.

16. Moulay M, Aggad H, Benmechernene Z, Guessas B, Henni DE, Kihal M. Cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and their proteolytic activity. World J Dairy Food Sci 2006; 1:12-8.

17. Ahmadova A, Ghaish SH, Choiset Y, Rabesona H, Drouet M, Chobert J, et al. Modification of IgE binding to β and αs_1-caseins by proteolytic activity of Lactobacillus helveticus A75. J Food Biochem 2013; 37:491-5. Doi: 10.1111.

18. Shi J, Luo Y, Xiao Y, Li Z, Xu Q, Yao M. Effects of fermentation by Lactobacillus casei on the antigenicity and allergenicity of four bovine milk proteins. Int Dairy J 2014;35:75-80. Doi: 10.1016.

19. Yao M, Xu Q, Luo Y, Shi J, Li Z. Study on reducing antigenic response and IgE-binding Inhibitions of four milk proteins of Lactobacillus casei 1134. J Sci Food Agric 2015; 95:1303-12. Doi: 10.1002.

20. Meijer W, Marugg JD, Hugenholtz J. Regulation of proteolytic enzyme activity Lactococcus lactis. Appl Environ Microb 1996;62:156-61. Doi: 10.1143.

21. Desmasures N, Mangin I, Corroler D, Gueguen M. Characterization of lactococci isolated from milk produced in the Camembert region of Normandy. J Appl Microb 1998;85:999-1005. Doi:10.1111.

Investigation of Proteolytic Ctivity of Lactococcus lactis in Reducing Cow´s Milk Caseins Allergenicity

Kordesedehi R[1], Taherikafrani A[1], Rabbanikhorasgani M[2]*

(Received: January 12, 2017 Accepted: April 5, 2017)

Abstract

Introduction: Bovine milk is the first and most common cause of food allergy in early childhood with a prevalence rate of about 2-7/5%. The milk coagulum consists of four proteins α_{S1}, α_{S2}, β and κ-caseins. Cow's milk caseins play a basic role in persistence of cow's milk allergy (CMA) in children. Proteolytic system of lactic acid bacteria (LAB) has the ability to hydrolyze antigenic epitopes of milk proteins and, as a result, can reduce allergy to caseins.The aim of this study was to isolate the best lactic acid bacteria strain from cow's milk samples in order to reduce bovine milk caseins allergenicity.

Materials & Methods: In the present study, after isolation of 30 cocci LAB from 20 Iranian cow's milk samples, the effect of proteolytic activity of these bacteria on milk caseins was investigated by SDS-PAGE and RP-HPLC techniques. Subsequently, among the 15 strains with protease activity, the binding ability of native and hydrolyzed α_{S1}-casein to IgE sera from cow's milk allergic patients was determined by competitive ELISA test.

Findings: After accomplishing biochemical tests including gram staining and catalase test, molecular identification of the strains was done by 16s rRNA fragment sequencing. The obtained results suggested that Lactococcus lactis was able to hydrolyze casein fractions in both skim milk and sodium caseinate and could reduce allergenicity of bovine milk α_{S1}-casein.

Discussion & Conclusions: Our conclusion demonstrated that the isolated Lactococcus lactis strain from cow's milk samples can be used as a main or adjunct starter culture in dairy products to reduce immunor-eactivity of cow's milk caseins.

Keywords: food hypersensitivity, casein, lactic acid bacteria, competitive ELISA.

1.Dept of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technologies, Isfahan University , Isfahan, Iran
2.Dept of Biology, Faculty of Science, Isfahan University , Isfahan, Iran
**Corresponding author Email: a.taheri@ast.ui.ac.ir*