شناسایی، جداسازی، تخلیص و بررسی طیف اثر باکتریوسین‌های چند سویه لاکتوباسیلوس بومی جدا شده از محصولات لبنی ایران

سعید میردامادی[1*]، مهرنوش تنگستانی[1]

۱- سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده بیوتکنولوژی، تهران، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: Mirdamadi@irost.org
(دریافت مقاله: ۹۰/۴/۱۵ پذیرش نهایی: ۹۰/۹/۷)

چکیده

در این مطالعه سویه‌های لاکتوباسیل جدا شده از فرآورده‌های شیری سنتی ایرانی که برای تولید باکتریوسین بر علیه ۸ سویه استاندارد باکتری گرم مثبت، گرم منفی و مخمر با روش انتشاری غربالگری شدند. تعداد ۸ سویه لاکتوباسیل بومی که از نظر تولید مناسب تشخیص داده شدند، انتخاب و از بین آنها ۲ سویه جهت مطالعه بیشتر در نظر گرفته شدند. باکتریوسین‌های تولید شده توسط ۲ سویه فوق‌الذکر با استفاده از رسوب‌دهی با ایزوپروپانول و آمونیوم سولفات و سپس دیالیز و کروماتوگرافی تخلیص گردید. آزمایش ژل الکتروفوز وجود باکتریوسین‌هایی با وزن مولکولی ٤٥ تا ٦٦/٢ کیلودالتون را در این سویه‌ها مشخص نمود. نتایج حاصله نشان داد سویه‌های جدا شده بومی قادر به تولید مواد باکتریوسینی هستند که به میزان بیشتر علیه *میکروکوکوس لوتئوس* (*Micrococcus luteus* PTCC1169**)، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* **PTCC1435** (***Staphylococcus epidermidis***) و *باسیلوس سرئوس* (***Bacillus cereus PTCC1247***) و به مقدار کمتر بر روی *لیستریا منوسیتوژنز* ***Listeria monocytogenes* PTCC (1301)** مؤثر می‌باشند. در بین میکروارگانیسم‌های شاخص، *میکروکوکوس لوتئوس* به عنوان حساسترین باکتری و *کاندیدا البیکنس* (***Candid albicans PTCC5027***) به عنوان مقاوم‌ترین ارگانیسم شناخته شدند. این مطالعه نشان داد، باکتریوسین‌های تولید شده توسط این لاکتوباسیل‌ها قادر به مهار طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای موجود در مواد غذایی می‌باشند و می‌توانند به عنوان نگه‌دارنده‌های بیولوژیک در فرآورده‌های غذایی مورد استفاده قرار گیرند.**

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس، باکتریوسین، محافظت کننده، فرآورده‌های غذایی، نیسین

مقدمه

در سالهای اخیر با مشخص شدن مضرات برخی از نگه‌دارنده‌های شیمیایی، محققین توجه خود را به ترکیبات نگه‌دارنده طبیعی معطوف کرده اند زیرا نگه-داری مواد غذایی و کنترل کیفیت آن از نظر میکروبی یکی از مشکلات و چالش‌های تولید کنندگان مواد غذایی است (Boziaris et al., 2006). بیماری‌های منتقل شده از طریق مواد غذایی هنوز از اهمیت بالایی برخوردار است. از جمله شایع‌ترین آنها می-توان به بیماری‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کولای*، سویه های سالمونلا و *لیستریا مونوسیتوژنز* اشاره نمود. از مهمترین راه‌های انتقال این باکتری‌ها به انسان، مصرف مواد غذایی آلوده به این پاتوژن‌ها به ویژه شیر و فرآورده‌های آن می‌باشد. مرکز کنترل بیماری‌های آمریکا در سال ۱۹۹۹ اعلام کرد که سالیانه ۷۶ میلیون مورد بیماری ناشی از مصرف غذا رخ می‌دهد که حدود ۵۰۰۰ مورد آنها به مرگ ختم می‌شود (Cleveland et al., 2001). حتی یکی از عوامل سقط جنین و یا عقب ماندگی ذهنی نوزاد *لیستریا مونوسیتوژنز* گزارش می-شود که در ایران سرو تایپ‌های عامل آن شناسایی گردیده است (Mirdamadi et al., 1994). این بیماری‌ها سالیانه بین ٦/٥ تا ٣٤/٩ بیلیون دلار هزینه به آمریکا تحمیل می‌کنند (Cleveland et al., 2001). در طی دهه گذشته مطالعات زیادی بر روی مواد ضد میکروبی مترشحه از باکتری‌های تخمیرکنندهٔ مواد غذایی، صورت گرفته است تا در آینده بتوانند جایگزین نگه‌دارنده‌های شیمیایی مانند دی اکسید سولفور، بنزوئیک اسید، سوربیک اسید، نیترات و نیتریت گردند (Mirdamadi et al., 2007).

درتخمیر که فرآیندی ناشی از فعالیت بیولوژیکی میکروارگانیسم‌ها است ضمن رشد میکروارگانیسم‌ها، متابولیت‌های مختلفی تولید می‌شود که برخی از آنها ضمن بی‌خطر بودن برای مصارف انسانی، مانع رشد و زندگی میکروارگانیسم‌های ناخواسته در مواد غذایی می‌شود. این مواد نگه‌دارنده را محافظت‌کننده-های بیولوژیکی (bio-preservative) می‌نامند (Hugas, 1991).

