

اثر آنتاگونیستی مواد ضد میکروبی تولیدی از سویه‌های لاکتوباسیلوس جداسازی شده از پنیر کوزه استان آذربایجان غربی

مهسا یوسفی^۱، محمود رضازادباری^{۲*}، محمد علیزاده خالد آباد^۲ و رجب خشای^۲

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۱ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۱۹

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

^۲ استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

^۳ کارشناس آزمایشگاه، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

*مسئول مکاتبه: E-mail: mahmoud114@hotmail.com

چکیده

در این تحقیق، سویه‌های تولید کننده باکتریوسین از انواع پنیر کوزه منطقه آذربایجان غربی جداسازی شده و ترکیبات ضد میکروبی تولید شده بوسیله سویه‌ها بصورت جزئی خالص سازی شدند. از ۸ نمونه پنیر جمع آوری شده نزدیک ۴۸ سویه جداسازی شد که دارای ویژگی‌های اصلی لاکتوباسیل‌ها یعنی میله‌ای گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند. از بین آنها ۳۶ سویه با انجام روش چاهک ویژگی‌های ضد میکروبی از خود نشان دادند. امکان این وجود داشت که فعالیت اصلی ضد میکروبی متعلق به اسیدهای آلی تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک باشد. بنابراین pH در سوپرناتانت در ۷-۶ تنظیم شد و بعد از تنظیم pH، تنها ۱۲ سویه فعالیت ضد میکروبی از خود نشان دادند. مطالعه مقایسه‌ای با استفاده از آزمون‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی نشان داد که ترکیبات ضد میکروبی توسط سویه‌های *Lb. plantarum* و *Lb. paracasei brevis* تولید شده بودند. بعد از مرحله شناسایی سویه‌های جداسازی شده، خالص سازی جزئی باکتریوسین تولیدی از این سویه انجام گرفت. مشخص شد که وزن مولکولی باکتریوسین‌های خالص سازی شده در دامنه ۱۵ kDa تا ۵۰ می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های اسید لاکتیک، باکتریوسین، پنیر کوزه

Antagonistic effect of bacteriocines produced by lactobacilli isolated from West Azerbaijan's Kuppeh cheese

M Yosefi¹, M Rezazadeh Bari^{2*}, M Alizadeh Kaledabad² and R Kashaei³

Received: November 11, 2011

Accepted: 12 October, 2011

¹MSc Graduated, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran

²Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran

³ Lab Assistant, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran

*Corresponding author: E-mail: mahmoud114@hotmail.com

Abstract

In this study, isolation and identification of bacteriocin producing strains from west Azerbaijan Kuppeh cheese is investigated. For this purpose, 8 samples of cheese were collected from different parts of west Azerbaijan. 36 out of 48 colonies of isolated Lactic Acid Bacteria (LAB) showed high antimicrobial activity against the indicator strains. In order to avoid of antimicrobial effect of organic acid produced by LAB, in this step, the pH levels of supernatant were adjusted to 6.5-7. After pH adjustment, only 12 isolated strains showed antimicrobial activity. A comparative study using morphological and biochemical tests demonstrated that 2 isolated strains were belonging to *Lactobacillus plantarum*, 1 belonging to *Lactobacillus brevis* and 1 belonging to *Lactobacillus paracasei*. The result of partial purification and electrophoresis of bacteriocin indicated that the molecular weight of proteins were 15, 40 and 50 kDa.

