مجله دنیای میکروب‌ها
سال دوازدهم شماره دوم (پیاپی ۳۹) تابستان ۱۳۹۸
صفحات ۱۲۴-۱۱۴

Original Article

تولید پروتئین نوترکیب ارگوکونین و کاربرد آن در فیلم پلی‌لاکتیک اسید به منظور کنترل آلودگی‌های قارچی *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم نوتاتیوم* در شرایط آزمایشگاهی

محمدجواداکبریان میمند[۱]، آرش بابایی[۲*]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه پژوهشی تبدیل و نگهداری انگور، پژوهشکده انگور و کشمش، دانشگاه ملایر، ایران.

[۲]استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ملایر، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: قارچ‌ها از مهم‌ترین دلایل فساد مواد غذایی هستند. استفاده از بسته‌بندی‌های فعال ضدمیکروبی، موجب افزایش ایمنی و ماندگاری مواد غذایی می‌شود. این تحقیق با هدف تولید ترکیب ضد قارچی (ارگوکونین) و کاربرد آن در فیلم پلی‌لاکتیک اسید به منظور کاهش آلودگی‌های قارچی *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم نوتاتیوم* انجام شد.

مواد و روش‌ها: برای تولید پروتئین نوترکیب ارگوکونین، ژن هدف به وکتور بیانی pET21 وارد شد. وکتور نوترکیب پس از تکثیر در باکتری *اشریشیا کلی* DHα به باکتری *اشریشیا کلی* (DE3) BL21 به عنوان میزبان بیان منتقل گردید. بیان ژن با استفاده از روش‌های SDS-PAGE، وسترن بلات و دات بلات بررسی شد. به منظور تخلیص پروتئین نوترکیب، از ستون کروماتوگافی میل‌ترکیبی استفاده شد. فیلم‌های زیست‌فعال پلی‌لاکتیک اسید به روش قالب‌گیری و افزودن مقادیر مختلف ارگوکونین (۰، ۰/۲۵، ۰/۵و ۰/۷۵ درصد) به محلول ٤ درصد وزنی پلی‌لاکتیک اسید تهیه شدند. به منظور بررسی اثر ضدقارچی فیلم پلی‌لاکتیک اسید از روش انتشار دیسک استفاده شد.

یافته‌ها: ژن ارگوکونین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به خوبی تکثیر شد. بیان پروتئین نوترکیب با روش SDS-PAGE و تایید آن با دات بلات و وسترن بلات انجام گرفت. ترکیبات گوکونین دارای اثر ضدقارچی بر روی هر دو قارچ بود. قطر هاله عدم رشد برای هر دو قارچ نیز، با افزایش غلظت ارگونین افزایش یافت. همچنین فیلم فعال، اثر ضدقارچی بیشتری بر روی قارچ *پنی‌سیلیوم نوتاتیوم* داشت.

نتیجه گیری: ارگوکونین با جلوگیری از سنتز گلوکان در دیواره قارچ‌ها موجب نابودی آن‌ها می‌شود. بنابراین فیلم پلی‌لاکتیک اسید حاوی ارگوکونین می‌تواند به عنوان بسته‌بندی فعال ضدمیکروبی در راستای افزایش ایمنی مواد غذایی استفاده شود.

واژگان کلیدی: بسته‌بندی فعال ضدمیکروبی، ترکیب ضدقارچی، بیان ژن، ارگوکونین، فیلم پلی‌لاکتیک اسید.

دریافت مقاله: آذر ماه ۹۷ پذیرش برای چاپ: بهمن ماه ۹۷

مقدمه

با توجه به شیوه تهیه و نگه‌داری مواد غذایی، احتمال آلودگی آن‌ها به انواع قارچ‌ها و در نتیجه تولید مایکوتوکسین‌ها زیاد است. بنابراین آلودگی مواد غذایی به قارچ‌ها، خسارات عمده‌ای به تولیدات غذایی وارد می‌کند (۱).

قارچ‌ها در طول رشد خود بر مواد غذایی، علاوه بر کاهش

*) آدرس برای مکاتبه: ملایر، دانشگاه ملایر، پژوهشکده کشمش و انگور
تلفن: ۰۹۱۸۸۵۱۲۶۲۲ پست الکترونیک: a.babaei@sheffield.ac.uk

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

کمیت غذا ناشی از حذف قسمت آلوده به قارچ و کاهش ارزش غذایی، به دلیل اثر بر مواد مغذی متشکل غذاها، متابولیت ثانویه‌ای به نام مایکوتوکسین از خود برجای می‌گذارند که اثرات مخرب و شدیدی مانند سرطان‌زایی، ناقص ژنتیکی در زمان تولد و کاهش رشد، مهار سیستم ایمنی و جهش‌زایی را در موجودات زنده ایجاد می‌کنند (۲).

مایکوتوکسین‌ها یا سموم قارچی، فرآورده‌های متابولیکی اولیه و یا ثانویه قارچ‌ها می‌باشند (۳). گستره وسیعی از انواع قارچ‌های کپکی مانند *آسپرژیلوس*‌ها، *پنی‌سیلیوم*‌ها، *بوتیریس*‌ها قادر به تولید مقادیر زیادی از مایکوتوکسین‌های خطرناک هستند (٤).