اگرچه باکتریوسین‌ها توسط بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تولید می‌شوند اما از آنجایی که باکتری‌های لاکتیک، بی‌ضرر (Generaly (GRAS regarded as safe می‌باشند، به طور کلی تمایل بیشتری برای استفاده از باکتریوسین‌های آنها وجود دارد. باکتری‌های لاکتیک (LAB) شامل نژادهای *لاکتوکوکوس*، *استرپتوکوکوس*، *لاکتوباسیلوس* و *پدیوکوکوس‌ها* هستند که به علت توانایی گسترده‌شان در تولید باکتریوسین‌ها و نقش نگه‌دارنده‌ای که دارند، امروزه مورد توجه خاص پژوهشگران قرار گرفته‌اند (Holzapfel et al., 1995). به علاوه، لاکتوباسیل‌ها به دلیل توانایی‌شان در تخمیر و نیز اهمیت‌شان در سلامتی انسان، به عنوان پروبیوتیک‌ها مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. آنها ترکیباتی مانند اسیدهای آلی، دی استیل، هیدروژن پراکساید و نیز باکتریوسین‌ها را در طی تخمیر لاکتیک، تولید می‌کنند

که اثر حفاظتی آنها در مواد غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Mead et al., 1999; Mirdamadi et al., 2007; Tafreshi et al., 2010a).

واژه باکتریوسین شامل گروه بزرگ و وسیعی از پروتئین‌ها یا پپتیدهای ضدمیکروبی ریبوزومی خارج سلولی می‌باشد که به عنوان مواد باکتری‌کشی معرفی شده‌اند که توسط باکتری‌ها ساخته می‌شوند و بر سویه‌های مشابه یا سویه‌های وابسته، اثر کشندگی یا مهارکنندگی دارند. آنها به طورکلی بر غشاء سیتوپلاسمیک اثرگذار هستند و با ایجاد نیروی حرکتی پروتون باعث تشکیل حفره‌هایی در دو لایه فسفولیپیدی غشاء می‌شوند. طیف فعالیت ضعیف آنها و مشخصهٔ پروتئینی بودنشان، آنها را از آنتی بیوتیک-ها متمایز ساخته است (Mirdamadi et al., 2009).

یکی از این باکتریوسین‌ها نیسین است که به عنوان یک نگه‌دارنده طبیعی از نظر FAO و WHO تائید شده است و جزو ترکیبات GRAS طبقه‌بندی می-شود. این ماده باکتریوسینی در دماهای پاستوریزاسیون نسبتاً پایدار و دمای ۹۵-۸۵ درجه سلیسیوس را به مدت بیش از ۲۰ دقیقه تحمل و حدود ۱۵ درصد فعالیت آن کاهش می‌یابد. استفاده توام از این نگه-دارنده با سایر عوامل ضد میکروبی باعث اثر بخشی بیشتر آن در افزایش ایمنی ماده غذایی بویژه در مقابل باکتری‌های گرم منفی می‌شود (Rauch et al., 1991; Tafreshi et al., 2010b ; Mirdamadi et al., 2009).

با توجه به طیف اثر متفاوت باکتریوسین‌ها و لزوم شناسایی ترکیبات جدید در این پژوهش با هدف شناسایی، جداسازی و تخلیص باکتریوسین‌های سویه‌های لاکتوباسیل بومی جدا شده از مواد لبنی طراحی و طیف اثر آنها جهت استفاده بالقوه به عنوان نگه‌دارنده زیستی (Bio preservative) سالم و بی‌خطر بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

سویه‌ها و محیط‌های کشت

سویه‌های لاکتوباسیل مورد بررسی از نظر تولید باکتریوسین، لاکتوباسیل‌های جداشده از محصولات لبنی بومی مناطق مختلف ایران بوده است که در فریزر ۷۶- درجه سلیسیوس نگه داشته و در هنگام آزمایش در محیط MRS broth (MERCK)، به عنوان محیط کشت مایع برای رشد و بررسی تولید باکتریوسین، کشت داده می‌شد.

بررسی طیف اثر

بررسی طیف اثر باکتریوسین تولیدی بر روی سویه-های استاندارد بررسی گردید. سویه‌های استاندارد مورد استفاده بعنوان سویه‌های موردآزمایش شامل *Micrococcus luteus PTCC 1169; Bacillus cereus PTCC1247; Staphylococcus epidermidis PTCC 1435; Candida albicans PTCC 5027; Escherichia coli PTCC 1399; Staphylococcus aureus PTCC 1431: Listeria monocytogenes PTCC 1310; Entrococcus fecalis PTCC 1393* به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، تهیه گردیدند.

تولید باکتریوسین

سویه‌های مولد در MRS broth کشت به مدت ٤٨ ساعت در۳۷ درجه سانتی گراد و دور ۱۵۰ rpm (دور در دقیقه) گرماگذاری شدند. به منظور کاهش فعالیت مهارکنندگی اسیدهای آلی تولید شده، pH محیط تخمیری توسط سود ٤ نرمال خنثی گردید همچنین برای حذف سلول‌های باکتریایی، سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه (Model:CLEMENTS) انجام گردید و سوپرناتانت حاصله به منظور بررسی فعالیت باکتریوسینی، مورد ارزیابی قرار گرفت (Tafreshi et al., 2010b; Mirdamadi et al., 2009).

جداسازی پروتئین‌ها (باکتریوسین‌ها)

استفاده از ۲-پروپانول

سوپرناتانت حاصله به آرامی در مجاورت یخ با ایزوپروپانول سرد (MERCK)، با نسبت۵۰ درصد حجمی، مخلوط گردید. سپس نمونه‌ها در rpm ۱۵۰۰۰ به مدت ٤٠ دقیقه در ٤ درجه سلیسیوس سانتریفیوژ (BECKMAN model J2) شد. رسوب حاصله در بافر سیترات فسفات ۰/۱ مولار pH=٤/٥، حل و از نظر فعالیت باکتریوسینی، مورد ارزیابی قرار گرفت.

استفاده از آمونیوم سولفات

پروتئین‌های موجود در مایع تخمیری فاقد سلول و خنثی شده، توسط سولفات آمونیم(MERCK) در٤ درجه سلیسیوس رسوب داده شد. رسوب پروتئینی حاصله توسط سانتریفیوژ با دور rpm ۱۵۰۰۰ به مدت ٤٠ دقیقه در ٤ درجه سلیسیوس جدا و در بافر پتاسیم فسفات (pH= ۷ و ۰/۰٦ مولار) حل گردید و سپس فعالیت باکتریوسینی آن ارزیابی شد.

