جداسازی و شناسایی سویه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* تولید کننده نایسین از پنیر لیقوان

خسرو محمدی

۱. گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
نویسنده مسئول مکاتبات: mohammadi@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۵/٤/۲۷ پذیرش نهایی: ۹۵/٦/۱۹)

چکیده

در این مطالعه سویه‌هایی از باکتری‌های اسید لاکتیک با قابلیت تولید باکتریوسین از نمونه‌های پنیر لیقوان جداسازی شدند. در ابتدا از ١٦ جدایه *لاکتوکوکوس لاکتیس* شناسایی شده، چهار جدایه از نظر فنوتیپی به‌عنوان تولید کننده باکتریوسین تعیین شدند. جدایه‌ها با روش لکه‌گذاری روی آگار بر رشد باکتری‌های گرم مثبت بیماریزای غذایی شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *کلستریدیوم پرفرینجنس* و *لیستریا مونوسیتوجنز* اثر بازدارندگی نشان دادند. در جدایه‌های انتخاب شده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن کد کننده نایسین مثبت بود. سویه‌ها مواد ضدباکتریایی مقاوم به آنزیم آلفا آمیلاز اما حساس به تریپسین و پروتئیناز K تولید کردند. مقاومت حرارتی با تحمل ۱۰۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ دقیقه مشخص شد. فعالیت ضدباکتریایی وابسته به pH بود و در pH ۳ و ٦ مشاهده شد اما در pH ۹ تا حد زیادی کاهش یافت. پس از تیمار با SDS، Tween 20، Tween 80، Triton X-100، اوره و EDTA هیچ کاهشی در فعالیت ضدباکتریایی مشاهده نشد. طبق نتایج، این جدایه‌ها قابلیت استفاده در مواد غذایی به‌عنوان نگه‌دارنده بیولوژیکی را دارند.

واژه‌های کلیدی: *لاکتوکوکوس لاکتیس*، باکتریوسین، نایسین، نگه‌دارنده بیولوژیکی، پنیر لیقوان

مقدمه

لاکتوکوکوس‌ها یک گروه مهم از باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که به‌طور گسترده‌ای برای تولید محصولات لبنی تخمیری مورد استفاده قرار می‌گیرند. اعضای جنس *لاکتوکوکوس* به‌وفور از گیاهان، شیر و مواد غذایی تخمیری جداسازی شده‌اند. این ارگانیسم‌ها از طریق جیره غذایی دام و از منابع خارج پستانی در حین شیردوشی به شیر راه پیدا می‌کنند (Dworkin *et al.*, 2006). ارزیابی میکروفلور لاکتیکی در پنیرهایی که از شیر خام تهیه می‌شوند اهمیت ویژه‌ای دارد زیرا این نوع پنیرها همواره حاوی تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌های فراسودمند می‌باشند (Corroler *et al.*, 1998). علاوه بر این، صنعت لبنیات بر پایه تعداد محدودی از کشت‌های آغازگر استوار است (Marshall, 1991) و تقاضای روزافزون برای سویه‌های جدیدتر با قابلیت‌های ویژه وجود دارد (Marshall, 1991; Forde and Fitzgerald, 1999). در دهه اخیر تلاش وافری برای شناسایی ویژگی‌های بیوشیمیایی، ژنتیکی و تکنولوژیکی سویه‌های وحشی لاکتوکوکوس‌های جداسازی شده از پنیرهای محلی انجام شده است (Corroler *et al.*, 1998; Gaya *et al.*, 1999; Sanchez *et al.*, 2000; Mannu and Paba, 2002).

