پژوهش و سازندگی
در امور دام و آبزیان
شماره ۷۱، تابستان ۱۳۸۵

شناسایی و تشخیص باکتریوسین تولید شده توسط *Lactobacillus acidophilus* (RN۷۸) جدا شده از پنیرمحلی

• **ناهید مژگانی**، بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
• **سعید اسماعیل خانیان** و • **منصوره عاملی**، موسسه تحقیقات علوم دامی‌کشور،کرج ، ایران
• **اصغر یوسفی امین**، بخش بیوتکنولوژی ،موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

تاریخ دریافت: خرداد ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: فروردین ماه ۱۳۸۴
E mail: moj@rvsri.com

چکیده

در ایـن مطالعـه لاکتوسـین۷۸ RN که بوسـیله *L. acidophilus* (جدا شـده ازیک نمونه پنیر غیر پاسـتوریزه) تولید شـده بود مـورد آزمایش قـرار گرفته وا ثر بازدارندگی آن بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسـی شـد. طیف بازدارندگی این باکتریوسـین برعلیه باکتری‌هـای پاتـوژن ازقبیـل *S.aureus* RTCC ۱۲۴۰ RTCC ۱۳۳۱ *L.monocytogenes* , *L.ivanovii* ۱۸۸۵ و *S.pyogenes* مشـاهده گردیـد. ویژگی این باکتریوسـین مقاومت در برابر گرما(۹۰دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سـانتیگراد) و همچنین حفظ فعالیت در pH قلیایی می‌باشـد. فعالیت ضد میکروبی لاکتوسـین RN ۷۸ پس از مجاورت با پروناز و تریپسـین به‌طورکامل از بین رفت ، درصورتی‌که کاتالاز هیچ اثری روی فعالیت آن نداشـت. اثر بازدارندگی این باکتریوسین پس از افزودن SDS و EDTA یک درصد وسـیع‌تر گردید و توانسـت از رشـد *E.coli* RTCC ۱۱۶۲ و *S.typhi* (local isolate) که قبلاً در مقابل آن مقـاوم بودنـد نیز جلوگیـری نماید. تیمار کردن این گونـه، با آکریدین اورنج و حـرارت بالا (۴۰درجه سـانتیگراد) منجر به بروز جهش‌هایـی در باکتـری گردید،کـه اختلال در تولید باکتریوسـین RN ۷۸ به‌دنبال داشـت . در تمام این جهش‌هـای اختلال زا، عدم حضور پلاسـمیدkb ۴۲ مشـاهده گردید، در صورتی‌که وجود این پلاسـمید در گونه اصلی مولد باکتریوسین، با استفاده از الکتروفورز Echardt gel به اثبات رسیده بود.

کلمات کلیدی: باکتری‌های اسید لاکتیک ، باکتریوسین ،آنتاگونیستی ،پلاسمید.

Pajouhesh & Sazandegi No:71 pp: 36-42

Detection and characterization of a bacteriocin RN78 produced by *Lactobacillus acidophilus* strain Isolated from a cheese sample

By: N.Mojgani,Biotechnology Dept ., S. Ismail Khanian,Razi Vaccine and Serum Research Institute., M. Ameli ,Razi Vaccine and Serum Research Institute.,and A.Yusefi Amin., Karaj, Iran.

A bacteriocin, lactocin RN78 produced by a *Lactobacillus acidophilus* RN78 isolated from a non-pasturized cheese sample was found inhibitory against many species of lactobacilli and other Gram-positive and Gram negative bacteria

tested in this study. The spectrum of inhibition of this bacteriocin was wide enough to inhibit the growth of pathogenic bacteria such as *L.monocytogenes*, *L.ivanovii, S.aureus* and *S.pyogenes*. Characterization studies revealed this bacteriocin to be heat stable (90min at 100°C) and active at alkaline pH values exceeding 9.0. The inhibitory activity of lactocin RN78 was completely destroyed after treatment with pronase and trypsin while catalase had no effect on its activity. The inhibitory spectrum of lactocin RN78 was widened against certain gram negative bacteria after treatment with 1% SDS and EDTA. The growth of *E.coli* and *S.typhi* was completely destroyed after treatment to lactocin and detergents in combination, while alone none were effective. Curing of this strain (*L.acidophilus* RN78) with acridine orange resulted in Bac- mutants defective in bacteriocin production. When checked by Echardt gel electrophoresis, all the defective mutants showed absence of a 42Kb plasmid that was present originally in the wild producer strain.

