



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

• ناهید مژگانی، بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
• سعید اسماعیل خانیان و • منصوره عاملی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، 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 این مطالعه لاکتوسین RN ۷۸ که بوسیله *L. acidophilus* (جدا شده از یک نمونه پنیر غیر پاستوریزه) تولید شده بود مورد آزمایش قرار گرفته و اثر بازدارندگی آن بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد. طیف بازدارندگی این باکتریوسین بر علیه باکتری‌های پاتوژن از قبیل *S.aureus* RTCC ۱۲۴۰، *L.monocytogenes*، *L.ivanovii* RTCC ۱۳۳۱ و ۱۸۸۵ *S.pyogenes* مشاهده گردید. ویژگی این باکتریوسین مقاومت در برابر گرما (۹۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد) و همچنین حفظ فعالیت در pH قلیایی می‌باشد. فعالیت ضد میکروبی لاکتوسین RN ۷۸ پس از مجاورت با پروناز و تریپسین به طور کامل از بین رفت، در صورتی که کاتالاز هیچ اثری روی فعالیت آن نداشت. اثر بازدارندگی این باکتریوسین پس از افزودن SDS و EDTA یک درصد وسیع تر گردید و توانست از رشد *E.coli* RTCC ۱۱۶۲ و *S.typhi* (local isolate) که قبلاً در مقابل آن مقاوم بودند نیز جلوگیری نماید. تیمار کردن این گونه، با آکریدین اورنج و حرارت بالا (۴۰ درجه سانتیگراد) منجر به بروز جهش‌هایی در باکتری گردید، که اختلال در تولید باکتریوسین RN ۷۸ به دنبال داشت. در تمام این جهش‌های اختلال زا، عدم حضور پلاسمید ۴۲ kb مشاهده گردید، در صورتی که وجود این پلاسمید در گونه اصلی مولد باکتریوسین، با استفاده از الکتروفورز Echaradt 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 Ehardt 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

مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت و شرایط رشد

کلیه محیط‌های کشت مصرفی در این مطالعه ساخت Oxoid, 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 به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در شرایط بی‌هوازی قرار گرفتند. سایر باکتری‌های غیر اسید لاکتیک (جدول شماره ۲) در محیط‌های BHI (Brain heart infusion) و Nutrient در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و به مدت 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 برات MRS در دو تکرار کشت سطحی در محیط‌های ذکر شده به عمل 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 جدا شده بر رشد چند باکتری مهم عامل فساد

مقدمه

در سال‌های اخیر، پدیده آنتاگونیسم باکتریایی به جهت تولید باکتریوسین‌ها یا مواد شبه باکتریوسین، از نظر قابلیت استفاده آنها در کنترل رشد میکروب‌های نامطلوب مدنظر قرار گرفته است (۲، ۱۶، ۱۹، ۲۴، ۲۷). بیشتر گزارش‌های اخیر در مورد باکتری‌های تولیدکننده این باکتریوسین‌ها مربوط به گروه باکتری‌های اسید لاکتیک، به ویژه جنس‌های لاکتوکوکوس، پدیوکوکوس، لاکتوباسیلوس و لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس‌ها بوده است (۱۳، ۱۶، ۱۷، ۱۹). این گروه از باکتری‌ها در فرآورده‌های غذایی همچون لبنیات، سبزیجات، نانواپی، 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 (۵، ۶، ۲۷) 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) و ۸۹۱۲ acidocin از *L.acidophilus* ۸۹۱۲ TK

(۳۰، ۱۲) از *L.plantarum* (۲۱) و gassericin A از *LAL.gasseri* ۳۹ (۱۴). در این میان نایسین که به عنوان یک باکتریوسین توسط *L.lactis* تولید می‌شود، در فرآورده‌های شیری به ویژه پنیر کاربرد فراوانی دارد (۱۱، ۱۲). از این باکتریوسین به علت طیف وسیع ممانعت از رشد میکروارگانیزم، فعالیت بالای ضد میکروبی و پایداری در مقابل pH پایین و حرارت بالا، در بیش از ۴۵ کشور جهان به عنوان یک ماده جلوگیری کننده از فساد مواد غذایی استفاده می‌شود (۷، ۸). در این مطالعه، باکتریوسین جدیدی بنام لاکتوسین RN۷۸ که توسط یک گونه بومی لاکتوباسیل که خود از نمونه پنیر غیر پاستوریزه جدا شده، تولید شده بود مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشات مشخص نمود که 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 پلاسمید ۴۲ kb در این باکتری مشخص کرد که تولید باکتریوسین ۷۸ RN در *L. acidophilus* مربوط به پلاسمید می‌باشد زیرا پرگنه‌های موتانت این باکتری فاقد پلاسمید بودند.