کپک *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger*)، مهم‌ترین قارچ عامل فساد در مواد غذایی است و ضایعات اقتصادی عظیمی به بار می‌آورد. *آسپرژیلوس نایجر* علاوه بر فاسد کردن مواد غذایی، می‌تواند برخی متابولیت‌های قارچی بنام مایکوتوکسین تولید کند که به شرایط رشد و نوع گونه نیز بستگی دارد. مصرف مواد غذایی آلوده به توکسین‌ها یا *آسپرژیلوس نایجر* می‌تواند باعث ایجاد سرطان شود. عضو اصلی که در مجاورت با توکسین‌های این کپک آسیب می‌بیند کبد است (۵). قارچ *پنی‌سیلیوم* نیز گستردگی زیادی در طبیعت دارد و از کپک‌های مهم در صنایع غذایی می‌باشد. گونه *پنی‌سیلیوم نوتاتیوم* (*Penicillium notatum*) نیز از کپک‌های مهم در فساد مواد غذایی به شمار می‌آید. این کپک علاوه بر فساد، عامل ایجاد لکه‌های سبز و آبی روی مواد غذایی می‌باشد (٦).

از متداول‌ترین روش‌ها جهت مبارزه با بسیاری از آلودگی‌های قارچی و باکتریایی، استفاده از انواع مواد شیمیایی است که علاوه بر هزینه‌های سنگینی که به بار می‌آورد، موجب به‌خطر افتادن سلامتی انسان، آلودگی محیط زیست، توسعه مقاومت پاتوژن‌ها نسبت به این مواد شیمیایی و تخریب اکوسیستم‌ها و جمعیت در سطوح مختلف زنجیره غذایی می‌شود (۷).

تلاش برای یافتن جایگزین‌های مناسب برای این ترکیبات شیمیایی، موجب استفاده از روش‌های کنترل زیستی گردید. کنترل زیستی ، در واقع سرکوب عامل آلودگی توسط نوع یا انواعی از میکروارگانیسم‌ها مانند مخمر، قارچ، باکتری و به صورت مستقیم و یا غیرمستقیم می‌باشد (۸).

ترکیبات ضدقارچی که به صورت زیستی تولید می‌شوند شامل polyene، imidazole، triazole، ellylamine و echinocandin می‌باشند. پلی‌ان‌ها ترکیباتی هستند که توانایی اتصال به استرول‌های موجود در غشای سلول (به ویژه ارگوسترول) را دارند و می توانند با خروج محتویات سلول موجب مرگ سلول شوند. پلی ان ها شامل ترکیباتی مانند نیستاتین، آمفوتریسین، ناتامایسین، ریموسیدین و فیلیپین می‌باشند. ایمیدازول‌ها و تریازول‌ها نیز گروهی از ترکیبات ضدمیکروبی هستند که از فعالیت آنزیم سیتوکروم P٤٥٠، ١٤ آلفا دی‌متیلاز جلوگیری می‌کنند. این آنزیم لانسترول را به ارگوسترول تبدیل می‌کند و یک آنزیم اساسی در دیواره سلولی قارچ‌ها می‌باشد. مایکونازول‌ها، کتوکونازول‌ها و بیفونازول‌ها جزء گروه ایمیندازول و فلوکونازول‌ها، ایتراکونازول‌ها و وریکونازول‌ها نیز جزء گروه تریازانول می‌باشند. آلیل‌آمین‌ها ترکیباتی هستند که از سنتز آنزیم اسکوالن اپوکسیداز و دیگر آنزیم‌های تولید کننده ارگوسترول جلوگیری می‌کنند و شامل نافتیفین، بوتنافین و آمورولفین می‌باشد. اکینوکندین‌ها نیز ترکیباتی هستند که به وسیله آنزیم ۱،۳- بتا گلوکان از سنتز گلوکان در دیواره سلولی جلوگیری می‌کنند وشامل اروندی فانجینگ، میکافانجینگ و ارگوکونین می‌باشند.

ارگوکونین (ergokonin) یک ترکیب ضدقارچی و از گروه اکینوکندین می‌باشد که نخستین بار از *تریکودرما کونینجی* استخراج شد. ارگوگونین یک سولفاتید کربوکسیس تروئید است که از سنتز گلوکان در دیواره قارچ‌ها جلوگیری نموده و موجب نابودی آن‌ها می‌شود. از دیگر قارچ‌هایی که این ترکیب را سنتز می‌کنند، *تریکودرما لانگیبراچیاتو* می‌باشد (۹).

استفاده از مواد ضدمیکروبی در بسته‌بندی مواد غذایی از کاربرد مستقیم این مواد در مواد غذایی بهتر می‌باشد. بسته‌بندی فعال نوعی بسته‌بندی می‌باشد که با ایجاد تغییرات شیمیایی یا زیستی در محتویات غذا یا فضای داخل بسته‌بندی، مدت زمان نگهداری ماده غذایی را افزایش می‌دهد (۱۰). پلی‌لاکتیک اسید یک ترکیب طبیعی است که توسط اداره غذا و داروی ایالات

متحده در لیست محصولات (GRAS) قرار داده شده و برای بسته‌بندی تمام مواد غذایی ایمن شناخته شده است (۱۱).

از آن‌جایی که تا کنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای در مورد بیان ژن ارگوکونین آنتاکنون و اثر ضدقارچی آن انجام نشده است، این مطالعه با هدف تولید پروتئین نوترکیب ارگوکونین به منظور کنترل فساد قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سلیوم نوتاتوم* در صنایع غذایی انجام شد.

مواد و روش ها

الف) سویه‌های باکتری، پلاسمیدها و محیط کشت: قارچ *تریکودرما* (ATCC 18648) از مرکز کلکسیون باکتری و قارچ ایران خریداری شد. باکتری‌های *اشریشیا کلی* DH5α و BL21 به عنوان میزبان استفاده شدند.

پلاسمید pET 21 (Novagen) به عنوان وکتور کلونینگ و بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت. باکتری *اشریشیا کلی* حاوی وکتور دست‌ورزی شده بر روی محیط کشت مایع لوریا برتانی (۱ درصد تریپتون، ۰/۵ درصد عصاره مخمر، ۰/۵ درصد کلرید سدیم) حاوی ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت داده شد. pH محیط کشت ۷/۵ تنظیم و سلول‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس در شرایط هوازی کشت داده شدند.