تخلیص پروتئین‌ها (باکتریوسین‌ها)

دیالیز

نمونه حاصله از مرحله قبل به مدت ٤٨ ساعت با بافر پتاسیم فسفات (۰/۰٦ مولار ,pH=7)، در ٤ درجه سلیسیوس، تحت دیالیز قرار گرفت و سپس با استفاده از معرف نسلر حذف یونهای آمونیم از محلول، اثبات گردید. نمونه‌ها برای اندازه‌گیری فعالیت باکتریوسینی، علیه سویه‌های حساس ارزیابی شدند.

کروماتوگرافی

ستون با ژل سفادکس (Sephadex G-100 G-100 Code No.17-0060-02, pharmacia,) پر گردید و به عنوان فاز متحرک از بافر پتاسیم فسفات (pH= ۷ و۰/۰٦ مولار) استفاده شد. نمونه پروتئین روی ستون وارد و ستون توسط بافر شستشو گردید تا کلیه پروتئین‌های متصل نشده از ستون خارج شوند.

فراکنش‌های خارج شده از ستون توسط فراکشن کالکتور جمع‌آوری گردید و بخشی از آن برای تعیین فعالیت باکتریوسین و غلظت پروتئین استفاده و باقیماندهٔ آن برای تغلیظ بیشتر، لیوفیلیزه گردید. پودر حاصل از لیوفیلیزه در ml ۱ بافر استریل حل و برای تخلیص بیشتر استفاده شد.

الکتروفورز

به منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها از تکنیک الکتروفورز با تکنیک SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی کماسی بلو مطابق دستورالعمل کاتالوگ BIORAD ,Mini-PROTEAN 3 cell Instruction manual,cat.No.165-3301,165-3302 استفاده گردید. الکتروفورز روی ژل ۱۷٪ پلی آکریلامید با حضور ۱۰٪ سدیم دودسیل سولفات، در یک ژل عمودی با ضخامت ۱/۵ mm و غلظت N, 'N متیلن بیس آکریلامید ۳۰٪، در حضور عوامل پلیمریزه کننده آمونیوم پرسولفات ۱۰٪ و TEMED انجام گرفت. ژل به مدت ۱۰ دقیقه در جریان ٦۰ ولت قرار داده شد و سپس الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۰ ولت انجام شد.

تعیین فعالیت باکتریوسینی

از روش (well diffusion assay) سنجش چاهک برای اندازه گیری فعالیت باکتریوسین استفاده شد (Schillinger and Luke,1989). در این روش ۵۰ میکرولیتر از هریک از محلول‌های باکتریوسینی بدست آمده در مراحل مختلف در چاهک‌های ایجاد شده روی پلیت کشت که از قبل با یک لایه نازک از کشت مایع تست استرین بذردهی شده بودند، ریخته شد. به منظور دیفیوز مایع پروتئینی در ژل، پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال ٤ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و سپس به مدت ۲٤ ساعت در دمای مناسب رشد گرماگذاری شدند. قطر هاله عدم رشد تعیین و میزان فعالیت باکتریوسینی محاسبه گردید.

میزان واحد باکتریوسین تولیدی بر اساس بالاترین رقت نمونه که قدرت ایجاد هاله عدم رشد بر سویه استاندارد را دارد، تعریف گردیده است (Tafreshi et al., 2010a ; Mirdamadi et al., 2007).

یافته‌ها

در این تحقیق سویه‌های لاکتوباسیل بومی از ماست و لبنیات مناطق مختلف ایران جداسازی و از نظر تولید باکتریوسین مقایسه گردیدند. از میان سویه‌های بومی هشت سویه بیشترین باکتریوسین را تولید نمودند (جدول ۱).

جدول ۱: قطر هاله‌های عدم رشد متابولیت‌های حاصل از کشت لاکتوباسیل‌های مختلف (بر حسب میلی‌متر)

	تست استرین سویه ها ی لاکتوباسیلو س	*M. loteus*	*S. aureus*	*S. epidermidis*	*E. coli*	*B. cereus*	*C. albicans*	*E. fecalis*	*L. monocytogenes*
۱	*Lactobacillus*٤٣B	۱۹	٥	۱۰	٤	۱۳	۳	٤	۱۲
۲	*Lactobacillus* ٤B	۲٥	۸	۹	۳	۹	۳	۳	۱۰
۳	*Lactobacillus* ٤۸	۲٥	۱۳	۸	۳	۸	٥	٥	۹
٤	*Lactobacillus* ۱۸M	۲٦	۳	۹	٦	۱۳	٤	۳	۹
٥	*Lactobacillus* ۳۱M	۲٤	٤	۱۳	٥	۱۲	٥	۳	۸
٦	*Lactobacillus* ٤۰M	۲۳	۱۱	۱۱	٤	۱٤	٤	٤	۹
۷	*Lactobacillus* ٤٦M	۲۱	۷	۸	٥	۲۰	٤	٥	۱۱
۸	*Lactobacillus* ٤۸M	۲٥	٥	۸	٦	۱۷	۳	٤	۱۰

پس از بررسی طیف اثر آنها دو سویه با نام‌هـای٤b و ٤۸ برای بررسی‌های بیشتر انتخاب گردید.

دو سویه لاکتوباسـیل بـومی ٤b و ٤۸ تقریبـاً علیـه تمام سویه‌های استاندارد با قدرت متفاوت اثر مهـاری داشتند و قوی‌ترین سویه‌ها از نظر تولید باکتریوسـین بودند. همچنـین *M .luteus PTCC 1169* بـه عنـوان حساس‌ترین سویه و *E. coli PTCC1399; Candida albicans PTCC5027; E. fecalis PTCC1393* مقاوم‌ترین تست‌استرین‌ها تشخیص داده شدند.