Keywords: Bacteriocin, Lactic acid bacteria, Traditional cheese

مقدمه

مثبت فعالیت بسیار خوبی دارند ولی در مقابل باکتری‌های گرم منفی به علت ساختار غشایی خاص آنها فعالیت کمتری از خود نشان می‌دهند (بارفوت و همکاران ۱۹۹۳). در این تحقیق سویه‌های تولیدکننده باکتریوسین از پنیر کوزه جداسازی شده و سپس فعالیت آنها در مقابل باکتری‌های پاتوژن بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های پنیر

به منظور جداسازی باکتری‌های تولید کننده باکتریوسین، ۸ نوع متفاوت پنیر کوزه با مشخصات متفاوت از نظر شکل ظاهری و عطر و طعم شامل سه نمونه از سلماس، دو نمونه از خوی، یک نمونه از

باکتری‌های اسید لاکتیک مواد ضد میکروبی را تولید می‌کنند که آنها استعداد بازدارندگی از رشد بیماری‌ها و میکروارگانیسم‌های مضر را دارا می‌باشند (ادتونجی و همکاران ۲۰۰۷). اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، دی‌استیل و باکتریوسین‌ها جزو متابولیت‌های باکتری‌های اسید لاکتیک هستند. ترکیبات ضد میکروبی پروتئینی تولید شده توسط باکتری‌ها با نام باکتریوسین شناخته می‌شوند. باکتریوسین‌ها و آنتی بیوتیک‌ها که به شدت از رشد باکتری‌های پاتوژن و باکتری‌های مضر ممانعت می‌کنند به علت به کارگیری آنها به عنوان مواد نگهدارنده طبیعی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند و در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای بر روی آنها انجام گرفته است. باکتریوسین‌ها بر روی باکتری‌های گرم

شد. بعد از این مرحله بر روی محیط کشت تلقیح شده با سویه‌های اندیکاتور چاهک‌هایی تعبیه شد. سپس در داخل چاهک‌ها ۲۰۰ μl از محلول رویی سویه‌های جداسازی شده ریخته شد و در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرمخانه گذاری گردید و در نهایت چاهک‌هایی که در اطراف آنها هاله عدم رشد مشاهده گردید، بعنوان سویه تولید کننده مواد ضد میکروبی مشخص شدند (ایوانوا ۲۰۰۰).

تشخیص وجود باکتریوسین

برای اثبات اینکه اثر ضد میکروبی در اثر تولید باکتریوسین می‌باشد نه مواد تولید شده دیگر مانند اسیدهای آلی، اثرات مواد ضد میکروبی اسیدهای آلی حذف شد. برای حذف اثر بازدارندگی اسیدهای آلی تولید شده، pH محلول رویی با استفاده از NaOH ۵ نرمال و یا HCL ۵ نرمال، pH روی ۶/۵ تا ۷ تنظیم شد. سپس اثر ضد میکروبی آن مطابق روش چاهک مورد بررسی قرار گرفت (کارتیکیان و همکاران ۲۰۰۹).

آزمایش دامنه رشد سویه‌ها

برای تثبیت توانایی رشد سویه‌های جداسازی شده در دماهای (صفر، ۱۰ و ۴۵ °C) و در غلظت ۶٪ و ۱۰٪ NaCl و در pH های ۴، ۶ و ۹ سویه‌های در محیط کشت MRS Broth کشت داده شدند. بعد از گرمخانه گذاری کردن در صورت کدر شدن محیط کشت و یا ته نشینی نتیجه آزمایش مثبت اعلام شد. مدت گرمخانه گذاری در دماهای ۱۵ تا ۴۵ °C به مدت ۳ روز و در دمای ۰ تا ۱۰ °C به مدت ۷ روز بود (دوویست و همکاران ۲۰۰۷).

خالص سازی جزئی باکتریوسین

ته‌نشین سازی پروتئین‌ها با سولفات آمونیوم

باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده دارای خاصیت ضد باکتریایی برای تهیه کشت تازه ۱۸ ساعته در داخل محیط کشت MRS Broth کشت داده شده و در ۳۷ °C گرمخانه گذاری شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد و محلول رویی آن برداشته شد و pH آنها بوسیله NaOH ۵ نرمال و HCl ۵ نرمال

شاهین‌دژ، یک نمونه از بوکان و یک نمونه از مهاباد تهیه گردیدند.

