مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2013) المجلد (29) ــ العدد 1 ــ الصفحات: 195-205

خصائص البكتريوسين المنتج من *Streptococcusthermophilus* المعزولة من الجبن الأبيض البلدي

عهد أبو يونس[1]

الملخص

هدف البحث إلى تعرّف البكتريوسين المنتج من سلالة من ***Strep. Thermophilus*** المعزولة من الجبن الأبيض البلدي السوري وتعرّف خصائصه. وقد وجدت الدراسة أن البكتريوسين المنتج قادر على تثبيط نمو بكتيريا ***B. cereus***، إلا أن هذه المقدرة تفقد عند معاملة البكتريوسين بدرجة حرارة 100 °م مدة تزيد على 60 دقيقة، كما أنّ هذه المقدرة تفقد بوجود أنزيم بروتيناز k ولا تتأثر بوجود أنزيم البيسين أو التربسين. وقدرتالقيمة الاعتباطية (Arbitrary units)بـ 200 AU/ml.

ووجدت الدراسة أن وزن البكتريوسين المدروس يقدر بنحو 4 KDa، بعد الترسيب بسلفات الأمونيوم، والترحيل على Tricine -SDS –PAGE تركيز 15 %، وعند استخدام تقنية PCR في تعرّف البكتريوسين وإجراء تقنية السكونسر وجد أن البكتريوسين المنتج يتوافق مع بكتريوسين13 Thermophilin.

الكلمات المفتاحية: *Strep. thermophilus*، بكتريوسين، *B. cereus*، بكتيريا حمض اللبن.

[1] قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، ص. ب 30621، دمشق، سورية.

Characteristics of Bactriocin produced from *Streptococcus thermophiles* isolated from native Syrian white cheese

A. Abou Younes[(1)]

ABSTRACT

This research aimed to identify the bacteriocin produced from a strain of Strep. Thermophiles which were isolated from native Syrian white cheese and to identify its characteristics.

The study showed that the produced bacteriocin is able to inhibit the growth of *B.cereus* bacteria, while this ability is lost when handling the bacteriocin with 100 degree for more than 60 minute, and is lost too in the presence of proteinase enzyme k and was affected by the presence of pepsin or trypsin enzymes. The arbitrary unit was estimated by 200 AU/ml.

The study also showed that the weight of the studied bacteriocin was almost 4 KDA and that was after the sedimentation by ammonium sulfate and the deportation of Tricine -SDS –PAGE with 15% concentration. When using the technique of PCR to recognize the bacteriocin and applying the technique of sconsr, it has been found that bacteriocin produce matches with bacteriocine. Thermophilin13.

Key Words: *Strep. thermophiles*, Bacteriocin, *B. cereus*, Lactic acid bacteria.

[(1)] Food Science Dept. Fac. Agr. P.O.Box 30621 Damascus, Syria.

المقدمة

دأب العلماء والباحثين في دراسة آليات التحكم بالعوامل الممرضة والمسببة للفساد في الأغذية؛ وذلك لضمان نوعية الأغذية وسلامتها، وفي السنوات الأخيرة، حدث انخفاض في استعمال الإضافات الكيميائية في التصنيع الغذائي، إذ أصبح استخدام المواد الطبيعية كمواد حافظة أكثر شيوعاً كبديل عن المواد الحافظة الكيميائية، لضمان زيادة مدة صلاحية المنتجات الغذائية (Stiles, 1996). وتعدُّ بكتيريا حمض اللبن من البكتيريا المفيدة التي استخدمت منذ فترة طويلة في عمليات التخمير والتصنيع الغذائي، ولأنّها تنتج عدداً من الأنزيمات والمواد المضادة للبكتيريا الممرضة والمسببة للفساد فهي قادرة على إنتاج الأحماض العضوية وبيروكسيد الهيدروجين H_2O (De Vuyst and Vandamme, 1992)، وتدل الدراسات الحديثة على مقدرة بكتيريا حمض اللبن على إنتاج مركبات بروتينية ذات أوزان جزيئية صغيرة تعرف باسم المضادات البكتيرية أو البكتريوسينات Bacteriocins(Klaenhammer, 1993)، وتتصف بأنّها بروتينات نوعية تجاه أنواع محددة (Stiles, 1996)، ولها القدرة على منع نمو البكتيريا الممرضة كبكتيريا *Clostridium* و *Listeria* وبعض البكتيريا سالبة الغرام (Jack *et al.*, 1995)؛ (McAuliffe *et al.*, 1998)؛ (Bredholt *et al.*, 2001)؛ (Cleveland *et al.*, 2001).