هریک از لاکتوباسیل‌ها الگوی مهـار رشـد متفـاوتی علیه تست استرین‌ها نشان دادند بطوریکه در شکل۱ مشاهده می‌گـردد ایـن بـاکتری‌هـا عـلاوه بـر سـویه *میکروکوکوس لوتئوس* بر باکتری اسپوردار *باسیلوس سرئوس* نیز اثر مهاری نشان دادند.

شکل ۱: هاله عدم رشد باکتریوسین های حاصل از لاکتوباسیل‌ها بر سویه‌های استاندارد *باسیلوس سرئوس* (شکل الف) و *میکروکوکوس لوتئوس* (شکل ب).

جهت حذف اثر اسیدهای آلی، وبررسی خواص باکتریوسین تولیدی مراحل خالص سازی انجام گردید. برای جداسازی این مولکول‌های پروتئینی از روش رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم و سپس بعد از دیالیز پروتئین‌ها، نمونه‌ها لیوفیلیزه و محصول در ۱۵ میلی‌لیتر بافر حل و برای ژل فیلتراسیون استفاده گردید. برای نمونه‌های باکتریوسین سویه‌های بومی ٤b و ٤٨ در هر مرحله تخلیص، مقدار پروتئین و فعالیت باکتریوسینی اندازه‌گیری (جداول۲ و۳) و بطورکلی کاهش در مقدار پروتئین و افزایش فعالیت ویژه (Specific Activity) ما را به درصد تخلیص باکتریوسین رهنمون ساخت.

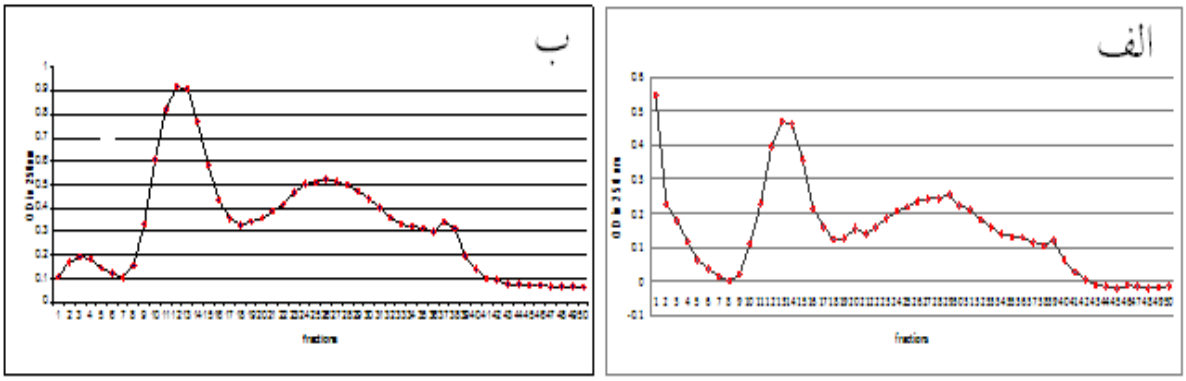
جدول ۲ : مراحل مختلف و ضرایب تخلیص باکتریوسین حاصل از سویه ۴b

سویه ۴b	حجم نمونه (ml)	Activity (Unit/ml)	Total Activity	Protein Concentration (mg/ml)	Total Protein (mg)	Specific Activity (U/mg)	Purification Yield (%)	Purification Fold
مایع تخمیر	۱۳۲	۵۰	٦٦۰۰	۳/٤٥	٤٥٥/٤	۱٤/٥	۱۰۰	۱
قبل از دیالیز	۳٦	۱۰۰	۳٦۰۰	–	–	–	٥٤/٥٤	–
بعد از دیالیز	٤٥	۵۰	۲۳۵۰	۰/۲۳۸	۱۰/۷۱	۲۱۰/۰۸	۳٥/٦	۱٤/٤۸
نمونه لیوفیلیزه حل شده در بافر	۱٥	۱۰۰	۱٥۰۰	۰/۲٦۳	۳/۹٤٥	۳۸۰/۲۲	۲۲/۷۲	۲٦/۲۲
بعد از ژل فیلتراسیون	۱/۱	۸۰۰	۸۸۰	۰/۲۷۱	۰/۲۹۸	۲۲۸۲	۱۳/۳	۱٥۷/٤