مواد و محیط کشت‌های لازم

محیط کشت‌های اختصاصی جهت جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک مورد استفاده در این تحقیق شامل MRS AGAR، MRS BROTH، BHI و MHA بودند که متعلق به شرکت Scharlau اسپانیا بودند (چیکیوسف و همکاران ۲۰۰۹).

سویه‌های حساس (اندیکاتور) شامل *Micrococcus luteus* ATCC9341، *Listeria monocytogenes* ATCC 1169 و *Lactobacillus delbroki* ATCC 9649 که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند.

روش کار

جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک و طبقه‌بندی آنها

با هدف جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از نمونه‌های جمع آوری شده پنیر رقت‌های مناسب تهیه و در محیط کشت MRS Agar کشت داده شدند و پس از جداسازی و خالص‌سازی سویه روی محیط کشت از نظر مورفولوژی، رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز و تولید گاز از گلوکز طبق Bergy's Manual مورد بررسی و شناسایی قرار گرفتند (کوئتراس و همکاران ۱۹۹۷).

شناسایی خاصیت ضد میکروبی سویه‌های جداسازی شده

برای شناسایی خاصیت ضد میکروبی در این تحقیق از روش چاهک استفاده شد. در این روش سویه‌های جداسازی شده در داخل محیط کشت MRS BROTH در ۳۷ °C به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سپس کشت‌ها در rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفیوژ و در نهایت محلول رویی جدا گردید. پتری-هایی با محیط کشت MHA آماده شد و بر سطح آنها به میزان ۱۰۰ μl از هر کدام از سویه‌های اندیکاتور تلقیح

روی ژل اولین و آخرین چاهک خالی نگه داشته شد و نشانگر به سومین چاهک و نمونه‌ها به سایر چاهک‌ها بارگذاری شد. سپس محفظه شیشه‌ای با استفاده از گیره‌هایی به تانک الکتروفورز متصل شد و مخزن با بافر الکتروود پر شد. نمونه‌ها ابتدا در ولتاژ ۱۳۰ و بعد از طی کردن مسیر ژل بالا با ولتاژ ۱۵۰ مسیر عمودی ژل پایین را تا انتها طی کردند. بعد از اتمام الکتروفورز برای دیده شدن باند پروتئین‌ها در داخل ژل از رنگ کوماسی آبی G-250 استفاده شد. بدین ترتیب که به داخل هر چاهک ۱-۰/۲ میکروگرم از رنگ کوماسی آبی اضافه شد. در آخر مراحل تثبیت به مدت یک شبانه روز، شستشو به مدت ۳۰ دقیقه، رنگ آمیزی به مدت ۵ ساعت و رنگ بری تا زمان سفید شدن ژل انجام شد. در مرحله آخر ژل بدست آمده در اسید استیک ۳٪ نگهداری شد (اسچاگر و همکاران ۱۹۸۷).

نتایج و بحث

باکتری‌های اسیدلاکتیک از اجزای اصلی فلور میکروبی محصولات لبنی بخصوص پنیر می‌باشند. در طی این تحقیق، ۴۸ سویه جداسازی شد که ۳۶ سویه از آنها باکتری‌های اسید لاکتیک بودند. با بررسی خاصیت ضد میکروبی این سویه‌ها مشخص شد که فقط ۱۲ عدد از آنها بعد از حذف اثر اسیدهای آلی خاصیت ضد میکروبی از خود نشان دادند.

با انجام آزمایشات مورفولوژی و رنگ آمیزی گرم و دیگر آزمایش‌های بیوشیمیایی (جدول‌های ۱ و ۲) مشخص شد که ۴ سویه از ۱۲ سویه موجود مربوط به باکتری‌های لاکتوباسیلوس بودند.

بعد از بررسی نتایج بدست آمده طبق Bergy's Manual (۵) مشخص شد که ۲ تا از میکروب‌های جداسازی شده متعلق به سویه‌های *Lb. Plantarum* بوده و ۲ سویه دیگر به *Lb. brevis* و *Lb. paracasei ssp. Paracasei* تعلق داشتند (اسنیت و همکاران ۱۹۸۶).