Key Words: Lactic acid bacteria, Inhibitory agent, Bacteriocin, Curing, Plasmids

مقدمه

در سال‌های اخیر، پدیده آنتاگونیسم باکتریایی به‌جهت تولید باکتریوسین‌ها یا مواد شبه باکتریوسین، از نظر قابلیت استفاده آنها در کنترل رشد میکرب‌های نامطلوب مد نظر قرار گرفته است(۲۷،۲۴،۱۹،۱۶،۲). بیشتر گزارش‌های اخیر در مورد باکتری‌های تولیدکننده این باکتریوسین‌ها مربوط به گروه باکتری‌های اسید لاکتیک، به‌ویژه جنس‌های لاکتوکوکوس، پدیوکوکوس، لوکونوستوک، کارنوباکتریوم، لاکتوباسیلوس و انتروکوکسی‌ها بوده است (۱۹،۱۷،۱۶،۱۳). این گروه از باکتری‌ها در فرآیندهای غذایی همچون لبنیات، سبزیجات، نانوایی، نوشیدنی‌ها و فرآورده‌های گوشتی مورد استفاده فراوان دارند(۱۹،۱). باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، مانع رشد یکی از مهمترین باکتری‌های پاتوژن به نام *L.monocytogenes* می‌گردند(۲۷،۶،۵) لذا این باکتریوسین‌ها اهمیت به سزایی در صنایع غذایی جهت جلوگیری از رشد این پاتوژن‌ها دارند.

چندین باکتریوسین باکتری‌های اسید لاکتیک ،همچون لاکتوسین تولیدی توسط زیر جنس *L. lactis* شناسایی، جداسازی و تشخیص داده شده‌اند. از جمله ۴۸۴ lactacin (۶) و۸۹۱۲ acidocin از *L.acidopillus* TK ۸۹۱۲ (۳۰،۱۲) از *L.plantarum* (۲۱)و LA*L.gasseri* ۳۹ gassericin A (۱۴). در این میان نایسین که به‌عنوان یک باکتریوسین توسط *L.lactis* تولید می‌شود ، در فرآورده‌های شیری به‌ویژه پنیر کاربرد فراوانی دارد(۱۲،۱۱). از این باکتریوسین به‌علت طیف وسیع ممانعت از رشد میکروارگانیسم، فعالیت بالای ضد میکروبی و پایداری در مقابل pH پایین و حرارت بالا، در بیش از ۴۵ کشور جهان به‌عنوان یک ماده جلوگیری کننده از فساد مواد غذایی استفاده می‌شود(۸،۷). در این مطالعه، باکتریوسین جدیدی بنام لاکتوسین RN۷۸ که توسط یک گونه بومی لاکتوباسیل که خود از نمونه پنیرغیر پاستوریزه جدا شده، تولید شده بود مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشات مشخص نمودکه این باکتریوسین در مقابل گرما، pH قلیایی و آنزیم‌های مختلف، پایداری بسیار خوبی دارد. فعالیت این باکتریوسین بر علیه سایر جنس‌های لاکتوباسیل و پاتوژن‌های مهم عملکرد ضد میکروبی وسیع این باکتریوسین را مشخص نمود. همچنین حضور یک پلاسمیدkb ۴۲ در این باکتری مشخص کرد که تولید باکتریوسین۷۸ RN در *L. acidophilus* مربوط به پلاسمید می‌باشد زیرا پرگنه‌های موتانت این باکتری فاقد پلاسمید بودند.

مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت و شرایط رشد

کلیه محیط‌های کشت مصرفی در این مطالعه ساختOxoid,England بوده است. محیط‌های کشت اختصاصی جهت جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک شامل: MRS آگار(deMan Rogosa & Sharpe) جهت جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک ، RA آگار(Rogosa agar) و LA آگار (Lactobacillus agar) جهت جداسازی لاکتوباسیل‌ها بودند. تمام محیط‌های کشت داده شده به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در شرایط بی‌هوازی قرارگرفتند.

سایر باکتری‌های غیر اسید لاکتیک(جدول شماره ۲) در محیط‌هایBHI (Brain heart infusion) و Nutrient در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و به‌مدت ۲۴-۱۲ ساعت در شرایط هوازی رشد داده شدند.

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک از نمونه‌های شیر و پنیر

برای این منظور از نمونه‌های شیر و پنیر سنتی (غیر پاستوریزه) و چند نمونه از شیر و پنیر پاستوریزه از نقاط مختلف شهر تهیه گردیده بود استفاده شد. پس از تهیه رقت‌های مختلف نمونه‌ها در براث MRS در دوتکرار کشت سطحی در محیط‌های ذکر شده به‌عمل آمد و پس از گذشت ۴۸ ساعت پرگنه‌های تشکیل شده از نظر مورفولوژی ، رنگ آمیزی گرم ، تست کاتالاز، قابلیت تشکیل هاگ و تخمیر قندها طبق Bergys Manual مورد بررسی و شناسایی قرار گرفته شدند (۲۶).