ب) تکثیر ژن Erg 20: استخراج DNA ژنومی از قارچ *تریکودرما* با استفاده از کیت استخراج DNA (Bioneer، کره جنوبی) انجام شد. ژن Erg 20 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت تکثیر شد. پرایمر رفت دارای توالی 5'ATGGCTCAAAAGACTACCCTCAAGGAG و پرایمر برگشت دارای توالی به صورت 5'-ATTTGCTTCGCTTGTAGA-3' بود (۱۲). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم *Pfu*، ۱/۲۵ واحد از آنزیم *Pfu* پلی‌مراز، ۱ میکروگرم DNA ژنومی، ۲/۵ میکرولیتر dNTP و ۰/۲۵ میکرومول از آغازگرها در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برنامه حرارتی جهت تکثیر ژن *ارگوکونینا* با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (T-Personal) ساخت آلمان به صورت زیر انجام شد: واسرشت‌سازی ۶۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلیسیوس، اتصال ۴۵ ثانیه در ۶۱ درجه سلیسیوس و گسترش ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سلیسیوس برای ۳۵ سیکل. یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس برای ۳ دقیقه و یک مرحله گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلیسیوس نیز انجام گردید (۱۲).

ج) بیان قطعه نوترکیب: محصول PCR حاوی ناحیه کدکننده ژن *ارگوکونین* به همراه جایگاه برشی آنزیم‌های *Nde*I در انتهای '۵ و *Xho*I در انتهای '۳ بود. محصول PCR تخلیص شده و وکتور pET21 با استفاده از آنزیم‌های برشی *Nde*I و *Xho*I هضم شدند و سپس واکنش الحاق با استفاده از آنزیم T4DNA لیگاز (Fermentas، آمریکا) صورت گرفت. پلاسمید نوترکیب حاصل از الحاق به منظور تکثیر به باکتری *اشریشیا کلی* DH5α و پس از استخراج پلاسمید به میزبان بیان *اشریشیا کلی* BL21 منتقل گردید و بر روی محیط کشت LB-Agar حاوی ۱۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت داده شد. غربال‌گری و انتخاب کلنی حاوی ژن هدف با استفاده از روش کلنی PCR انجام گردید. سپس تک کلنی دست‌ورزی شده به مدت ۱۶ ساعت در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد. ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت تهیه شده به ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی آمپی‌سیلین اضافه و در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس در انکوباتور شیکردار انکوبه شد. در این مرحله، نمونه صفر برداشته و سپس IPTG در غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار به محیط کشت اضافه شد. نمونه‌برداری در ساعت‌های ۲، ۴ و ۶ به منظور مشخص کردن بیان ارگوکونین نوترکیب صورت گرفت. سلول‌ها با استفاده از بافر SDS (2X) شکسته شدند و بر روی ژل اکریل آمید ۱۲ درصد الکتروفورز شدند (۱۳).

د) تخلیص پروتئین‌های نوترکیب به کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی: پس از القای بیان توسط IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار و در مقیاس آزمایشگاهی و جمع آوری رسوب باکتری، وزن رسوب اندازه‌گیری و در ۱۰ حجم از بافر ۱ ستون

معلق گردید. با کمک سونیکاتور در ٤ سیکل ۳۰ ثانیه‌ای سلول‌ها کافت شدند. سلول‌های کافت شده به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار با دمای ٤ درجه سلیسیوس و با ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. مایع روماند با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ µm جدا گردید. سپس از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی (Bio-Scale Mini IMAC) عبور داده شد. به منظور تایید پروتئین مورد نظر از ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی، از ژل اکریل آمید ۱۲ درصد SDS-PADE استفاده شد (١٤).

ه) ارزیابی پروتئین بیان شده در ژل پلی اکریل آمید: پس از افزودن غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار IPTG و اتمام زمان بیان و جمع آوری سلول‌ها، به هرکدام از لوله‌ها ۵۰ میکرولیتر بافر نمونه (Sample buffer) با رقت ×۱ اضافه شد و به کمک ورتکس به خوبی هم زده شد. نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ٦۰ درجه سلیسیوس حرارت داده شدند تا سلول‌ها کافت شوند و پروتئین‌ها آزاد شده تخریب گردد. به منظور انجام الکتروفورز، برای تهیه محلول ژل، درصد آکریل آمید و بیس آکریل آمید متناسب با اندازه‌ی پروتئین انتخاب شد. با توجه به پیش بینی وزن احتمالی پروتئین ایجاد شده (٣٤ کیلودالتون) از ژل ۱۲ درصد استفاده شد. پس از تهیه ژل از هر یک از نمونه‌ها مقدار ۵ میکرولیتر در چاهک‌های ژل تزریق شد و با ۱۰۰ ولت عمل الکتروفورز گردید. برای رنگ‌آمیزی نیز از کوماسی بلو ۰/۰۵ درصد در متانول ۵۰ درصد و اسید استیک ۱۰ درصد استفاده شد (۱۵).

و) تکنیک دات بلات: دات بلات یک روش اختصاصی برای شناسایی و تعیین کمیت نسبی پروتئین‌ها در نمونه‌های مجهول می‌باشد. در این روش ۲ میکرولیتر از نمونه بر روی یک غشای نیترو سلولز ریخته شد. سپس این غشا توسط شیر بدون چربی بلوک شد. سپس در معرض آنتی‌بادی‌های اختصاصی کانژوگه قرار گرفت و در نهایت به مدت ۱ دقیقه توسط ECL (Enhanced Chemi Luminescence) که سوبسترای آنزیم HRP (Horse Raddish Peroxidase) بود تیمار گردید. کاغذ نیترو سلولز بین دو طلق شفاف قرار گرفت و سپس به کاست فیلم رادیولوژی منتقل گردید (از این مرحله به بعد عملیات در تاریکی انجام شد). بر روی این طلق، فیلم رادیولوژی قرار گرفت و به مدت ۱۰ تا ۳۰ دقیقه در آن بسته شد. با سپری شدن این مدت زمان، فیلم رادیولوژی به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ظهور فیلم رادیوگرافی قرار گرفت. فیلم رادیولوژی به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ثبوت فیلم رادیوگرافی قرار گرفت. فیلم رادیولوژی با آب فراوان شست و شو داده شد و در حرارت اتاق خشک گردید و سپس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۵).