سنجش (عیارگیری) باکتریوسین

سنجش رقت توسط روش کریتیکیال^۱ انجام گرفت (۱۸). طبق این روش مایع رویی کشت باکتری مورد نظر به اندازه دو برابر در محیط MRS برات رقیق گردیده و میزان فعالیت در هر رقت به وسیله روش حفره ای تعیین شد. بالاترین رقتی که فعالیت بازدارندگی را در برابر اندیکاتور نشان می دهد، به عنوان تیترو با 2 AU/ml تعریف می گردد.

سنجش Lacuna

جهت اندازه گیری تعداد سلول های لاکوناساز، در کشت ۷۸ RN، این سلول ها پس از قرار گرفتن در معرض کلروفورم، با باکتری حساس و آگار نیمه جامد مخلوط و سپس بر روی سطح پلیت های MRS آگار ریخته شدند. سپس این پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. فراوانی لاکونا با استفاده از فرمول ذیل محاسبه گردید.

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

LF: فراوانی لاکونا (Lacuna formation)

LFC: فراوانی سلول های لاکوناساز (Lacuna forming cell)

VBC: سلول های زنده (Viable bacterial count)

تیمار پلاسمید (Plasmid curing)

با استفاده از روش های تیماری، نقش انواع جهش ها در ایجاد اختلال در روند تولید باکتریوسین، توسط Hirota در سال ۱۹۶۰ تشریح شده است (۹). در این بررسی، آکریدین اورنج^۲ به عنوان عامل تیمار شیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. ارگانیسیم مورد آزمایش در MRS برای آن که به آن، آکریدین اورنج (به عنوان مکمل) با غلظت ۵-۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر افزوده شده بود، رشد داده شد. تمام لوله ها در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. آخرین (رقیق ترین) لوله ای که رشد قابل مشاهده و خوبی نشان داد انتخاب شده و با MRS برات تازه به میزان ۱۰ برابر رقیق گردید از این رقت ۱۰۰ میکروگرم بر روی سطح هر یک از پلیت های محتوی MRS آگار گسترش داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. پس از انکوباسیون تک کلون های 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 نمونه های جهش یافته (mutant strain) *L. acidophilus* RN ۷۸ با استفاده از الکتروفورز Ehardt gel (۴) مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی کشت ۲۴ ساعته این باکتری (۵۰۰-۱۰۰۰ میکرولیتر) با ۱۰۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سلول های آن جمع آوری گردید. سلول ها پس از شسته شدن با بافر خنک TNE، (تریس ۱۰ میلی مولار، نمک طعام ۱۰۰ میلی مولار، EDTA ۱ میلی مولار) به ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE (تریس ۱۰ میلی مولار و EDTA ۱ میلی مولار) اضافه گردیدند، سپس این محصول به حفره های ایجاد شده در ژل آگار ۰/۹ درصد ریخته شد. ۵۰ میکرولیتر

و بیماری را با استفاده از روش حفره ای (Agar well diffusion) مورد بررسی قرار گرفت (۳۰). کشت ۲۴ ساعته باکتری تولید کننده باکتریوسین به مدت ۱۵ دقیقه، در ۴ درجه سانتیگراد و با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردیده و مایع رویی جداسازی شد. pH مایع رویی به وسیله سود ۴ مولار در حد ۷ تنظیم گردید. سطح هر یک از پلیت های حاوی MRS آگار، بوسیله ۵ میلی لیتر MRS نیمه جامد حاوی ۲۰ میکرولیتر از کشت اندیکاتور پوشانده شده و گوده هایی به قطر ۵ میلی لیتر روی پلیت های مذکور بوسیله Cock borer ایجاد گردیده و داخل هر گوده ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی کشت باکتری تولید کننده ریخته شد. تمام پلیت ها بمدت ۲ الی ۴ ساعت در یخچال و سپس در شرایط بی هوازی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. پس از این مدت هاله های شفاف ایجاد شده در اطراف گوده ها مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی مواد باکتریوسین مانند تولید شده

توسط برخی باکتری های اسید لاکتیک

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

شناسایی طیف بازدارندگی باکتریوسین

نظر به اینکه در آزمایش های قبلی یکی از این نمونه های باکتری که به عنوان *L. acidophilus* RN ۷۸ شناسایی شده بود طیف بازدارندگی وسیعی بر رشد باکتری های اسید لاکتیک دیگر را نشان داد و از طرفی ماده بازدارنده تولیدی توسط این باکتری در مجاورت برخی از آنزیم های پروتئولیتیک حساس بوده و آنزیم کاتالاز نیز بر فعالیت بازدارندگی آن تأثیری 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. acidophilus* RN ۷۸ بر علیه باکتری های گرم مثبت و منفی با استفاده از روش حفره ای مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۵،۲۳،۱۷).