ارزیابی قابلیت بازدارندگی باکتری‌های اسید لاکتیک

ویژگی‌های ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده بر رشد چند باکتری مهم عامل فساد

و بیماری‌زا با استفاده ازروش حفره‌ای (Agar well diffusion) مورد بررسی قرار گرفت(۳۰). کشت ۲۴ساعته باکتری تولید کننده باکتریوسین به‌مدت ۱۵ دقیقه، در۴درجه سانتیگراد و با دور ۱۰۰۰۰rpm سانتریوفیوژ گردیده و مایع رویی جداسازی شد. pH مایع رویی به‌وسیله سود ۴ مولار در حد ۷ تنظیم گردید. سطح هر یک از پلیت‌های حاوی MRS آگا ر، بوسیله ۵ میلی لیترMRS نیمه جامد حاوی ۲۰ میکرولیتر از کشت اندیکاتور پوشانده شده و گودهایی به قطر۵ میلی لیتر روی پلیت‌های مذکور بوسیلهCock borer ایجاد گردیده و داخل هر گوده ۱۰۰میکرولیتر از مایع رویی کشت باکتری تولید کننده ریخته شد. تمام پلیت‌ها بمدت ۲ الی ۴ ساعت در یخچال و سپس در شرایط بی‌هوازی به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. پس از این مدت هاله‌های شفاف ایجاد شده در اطراف گوده‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی مواد باکتریوسین مانند تولید شده توسط برخی باکتری‌های اسید لاکتیک

جهت مشخص نمودن اینکه اثر ضد میکروبی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از نمونه های پنیر و شیر مربوط به باکتریوسین است یا خیر، حساسیت عوامل بازدارنده این باکتری‌ها بر رشد باکتری‌های شاخص در حضور آنزیم کاتالاز و آنزیم‌های پروتئولیتیک و لیپاز مورد بررسی قرار گرفت. برای این کارمایع رویی عاری از سلول با تریپسین(Trypsin)، پرونـاز(Pronase E) وکاتالاز(Catalase) با غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر مجاور گردید و پس از گذشت یک ساعت فعالیت باقیمانده باکتریوسین بروش حفره‌ای اندازه‌گیری شد(۲۸،۳).

شناسایی طیف بازدارندگی باکتریوسین

نظر به اینکه در آزمایش‌های قبلی یکی از این نمونه‌های باکتری که به‌عنوان *L.acidophillus* RN ۷۸ شناسایی شده بود طیف بازدارندگی وسیعی بر رشد باکتری‌های اسید لاکتیک دیگر را نشان داد و از طرفی ماده بازدارنده تولیدی توسط این باکتری در مجاورت برخی از آنزیم‌های پروتئولیتیک حساس بوده و آنزیم کاتالاز نیز بر فعالیت بازدارندگی آن تاثیری نداشت، همچنین این باکتری در pH خنثی خاصیت بازدارندگی را نشان داد، لذا این باکتری تولید کننده باکتریوسین فرضی در نظر گرفته شد. طیف بازدارندگی باکتریوسین تولید شده توسط *L.acidophillus* ۷۸ RN بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی با استفاده از روش حفره‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۵،۲۳،۱۷).

تاثیر pH ،حرارت و درجنت‌ها بر عملکرد باکتریوسین

جهت بررسی اثر pH با استفاده از HCl و NaOH ۴ مولار از مایع رویی کشت باکتری مورد نظر ۱۲ نمونه در pH های۱،تا ۱۲ تهیه و فعالیت هرنمونه بوسیله روش حفره‌ای مورد بررسی قرار گرفت. جهت اندازه‌گیری مقاومت به گرما مایع رویی در حرارت ۸۰، ۱۰۰و ۱۲۱ درجه سانتیگراد قرار گرفته و نمونه‌ها پس از هر ۱۵ دقیقه مورد بررسی قرار گرفتند. عامل آنتاگونیستی RN ۷۸ با EDTA و SDS در غلظت ۱درصد W/V مجاور گردید و باقیمانده فعالیت آنتاگونیستی بر علیه ارگانیسم‌های اندیکاتور توسط روش ذکرشده مورد بررسی قرار گرفت(۱۸،۳).

سنجش (عیارگیری) باکتریوسین

سنجش رقت توسط روش کریتیکال[1] انجام گرفت (۱۸) .طبق این روش مایع رویی کشت باکتری مورد نظر به اندازه دو برابر در محیط MRS براث رقیق گردیده و میزان فعالیت در هر رقت به‌وسیله روش حفره ای تعیین شد. بالاترین رقتی که فعالیت بازدارندگی را در برابر اندیکاتور نشان می‌دهد، به‌عنوان تیتر و با AU/ml [2] تعریف می‌گردد.