ز) تکنیک وسترن بلات(Western blot) : تکنیک وسترن بلات یا ایمونوبلات (Immunoblot) روشی برای اندازه‌گیری وزن مولکولی آنتی‌ژن‌های ماکرومولکولی (معمولاً پروتئین‌ها) است که با یک آنتی‌بادی اختصاصی (Goat anti-mouse HRP conjugate) از شرکت Dako واکنش می‌دهد. ابتدا پروتئین‌ها توسط الکتروفورز از طریق ژل‌های SDS-PAGE از یکدیگر جدا شدند و سپس به صورت الکتروفورتیک از ژل به نیتروسلولز انتقال یافتند. پس از این‌که جایگاه‌هایی که با پروتئین‌ها واکنش نداده‌اند توسط شیر بدون چربی بلوکه شدند، پروتئین‌های ثابت شده با HRP واکنش داده شدند. کمپلکس آنتی‌ژن/آنتی‌بادی در نهایت توسط واکنش‌های شیمیایی نورانی (ECL) شناسایی شدند(۱۵).

ح) تهیه فیلم پلی لاکتیک اسید: پلی‌لاکتیک اسید (M_w=۱٤۰۰۰) به صورت گرانول از شرکت فکیور آلمان و کلروفرم به عنوان حلال از شرکت مرک آلمان خریداری شد. برای تهیه فیلم پلی‌لاکتیک اسید از روش ریخته‌گری محلول (روش قالب‌گیری) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا محلول ٤ درصد وزنی PLA در کلروفرم تهیه و به مدت ٤ ساعت در دمای محیط هم زده شد تا گرانول‌ها کامل حل و محلول یکنواختی به دست آمد. برای تهیه فیلم خالص PLA، ۳۵ گرم از محلول ٤ درصد تهیه شده از PLA، بر روی پلیت شیشه‌ای به قطر ۱۰ سانتی‌متر ریخته و به مدت ٢٤ ساعت در دمای محیط خشک شد.

ط) تهیه فیلم پلی‌لاکتیک اسید ضدمیکروبی: برای تهیه فیلم‌های PLA ضدمیکروبی، مقادیر (۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد)

ارگوکونین به محلول ٤ درصد وزنی PLA اضافه شده و پس از ٤ ساعت هم زدن، مخلوط نهایی روی سطح صفحه شیشه‌ای پخش شد. در ادامه، محلول به مدت ٢٤ ساعت روی صفحه شیشه‌ای در دمای محیط خشک شد. پس از خشک شدن فیلم‌های پیوسته و شفاف PLA، از سطح آن‌ها جدا شدند.

ی) فعال‌سازی قارچ‌های مورد آزمون: *آسپرژیلوس نایجر* (ATCC9142) و *پنی‌سیلیوم نوتاتوم* (PTCC5074) از ویال لیوفیلیزه در محیط سابوراد دکستروز براث (SDB) فعال گردیدند و سپس در محیط پوتیتو دکستروز آگار (PDA) به صورت شیب‌دار در دمای ۲۸ درجه سلیسیوس و به مدت ۵ روز کشت شد. اسپورها پس از برداشت از محیط کشت به آب مقطر استریل حاوی توئین ۸۰ (۰/۰۱ درصد) منتقل و به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط گردید و ۵ دقیقه اجازه داده شد تا قطعات سنگین ته‌نشین شوند. تعداد اسپورهای موجود در سوسپانسیون حاصل توسط لام نئوبار (boeco,0/0025 mm2, Germany) شمارش و در نهایت غلظت ۵×۱۰^{٤} اسپور در میلی‌لیتر استاندارد گردید.

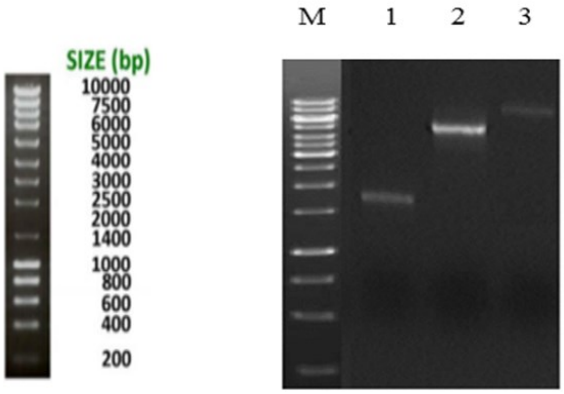
ک) بررسی اثر ضدقارچی فیلم تولید شده: به منظور انجام آزمون‌های تشخیص فعالیت ضدمیکروبی، فیلم‌ها با استفاده از کاتر، به شکل دیسک‌های دایره‌ای به قطر ٦ میلی‌متر بریده شدند. سپس با استفاده از روش دیسک دیفیوژن، فیلم‌های بریده شده روی محیط‌های کشت PDA تلقیح شده با سوسپانسیون *آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم نوتاتیوم* در فاصله مناسب از هم جای‌گذاری شده و پلیت‌ها به مدت ٤ روز در انکوباتور ۲۷ درجه سلیسیوس قرار گرفتند. پس از طی مدت زمان مورد نظر، قطر هاله شفاف در اطراف فیلم بر اساس میلی‌متر گزارش شد (١٦).