پنیر لیقوان پنیری نرم (دارای حدود ۶۰ درصد رطوبت) می‌باشد که با استفاده از شیر خام گوسفند و یا با مخلوط شیر بز تا ۳۰ درصد در دهکده لیقوان از توابع تبریز به روش سنتی تهیه می‌شود و به لحاظ خوش‌طعم بودن از مقبولیت زیادی برخوردار است. در تهیه پنیر لیقوان از مایه کشت آغازگر استفاده نمی‌شود و تخمیر آن توسط باکتری‌های لاکتیکی موجود در شیر خام انجام می‌شود. خصوصیات کیفی و حسی پنیر نظیر بافت، بو و طعم نیز به عوامل مهمی از جمله به نوع شیر، کیفیت میکروبی آن، تکنولوژی به‌کار رفته در ساخت پنیر و شرایط رسیدن آن بستگی دارد (Hanifian and Khani, 2012).

در تخمیر که فرآیندی ناشی از فعالیت بیولوژیکی میکروارگانیسم‌ها است ضمن رشد میکروارگانیسم‌ها، متابولیک‌های 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 محافظت کننده‌های بیولوژیکی (biopreservative) می‌نامند (Ammor *et al.*, 2006). از جمله ترکیباتی مانند اسیدهای آلی، دی استیل، هیدروژن پراکساید و نیز باکتریوسین‌ها که در طی تخمیر لاکتیک توسط لاکتوکوکوس‌ها تولید می‌شوند (Mead *et al.*, 1999; Mirdamadi *et al.*, 2015; Tafreshi *et al.*, 2010).

باکتریوسین‌ها، پپتیدها و یا پروتئین‌های ریبوزومی خارج سلولی با فعالیت باکتری‌کشی (Bactricidal) و یا بازدارنده رشد باکتری (Bacteriostatic) می‌باشند. آن‌ها به‌طور کلی بر غشاء سیتوپلاسم اثرگذار هستند و با ایجاد نیروی حرکتی پروتون باعث تشکیل حفره‌هایی در غشاء دو لایه فسفولیپیدی می‌شوند. طیف فعالیت ضعیف آن‌ها و مشخصه پروتئینی بودن این ترکیبات، آن‌ها را از آنتی‌بیوتیک‌ها متمایز ساخته است (Mirdamadi *et al.*, 2015). اگرچه ممکن است بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی قادر به تولید باکتریوسین باشند اما از آن‌جایی‌که باکتری‌های لاکتیک با منشأ غذایی، بی‌ضرر

می‌باشند Generally regarded as safe (GRAS)، بنابراین تمایل بیشتری برای استفاده از این باکتری‌ها و یا باکتریوسین‌های آن‌ها در تولید و نگهداری مواد غذایی وجود دارد (Topisirovic *et al*., 2006).

نایسین یک نوع باکتریوسین می‌باشد که ماهیت پلی‌پپتیدی داشته و توسط بعضی از سویه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* تحت گونه *لاکتیس* تولید می‌شود. این ترکیب به‌عنوان یک افزودنی ایمن (GRAS) تأیید شده و تنها باکتریوسین خالص‌سازی شده است که به‌صورت تجاری موجود بوده و به‌عنوان نگه‌دارنده مواد غذایی در بیش از ۵۰ کشور مورد استفاده است (Bari, *et al*., 2005). این ترکیب دارای دامنه عملکرد وسیع بر روی باکتری‌های گرم مثبت و اسپورهای باکتری‌های مقاوم به حرارت مانند *کلستریدیوم بوتولینوم* و باکتری‌های بیماریزای غذایی مانند *لیستریا مونوسیتوجنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* یا *باسیلوس سرئوس* می‌باشد (Brewer *et al*., 2002; Lopez-Pedemonte *et al*., 2003; Sobrino-Lopezand and Martin-Belloso,2006).

کاربرد باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسین و یا باکتریوسین خالص‌سازی شده آن‌ها مورد توجه است زیرا جداسازی و شناسایی گونه‌های قادر به تولید باکتریوسین و ذخیره‌سازی و نگهداری آن‌ها جهت استفاده در محصولات لبنی منجر به تولید محصولات ایمن خواهد شد. لذا هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی لاکتوکوکوس‌های تولید کننده باکتریوسین نایسین و ردیابی مولکولی ژن‌های کد کننده نایسین در جدایه‌های *لاکتوکوکوس* از پنیر لیقوان بود.