سنجش Lacuna

جهت اندازه‌گیری تعداد سلول‌های لاکوناساز ،در کشت۷۸ RN، این سلول‌ها پس از قرار گرفتن در معرض کلروفرم، با باکتری حساس و آگار نیمه جامد مخلوط و سپس بر روی سطح پلیت‌های MRS آگار ریخته شدند. سپس این پلیت‌ها در دمای ۳۷درجه سانتیگراد، به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند . فراوانی لاکونا با استفاده از فرمول ذیل محاسبه گردید .

$$LF = \frac{LFC\ t}{LFC + VBC}$$

LF: فراوانی لاکونا (Lacuna formation)

LFC : فراوانی سلول‌های لاکوناساز (Lacuna forming cell)

VBC: سلول‌های زنده (Viable bacterial count)

تیمار پلاسمید(Plasmid curing)

با استفاده از روش‌های تیماری ، نقش انواع جهش‌ها در ایجاد اختلال درروند تولید باکتریوسین ،توسط Hirota در سال ۱۹۶۰تشریح شده است(۹). دراین بررسی ، آکریدین اورنج[3] به‌عنوان عامل تیمار شیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. ارگانیسم مورد آزمایش درMRS براثی که به آن، آکریدین اورنج (به‌عنوان مکمل) با غلظت ۱۵۰۰-۵ میکروگرم برمیلی لیتر افزوده شده بود ، رشد داده شد . تمام لوله ها در۳۷ درجه سانتیگراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.آخرین (رقیق‌ترین) لوله‌ای که رشد قابل مشاهده و خوبی نشان داد انتخاب شده و با MRS براث تازه به‌میزان ۱۰ برابر رقیق گردید از این رقت ۱۰۰ میکروگرم بر روی سطح هر یک از پلیت‌های محتوی MRS آگار گسترش داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. پس از انکوباسیون تک‌کلون‌های موجود با دقت برداشته شده و فعالیت بازدارندگی آن توسط روش آگار ول دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی پلاسمید

وجود یا عدم وجود پلاسمید در نمونه اصلی(Wild type) و نمونه‌های جهش یافته(mutant strain) *L.acidophilus* RN ۷۸ با استفاده از الکتروفورز Echardt gel (۴) مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی کشت ۲۴ساعته این باکتری(۵۰۰ -۱۰۰میکرولیتر) با ۱۰۰۰۰rpm و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریوفوژ و سلول‌های آن جمع آوری گردید. سلول‌ها پس از شسته شدن با بافر خنک TNE، (تریس۱۰ میلی مولار، نمک طعام ۱۰۰ میلی مولار،EDTA ۱ میلی مولار) به ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE (تریس ۱۰میلی مولار و EDTA ۱ میلی مولار) اضافه گردیدند، سپس این محصول به حفره‌های ایجاد شده در ژل آگارز ۰/۹درصد ریخته شد. ۵۰ میکرولیتر

محلول لیز کننده (۲۵ درصد w/v محلول ساکارز در ۱۰ ، TBE میلی گرم در میلی لیتر لیزوزایم و یک واحد RNase) به حفره‌های مذکور افزوده و با یک خلال اســتریل مخلوط گردید. الکتروفورز با ۳۰ولت به‌مدت ۳۰ دقیقه آغاز و سپس با ۱۲۰ ولت به‌مدت ۳ ساعت ادامه یافت ،و ژل زیر اشعه UV مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

باکتری‌های اســید لاکتیک از اجزای اصلی فلــور میکروبی محصولات لبنی می‌باشــند. این باکتریها را می‌توان به‌عنــوان باکتری‌های گرم مثبت، کاتــالاز منفی و میکروآئروفیلیک که قادر به تولید هاگ نمی‌باشــند معرفی کرد(۳). از ۵۴ نمونه شــیر و پنیرغیر پاســتوریزه ۲۲ نمونه باکتری شــامل مخلوطی از باســیل‌ها، کوکوباســیل‌ها و کوکســی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و غیر هاگزا بوده‌اند که می‌توان آنها را باکتری اســید لاکتیک(LAB) محســوب نمود. در این مطالعــه برخی از باکتری‌های اســید لاکتیک جدا شــده اثر بازدارندگی وســیعی را بر علیه باکتری‌های شاخص نشان داده که این عمل بازدارندگی می‌تواند ناشــی از سیســتم‌های پیچیده آنتاگونیستی باشــد که توسط این باکتری‌ها تولید می‌شــود(۲۷،۱). جهت تعیین حضور باکتریوســین در اثــر بازدارندگی این باکتری‌ها، اثر آنزیم‌هــای گوناگون بر فعالیــت ضد میکروبی این باکتری‌ها مورد آزمایش قرار گرفت. همانطور که در جدول شــماره -۱ مشاهده می‌شــود عمل بازدارندگی *L.acidophillus* RN۷۸ در حضــور آنزیــم کاتالاز حفــظ گردیده و لذا نمی‌تــوان این اثر را صرفاً به پر اکســید هیدروژن نسبت داد . اما قابلیت بازدارندگی مایع رویی این باکتری در مجاورت آنزیم‌های پرونازE و تریپســین به‌طور کامل ازمیان رفت ،که می‌توان آن را به پروتیینی بودن ترکیب بازدارنده (باکتریوســین) نسبت داد(۲۹،۸،۳). نتایج بررسی‌ها حاکی از این بودکه قابلیت بازدارندگی *L.acidophillus* RN۷۸ به‌علت وجود باکتریوســین که لاکتوسین RN۷۸ نامیده شد، می‌باشد.گزارش‌های متعددی تولید باکتریوسین را در این گونه باکتری تایید نموده است (۲۰،۱۶،۱۵).