ل) روش و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها: به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، از طرح کامل تصادفی استفاده گردید. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. پس از آنالیز واریانس، میانگین‌های مربوطه با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند. نمودارها به وسیله نرم‌افزار EXCEL رسم گردید.

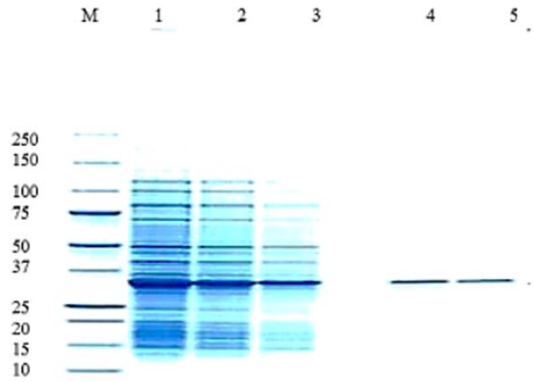
یافته‌ها

الف) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و انتقال ژن: ژن *ارگوکونین* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به خوبی تکثیر شد. فرآورده تکثیر شده که حاوی جایگاه‌های برشی برای آنزیم‌های *Nde*I و *Xho*I بود، به خوبی هضم و در جایگاه همسانه‌سازی وکتور pET21 الحاق شد. ناحیه کد کننده *ارگوکونین* به طرز مطلوبی به وسیله پلاسمید نوترکیب pET21+Erg تکثیر شد. ساختار پلاسمید نوترکیب pET21+Erg، DNAحاوی ژن *ارگوکونین* و پلاسمید pET21 در شکل ۱ نشان داده شده است.

ب) بررسی بیان ژن نوترکیب هدف: برای بررسی بیان ژن



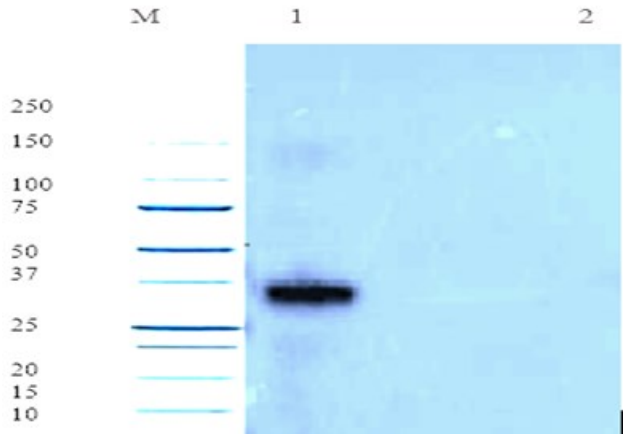
شکل ۱: پلاسمید حاوی ژن *ارگوکونین* و همچنین محصول هضم آنزیمی پلاسمید: ستون ۱ قطعه DNA(حاوی ژن *ارگوکونین*)، ستون۲ پلاسمید pET 21 و ستون۳ پلاسمید حاوی DNA(pET 21-ERG).



شکل ۲: بیان پروتئین ارگوکونین در ژل SDS-PAGE: ستون‌های ۱، ۲ و ۳ میزان بیان پس از ٦، ٤ و ۲ ساعت پس از القای IPTG، ستون‌های ٤ و ۵ نمونه‌های خالص شده. ستون M: مارکر.

شکل ۳: دات بلات پروتئین استخراج شده، ستون ۱ پروتئین ارگوکونین و ستون ۲ نمونه کنترل منفی.

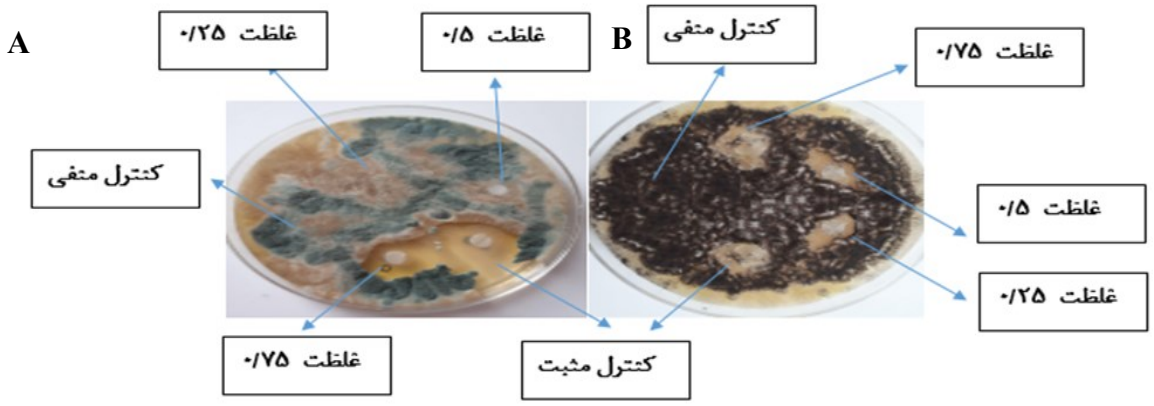
نوترکیب در همسانه انتخاب شده، سلول‌ها در فاصله ٤،٢ و ٦ ساعت بعد از القا، برداشت شدند. نتایج بیان پروتئین نوترکیب با روش SDS-PAGE و تایید آن با دات بلات و وسترن بلات در شکل‌های ۲، ۳ و ٤ آورده شده است. شکل ۲ تولید پروتئین نوترکیب (حدود ۳٤/۸ کیلودالتون) در ساعات مختلف بعد از القا (ستون‌های ۱، ۲ و ۳) را در *E.coli BL21* (DE3) نشان می‌دهد. سویه *اشریشیا کلی* حای وکتور با غلظت ۱ میلی‌مولار از IPTG القا گردید. القاگر از جمله عوامل مهمی است که بر روی میزان پروتئین نوترکیب اثر می‌گذارد. زمان القا نیز از عوامل مهم در بهینه‌سازی تولید پروتئین نوترکیب می‌باشند، زیرا بازدهی تولید پروتئین نوترکیب به نقطه‌ای از تابع رشد که القا صورت می‌گیرد وابستگی زیادی دارد. به‌منظور تخلیص پروتئین نوترکیب، از ستون کروماتوگرافی گرایشی Mini IMACBio-Scale استفاده شد و نتایج با کمک SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. در شکل ۲ نتیجه تخلیص پروتئین نوترکیب ارگوکونین (ستون‌های ٤ و ٥) نشان داده شده است.