وتعدّ بكتيريا *Streptococcusthermophilus*إحدى أهم بكتيريا حمض اللبن المستخدمة في بادئات الألبان المتخمرة إذ يستخدم في تصنيع اللبن الرائب وبعض أنواع الأجبان (Delcour *et al.*, 1996)؛ (Parente and Cogan, 2004). وخلال السنوات الأخيرة كان هناك عدد قليل من الدراسات تناولت إمكانية إنتاج بكتيريا *Strep. Thermophilus* للبكتريوسينات، فقد عرّف Marciset وزملاؤه عام 1997 مركب Thermophilin 13 المنتج من *Strep. thermophilus*Sif13، كما دُرس Thermophilin A المنتج من بكتيريا *Strep. thermophilus*ST134 (Whitford *et al.*, 2001)؛ (Ward and Somkuti, 1995)، ودُرست خصائص Thermophilic 110 المنتج من *Strep. thermophilus*ST 110 (Gilbreth and Somkuti, 2005)، كما حُدّدت الأحماض الأمينية المكونة لـ Thermophilin 1277 المنتجة من بكتيريا *Strep. thermophilus*SBT 1277 المعزولة من حليب خام (Kabuki *et al.*, 2007)،وعلى الرغم من قلة هذه البحوث إلا أنها أوصت بإمكانية استخدام هذه المركبات كمواد حافظة في الأغذية بشكل عام واللبنية بشكل خاص (Ennahar *et al.*, 2000)؛ (Oumer *et al.*, 2001).

وقد هدف البحث إلى تعرّف البكتيريوسين المنتج من سلالة من *Strep. thermophilus* المعزولة من الجبن الأبيض البلدي السوري ودراسة خصائصه؛ وذلك لمعرفة إمكانية استخدامه في الصناعات المحلية.

مواد البحث وطرائقه

أُجريت الدراسة على سلالة *Strep.thermophilus* عزلت من جبن أبيض بلدي مصنع بالطريقة التقليدية ومن حليب غير معامل حرارياً، انتُقيت من مجموعة عزلات نامية على بيئة M17 وبدرجة 44.5 مْ، وقد جرى التأكد من مَجموعة الخصائص الفيزيولوجية Physiological characterization للسلالة، كما حُدّدت هويتها باستخدام تقنية التفاعل التسلسل البوليمرازي PCR (Polimrase Chain Reaction) (Sambrook and Russell, 2001)؛ (Gilbreth and Somkuti, 2005)، ودرست مقدرة السلالة على تخمير السكريات باستخدام نظام API 50CHL (Analytical Profile Index) (من شركة Bio-Merieux - فرنسا)، ودُرِست مقدرة السلالة على النمو في درجتي الحرارة 10 – 45 مْ، وبدرجات pH مختلفة بحسب (Kaduki *et al.*, 2007).