تأثیر pH، حرارت و دترجنت ها بر عملکرد باکتریوسین

جهت بررسی اثر pH با استفاده از HCl و NaOH مولار از مایع رویی کشت باکتری مورد نظر ۱۲ نمونه در pH های ۱ تا ۱۲ تهیه و فعالیت هر نمونه بوسیله روش حفره ای مورد بررسی قرار گرفت. جهت اندازه گیری مقاومت به گرما مایع رویی در حرارت ۸۰، ۱۰۰، و ۱۲۱ درجه سانتیگراد قرار گرفته و نمونه ها پس از هر ۱۵ دقیقه مورد بررسی قرار گرفتند. عامل آنتاگونیستی RN ۷۸ با EDTA و SDS در غلظت ۱ درصد W/V مجاور گردید و باقیمانده فعالیت آنتاگونیستی بر علیه ارگانیسیم های اندیکاتور توسط روش ذکر شده مورد بررسی قرار گرفت (۱۸،۳).

این زیر واحدها با باکتری‌ها نسبت داد. همچنین Muriana و Klaenhammer (۲۱) و Kato و همکاران نتایج مشابهی گرفته‌اند (۱۳) بر اساس گزارشات آنها پس از مجاورت با SDS، واحدهای بزرگتر باکتریوسین‌ها به زیر واحدهای فعال کوچک تقسیم شده و در نتیجه مانعت از رشد باکتری‌ها افزایش یافته است و وقوع برخوردهای کشنده با باکتری‌ها افزایش می‌یابد. این در حالی است که نتایج متفاوتی که توسط Tagg و همکاران (۲۷) گزارش شده حاکی از آن بود که اگر زیر واحدهای بزرگ باکتریوسین‌ها توسط دترجنت‌ها به زیرواحدهای کوچکتر تقسیم شوند ممکن است فعالیت ضد باکتریایی آنها کاهش یافته و یا به طور کلی متوقف شود.

بالاترین تیترا لاکتوسین RN ۷۸ بر علیه لیستریا مونوسیژنوز، به میزان AU ۱۰۲۴ در میلی لیتر بود. (شکل-۱) در حالی که پایین ترین تیترا آن بر علیه *L. ivanovi* به میزان و AU ۳۲۰ در میلی لیتر ثبت گردید. اگرچه تیتراهای بالای فعالیت بر علیه لیستریا به وسیله بعضی باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک نیز گزارش شده است (۳۰)، اثر ضدلیستریایی لاکتوسین RN ۷۸ از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. بر پایه این نتایج فعالیت لاکتوسین RN ۷۸، در مقایسه با فعالیت لاکتوسین JCM ۱۰۲۸ تولید شده توسط *L. acidophilus* L. AU ۱۳۵۰

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 استریل مخلوط گردید. الکتروفورز با ۳۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه آغاز و سپس با ۱۲۰ ولت به مدت ۳ ساعت ادامه یافت، و ژل زیر اشعه UV مورد بررسی قرار گرفت.