طیــف بازدارندگــی مایــع رویی کشــت RN ۷۸ در جدول -۲ نشــان داده شــده اســت. ماده ضــد باکتریایی تولید شــده به‌وســیله ایــن گونه بخوبــی فعالیــت بازدارندگی بــر علیه به‌عضــی از پاتوژن‌های گــرم مثبت را نشــان داد. لاکتوســین RN ۷۸ ، باکتریوســین تولید شــده توسط گونه مــورد آزمایش بر علیــه یکی از مهمتریــن پاتوژن‌های مــواد غذایی یعنی *L.monocytogenes* نیز موثر بود. این ویژگی ضد باکتریایی ،باکتریوسین‌ها را به‌عنــوان یکی از بهتریــن گزینه‌ها جهت کاربرد به‌صورت خالص شــده و به‌عنــوان نگهدارنــده بیولوژیــک ، در صنایع غذایی مطرح نموده اســت و جهــت جلوگیــری از لیســتریوزیس(listeriosis) در پنیر قابل اســتفاده می‌باشــد (۲۷،۲۳،۲۲،۱۷،۲،۱). در این بررســی هیچگونــه اثر بازدارندگی لاکتوســین RN ۷۸ بر علیه باکتری‌های گرم منفی مورد آزمایش ثبت نشد. اما ترکیب این لاکتوســین با دترجنت‌هــای EDTA وSDS موجب افزایش فعالیت بازدارندگی آن بر علیه برخی باکتری‌های گرم منفی از جمله *E.coli* و *Salmonella typhi* گردیــد. درصورتی‌کــه درغیاب ایــن دترجنت‌ها این لاکتوســین بر باکتری‌های مذکور بی اثر بود. افزایش فعالیت لاکتوسین RN۷۸ پس از مجاورت با دترجنت‌ها را می‌توان به تقسیم شدن سلول پروتیین باکتریوسین به زیر واحدهای کوچکتر و در نتیجه افزایش میزان برخوردهای این زیر واحدها با باکتری‌ها نسبت داد. همچنین Muriana و Klaenhammer (۲۱)و Kato و همکاران نتایج مشــابهی گرفته‌اند(۱۳) بر اســاس گزارشات آنهــا پس از مجاورت بــا SDS ، واحدهــای بزرگتر باکتریوســین‌ها به زیر واحدهای فعال کوچک تقســیم شده و در نتیجه ممانعت از رشد باکتری‌ها افزایش یافته است و وقوع برخوردهای کشنده با باکتری‌ها افزایش می‌یابد. این درحالی‌است که نتایج متفاوتی که توسط Tagg وهمکاران (۲۷) گزارش شــده حاکی از آن بود که اگر زیر واحدهای بزرگ باکتریوســین‌ها توســط دترجنت‌ها به زیرواحدهای کوچکتر تقســیم شوند ممکن است فعالیت ضد باکتریایی آنها کاهش یافته و یا به‌طور کلی متوقف شود .

بالاترین تیتر لاکتوسین RN ۷۸ بر علیه لیستریا مونوسیتوژنز، به‌میزان AU۱۰۲۴ در میلی لیتر بود.(شــکل-۱) درحالی‌کــه پایین‌ترین تیتر آن بر علیــه *L. ivanovi* به‌میــزان AU ۳۲۰ در میلی لیتر ثبــت گردید. اگرچه تیترهای بالای فعالیت بر علیه لیســتریا به‌وســیله بعضی باکتریوسین‌های تولید شــده توسط باکتری‌های اســید لاکتیک نیز گزارش شده است(۳۰)، اثــر ضدلیســتریایی لاکتوســین RN ۷۸ از اهمیت قابل توجهــی برخوردار اســت. بر پایه این نتایج فعالیت لاکتوســین RN ۷۸ ، در مقایسه با فعالیت لاکتوســین JCM ۱۰۲۸ تولید شده توسط *L. acidophilus* که AU۱۳۵۰

جــدول-۱ تاثیر عوامــل فیزیکی وشــیمیایی برعامل بازدارنده تولید شــده توسط *L.acidophillus* (RN ۷۸)

ردیف	عامل	فعالیت بازدارندگی
۱	آنزیمها پرونازE تریپسین کاتالاز	 - - +
۲	درجنتها SDS EDT A Tween ۲۰ Tween ۸۰	 + + - -
۳	حرارت ۸۰ ۱۰۰ ۱۲۰	 + + +
۴	pH ۳ ۵ ۷ ۱۰	 - + + +

شکل۱- سنجش فعالیت باکتریوسین۷۸ RN بر علیه *L. monocytogenes* در غلظت‌های مختلف (AU/ml)

در میلی لیتر می‌باشد نسبتاً کمتر است(۲۹،۲۰). همچنین میزان‌های فعالیت پایین‌تر از این باکتریوسین (۷۸ RN) نیز در این بررسی مشاهده گردید، که در مورد پلانتارسین۱۴۹ و گازرسین A (۱۵)، میزان این فعالیت به ترتیب ۸۰۰ و AU۶۴۰ در میلی لیتر بود .