شکل ٤: وسترن بلات پروتئین استخراج شده ستون ۱ پروتئین ارگوکونین، ستون ۲ نمونه کنترل منفی و ستون M مارکر.

ج) نتایج ضد قارچی فیلم پلی لاکتیک حاوی ارگوکونین: در این مطالعه اثر ضدقارچی درصدهای مختلف ارگوکونین در برابر قارچ‌های آلوده کننده مواد غذایی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در جدول ۱ آورده شده است. همان‌طور که از جدول ۱ مشاهده می‌شود، فیلم PLA فاقد ارگونین (نمونه شاهد)، فاقد هرگونه اثر ضدقارچی بود. همچنین فیلم PLA حاوی غلظت‌های مختلف ارگوکونین روی هر دو قارچ مورد بررسی اثر مهارکنندگی نشان داد.

نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت ارگوگونین از صفر به ۰/۷۵ درصد، اثر ضدقارچی به‌صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد ($p\leq$۰/۰۵). نتایج حاصل از اثر ضدقارچی ارگونین بر*آسپرژیلوس نایجر* و *پنی‌سیلیوم نوتاتیوم* نشان داد که هر دو قارچ نسبت به این ترکیب حساس بودند. نتایج



شکل ٥: هاله عدم رشد اطراف کپک‌های مورد مطالعه در فیلم خالص و فیلم حاوی غلظت‌های مختلف ارگوکونین. A) *آسپرژیلوس نایجر*، B) *پنی‌سیلیوم نوتاتیوم*

جدول ۱: قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) اطراف فیلم‌های پلی‌لاکتیک اسید حاوی درصدهای مختلف ارگوکونین.

ارگوکونین (درصد)	*آسپرژیلوس نایجر*	*پنی‌سیلیوم نوتاتیوم*
۰	۰^{a}	۰^{a}
۰/۲۵	۸/۰±۴۲/۱۰^{bB*}	۰^{bA}
۰/۵	۱۴/۰±۲۲/۱۳^{cB}	۱۳/۰±۰۲/۱۳^{cA}
۰	۲۵/۰±۱۲/۰۳^{dA}	۲۷/۰±۰۲/۱۳^{dB}

* نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده و مقادیر با حرف فوقانی مشابه، اختلاف معنی‌داری با یک‌دیگر ندارند ($p>۰/۰۵$).*حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت در ستون‌ها می‌باشد.*حروف بزرگ متفاوت نشان‌دهنده تفاوت در ردیف‌ها می‌باشد.

اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد نشان داد که قطر هاله عدم رشد ارگوکونین در *پنی‌سیلیوم نوتاتیوم* نسبت به *آسپرژیلوس نایجر* بیشتر بود ($p\leq۰/۰۵$).

بحث

امروزه با توجه به عوارض جانبی نگه‌دارنده‌های شیمیایی و بی‌خطر بودن ترکیبات طبیعی، توجه فراوانی به تحقیق در مورد ترکیبات طبیعی معطوف شده است. با توجه به این‌که در سال‌های اخیر به صورت گسترده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود، این امر موجب ایجاد مقاومت در میکروارگانیسم‌ها شده و از طرفی این آنتی‌بیوتیک‌ها اثرات جانبی متعددی نیز دارند. بنابراین توجه به ترکیبات طبیعی افزایش یافته است. یکی از منابع یافتن چنین ترکیباتی علم مهندسی ژنتیک است. کنترل بیولوژیک، در واقع سرکوب عامل آلودگی توسط نوع یا انواعی از میکروارگانیسم‌ها هم‌چون جدایه‌های مخمر مانند، قارچی و باکتریایی، به‌صورت مستقیم و یا غیرمستقیم می‌باشد (۱۷).

برخلاف ترکیبات سنتزی، سمیت و آلرژی‌زایی فراورده های زیستی کمتر است و به راحتی نیز قابل تجزیه هستند. همچنین این مواد در محصولات غذایی انباشته نمی‌شوند و نیز ارزان و مناسب برای مصرف در مقیاس صنعتی می‌باشند. اساس برخی از بسته‌بندی‌های فعال، استفاده از فیلم‌ها به‌همراه مواد ضدمیکروبی است که باعث محدود شدن یا کاهش رشد میکروارگانیسم‌ها در سطح مواد غذایی می‌شود. بسیاری از مطالعات نشان دادند که استفاده از مواد ضدمیکروبی به‌همراه فیلم‌های بسته‌بندی مختلف بر روی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا موثر است. ترکیبات ضدقارچی که به‌صورت بیولوژیکی تولید می‌شوند شامل ایمیدازول، تریازول و اکینوکاندین می‌باشند. ارگوکونین یک ترکیب ضدقارچی و از گروه اکینوکاندین می‌باشد که یک سولفاتید کربوکسیس تروئید است که از سنتز گلوکان در دیواره قارچ‌ها جلوگیری نموده و موجب نابودی آن‌ها می‌شود. پژوهش‌های انجام شده در این رابطه نشان می‌دهد که استفاده از فیلم‌های ضدمیکروبی در مقایسه با افزودن مستقیم ماده ضدمیکروب بسیار موثرتر است، زیرا ترکیب ضدمیکروبی به کندی از سطح بسته‌بندی به ماده غذایی آزاد می‌شود و در غلظت مورد نیاز برای جلوگیری از رشد میکروبی حفظ می‌گردد. گستره وسیعی از مواد افزودنی فعال، از جمله نیترات نقره، اسیدهای آلی، باکتریوسین (مانند: نیسین، پدیوسین)، آنزیم‌ها از قبیل لیزوزیم، شلاته کننده‌ها مانند اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید (EDTA)، لاکتوفرین و عصاره‌های گیاهی به صورت موثری در بسته‌بندی مواد غذایی به کار برده شده‌اند (۱۸).