روی ۶/۵ تا ۷ تنظیم گردید. برای ته‌نشین سازی و بالا بردن غلظت پروتئین‌ها از غلظت ۷۰٪ سولفات آمونیوم (Merck, 31119) استفاده شد. سولفات آمونیوم بصورت پودر به محلول رویی حاصل اضافه و سپس به مدت ۱۸ ساعت در یخچال نگهداری شد. بعد از اتمام مدت زمان لازم نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با ۱۵۰۰۰× g سانتریفیوژ شدند. سپس خاصیت ضد میکروبی ماده ته‌نشین شده و رویی باقی مانده مورد آزمایش قرار گرفت (ادتونجی و همکاران ۲۰۰۷).

دیالیز

برای حذف سولفات آمونیوم موجود در ماده ته‌نشین شده و همچنین خالص سازی جزئی ماده ته‌نشین شده از روش دیالیز استفاده شد. در این روش ماده ته‌نشین شده در بافر سدیم فسفات ۱۰ mM با (pH ۶/۵) حل شد. سوسپانسیون حاصله در داخل کیسه دیالیز ۱۰۰۰ Da ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در داخل بافر سدیم فسفات نگهداری گردید. در طول دیالیز بافر مورد استفاده هر ۳ ساعت یکبار تعویض شد. بعد از دیالیز اثر ضد میکروبی ماده باقیمانده در داخل کیسه دیالیز مورد آزمایش قرار گرفت (مژگانی و همکاران ۲۰۰۶).

الکتروفورز

با انجام روش TRICINE-SDS-PAGE بر روی نمونه بدست آمده هم عمل خالص سازی انجام شد و هم وزن مولکولی پروتئین‌ها مشخص گردید. در این روش بافر ژل پایین ۱۰٪ با (pH ۸/۸) تهیه و در داخل محفظه ریخته شد بطوریکه حدود ۳ cm فضا برای محلول ژل بالا باقی ماند. بعد از انعقاد ژل پایین، بافر ژل بالا ۶٪ با (pH ۶/۸) تهیه شده و داخل محفظه ریخته شد و شانه بر روی آن قرار گرفت. بعد از انعقاد بافر ژل بالا شانه خارج شد و نمونه‌ها به داخل چاهک‌ها تزریق شدند. روش آماده کردن نمونه‌ها بدین صورت بود که ۱۵ میکرولیتر از نمونه با ۵ میکرولیتر از بافر نمونه حل شده سپس به مدت ۵ دقیقه جوشانده شدند.

جدول ۱- آزمایشات بیوشیمیایی انجام شده برای شناسایی سویه‌هایی با فعالیت ضد میکروبی

سویه های جداسازی شده	مورفولوژی	NaCl (%)	pH			حرارت °C		
			۴	۹/۶	۰	۱۰	۴۵	
۱	کوکسی	+	+	-	+	-	+	-
۲	باسیل	+	+	+	+	+	+	-
۳	کوکسی	+	+	+	+	-	+	-
۴	کوکسی	+	-	-	+	-	+	-
۵	کوکسی	+	-	-	+	-	+	-
۶	کوکسی	+	-	-	+	-	+	-
۷	کوکسی	+	-	-	+	-	+	-
۸	باسیل	+	-	-	+	-	+	-
۹	کوکسی	+	-	-	+	-	+	-
۱۰	باسیل	+	+	+	+	+	+	-
۱۱	باسیل	+	-	+	+	-	+	-
۱۲	کوکسی	+	-	+	+	+	+	-

جدول ۳- اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد سویه‌های جداسازی شده در برابر سویه‌های حساس