حساسیت باکتریوسین‌ها نسبت به pH بسیار متفاوت بوده وتعداد زیادی از آنها در حیطه بسیار وسیعی از pH فعال می‌باشند (۱۹،۱۶). باکتریوسین تولید شده توسط۷۸ RN نیز همین خصوصیت را نشان داده و در pH های بین ۱۱-۳ فعال بود. حداکثر فعالیت بازدارندگی لاکتوسین۷۸ RN، درpH های بین ۵ و۶ مشاهده گردید.

خاصیت مهم لاکتوسین۷۸ RN تولید شده در این تحقیق، پایداری در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد، به مدت بیش ازیک‌ساعت (۹۰دقیقه) به‌علاوه تحمل حرارت ۱۲۱ درجه سانتیگراد به‌مدت ۱۵ دقیقه نیز حفظ نمود. موارد زیادی از مقاومت باکتریوسین‌ها درمقابل حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد به‌مدت ۶۰ دقیقه، قبلاً گزارش گردیده است . این باکتریوسین‌ها شامل لاکتوسین۲۷LP و B (۲،۳۰) و انتروسین۱۰۱ (۱۳) بودند که درمقابل حرارت مقاوم گزارش شده بودند. بااین حال به نظر می‌رسد مقاومت حرارتی لاکتوسین۷۸ RN از باکتریوسین‌های نامبرده بیشتر باشد، این باکتریوسین در برابر دمای اتوکلاو به‌مدت ۱۵دقیقه مقاوم بود. پایداری لاکتوسین۷۸ RN می‌تواند نشان‌دهنده ماهیت پیچیده این پروتئین باشد.

جدول-۲ طیف بازدارندگی لاکتوسین۷۸ RN برعلیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

ردیف	باکتری‌های اندیکاتور	فعالیت بازدارندگی
۱	*B.subtilis* RTCC ۱۰۵۸	-
۲	*E.coli* RTCC ۱۱۶۲	-
۳	*Kl.pneumoniae* (Local isolate)	+
۴	*L.paracasei* ATCC ۳۹۳	+
۵	*L.bulgaricus* DSMZ ۲۰۰۸۱	+
۶	*L.ivanovii* RTCC ۱۳۳۱۱	+
۷	*L.monocytogenes* RTCC ۱۲۴۰	+
۸	*P.multicida* (Local isolate)	-
۹	*Ps.aeruginosa* RTCC ۱۵۰۲	-
۱۰	*S.typhi*(Local isolate)	-
۱۱	*S.dysentriae* (Local isolate)	-
۱۲	*S.aureus* RTCC ۱۸۸۵	+
۱۳	*S.agalactieae* (Local isolate)	-
۱۴	*S.pyogenes* (Local isolate)	-

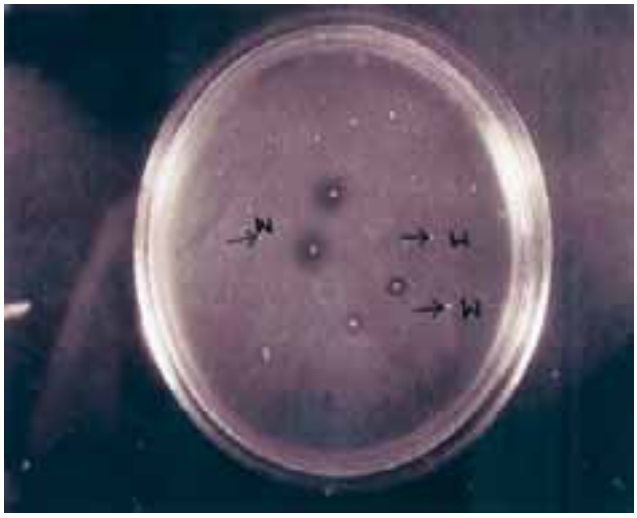
قبلا سنجش سلول‌های لاکونا ساز (Lacuna assay) به‌منظور تعیین تعداد سلول‌های تولید کننده کولیسن موجود در کشت در یک زمان مشخص بکار می‌رفت. درمورد گونه‌های دارای سلول‌های لاکوناساز ایجاد منطقه عدم رشد همیشه به چشم نمی‌خورد، که دو علت را می‌توان برای آن درنظر گرفت.

الف) عدم تولید باکتریوسین کافی توسط سلول‌های منفرد به میزانی‌که جهت ایجاد هاله لازم است.