جدول ۳ : مراحل مختلف و ضرایب تخلیص باکتریوسین حاصل از سویه ۴۸

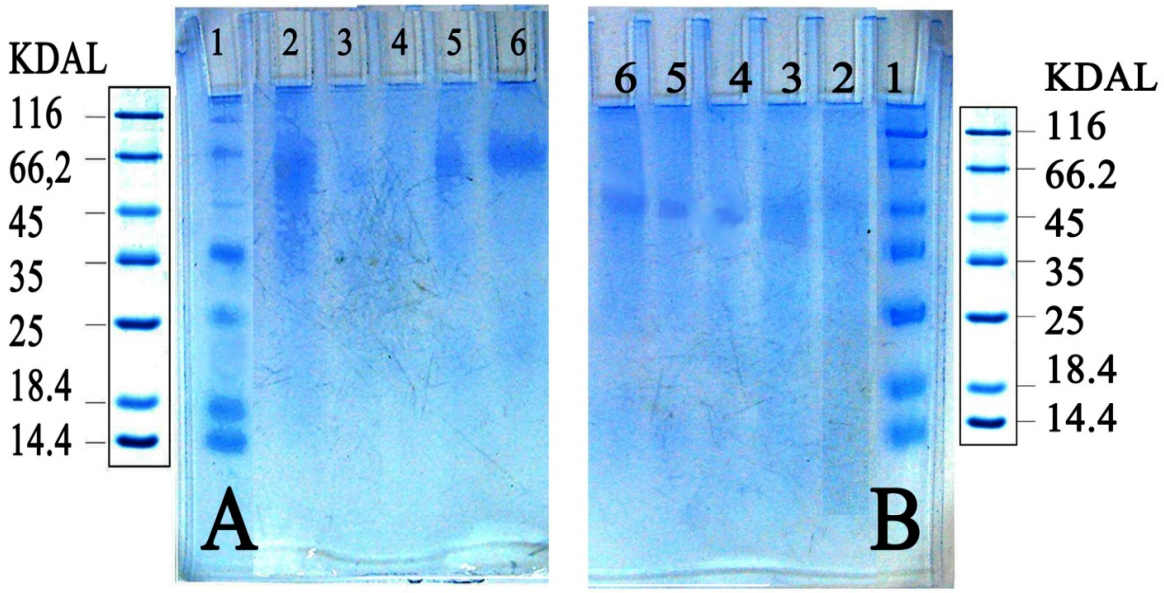
سویه ۴۸	حجم نمونه (ml)	Activity (unit/ml)	Total Activity	Protein Concentration (mg/ml)	Total Protein (mg)	Specific Activity (U/mg)	Purification Yield (%)	Purification Fold
مایع تخمیر	۱۳۲	۵۰	٦٦۰۰	۲/۲۹	۳۰۲/۲۸	۲۱/۸۳	۱۰۰	۱
قبل از دیالیز	۳٦	۱۰۰	۳٦۰۰	–	–	–	٥٤/٥٤	–
بعد از دیالیز	٤۲	۵۰	۲۱۰۰	۰/٤۱	۱۷/۲۲	۱۲۱/۹٥	۳۱/۸۱	٥/٥۸
نمونه لیوفیلیزه حل شده در بافر	۱۷	۱۰۰	۱۷۰۰	۰/۷۷	۱۳/۱	۱۲۹/۸۷	۲٥/۷٥	٥/۹٤
بعد از ژل فیلتراسیون	۱/۱	۱۰۰۰	۱۱۰۰	۰/۰۲	۰/۱۱	۱۰۰۰۰	۱٦/٦	٤٥۸/۰۸

همانگونه که در نمودار (۱ الف و ب) دیده می‌شود، در این بررسی هریک از سویه‌های مورد آزمایش در ژل فیلتراسیون، دو ناحیه جذبی در ۲۵۰ نانومتر تشخیص داده شد که در مورد سویه ٤۸ لوله‌های شماره ۱۱ تا ۱٦ و در مورد سویه ٤b لوله‌های شماره ۱۰ تا ۱٥ فعالیت ضد رشد داشتند.



نمودار ۱ : منحنی بررسی خروج فراکشن‌های پروتئینی از ستون‌های ژل فیلتراسیون برای باکتریوسین‌های سویه‌های ۴۸ (نمودار الف) و 4b (نمودارب)

شکل۲، الکترفورز باکتریوسین‌های حاصل از دو سویه را نشان می‌دهد مقایسه باندها با مارکر نشان داد که وزن باکتریوسین‌های موجود در این دو سویه‌ها حدود ٤٠ تا ٥٠ کیلودالتون می‌باشد .



شکل ۲: الکتروفورز نمونه‌های 4b (تصویر A) و ۴۸ (تصویر B) به همراه مارکر وزن مولکولی. نمونه ۱ تا ۶ مربوط به تکرارهای متفاوت در مراحل مختلف تخلیص است.

بحث و نتیجه‌گیری

سویه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک نظیر لاکتوباسیل‌ها و لاکتوکوکوس‌ها با تولید اسیدهای آلی از جمله اسید لاکتیک، تولید آنزیم‌ها و متابولیت‌های مختلف و از جمله باکتریوسین‌ها توانایی بالایی جهت کنترل آلودگی‌های مختلف میکروبی در مواد غذایی دارند (Rajaram et al., 2010). بسیاری از این باکتری‌ها به عنوان پروبیوتیک‌ها در حفظ سلامت انسان نقش به سزایی دارند. قدرت پروبیوتیک‌ها در داشتن خواص فوق باعث گسترش تحقیقات در این زمینه گردیده است (Mirdamadi et al., 2007). یکی از باکتریوسین‌های مجازی که اکنون در صنعت غذا کاربرد فراوان یافته نیسین است. نیسین بوسیله *لاکتوکوکوس لاکتیس* تولید (Tafreshi et al., 2010a) و به عنوان یک نگه‌دارنده بیولوژیک طبیعی در فرآورده‌های غذایی استفاده می‌گردد امروزه محققین با به دام اندازی نیسین در نانو ساختارهای بیولوژیک، فرمول‌های آهسته رهش آنرا برای مواد غذایی تخمیری طراحی نموده‌اند (Zohri et al., 2009; Mirdamadi et al., 2009). با وسیع‌تر شدن دامنه استفاده از این باکتریوسین و گسترش مقاومت سویه‌های میکروبی به مواد ضد رشد، محققین به فکر شناسایی باکتریوسین‌های جدید دیگر افتاده و تحقیقات زیادی جهت شناسایی و تولید این مواد طبیعی در کشورهای مختلف دنیا در جریان است (Mirdamadi et al., 2007, Poor Anas et al., 2008 Ahmad et al., 2006; Rajaram et al., 2010). از ویژگی‌های مهم این باکتریوسین‌ها طیف اثر گسترده آن می‌باشد. همانگونه که ذکر شد، در این تحقیق سویه‌های لاکتوباسیل بومی از ماست و لبنیات مناطق مختلف ایران جداسازی و از نظر تولید باکتریوسین مقایسه گردیدند. از میان هشت سویه که بیشترین باکتریوسین را تولید نمودند (جدول۱). دو سویه با نام‌های ٤b و ٤٨ با طیف اثر وسیع انتخاب و باکتریوسین تولیدی آنها خالص گردید.