سویه های لاکتوباسیل جداسازی شده	قطر هاله عدم رشد بر حسب cm		
	<i>Lactobacillus delbrukii</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
۲	۱/۱	۲/۲	۱/۲
	۱/۴	۲	۲/۲
۸	۱/۵	۱/۷	۲/۵
	-	۱/۸	۱/۵
۱۰	-	۱/۵	۱/۲
	-	۱/۷	۰/۸
۱۱	-	۰/۸	۲/۲
	-	۱/۵	۱/۸
		۱/۵	۲
		۰/۷	-
		۰/۷	-
		۰/۷	-

بعد از بدست آوردن قطر هاله‌های عدم رشد، مشخص شد که هر ۴ سویه لاکتوباسیل موجود در مقابل سویه حساس میکروکوکوس لوتئوس فعالیت خوبی داشته‌اند ولی بیشترین فعالیت را سویه شماره ۲ با قطر هاله بازدارنده رشد ۱/۵ سانتیمتری روی لاکتوباسیلوس دلبروکی و ۱/۲ سانتیمتری روی میکروکوکوس لوتئوس و ۲/۵ سانتیمتری روی لیستریا مونوسیتوژنز نشان داد. همچنین بعد از بررسی دقیق نتایج مشخص شد که سه سویه (۲، ۸ و ۱۰) فعالیت آنتی‌لیستریایی از خود نشان می‌دهند.

جدول ۲- تخمیر کربوهیدرات‌ها توسط سویه‌های لاکتوباسیل جداسازی شده از پنیر کوزه

کربوهیدراتها	سویه های جداسازی شده از پنیر کوزه			
	۲	۸	۱۰	۱۱
گلوزکز	+	+	+	+
لاکتوز	+	+	+	+
ساکارز	+	+	-	+
گالاکتوز	-	-	+	+
فروکتوز	+	-	+	+
رافینوز	-	+	+	+
گزیلوز	-	+	+	+
مالتوز	+	+	+	+
نشاسته	+	+	+	-

جدول ۴- آزمایش فعالیت ضد میکروبی در غلظت‌های متفاوت سولفات آمونیوم

اندازه گیری خاصیت ضد میکروبی با غلظت متفاوت آمونیوم سولفات بر حسب (cm)	غلظت سولفات آمونیوم		
	۷۰٪	۶۰٪	۴۰٪
محلول روی	۱/۱۵	۱/۵	۱/۳۵
هاله نه نشین شده	۱/۴	۱/۷۵	۱/۹۵

بعد از تشخیص نوع سویه‌های جداسازی شده و بررسی فعالیت ضد میکروبی آنها بر اساس اندازه گیری قطر هاله‌های عدم رشد سویه‌های حساس انجام شد. در جدول ۳ نتایج این آزمایشات مشاهده می‌شود.

دیالیز باید بطور کامل در داخل بافر سدیم فسفات قرار گیرد چون در غیر این صورت کیسه ترک برمی‌دارد. در انتها اثر ضد میکروبی ماده خالص سازی شده بعد از عمل دیالیز مورد آزمایش قرار گرفت. از مهمترین نتایج این مرحله می‌توان به این نکته اشاره کرد که در طی آزمایش‌های فعالیت ضد میکروبی که قبل از مرحله دیالیز انجام گرفته است مشخص شد که بعد از ۶-۸ ساعت اثر ضد میکروبی کاملاً "مشهود بوده ولی بعد از گذشت زمان اثر آن کم کم ناپدید شده و جای آنرا میکروارگانسیم‌های حساس می‌گیرند. در صورتیکه بعد از انجام مراحل خالص سازی و دیالیز نه تنها بعد از ۶-۸ ساعت بلکه حتی بعد از ۴۸ ساعت نیز این اثر ضد میکروبی باقی می‌ماند.