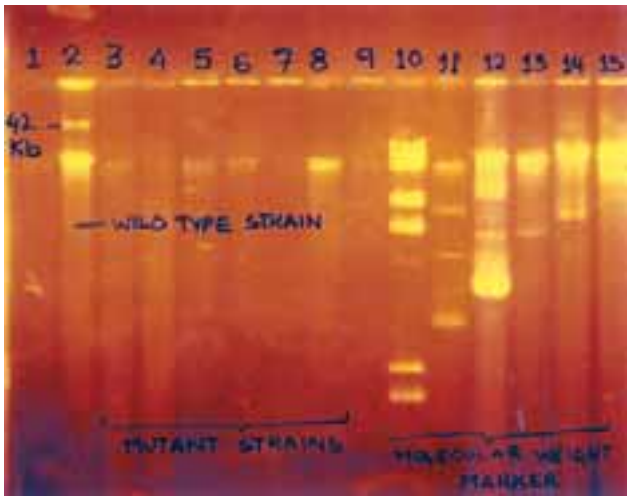
ب)عدم توانایی باکتریوسین در خروج از سلول‌های منفرد و انتشار به محیط اطراف.

اما درمورد سلول‌های منفرد *L.acidophillus* ۷۸ RN با وجود سلول‌های لاکوناساز(Lacuna forming cell) به‌میزان ۱۶ درصد نیز، منطقه عدم رشد(هاله شفاف)ایجاد گردید. این واقعیت ثابت می‌کند که گونه۷۸ RN یک مولد قوی باکتریوسین می‌باشد، زیرا سلول‌های منفرد آن قادر به تولید باکتریوسین کافی بوده و این باکتریوسین تولید شده از سلول تراوش شده و یک منطقه عدم رشد قابل مشاهده ایجاد می‌کند. این در حالی است که درصد سلول‌های لاکونا در مورد۷۸ RN به‌مراتب بیشتر از تعداد آنها در کشت *E.coli* محتوی پلاسمید Col E۲-P۹ (که۰/۰۱ درصد بود) گزارش شده است(۷).

بسیاری از تحقیقات نشان داده است، که ژن‌های سازنده باکتریوسین یا پلاسمیدها و یا بوجود آمده از کروموزوم‌ها می‌باشند(۱۰،۱۱،۲۱). نتایج مقدماتی این آزمایش حاکی از آن بود که توانایی باکتریوسین تولید شده توسط ۷۸ RN می‌تواند مربوط به عملکرد پلاسمید باشد ، زیرا آزمایشات تیماری با عامل تیمار شیمیایی منجر به ایجاد پرگنه‌هایی شد که قابلیت تولید لاکتوسین را از دست داده بودند(شکل-۲). عدم وجود پلاسمید ، در این باکتری‌ها جهش یافته با استفاده از الکتروفورز بروش Echardt gel به اثبات رسید. هیچیک از باکتری‌های جهش یافته دارای پلاسمید نمی‌باشند درصورتی‌که در باکتری مولد لاکتوسین۷۸ RN وجود یک پلاسمید ۴۲ کیلوبیسی احراز گردیده بود (شکل-



شکل۲- اثر ضد باکتریایی باکتریوسین
RN ۷۸ بر علیه باکتریهای اندیکاتور پس از تیمار شدن



شکل ۳- تایید وجود پلاسمید در سویه های وحشی
لاکتوسین RN ۷۸ و غیاب آن در کلنی های تیمار شده

۳). ایـن نتایـج نشـان می‌دهد که تولید لاکتوسـین RN ۷۸ توسـط *L.acidophillus* RN ۷۸ مربوط به پلاسـمید می‌باشـد. چندین چنین گـزارش نیـز ، تولید باکتریوسـین توام با پلاسـمید را در باکتری‌های لاکتیک اسید نشان داده‌اند (۲۷،۹).

اسـتفاده از عوامل نگهدارنده غذایی به‌صـورت فلور میکروبی بی خطر (Safe)،تلاش‌های فراوانی را جهت جداسازی نوع وحشی (Wild) باکتری‌های لاکتیک اسـید ایجـاد نموده اسـت. در این مطالعات اگرچه باکتریوسـین تولید شده توسـط این گونه لاکتوباسـیل(*L.acidophillus* RN۷۸) نتایج امیدبخشـی را از خود نشـان داد امـا پیش از کاربرد عملـی آن در صنایع غذایی و اسـتفاده این‌گونه محصولات توسـط مصرف کننده باید تحقیقات بیشـتری به‌منظور تشـریح مکانیسم عمل در سـطح مولکولی و همچنین خواص باکتریوسـین درمحصول غذایی که در آن مورد استفاده قرار خواهد گرفت صورت پذیرد.

پاورقی‌ها

1- Critical dilution method
2- Arbitraray unit per ml
3- Acridine orange

منابع مورد استفاده

1- Barefoot SF and Klaenhammer TR: 1983; Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *L. acidophilus*. Appl Environ Microbiol, 45:1808-1815.

2- Delves-Broughton J Blackburn P, Evans R J and Hugenholtz: 1996; Nisin and its uses as a food preservative. Food Tech. 44: 100-112.

3- De vuyst.L., and Vandamme E.J: 1994; Bacteriocins of LAB, microbiology, Genetics and applications. Blackie Academic and Professional. London.