هریک از لاکتوباسیل‌ها الگوی مهار رشد متفاوتی علیه سویه‌های مورد آزمایش نشان دادند (شکل۱). دو سویه لاکتوباسیل بومی ٤b و٤٨ تقریبا علیه تمام سویه‌های استاندارد با قدرت متفاوت اثر مهاری داشتند و قوی‌ترین سویه‌ها از نظر تولید باکتریوسین بودند. همچنین *M .luteus* PTCC 1169 به عنوان حساس‌ترین سویه و *E. coli PTCC1399; Candida albicans PTCC5027; E. fecalis PTCC1393* مقاوم‌ترین تست استرین‌ها تشخیص داده شدند. عدم تاثیر قوی این باکتریوسین‌ها بر روی باکتری‌های گرم منفی مشابه نیسین می‌باشد. نیسین روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسایتوژنز* و گونه‌های مختلف باسیلوس و کلستریدیوم اثر باکتری کشی دارد. اما بطور خالص بر باکتری‌های گرم منفی بی‌تأثیر است. این باکتریوسین به همراه مواد شلاته کننده و متابولیت‌های دیگر در مواد غذایی به خوبی رشد باکتری‌های گرم منفی را نیز مهار می‌نماید (Mirdamadi et al., 2009; Tafreshi et al., 2010b)، لذا می‌توان امیدوار بود که این باکتریوسین-

ها نیز با سایر هردل‌ها اثر بیشتری بر تمام سویه‌ها داشته باشد.

باکتریوسین‌ها در فرم خام، ترکیباتی غیر قابل دیالیز، مقاوم به حرارت، غیرحساس به کاتالاز و حساس به آنزیم‌های پروتئولیتیک، هستند (Ogunbanwo et al., 2003) و لذا در مراحل تخلیص، تکنیک‌های مختلف به راحتی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش حلالیت پروتئین با افزودن نمک سولفات آمونیوم، حلال ایزوپروپانل کاهش داده و رسوب‌دهی را برای تفکیک پروتئین‌ها از یکدیگر انجام شد. همچنین می توان از آن به عنوان یک مرحله پیش از مراحل تخلیص نهایی برای جداسازی محصولات جانبی نامطلوب مانند اسیدهای نوکلئیک، رنگدانه‌ها و دیگر اجزای باقیمانده از محلول حاصل از تخمیر استفاده کرد. استفاده از آمونیم سولفات در جداسازی باکتریوسین، کارایی بهتری نسبت به ایزوپروپانول نشان داده و دیالیز پروتئین‌ها بطور چشمگیری موجب جداسازی بهتر باکتریوسین از املاح و افزایش فعالیت مهاری باکتریوسین‌ها گردید (جدول ۲). نتایج این مرحله با نتایج Ogunbanwo و همکاران (2003) در مورد تخلیص پروتئین‌ها مطابقت نشان داد آنها با استفاده از حلال‌های آلی، نشان دادند که باکتریوسین‌ها را می‌توان نه‌تنها از فاز آبی بلکه از فاز آلی نیز جدا نمود و این نشان می‌دهد که حداقل قسمتی از مولکول‌های باکتریوسین ویژگی هیدروفوبیک یا آب‌گریزی دارند و این ویژگی در اغلب باکتریوسین‌ها مشترک است.

پدیوسین PA1 نیز توسط رسوب با آمونیوم سولفات و سپس کروماتوگرافی فاز معکوس خالص گردیده است (Ralph et al., 1995). این روش با کمی تغییر برای خالص سازی Mesentericin Y105 نیز بکار گرفته شده است مایع کشت تحت کروماتوگرافی روی ستون آگارز قرار گرفت و با عبور از غشائی با Cut off 5 KDa اولترافیلتره و نهایتاً توسط HPLC فاز معکوس خالص گردید (Leer et al., 1995).

همانگونه که در نمودار (۱- الف) و (۱- ب) دیده می‌شود، در این بررسی هریک از سویه‌های مورد آزمایش در ژل فیلتراسیون، دو ناحیه جذبی در ۲۵۰ نانومتر حاصل گردید. در بررسی فعالیت باکتریوسینی، هردو آنها دارای خاصیت مهار کننده رشد روی سویه‌های استاندارد بودند و نشان داده شد که با افزایش خلوص باکتریوسین‌ها، به طور چشمگیری فعالیت ضد رشد آنها روی کلیه سویه‌های استاندارد افزایش می‌یابد.

همانگونه که در جداول شماره ۲ و۳ دیده می‌شود در طی مراحل تخلیص، در هر مرحله غلظت پروتئین کاهش ولی فعالیت باکتریوسین افزایش پیدا می‌کند بطوریکه برای سویه ٤٨ میزان پروتئین از ۳۰۲/۲۸ به ۰/۱۱ میلی گرم می‌رسد یعنی بیش از ۲۷۰۰ برابر پروتئین‌های غیر باکتریوسینی در محیط کشت وجود داشته که در مراحل تخلیص دور ریخته شده است. در عوض میزان فعالیت از ٦٦۰۰ واحد به ۱۱۰۰ رسیده یعنی در این فرآیند ۸۳/٤ درصد باکتریوسین نیز از دست رفته یا غیر فعال گردیده

است بطوریکه میزان فعالیت ویژه کـه نشـان دهنـده خلـوص باکتریوسـین اسـت از ۲۱/۸۳ بـه ۱۰۰۰۰ رسـیده اسـت یعنـی باکتریوسـین حـدود ٤٥٨ برابـر خالص گردیده است. این روند برای سویهٔb٤ نیز بـا اختلافاتی تکرار می‌گردد ولی برای این سویه میـزان تخلیص کمتر و در حدود ۱۵۷ برابر بوده است. ایـن بـدان مفهـوم اسـت کـه میـزان پـروتئین‌هـای غیرباکتریوسینی در این سویه بسیار بیشتر تولید شـده است و در نتیجـه در مراحـل خـالص‌سـازی مقـادیر بیشتری از باکتریوسین از دست رفته و یـا ناخالصـی بیشتری در محصـول نهـایی بـاقی مانـده اسـت. بـه عبارت دیگر محیط MRS بـرای تولیـد باکتریوسـین توسط سویه ٤٨ مناسب‌تر می‌باشد. یعنی محیط رشد برای تولید باکتریوسین نقش مهمی بـازی مـی‌کنـد و هر سویه در یک نوع ترکیب غـذایی خـاص قـدرت بالاتری برای تولید باکتریوسین خواهد داشت. از این مطالب می‌توان این نتیجه را گرفت که اگر از سـویه-های لاکتوباسیل برای حفظ مـواد غـذایی از فسـاد و رشد باکتری‌های بیماری‌زا استفاده مـی‌شـود بایـد در نظر گرفت که کدام سویه در آن ماده غـذایی خـاص قدرت بالاتری دارد. این یافته در مورد *لاکتوکوکوس لاکتیس PTCC 1336* که تولید کننده نیسـین اسـت در پنیر اولترافیلتر بررسی و نشان داده شد کـه میـزان تولید نیسین در پنیر کاهش اما اثر هم افزایی نیسین با متابولیت‌های دیگر باکتری بشدت افزایش مـی‌یابـد (Mirdamadi et al., 2009).