لدراسة الأثر التثبيطي للسلالة، جرى تعديل لتجربة الانتشار التي قام بها Savadogo وزملاؤه عام 2004، أُجريت تنمية السلالة في أنبوب يحتوي 5 مل من المرق المغذي والتحضين جرى في الدرجة 37 مْ مدة 24 ساعة، بحسب توصية Gilbreth and Somkuti, 2005 لأنّها الدرجة المناسبة لإنتاج البكتريوسين. بعد مرور 24 ساعة تم الحصول على الرشاحة خالية من الكتلة الخلوية بالتثفيل (10000 دورة/ دقيقة، مدة 20 دقيقة، في الدرجة 4 مْ)، ثم قسمت الرشاحة إلى قسمين الأول أُبقي على حاله، والثاني عُدّلت درجة pH إلى 7 بإضافة NaOH 1 نظامي لاستبعاد التأثير التثبيطي الحمضي والتأكد من أنَّ التأثير ناتج عن تأثير بروتينات موجودة في الوسط. بعدها جرت الزراعة على أطباق صلبة من بيئة Nutrient agar من شركة MERCK – إنكلترا، حيث أُدخلت قطنة معقمة إلى داخل أنبوب حاوٍ على بكتيريا *Bacilluscereus* (سلالة منمطة بقسم علوم الأغذية – كلية الزراعة - جامعة دمشق) بعمر 24 ساعة ثم مُسِحَ السطح الجاف للبيئة الصلبة، جرى العمل باستخدام مكررين على الأقل. وقد عُملت أربع حفر بأداة معقمة ضمن طبق الآغار، ووضع 70µl ضمن الحفرة الواحدة. حُضّنت الأطباق في الدرجة 37 مْ مدة 20 ساعة، وبعدها قيس قطر منطقة المنع وتم التعبير عن الطول بالميلي متر ضمن قطر شفاف محيط بالحفرة.

للتأكد من الطبيعية البروتينية لمركبات التثبيط التي تنتجها العزلة دُرست حساسية هذه المركبات تجاه الأنزيمات المحللة للبروتين، وذلك بتنمية سلالة *Strep. thermophilus* على بيئة M17 broth من شركة MERCK – إنكلترا، وحضنت في الدرجة 37 مْ مدة 24 ساعة ثم أخذ 160µl من الرشاحة الناتجة كما هو مبين أعلاه، ثم أضيف إليها أنزيم بروتيناز ك ProtinasK بمقدار 50 µl، ثم حُضّن المزيج على الدرجة 30 مْ مدة 4

ساعات، وأُعيدتْ دراسة التأثير التثبيطي للرشاحة كما ورد سابقاً بطريقة الحفر (Gilbreth and Somkuti, 2005).

دراسة تأثير المعاملة الحرارية المرتفعة والأنزيمات في خصائص البكتريوسين التثبيطية: دُرسَ تأثير درجات الحرارة المرتفعة 100 ْم في البكتريوسين المنتج من سلالة *Strep. thermophilus* ضمن حمام مائي مدداً زمنية مختلفة (5-10-15-30-45-60-90 و120 دقيقة) ثم دُرس الاثر التثبيطي في الآغار بطريقة الحفر (Gilbreth and Somkuti, 2005). كما دُرِسَ تأثير الأنزيمات المحللة للبروتين في البكتريوسين بعد تنمية السلالة في مرق مغذ والتحضن في الدرجة 37 ْم مدة 24 ساعة (بحسب توصيات Gilbreth and Somkuti, 2005 لأنّها الدرجة المناسبة لإنتاج البكتريوسين) إذ أُخذَ 160µl من الرشاحة تم الحصول عليها بعد إجراء فلترة للطافي الناتج عن التثفيل ثم يضاف إليها على حدة 50µl من الببسين و50µl من التربسين، ثم يُحضّن المزيج على الدرجة 30 ْم مدة 4 ساعات ثم دُرس الأثر التثبيطي للبكتريوسين بطريقة الحفر (Gilbreth and Somkuti, 2005).