اردوهان (Erdohan) و همکاران (۲۰۱۳)، به بررسی ویژگی ضدمیکروبی فیلم اسید لاکتیک حاوی اسانس پرداختند که نتایج این تحقیق نشان داد که فیلم‌های حاصل دارای خواص ضدمیکروبی هستند (۱۹). عبدالشاهی و همکاران (۲۰۱۶)، به بررسی اثرات ضدقارچی پوشش خوراکی حاوی مانان بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در مغز پسته را مورد بررسی قرار دادند که نتایج آن‌ها نشان داد که پوشش ژلاتینی حاوی مانان اثر مهارکنندگی بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* داشت (۲۰).

هدف از این تحقیق استخراج ژن *ارگوکونین* و قرار دادن آن داخل وکتور pET 21 و بیان در باکتری *اشریشیا کلی* بود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ژن مورد نظر به‌خوبی در باکتری *اشریشیا کلی* بیان شده است. اگرچه امروزه ارگانیسم‌ها و سامانه‌های بیانی بسیار متنوعی برای تولید پروتئین نوترکیب وجود دارد، باکتری *اشریشیا کلی* اولین میزبانی بود که برای

تولید داروهای نوترکیب مورد استفاده قرار گرفت. رشد سریع و سرعت بالای تولید پروتئین و دانش زیادی که در مورد فیزیولوژی *اشرشیا کلی* وجود دارد، به همراه ابزار کارآمد ژنتیکی، آن را به یکی از بهترین سیستم‌های بیانی مبدل ساخته است.

توفیق (Toufiq) و همکاران (۲۰۱۷)، به بررسی انتقال ژن *کیتوزان*، درون *اشرشیا کلی* به وسیله وکتور pET 30 پرداختند. نتایج این پژوهش نشان داد که پروتئین کیتوزان به‌خوبی در باکتری *اشرشیا کلی* بیان شده است (۲۱). آریان نژاد و همکاران (۲۰۱۵)، به همسانه‌سازی و بیان آنزیم فیتاز در باکتری *اشریشیا کلی* پرداختند، نتایج این تحقیق نشان داد که ژن کد کننده فیتاز با موفقیت به‌شکل درون سلولی در باکتری *اشریشیا کلی* بیان شد (۲۲).

لیو (Liu) و همکاران (۲۰۰۹)، در پژوهشی به انتقال ژن *کیتوزان* به درون باکتری *اشرشیا کلی* و بیان آن پرداختند، پس از بیان و استخراج، اثر ضدقارچی این ترکیب را بررسی کردند که نتایج حاصل نشان داد که کپک *آسپرژیلوس نایجر* نسبت به این ترکیب حساس بود (۲۳).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان چنین نتیجه گرفت که استفاده از فیلم PLA حاوی درصدهای مختلف ارگوکونین با توجه به اثر ضدقارچی که از خود نشان دادند، می‌توانند به منظور افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی به‌کار گرفته شوند. از این رو در صورت تولید آن به صورت صنعتی می‌توان از بسته‌بندی‌های مذکور در صنایع غذایی بهره برد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از گروه زیست شناسی دانشگاه ملایر به دلیل همکاری در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد

References

1. Jamshidian M, Arab Tehrany E, Imran M, Jacquot M, Desobry S. Poly (lactic acid): production, applications, nanocomposites, and release studies comper. Rev Food Sci Food Saf. 2010; (9): 552-571.
2. Suprakas SR, Pralay M, Masami O, Kazunobu Y, Kazue U. New polylactide/layered silicate nanocomposites. preparation, characterization, and properties. Macromol. 2002; 35(8): 3104-3110.
3. Almasi H, Ghanbarzadeh B, Dehghannia J. Film nanocomposite (acid lactic) poly of properties nanofibers cellulose modified containing. Poly Sci and Technol. 2014; 6(26): 485-497.
4. Ivana DR, Milan S, Olgica DS, Marina DT, Ljiljana R, Čomic AM. Anti *Aspergillus* properties of different extracts from selected plants. Afr J Microbiol. 2011; 5(23): 3986–3990 .
5. Arnoult M, Dargent E, Mano JF. Mobile amorphous phase fragility in semi-crystalline polymers: Comparison of PET and PLLA. Polymer. 2007; 48: 1012-1019.

6. Salehi Z, Kheirkhah B, Masoumalinejad Z, Zinatizadeh M R. Identification of *aflR* gene in aflatoxigenic *Aspergillus* isolated from pistachio kernel of Sirjan Region using molecular method. Iran J Med Microbiol. 2018; 12(1): 43-50.

7. Prapagdee B, Kuekulvong Ch, Mongkolsuk S. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hyroscopicus* against phytopathogenic fungi. Int J Biol Sci. 2008; 4: 330-337.

8. Kezuk Y, Ohishi M, Itoh Y, Watanabe J .Structural studies of a two-domain chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. J HIV Mol Biol. 2006; 358, 472-484.