در این تحقیق با توجه به وزن ملکولی بسیار نزدیک باکتریوسین‌هـای حاصـل از دو لاکتوباسـیل ٤٨ و ٤b که حدود ٤٠ تا ٥٠ کیلودالتون بدست آمد (شکل ۲)، طیف اثر تقریبا مشابه آنها (جدول ۱) و الگوی خروج فراکشن‌ها از ستون الکتروفـورز هـر دو باکتریوسـین (شـکل۲) ایـن احتمـال قـوت مـی‌یابـد کـه ایـن دو باکتریوسین ساختاری نزدیک به هـم داشـته باشـند و تنها تفاوت عمده آنها سویه‌های مولد آنها می‌باشد.

باکتریوسین‌های متعـددی از بـاکتری‌هـای لاکتیکـی گزارش شده است Rajaram و همکاران از یک سویه *لاکتوکوکوس لاکتیس* جدا شده از محیط‌های آبی یک نوع باکتریوسین را خالص خصوصیات آن را گزارش نمود (Rajaram et al., 2010). این در حـالی اسـت که بسیاری از محققین دیگـر از سـویه *لاکتوکوکـوس لاکتـیس* نیسـین را جداسـازی و خـالص نمـوده انـد (Tafresh et al., 2010a).

درمقایسه می‌توان گفت که نیسین هم بـا ٣٤ اسـید آمینه و وزن ملکولی ۳۳۵٤/۱۲ دالتـون دارای دو فـرم A و Z است، که تفاوت آنها در نوع اسید آمینه شماره ۳۷ می‌باشد. نوع A دارای هیستیدین و نـوع Z دارای اسید امینه آسپارژین است. همانگونه کـه سـویه‌هـای مختلف لاکتوکوکوس می‌تواند انواع مختلـف نیسـین تولید نماید (Tafreshi et al., 2010a). این دو سـویه نیز باکتریوسین‌هایی با ساختار و طیف اثر نزدیک بـه هم تولید نموده‌اند. بررسی توالی اسیدهای آمینه ایـن دو باکتریوسین می‌تواند پاسخ نهایی بـه صـحت و یـا

عدم صحت نظزیه فوق باشد، همچنین Noonpakdee و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز شناسایی دو پپتید از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از محصولات تخمیری که خاصیت باکتریوسینی دارند را گزارش کرده است.

محققین زیادی اکنون در حال گزارش باکتریوسین های تولیدی از میکروارگانیسم‌ها بخصوص لاکتوباسیل‌ها می‌باشند. این واقعیت که اکثر این باکتری‌ها قادر به تولید باکتریوسین‌های مفید هستند توسط Ogunbanwo و همکاران (2003) در مورد باکتریوسین‌های حاصل از لاکتوباسیل‌های موجود در کاساوا و دانه‌های ذرت و Invanova و همکاران (2000) در مورد باکتریوسین‌های حاصل از لاکتوباسیل‌های موجود در پنیر زرد بلغار، Anas و همکاران (2008) فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیل های جدا شده از شیر بز و نیز بسیاری دیگر گزارش گردیده است. اگرچه بعضی از مواد شبه باکتریوسینی تولید شده توسط باکتری‌های گرم مثبت (بویژه برخی از آنها که توسط لاکتوباسیل‌ها و لاکتوکوکسی‌ها تولید می‌شوند)، طیف مهارکنندگی نسبتاً کمی دارند؛ اما بسیاری از آنها، بسیار فعال‌تر از کلیسین‌ها هستند (Ralph et al., 1995) و به طور کلی علیه طیف وسیعی از باکتریهای گرم مثبت و بعضی از سویه‌های گرم منفی، مؤثرند مثلاً لاکتوکوکسین A که یک باکتریوسین کلاس II است به طور اختصاصی می‌تواند لاکتوکوکوس‌ها را بکشد (Holo et al., 1991). فعالیت مواد باکتریوسینی علیه سویه‌های حساس و همچنین میزان حساسیت ظاهری سویه‌ها، اساساً در بعضی pH یا در حضور مواد شیمیایی که دیواره باکتری را ضعیف می‌کنند، افزایش پیدا می‌کند (Ganzle et al., 2000).

در پایان با توجه به فعالیت باکتریوسینی این سویه‌های بومی، به خوبی اهمیت تحقیق بر سویه‌های بومی جهت جداسازی سویه‌های مناسب پروبیوتیک و تولید کننده مواد بیولوژیک جدید که در محافظت از فرآورده‌ها و غذاهای تخمیری سنتی و تجاری نقش دارند را نشان می‌دهد.

منابع

- Anas, M., Eddine, H.J. and Mebrouk, K. (2008). Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Isolated from Algerian Raw Goat's Milk Against *Staphylococcus aureus*, World Journal of Dairy and Food Sciences, 3(2): 39-49.
- Boziaris, I.S. and Nychas, G.J.E. (2006). Effect of nisin on growth boundaries of *Listeria monocytogenes* at various temperatures, pH, and water activities. Food Microbiology, 23: 779-784.
- Cleveland, J., Motville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology, 71: 1-20.