تقدير القيمة الاعتباطية للبكتريوسين (Arbitrary units) (Marcise*et al.*, 1997): وهي القيمة التقريبية لقوة البكتريوسين، بطريقة الآبار، وذلك بنشر 0.1 مل من بكتيريا *B.cerues* على طبق من Nutrient agar بواسطة أداة معقمة، ثم تُعمل حفر بقطر 6 ملم ليوضع ضمنها 70µlمن الرشاحة ضمن الحفر، ثم توضع الأطباق مدة ساعة ونصف ضمن البراد، بعدها يجري التحضين بالدرجة 30 درجة مدة 24 ساعة، ليقاس بعدها منطقة المنع والتثبيط أو الهالة المحيطة بالحفر والخالية من النمو ويقاس بالميلي متر. وتُطبّق المعادلة الآتية: AU/ml= AU/70×1000

معرفة وزن الجزيئيللبكتريوسين:جرى على الرشاحة المعدلة الحموضة، حيث رُسّب البكتريوسين باستخدام سلفات الأمونيوم تركيز 80% طوال الليل بدرجة حرارة 10 ْم (Savadogo *et al.*, 2004)، وجرى الترحيل على Tricine-SDS –PAGE تركيز 15% (بحسب Schagger and Von Jagow, 1987)، وبوجود ماركر بأوزان مختلفة (molecular weight marker) من شركة Bio-Rad - ألمانيا. وبعد الانتهاء من الترحيل أُجريت عملية التلوين باستخدام أزرق كومازي Coomasei brilliant blue 250R (Daba *et al.*, 1991).

عزل البلاسميد وتحديد مورثة البكتريوسين (Kabuki *et al.*, 2007): عُزل بلاسميد بكتيريا Strep. thermophilus باستخدام الكيت المصغر الجاهز Plasmid Midi Kit من شركة QIAGEN – اليابان. حيث نميت البكتيريا على الدرجة 44.5 ْم (لأنّها الدرجة المناسبة لنمو البكتيريا بحسب توصيات Gilbreth and Somkuti, 2005) مدة 24 ساعة، جمعت البكتيريا بالتثفيل (10000 دورة/ دقيقة، مدة 20 دقيقة، في الدرجة 4 ْم) وجرى

التخلص من الرشاحة، وأضيف 700 µl محلول P1 المضاف إليه أنزيم الليزوزيم (10 ملغ/مل)، و700 µl من TE (المكون من $10\ mmol\ l^{-1}$Tris–HCl، pH 8، 1 mmol l^{-1} EDTA). إضافة 750 µl من محلول PCI المكون من 25: 24: 1 من الفينول Phenol: كلوروفورم Chloroform: كحول إيزو اميل Isoamyl alcohol، على التوالي. ثم يجري التثفيل 10000 دورة/دقيقة مدة 5 دقائق، ثم أُخذ الطافي. ليغسل بكحول إتيلي 70% بارد. ثم يعاد التثفيل مرة أخرى ويجري التخلص من الطافي ويجفف الراسب للتخلص من أثر الكحول الاتيلي، ثم يُحل الراسب بواسطة 20 µlTE.

من أجل التأكد من المورثة المنتجة للبكتريوسين المدروس، استُعين بالمورثة المسؤولة عن إنتاج البكتريوسين Thermophilin 13 والمدروسة من قبل (Marciset *et al.*, 1997) وحُضّر زوجا مرئسات بالاستعانة ببرنامج Vactor 9، فاستخدم زوج المرئسات، زوج المرئس الأول مكون من A1: 5'-AAAGTCTTTTATCGCTTTTATTATTCA-3' و RA1: 5'-TAAGAGGAGCTACCCCAGCA-3' لحصر شدفة بطول 150 bp، وزوج المرئس الثاني المكون من A2 5'-TTTATCGCTTTTATTATTCATAATTCC-3' و RA2: 5' -AGATAAGAGGAGCTACCCCAGCA- 3' لحصر شدفة بطول 50bp.

ومن أجل إجراء تفاعل PCR حضر مزيج بحجم 25 µl، احتوى على 2µl من معلق DNA، فضلاً عن 2.5 µl من المحلول الموقي (Reaction Buffer 10X)، 3µl من كلوريد المغنيزيوم $MgCl_2$ (50nM)، 0.5µl من مزيج من النكليوتيدات (dNTP) (بتركيز نهائي في التفاعل 1p.mol/µl) من شركة Eurobio - فرنسا، 2µl من مزيج زوج المرئسات، و1µl من أنزيم البوليمراز (DNA polymerase)، وأكمل الحجم باستخدام ماء مقطر.