4- Gilliland SE: 1990; Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Revs, 87:175-188.

5- Guerra N P and Pastrana L: 2002; Production of bacteriocins from *L.lactis* subsp.lactis CECT 539 and *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 using mussel-processing wastes. Biotechnol. Appl. Biochem, 36:119-125.

6- Gupta RK and Batish VK: 1992; Genetic evidence for plasmid-encoded lactococcin production in *Lactococcus lactis* subsp. lactis 484. Current Microbial, 24:231-238.

7- Hardy KG: 1982; Bacteriocins in experimental microbial ecology. Ed by RG Burns and JH Slater, chapter 21. Edinburgh Blackwell Scientific Publications, 368-379.

8- Harlander SK: 1993; Regulatory aspects of bacteriocin used. In: Bacteriocin of LAB, Ed by DG Hoover and LR Steinson San Diego, California. Academic Press Inc.

9- Hirota V: 1960; The effect of acridine dyes on mating type factors in *E. coli*. Pro Natl Acad Sci USA, 46:57-64.

10- Kanatani K and Oshimura M: 1994; Plasmid associated bacteriocin production by an L plantarum strain. Biosci Biotech Biochem, 58:2084-2086.

11- Kanatani K, Tahara T, Yoshida K, Miura H, Sakamoto M and Oshimura M.: 1992; Plasmid associated bacteriocin production by and immunity of L. acidophilus TK 8912. Biosci Biotech Biochem, 56:648-651.

12- Kato T, Matsuda T, Ogawa E, Ogawa H, Kato H, Doi U and Nakamura R.,1994; Plantaricin-149, a bacteriocin produced by *L. plantarum* NRIC 149. J Ferment Bioeng, 77:277-282.

13- Kato T, Matsuda T, Yoneyama Y, Kato H and Nakamura R.,1993; Isolation of *Enterococcus faecium* with antibacterial activity and characterization of its bacteriocin. Biosci Biotech Biochem, 57:551-556.

14- Kawai Y, Saito T, Toba T, Samant SK and Itoh I, 1994; Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (gassericin A) from *L. gasseri* LA 39 61:34-37.

15- Kawai Y, Saito T, Uemura J and Itoh T: 1997; Rapid detection method for bacteriocin and distribution of bacteriocin-producing strains in *L acidophilus* group lactic acid bacteria isolated from human feces. Biosci Biotech Biochem, 61:179-182.

16- Klaenhammer TR: 1988; Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochemia, 70; 337-349.

17- Lindgren SE and Doborogosz WJ: 1990; Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbial Revs, 87; 149-164.

18- Mayr-Hartings, A.hedges, A.J, and Berkeley, R.C.W: 1972; Methods for studying bacteriocins. Methods Microbiol 7; 315-422.

19- McKay LL and Baldwin KA: 1990; Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. FEMS Microbial Revs, 87:3-14.

20- Muriana PM and Klaenhammer TR: 1991; Cloning, phenotypic expression and DNA sequence of the gene for lactacin F, a bacteriocin produced by *L. acidophilus*. J Bacteriol, 173; 1779-1778.

21- Nissen-Meyer J, Larsen AG, Sletten K, Daeschel M and Nes IF: 1993; Purification and characterization of plantaricin A, a *L. plantarum* bacteriocin whose activity depends on the action of two peptides. J Gen Microbiol, 139; 1973-1978.

22- Prasad J, Gill H, Smart J and Gopal P K: 1999; Selection and characterization of lactobacillus and bifidobacterium strains for use as probiotics. Int Dairy J 8; 993-1002.

23- Pucci. M.J, E.R vedomutha, B.S. Kontia and Vandenbergh P.A: 2004; Inhibition of L.monocytogenes by using bacteriocin PA-Z produced by *P.acidilactici*. Appl. Environ Microbiol 54: 2349-2353.

24- Rasch M and S Knochel: 1998; Variation in tolerance of Listeria monocytogenes to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. letters in Appl Microbiol. 27:275-278.

25- Schillinger U and Lüke FK: 1998; Antibacterial activity of L. sake isolated from meat. Appl Env Microbiol, 55:1901-1906.

26- Sneath, P.H.A, N.S.Mair and Holt J.G : 1986; Bergys manual of systematic bacteriology vol 2 Williama & Wilkins, Baltimore.

27- Tagg JR, Dajani AS and Wannamaker LW: 1976; Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol Rev, 40:722-756.

28- Tahara T, Kanatani K, Yoshida K, Hirosumi M, Sakamoto M and Oshimura M: 1991; Purification and some properties of acidocin 8912, a novel bacteriocin produced by *L. acidophilus* TK 8912. Biosci Biotech Biochem, 56:1212-1215.

29- Tahara T and Kanatani K: 1997; Isolation and partial amino acid sequence of bacteriocins produced by *L. acidophilus*. Biosci Biotech Biochem, 61:884-886.

30- Upreti GC and Hindsill RD: 1973; Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative Lactobacillus. Antimicrobial Agents Chemother, 4:487-494.