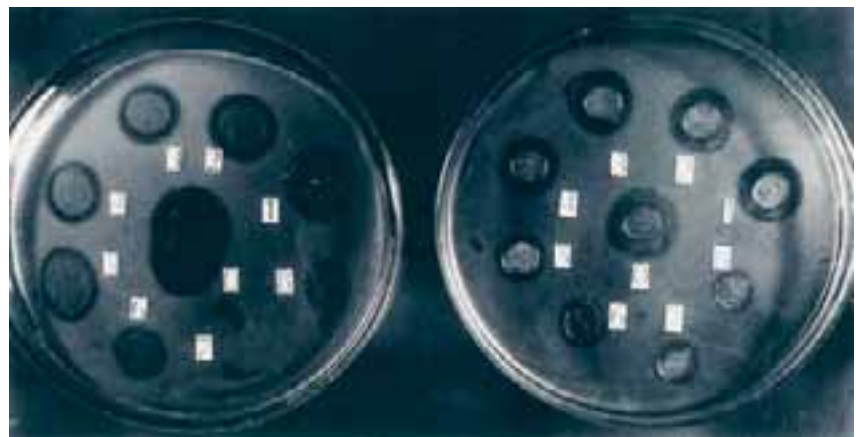
نتایج و بحث

باکتری‌های اسید لاکتیک از اجزای اصلی فلور میکروبی محصولات لبنی می‌باشند. این باکتری‌ها را می‌توان به عنوان باکتری‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و میکروآئروفیلیک که قادر به تولید هاگ نمی‌باشند معرفی کرد (۳). از ۵۴ نمونه شیر و پنیر غیر پاستوریزه ۲۲ نمونه باکتری شامل مخلوطی از باسیل‌ها، کوکوباسیل‌ها و کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و غیر هاگزا بوده‌اند که می‌توان آنها را باکتری اسید لاکتیک (LAB) محسوب نمود. در این مطالعه برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده اثر بازدارندگی وسیعی را بر علیه باکتری‌های شاخص نشان داده که این عمل بازدارندگی می‌تواند ناشی از سیستم‌های پیچیده آنتاگونیستی باشد که توسط این باکتری‌ها تولید می‌شود (۲۷، ۱). جهت تعیین حضور باکتریوسین در اثر بازدارندگی این باکتری‌ها، اثر آنزیم‌های گوناگون بر فعالیت ضد میکروبی این باکتری‌ها مورد آزمایش قرار گرفت. همانطور که در جدول شماره ۱- مشاهده می‌شود عمل بازدارندگی *L. acidophilus* RN ۷۸ در حضور آنزیم کاتالاز حفظ گردیده و لذا نمی‌توان این اثر را صرفاً به پر اکسید هیدروژن نسبت داد. اما قابلیت بازدارندگی مایع رویی این باکتری در مجاورت آنزیم‌های پروناز E و تریپسین به طور کامل از میان رفت، که می‌توان آن را به پروتئینی بودن ترکیب بازدارنده (باکتریوسین) نسبت داد (۲۹، ۸، ۳). نتایج بررسی‌ها حاکی از این بود که قابلیت بازدارندگی *L. acidophilus* RN ۷۸ به علت وجود باکتریوسین که لاکتوسین RN ۷۸ نامیده شد، می‌باشد. گزارش‌های متعددی تولید باکتریوسین را در این گونه باکتری تایید نموده است (۲۰، ۱۶، ۱۵).

طیف بازدارندگی مایع رویی کشت RN ۷۸ در جدول ۲- نشان داده شده است. ماده ضد باکتریایی تولید شده به وسیله این گونه ب خوبی فعالیت بازدارندگی بر علیه بعضی از پاتوژن‌های گرم مثبت را نشان داد. لاکتوسین RN ۷۸، باکتریوسین تولید شده توسط گونه مورد آزمایش بر علیه یکی از مهمترین پاتوژن‌های مواد غذایی یعنی *L. monocytogenes* نیز موثر بود. این ویژگی ضد باکتریایی، باکتریوسین‌ها را به عنوان یکی از بهترین گزینه‌ها جهت کاربرد به صورت خالص شده و به عنوان نگهدارنده بیولوژیک، در صنایع غذایی مطرح نموده است و جهت جلوگیری از لیستریوزیس (listeriosis) در پنیر قابل استفاده می‌باشد (۲۷، ۲۳، ۲۲، ۱۷، ۲، ۱). در این بررسی هیچگونه اثر بازدارندگی لاکتوسین RN ۷۸ بر علیه باکتری‌های گرم منفی مورد آزمایش ثبت نشد. اما ترکیب این لاکتوسین با دترجنت‌های EDTA و SDS موجب افزایش فعالیت بازدارندگی آن بر علیه برخی باکتری‌های گرم منفی از جمله *E. coli* و *Salmonella typhi* گردید. در صورتی که در غیاب این دترجنت‌ها این لاکتوسین بر باکتری‌های مذکور بی اثر بود. افزایش فعالیت لاکتوسین RN ۷۸ پس از مجاورت با دترجنت‌ها را می‌توان به تقسیم شدن سلول پروتئین باکتریوسین به زیر واحدهای کوچکتر و در نتیجه افزایش میزان برخوردهای

جدول ۱- تاثیر عوامل فیزیکی و شیمیایی بر عامل بازدارنده تولید شده توسط *L. acidophilus* (RN ۷۸)

فعالیت بازدارندگی	عامل	نتیجه
-	آنزیمها پروناز E	۱
-	تریپسین	
+	کاتالاز	
+	دترجنتها SDS	۲
+	EDT A	
-	Tween ۲۰	
-	Tween ۸۰	
+	حرارت ۸۰	۳
+	۱۰۰	
+	۱۲۰	
-	pH ۳	۴
+	۵	
+	۷	
+	۱۰	