- Ganzle, M.G., Holtzel, A., Walter, J., Jung, G. and Hammes, W.P. (2000). "Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri LTH2584*". Applied and Environmental Microbiology, 66: 4233-4333.
- Holo, H., Nilssen, O. and Nes, I.F. (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* isolation and characterization of the protein and its gene. Journal of Bacteriology, 173: 3879-3887.
- Holzapfel, W.H., Geisen, R. and Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. International Journal of Food Microbiology, 24: 343-362.
- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. Meat Science, 49: 139-150.
- Invanova, I., Kabadjova, P., Panter, A., Danova, S. and Dousset, X. (2000). Detection, purification and partial characterization of a novel, Bacteriocin sub sp. Lactis B14 isolated from Boza-Bulgarian Traditional cereal Beverage. Biocatalysis, Fundamentals and Applications, 41(6): 47-53.
- Leer, R.J., van der Vossen, J.M., van Giezen, M., van Noort, J.M. and Pouwels, P.H. (1995). Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Microbiology, 141: 1629-1635.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.F., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. (1999). Food-related illness and death in the United States, Emerging Infectious Diseases, 5(5): 607-625.
- Mirdamadi, S., Moazami, N. and Rafiei, T. (1994). Rate of Listeria Abortion in Tehran. Medical Journal of Islamic Republic of IRAN (MJIRI), 8(1): 1-4 [In Farsi].
- Mirdamadi, S., Moazami, N. and Rafiei, T. (1994). Determination of Dominant Serovars of *Listeria monocytogenes*. Medical Journal of Islamic Republic of IRAN (MJIRI), 3: 173-175.
- Mirdamadi, S., Aziz Mohseni, F., Fallahpour, M. and Tangestani, M. (2007). Screening of lactobacillus strains for bio-preservative production and probiotic activities from Iranian Yogurt. (2007). Annals of Nutrition and Metabolism, 51: 159-159.
- Mirdamadi, S., Agha Ghazvini, Sh. and Taffresh, H. (2009). Production and Nano-Formulation of Nisin in Liposome as a slow Release Preservative Against Important Food-Born Pathogens in Uf Cheese, New Biotechnology , Volume 25, Suppl. 1, Elsevier, ISSN: 1871-678.
- Noonpakdee, W., Jumriangrit, P., Wittayakom, K., Zendo, J., Nakayama, J., Sonomoto, K. and Panyim, S. (2009). Two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* (PMU) 33 strain isolated from som-fak, a Thai low salt fermented fish product. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 17(1): 19-25.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. and Onilude, A.A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*F1 and *Lactobacillus bervis* (OG1). African Journal of Biotechnology, 2(8): 219-227.
- Poor Ahmad, R., Mazaheri Asadi, M. and Mirdamadi, S. (2006). Study of Anti bacterial effects of Isolated Iranian Native starter cultures. (2006), Food Technology and Nutrition, 3(1): 23-32.
- Rajaram, G., Manivasagan, P., Thilagavathi, B. and Saravanakumar, A. (2010). Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* Isolated from Marine Environment. Advance Journal of Food Science and Technology, 2(2): 138-144.
- Ralph, W., Jack John, R., Tagg, and Bibekray. (1995). Bacteriocin of gram-positive bacteria. Microbiology Reviews, 59(2): 171-200.

- Rauch, P.J.G., Beerthuyzen, M.M. and De Vos, W.M. (1991). Molecular analysis and evolution of conjugative transposons encoding nisin production and sucrose fermentation in *Lactococcus lactis*, pp. 243–249. *In* G. Jung and H.G. Sahl (ed.), Nisin and novel lantibiotics. Escom Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Schillinger, U. and Lucke, F.K. (1989). Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from Meat. Applied and Environmental Microbiology, 55: 1901-1906.
- Tafreshi, H., Mirdamadi, S., Norouzian, D., Khatami, Sh. and Sardari, S. (2010a). Effect of nonnutritional factors on nisin production. African Journal of Biotechnology, 9(9): 1382-1391.
- Tafreshi, H., Mirdamadi, S., Norouzian, D., Khatami, Sh. and Sardari, S. (2010b). Optimization of Non-Nutritional Factors for a Cost-Effective Enhancement of Nisin Production Using Orthogonal Array, Method, Journal of Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2: 267-273.
- Zohri, M., Gazori, T., Mirdamadi, S., Asadi, A. and Haririan, I. (2009). Polymeric NanoParticles: Production, applications and Advantage. The Internet Journal of Nanotechnology, 3(1): 1-7.

Screening and characterization of bacteriocins produced by some Strains of *Lactobacillus spp* isolated from Iranian Dairy products

Mirdamadi, S.[1*], Tangestani, M.[1]

1- Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.
Corresponding author email: Mirdamadi@irost.org
(Received: 2011/7/6 Accepted: 2011/11/28)

Abstract

In this study, the inhibitory effects of bacteriocins of *lactobacilli* which were isolated from Iranian traditional dairy products was determined against known gram positive, gram negative and yeast by well diffusion technique. Among 8 isolates with higher capability of bacteriocin production, 2 isolates were selected for further investigations. The bacteriocins were purified by iso-propanol and ammonium sulfate precipitation following by dialysis and chromatography technique. The molecular weight of bacteriocins was determined as 45 to 66/2 KDa. by SDS-page electrophoresis. According to the results, the produced bacteriocins had more inhibition effect on *Micrococcus luteus PTCC1169*, *Staphylococcus epidermidis PTCC1435* as well as *Bacillus cereus PTCC1247* and with lesser degree of extent on *Listeria monocytogenes PTCC 1301*. Results also revealed that, *Micrococcus luteus* was the most sensitive bacterium among indicator bacteria, while *Candid albicans PTCC 5027* identified as the most resistance organism. This research showed that, bacteriocins produced by *lactobacilli* isolated from traditional dairy products have high potency to be used against microbial pathogens and could be applied as bio-preservative in food products.

Key Words*: Lactobacilli*, Bacteriocin, Preservatives, Food Products, Nisin