در این مرحله برای ارزیابی خلوص باکتریوسین‌های بدست آمده و نیز تعیین وزن مولکولی آنها از روش الکتروفورز استفاده شد. لازم به ذکر است به علت وزن مولکولی کم نمونه‌های پروتئینی خالص سازی شده روش Tris-SDS-PAGE برای الکتروفورز انتخاب شد. نمونه‌ها به طور متوسط در طی ۲/۵ ساعت مسیر عمودی ژل را طی کردند. سپس این ژل توسط رنگ کوماسی آبی، رنگ آمیزی شد. در نهایت از هر ۴ نمونه آزمایش شده باندهایی در محدوده ۱۵ kDa بدست آمد و همچنین در سویه شماره ۲ و ۱۱ در ۲ وزن مولکولی متفاوت به ترتیب ۴۰ و ۵۰ kDa نیز باندهایی مشاهده شد.

باتوجه به نتایج بدست آمده از مراحل خالص سازی می‌توان به این نکته اشاره کرد که باکتریوسین‌های تولید شده از ۴ سویه لاکتوباسیل دارای وزن مولکولی در محدوده ۱۵، ۴۰ و ۵۰ kDa بودند و هر ۴ ماده ضد میکروبی تولیدی از ۴ سویه، در دارای وزن مولکولی ۱۵ kDa مشترک بودند. ذکر این نکته ضروری است که نتایج بدست آمده از این آزمایش در توافق با آزمایشات انجام یافته توسط دیگر محققان است (متجاسیک و همکاران ۱۹۹۸؛ میر حسینی و همکاران ۲۰۰۶).

برای بدست آوردن پروتئین‌هایی با درجه خلوص بالا و حذف کردن ناخالصی‌های مربوط به محیط کشت و سلول‌ها، عمل خالص سازی بر روی محلول رویی بدست آمده از کشت سویه‌ها انجام گرفت. در این مرحله پروتئین‌های هر ۴ سویه جداسازی شده که دارای خاصیت ضد میکروبی بودند خالص سازی شدند. برای این آزمایش از مراحل ته‌نشین کردن با سولفات آمونیوم، دیالیز و الکتروفورز TRICINE-SDS-PAGE برای خالص سازی جزئی پروتئین استفاده شد. پروتئین کل توسط دستگاه بیوفتومتر اندازه‌گیری شد. مقدار پروتئین در نمونه های ۲، ۸، ۱۰ و ۱۱ به ترتیب برابر $۳/۰۸۳ \mu\text{g/ml}$ ، $۲/۰۱۲ \mu\text{g/ml}$ ، $۲/۴۶ \mu\text{g/ml}$ و $۱۱/۵۷۰ \mu\text{g/ml}$ بود (کومار و همکاران ۲۰۰۹).

اولین مرحله و یکی از مهمترین مراحل خالص سازی پروتئین‌ها ته‌نشین کردن آنها توسط سولفات آمونیوم می‌باشد. در این آزمایش برای شناسایی غلظت مناسب برای ته‌نشین کردن پروتئین‌ها از غلظت‌های ۴۰٪، ۶۰٪ و ۷۰٪ سولفات آمونیوم استفاده شد. در جدول ۴ نتایج این آزمایش نشان داده شده است. با توجه به جدول ۴ می‌توان نتیجه گرفت که در تمام غلظت‌ها هم در ماده ته‌نشین شده و هم در محلول رویی خاصیت ضد میکروبی دیده می‌شود. بطوریکه در غلظت ۴۰٪ سولفات آمونیوم، خاصیت ضد میکروبی ظاهر شده (بر حسب اندازه قطر هاله عدم رشد) بالا می‌باشد در حالیکه در غلظت ۷۰٪ سولفات آمونیوم مقدار پروتئین ته‌نشین شده نسبت به بقیه غلظت‌ها بیشتر می‌باشد.