شکل ۱- سنجش فعالیت باکتریوسین RN ۷۸ بر علیه *L. monocytogenes* در غلظت‌های مختلف (AU/ml)

پایداری در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد، به مدت بیش از یک ساعت (۹۰ دقیقه) به علاوه تحمل حرارت ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه نیز حفظ نمود. موارد زیادی از مقاومت باکتریوسین‌ها در مقابل حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه، قبلاً گزارش گردیده است. این باکتریوسین‌ها شامل لاکتوسین ۲۷LP و B (۲,۳۰) و انتروسین ۱۰۱ (۱۳) بودند که در مقابل حرارت مقاوم گزارش شده بودند. باین حال به نظر می‌رسد مقاومت حرارتی لاکتوسین ۷۸ RN از باکتریوسین‌های نامبرده بیشتر باشد، این باکتریوسین در برابر دمای اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه مقاوم بود. پایداری لاکتوسین ۷۸ RN می‌تواند نشان‌دهنده ماهیت پیچیده این

پروتئین باشد.

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

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

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

اما در مورد سلول‌های منفرد *L. acidophilus* RN ۷۸ با وجود سلول‌های لاکوناساز (Lacuna forming cell) به میزان ۱۶ درصد نیز، منطقه عدم رشد (هاله شفاف) ایجاد گردید. این واقعیت ثابت می‌کند که گونه ۷۸ 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 مورد RN ۷۸ به مراتب بیشتر از تعداد آنها در کشت *E. coli* محتوی پلاسمید Col E۲-P۹ (که ۰/۰۱ 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 (۲۱، ۱۱، ۱۰). نتایج مقدماتی این آزمایش حاکی از آن بود که توانایی باکتریوسین تولید شده توسط RN ۷۸ 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 باکتری‌های جهش یافته با استفاده از الکتروفورز برش Echardt gel به اثبات رسید. هیچیک از باکتری‌های جهش یافته دارای پلاسمید نمی‌باشند در صورتی که در باکتری مولد لاکتوسین ۷۸ RN وجود یک پلاسمید ۴۲ کیلوبیسی احراز گردیده بود (شکل-

در میلی لیتر می‌باشد نسبتاً کمتر است (۲۹، ۲۰). همچنین میزان‌های فعالیت پایین‌تر از این باکتریوسین (RN ۷۸) نیز در این بررسی مشاهده گردید، که در مورد پلاننار سین ۱۴۹ و گازرسین A (۱۵)، میزان این فعالیت به ترتیب ۸۰۰ و ۶۴۰ AU در میلی لیتر بود.

حساسیت باکتریوسین‌ها نسبت به pH بسیار متفاوت بوده و تعداد زیادی از آنها در حیطة بسیار وسیعی از pH فعال می‌باشند (۱۹، ۱۶). باکتریوسین تولید شده توسط RN ۷۸ نیز همین خصوصیت را نشان داده و در pH های بین ۳-۱۱ فعال بود. حداکثر فعالیت بازدارندگی لاکتوسین ۷۸ RN در pH های بین ۵ و ۶ مشاهده گردید.

خاصیت مهم لاکتوسین RN ۷۸ تولید شده در این تحقیق،

جدول ۲- طیف بازدارندگی لاکتوسین RN ۷۸ بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

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

بیشتری به منظور تشریح مکانیسم عمل در سطح مولکولی و همچنین خواص باکتریوسین در محصول 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.



شکل ۲- 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. این نتایج نشان می دهد که تولید لاکتوسین RN ۷۸ توسط *L.acidophilus* RN ۷۸ مربوط به پلاسمید می باشد. چندین چنین گزارش نیز ، تولید باکتریوسین توام با پلاسمید را در باکتری های لاکتیک اسید نشان داده اند (۲۷،۹).

استفاده از عوامل نگهدارنده غذایی به صورت فلور میکروبی بی خطر (Safe)، تلاش های فراوانی را جهت جداسازی نوع وحشی (Wild) باکتری های لاکتیک اسید ایجاد نموده است. در این مطالعات اگرچه باکتریوسین تولید شده توسط این گونه لاکتوباسیل (*RN۷۸L.acidophilus*) نتایج امیدبخشی را از خود نشان داد اما پیش از کاربرد عملی آن در صنایع غذایی و استفاده این گونه محصولات توسط مصرف کننده باید تحقیقات

- 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 Vandenberg 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.