اعتمد برنامج التفاعل التسلسلي للبوليمرازPCR باستخدام جهاز PCR من شركة.GENE Amp - PCR system 9700 - أمريكا، وقد تكون البرنامج من 30 دورة، وقد شمل البرنامج مرحلة التمسخ (Denaturation)94 ْم مدة 45 ثانية، ومرحلة الالتحام (Annealing) 60 ْم مدة 45 ثانية، ومرحلة الاستطالة (Extension) 72 ْم مدة 45 ثانية، كما تضمن برنامج التحضين عند الدرجة 92 ْم مدة 10 دقائق دورة واحدة، وفي نهاية الدورات حضنت المحتويات عند الدرجة 72 ْم مدة 10 دقائق كمرحلة استطالة نهائية (Final extension)، وحُفظت نواتج التفاعل عند الدرجة 4 ْم. رُحلت نواتج التفاعل على هلام آغاروز (Agarose gel) تركيزه 1.5% في محلولTris – EDTA (TE) من شركة Eurobio - فرنسا، كما استُعين بعياري الوزن الجزيئي للدنا (DNA Marker) من شركة –Eurobio فرنسا. وقد استخدم جهاز الرحلان الكهربائي (Electrophorese) من شركة BIO RAD- أمريكا، بجهد (فرق كمون) 85 فولطاً، وشدة تيار 150 أمبيراً

مدة ساعة، وبعد انتهاء المدة درست الحزم المتشكلة وحللت الصور باستخدام جهاز gel Doc من شركة–UVITEC أنكلترا.

النتائج والمناقشة

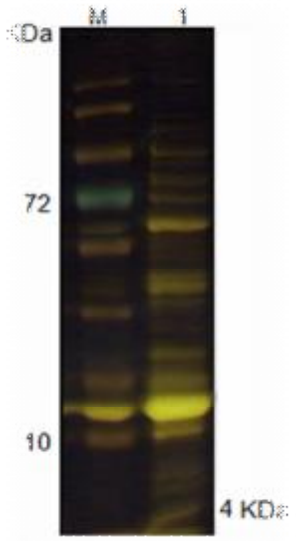
أُجريت الدراسة على سلالة *Strep. thermophilus* المعزولة والمنتقاة من 70 عزلة عُزلت على بيئة M17 بالدرجة 44.5 مْ عزلت من جبن أبيض بلدي المصنع بالطريقة التقليدية ومن حليب غير معامل حرارياً، وبعد التأكد من هويتها باستخدام تقنية PCR وتعرّف خصائصها في تخمير السكريات باستخدام نظام API 50CHL. أُجريت الدراسة على مقدرة هذه السلالة على إعطاء أثر تثبيطي تجاه بكتيريا *B. cereus* على طبق الآغار المغذي باستخدام الطريقة المعدلة من طريقة الانتشار التي قام بها Savadogo وزملاؤه 2004، وقد وجدت أنّ السلالة قادرة على إعطاء قطر منطقة تثبيط 14 ملم حول منطقة الحفرة، ولم يتغيّر قطر هذه الهالة عند تعديل الرشاحة باستخدام NaOH 1 ن، إلا أن هذه الهالة لم تظهر عند معاملة الرشاحة بوجود أنزيم بروتينازك.

نتائج دراسة تأثير المعاملة الحرارية المرتفعة والأنزيمات: لوحظ أنه عند دراسة تأثير درجة الحرارة 100 مْ في البكتريوسين المنتج من قبل سلالة *Strep. thermophilus* باستخدام مدد زمنية مختلفة (5-10-15-30-45-60-90 و120 دقيقة)، وجد أن البكتريوسين فقد مقدرته التثبيطية في الزمن 60 دقيقة وأكثر، وهذا يخالف ما ورد في دراسة (Gilbreth and Somkuti, 2005) إذ إنَّ البكتريوسين المدروس احتفظ بمقدرته التثبيطية حتى 60 دقيقة.