9. Vicente MF, Cabello A, Platas G, Basilio A, Dõ Âez MT, Dreikorn S. Antimicrobial activity of ergokonin A from *Trichoderma longibrachiatum*. J App Microbiol. 2001; 91, 806-813.

10. Shekarfrosh Sh, Azizi Shirazi A, Vali A. The effect of packaging on some of the microbial, chemical and physical properties of *Oncorhynchus mykiss* kept in the refrigerator. Fisheries Sci Technol. 2014; 3(4): 31-42.

11. Salmieri S, Islam F, Khan RA, Hossain FM, Ibrahim HM, Miao C, Hamad WY, Lacroix M. Antimicrobial nanocomposite films made of poly (lactic acid)–cellulose nanocrystals (PLA–CNC) in food applications-part B: effect of oregano essential oil release on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in mixed vegetables. Cellulose. 2014; 21(6): 4271-4285.

12. Plisky S, Perlińska-Lenart U, Górka-Nieć W, Graczyk S, Antosiewicz B, Zembek P, Palamarczyk G, Kruszewska JS. Overexpression of *erg20* gene encoding farnesyl pyrophosphate synthasehas contrasting effects on activity of enzymes of the dolichyl and sterolbranches of mevalonate pathway in *Trichoderma reesei*. Gene. 2014; 544(2):114-122

13. Collins T, Azevedo-silva J, Costa A, Branca F, Machado R, Casal M. Batch production of a silk -elastin-like protein in *E. coli* BL21(DE3): key parameters for optimization. Microb Cell Fact. 2013; 1: 12-21.

14. Ausubel FM, Brent R, Kingston R, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struh L. Current protocols in molecular biology. New York. 2002; 102-109.

15. Atehortúa A. Cost-effectiveness analysis of diagnosis of duchenne/becker muscular dystrophy in Colombia. Value Health Reg Issues. 2018;17: 1-6

16. Silveria MF. Active film incorporated with Sorbic acid on pastry dough conservation. Food Control. 2007; 18: 1063-1067.

17. Kezuk Y, Ohishi M, Itoh Y, Watanabe J. Structural studies of a two-domain chitinase from-*Streptomyces griseus* HUT6037. HIV Mol Biol. 2006; 358: 472-484.

18. Vicente MF, Cabello A, Platas G, Basilio A, Dõ Âez MT, Dreikorn S. Antimicrobial activity of ergokonin A from *Trichoderma longibrachiatum*. App Microbiol. 2001; 91: 806-813.

19. Erdohan ZÖ, Çam B, Turhan KN. Characterization of antimicrobial polylactic acid based films. J Food Eng. 2013; 119(2): 308-315.

20. Abdolshahi A. Antifungal properties of gelatin-based coating containing mannoprotein from *Saccharomyces cerevisiae* on *Aspergillus flavus* growth in Pistachio. J Mazandaran Univ Med

Sci. 2016; 26(139): 93-102.

21. Toufiq N. Improved antifungal activity of barley derived chitinase I gene that overexpress a 32 kDa recombinant chitinase in *Escherichia coli* host. Braz J Microbiol .2018; 49: 414-421.

22. Ariannejad H. Cloning, over expression and characterization of alkalin phytase enzyme in *Escherichia Coli.* J Agr Biotechnol. 2013; 5: 1-15.

23. Liu H, Naismith JH. A simple and efficient expression and purification system using two newly constructed vectors. Protein Expr Purif. 2009; 63(2): 102-111.

Journal of Microbial World
Volume 12, No. 2, July 2019

Original Article

In vitro production of recombinant ergokonin protein and its application in the polylactic acid film to control *Aspergillus niger* and *Penicillium notatum*

Mohammad Javad Akbarian Meymand[1], Arash Babaei[2]

[1]Ph.D. student, Grape Environmental Science Department, Research Institute for Grapes and Raisin (RIGR), Malayer University, Iran. [2]Assistant Professor, Biology Department, Faculty of Sciences, Malayer University, Malayer, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Fungal is one of the most important causes of food spoilage. The use of antimicrobial active packaging increases food safety and shelf life. Hence, this study aimed to produce antifungal compounds (Ergoconin) and its application in the polylactic acid film to reduce the fungal contamination of *Aspergillus niger* and *Penicillium notatum*.

Materials & Methods: To produce the Ergoconin recombinant protein, the target gene was entered into the pET21 expression vector, and the recombinant vector was transferred to *Escherichia coli* BL21 (DE3) as host of expression. Gene expression was evaluated by SDS-PAGE, western blot and dot blot. To purify the recombinant protein, a chromatography column was used. Poly-lactic acid bioactive films were prepared by casting method and adding different amounts of Ergoconin (0, 0.25, 0.5, and 0.75%) to 4% wt Poly-lactic acid solution. To investigate the antifungal effect of the poly-lactic acid film, Disc diffusion was used.

Results: Ergokonin gene was replicated by specific primers. The expression of recombinant protein was performed by SDS-PAGE and confirmed by dot and western blot. Ergoconin compound had an antifungal effect on both fungi. The inhibition zone diameter for both fungi increased with increasing Ergoconin concentration. The antimicrobial film had a more antifungal effect on *Penicillium notatum*.

Conclusion: Ergoconin destroys fungi by preventing the synthesis of glucan in the wall of fungi. Therefore, Poly-lactic acid film containing Ergoconin can be used as antimicrobial active packaging to increase food safety.

Keywords: Antimicrobial active packaging, Antifungal combination, Gene expression, Ergoconin, Poly-lactic acid film.

Correspondence to: Arash Babaei

Tel: +98 9188512622

E-mail: a.ababaei@sheffield.ac.uk

Journal of Microbial World 2019, 12(2): 114-124.

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.