در مرحله دیالیز ماده پروتئینی بدست آمده از مرحله ته‌نشین سازی با سولفات آمونیوم، که در بافر فسفات سدیم ۱۰ mM حل و مورد آزمایش قرار گرفت. افزایش حجم داخل کیسه دیالیز بعد از انجام عمل دیالیز ثابت می‌کند که آب خالص وارد کیسه دیالیز شده و سولفات آمونیوم از آن خارج شده است. همچنین مشخص شد که حجم کیسه دیالیز در نظر گرفته شده باید بزرگتر از حجم ماده ته‌نشین شده باشد. در طی انجام عمل دیالیز کیسه

نتیجه‌گیری

از آنجا که امروزه، استفاده از افزودن‌های طبیعی در صنایع غذایی، اهمیت فراوانی یافته است و فراورده‌های میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک، نظیر پروتئین‌هایی با خواص ممانعت‌کنندگی رشد میکروارگانیسم‌ها، به عنوان نگهدارنده به وفور در تهیه غذاهای مختلف به کار می‌روند.

تعداد کم سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک که تولید باکتریوسین می‌کنند می‌تواند دلایل مختلفی داشته باشد که از این دلایل می‌توان شرایط محیطی آزمایشگاه، شرایط گرمخانه‌گذاری، میکروارگانیسم‌های حساس، روش‌های مورد استفاده در شناسایی خاصیت ضد میکروبی سویه‌های جداسازی شده و حساسیت آنها را نام برد.

منابع مورد استفاده

- Adetunji VO and Adegoke GO, 2007. Bacteriocin and cellulose production by lactic acid bacteria isolated from West African soft cheese. *African Journal of Biotechnology* 6: 2616-2619.
- Barefoot SF and Nettles CG, 1993. Antibiosis revisited: Bacteriocins produced by dairy starter cultures. *Journal of Dairy Sciences* 76: 2366-2379.
- Cheikhoussef A, Pogori N, Chen H, Tian F, Chen W, Tang J and Zhang H, 2009. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602. *Food Control* 20: 553-559.
- Contreras BGL, De Vuyst L, Devreese B, Busanyova K, Raymaeckers J, Bosman F, Sablon E and Vandamme EJ, 1997. Isolation, purification, and amino acid sequence of lactobinA, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139." *Applied and Environmental Microbiology* 63: 13-20.
- De Vuyst L and Leroy F, 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13: 194-199.
- Ivanova I, Kabadjova P, Pantev A, Danova S and Dousset X, 2000. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus Lactis* subsp. *Lactis* B14 Isolated from Boza- Bulgarian traditional cereal beverage. *Biocatalysis: Fundamentals & Applications* 41: 47-53.
- Karthikeyan V and Santhosh SW, 2009. Study of bacteriocin as a food preservative and the *L. acidophilus* strain as probiotic. *Pakistan Journal of Nutrition* 8: 335-340.
- Kumar M, Tiwari SK and Srivastava S, 2009. Purification and characterization of enterocin LR/6, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* LR/6. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160: 40-49.
- Matijasic BB and Rogelj I, 1998. Bacteriocins of *Lactobacillus* LF221 strain. *Scientific Symposium on Animal Microbiology- Slovenia* 72: 113-121.
- Mirhosaini M, Nahvi I, Kasra Kemanshahi R and Tavassoli M, 2006. Isolation of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strain from dairy products. *International Journal of Dairy Sciences* 1: 51-56.
- Mojgani N, Ismail Khanian S, Ameli M and Yusefi Amin A, 2006. Detection and characterization of a bacteriocin RN78 produced by *Lactobacillus acidophilus* strain Isolated from a cheese sample. *Pajouhesh and Sazandegi (in Persian)* 71: 36-42.
- Pal V, Jamuna M and Jeevaratnam K, 2004. Isolation and characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria from a south Indian special dosa (Appam) batter. *Journal of Culture Collections* 4: 53-60.
- Parada JL, Caron CR, Medeiros ABP and Soccol CR, 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50: 521-542.

- Schägger H and Von Jagow G, 1987. Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166: 368–379.
- Sneath PHA, Mair NS and Holt JG, 1986. *Berge's manual of systematic bacteriology*, Vol (2). Williams & Wilkins, Baltimore.