وعند دراسة تأثير استخدام الأنزيمات البيسين والتربسين لم يلاحظ أي تأثير في الأثر التثبيطي للبكتريوسين. وهذا يتوافق مع دراسة (Gilbreth and Somkuti, 2005).

أما القيمة الاعتباطية للبكتريوسين المدروس فتكون بعد تطبيق المعادلة التي اوردها (Marciset *et al.*, 1997) بعد إضافة 70 µl للحفرة ــ 200AU/ml.

معرفة وزن البكتريوسين: قُدّر وزن البكتريوسين المدروس والمعزول من رشاحة بكتيريا *Strep. thermophilus*، وبعد الترسيب باستخدام سلفات الأمونيوم، والترحيل على Tricine -SDS –PAGE تركيز 15%، بنحو 4 KDa وقد ظهر البكتريوسين بشكل مائل نتيجة طبيعة البكتريوسين نفسه بحسب ملاحظات كل من Kabuki *et al.*, 2007 وGilbrethand Somkuti, 2005، وتظهر الصورة (1) صورة الجيل.

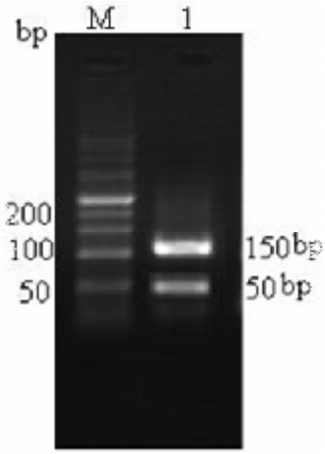


الصورة (1)

تبيّن المسار 1 يوضح ترحيل رشاحة بكتيريا *Strep.thermophilus* بعد الترسيب بسلفات الأمونيوم 80%، M ماركر بأطوال مختلفة مميز بطولين 72 و10 KDa

يقترب البكتريوسين المدروس والمعُزل بهذه الدراسة بالطول ممّا ذكره Kabuki وزملاؤه عام 2007 بدراستهم إذْ ذكروا أن طول Thermophilin 1277 نحو 3.7 KDa، وأكد Gilbrth and Somkuti, 2005 بدراستهما أن طول Thermophilin 110 نحو 4 KDa.

عند استخدام خليط المرئسات لتعرّف المورثة المنتجة للبكتريوسين بحسب Marciset *et al.*, 1997 والترحيل على هلام أغاروز 1.5 % تم الحصول على شدفتين اختلفت بأطوالها، كما هو موضّح بالصورة (2).



الصورة (2)

صورة لترحيل نتائج تفاعل PCR على هلام أغاروز 1.5% حيث يظهر المسار 1 نواتج التفاعل موضحة بشدفتين الأولى بطول 50 bp والثانية بطول 150bp، في حين أن M هو ماركر بأطوال مختلفة

وبالاعتماد على أزواج المورثات المصممة سابقاً أُجريت عملية سكونسر من أجل التأكد من القطعة الناتجة فلم يلاحظ أي اختلاف عما قام بنشره Marciset وزملاؤه عام 1997، ومن ثم من الممكن الاستنتاج أن فعل التضاد الناتج من بكتيريا *Strep .thermophilus* المعزولة من الجبن المصنع بالطريقة التقليدية ناتج عن وجود بكتريوسين، ويتوافق مع بكتريوسين13 Thermophilin.

الاستنتاجات

1 – تمتلك بكتيريا *Strep .thermophilus* فعلاً تثبيطياً لنمو بكتيريا *B.cereus* ونشاطها.

2 – الفعل التثبيطي ناتج عن وجود بكتريوسين طوله نحو 4 KDa.

3 – هذا البكتريوسين يشابه في تسلسل المورثة المنتجة له، من ثمّ تسلسل الأحماض الأمينية له بكتريوسين13 Thermophilin.

لابدّ في نهاية الدراسة من تأكيد ضرورة متابعة دراسة البكتريوسين الناتج، ودراسة أفضل شروط إنتاج لاستخدامه كمادة حافظة للأغذية، ومنها دراسة درجة الحرارة المُثلى لإنتاج البكتريوسين ودرجة pH المُثلى.

REFERENCES المراجع

Bredholt, S., Nesbakken, T. and Holck, A. (2001). Industrial application of an antilisterial strain of Lactobacillus sakei as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. Int J Food Microbiol 71, 191–196.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nesr, I.F. and Chikindas, M. L. (2001). "Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int J Food Microbiol 71, 1–20.

Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J.F., Simard, R.E., Huang, J. and Lacroix, C. (1991). "Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostocmesenteroides"* Appl Environ Microbiol 57, 3450–3455.

De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. (1992). "Influence of the carbon source on nisin production in Lactococcuslactis subsp. lactis batch fermentations" J General Microbiol 138, 571–578.

Delcour, J., Ferain, T. and Hols, P. (1996). "Advances in the genetics of thermophilic lactic acid bacteria". CurrOpinBiotechnol 70, 497–504.

Ennahar, S., Sashihara, T., Snomoto, K. and Ishizaki, A. (2000). "Class IIabacteriocins: biosynthesis, structure and activity." FEMS Microbiol Rev 24, 85–106.

Gilbreth S.E. and Somkuti, G. A. (2005). "Thermophilin 110: Abacteriocin of *Streptococcusthermophilus* ST110" Current Microbiology 51:175- 182.

Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. (1995) Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol Rev 59, 171–200.

Kabuki, T., Saito, T., Kawai, Y., Uemura, J. and Itoh, T. (1997). "Production, purification and characterization of reutericin 6, a bacteriocin with lytic activity produced by lactobacillus reuteri LA6. Int J Food Microbiol 34, 145–156.

Kaduki, T., Venishi, H., Watanabe, M., Seto,Y., and Nakajima, H. (2007). "Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcusthermophilus* SBT 1277" Journal of Applied Microbiology. 102: 971-980.

Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev 12, 39–85.

Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M.C., Mollet, B. and Poolman, B. (1997). Thermophilin 13, a nontypicalantilisterialporation complex bacteriocin that functionswithout a receptor. J BiolChem 43, 14277– 14284.

McAuliffe, O., Hill, C. and Ross, R. P. (1998). Inhibition of Listeria monocytogenes in cottage cheese manufactured with a lacticin 3147-producing starter culture. J ApplMicrobiol 64, 251–256.

Oumer, A., Gaya, P., Fernandez-Garcia, E., Mariace R., Garde, S., Medina, M., and Nunez, M. (2001). "Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with a bacteriocin producing adjunct culture" Journal of dairy research. 68:117-129.

Parente, E. and Cogan, T. M. (2004). Starter cultures: general aspects. In CHHESE, Chemistry, Physics and Microbiology, Third Edition ed. Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. and Guinee, T. P. pp. 123–148. London: Elsevier Academic Press.

Sambrook, J., and Russell D. (2001). "Molecular cloning. A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory, New York.45-75

Savadogo A., Ouattara C., Bassole I. H. and Traore A. S. (2004). "Antimicrobial Activities of *Lactic Acid Bacteria* Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk" Pakistan Journal of Nutrition. 3(3):174-179

Schagger, H. and von Jagow, G. (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa" Anal Biochem 166, 368–379.

Stiles, M. E. (1996). "Biopreservation by *lactic acid* bacteria" Antonie Van Leeuwenhoek 70, 331–345.

Ward, D. J and Somkuti, G. A. (1995). "Characterization of a bacteriocin produced by Streptococcus thermophilus ST134". ApplMicrobiolBiotechnol 43, 330–335.

Whitford, M. F., McPherson, M. A., Forster, R. J. and Teather, R. M. (2001). "Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen Streptococcus spp. and isolation and characterization of bovicin 255. Appl Environ Microbiol 67, 569–574.

Received	**2012/08/01**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2012/12/19**	**قبول البحث للنشر**