مواد و روش کار

- جداسازی سویه‌های لاکتوکوکوس

چهار نمونه پنیر لیقوان از روستای لیقوان در استان آذربایجان شرقی تهیه و در کنار یخ خشک در دمای ٤ °C به آزمایشگاه منتقل گردید. به‌منظور جداسازی گونه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس*، مقدار ۱۰ گرم از هر نمونه پنیر در کیسه‌های زیپ‌دار استریل حاوی ۹۰ میلی‌لیتر مایع رقیق کننده پنیر (کلرید سدیم ۰/۵ درصد، کازیتون ۱ درصد و سیترات سدیم ۲ درصد) توزین شده و به‌مدت ۲ دقیقه در استومیکر همگن گردید. به‌منظور تهیه سوسپانسیون یکنواخت به‌مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب ۳۷ °C گرماگذاری شد. پس از تهیه رقت‌های سریال، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت در سطح دو پلیت حاوی محیط کشت M17 آگار (Merck) پخش گردید و در دمای ۳۰ °C به‌مدت سه روز در شرایط هوازی گرماگذاری شد (Hanifian and Khani 2012).

- آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

پس از چند بار پاساژ دادن کلونی‌های رشد کرده در محیط M17 آگار و خالص‌سازی آن‌ها، سویه‌ها از نظر مورفولوژی، رنگ‌آمیزی گرم و تست کاتالاز مورد شناسایی اولیه قرار گرفتند. سپس با استفاده از آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی تکمیلی بر روی آن‌ها انجام گرفت. از جمله: رشد در دماهای ۱۰، ٤٠ و ٤٥ °C، رشد در نمک ٤ و ٦/٥ درصد، رشد در pH ۹/۲، رشد در حضور ۰/۱ درصد متیلن بلو در شیر، هیدرولیز آرژنین، تولید CO2 از سیترات، تولید دی‌استیل و استوئین، تخمیر مالتوز و هیدرولیز نشاسته (Dworkin, *et al*., 2006). سویه‌ها پس از شناسایی در

M17 broth (Merck) حاوی گلیسرول (v/v ٪۲۰) در ۷۰- °C نگهداری شدند.

- سنجش طیف اثر باکتریوسین

قابلیت تولید باکتریوسین توسط جدایه‌ها روی شش ارگانیسم جدول (۱) با استفاده از روش لکه‌گذاری روی آگار (agar spot test) انجام شد (Todorov, 2008). در این روش سویه‌های جداسازی شده در داخل محیط کشت MRS broth در ۳۷ °C به‌مدت ۲٤ ساعت گرماگذاری شدند. سپس کشت‌ها در ۱۰۰۰۰rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ °C سانتریفیوژ و محلول رویی جدا شد. برای پیشگیری از اثر بازدارندگی اسید لاکتیک، pH مایع رویی فاقد سلول با محلول استریل هیدروکسید سدیم ۱ مولار روی ٦ تنظیم شد. سپس به‌منظور غیرفعال سازی پروتئازهای خارج سلولی و پراکسید هیدروژن، به‌مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۸۰ °C قرار گرفت و در نهایت از فیلتر میلی‌پور (۰/۲۲ میکرون) عبور داده شد (Todorov, 2008). میکروارگانیسم‌های شاخص در غلظت نهایی حدود ۱۰^{۵} cfu/ml در داخل محیط‌های کشت تلقیح شده و در پلیت‌ها ریخته شد. ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی فاقد سلول در سطح پلیت‌ها قرار داده شد و به‌مدت ٤۸-۲٤ ساعت در دمای توصیه شده گرماگذاری شدند جدول (۱). هاله‌های عدم رشد بزرگ‌تر از ۵ میلی‌متر به‌عنوان مثبت در نظر گرفته شدند (Todorov, 2008).

جدول (۱)- ارگانیسم‌های مورد آزمایش، نوع محیط کشت و شرایط گرماگذاری جهت تعیین فعالیت ضدباکتریایی جدایه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس*

ارگانیسم‌های مورد آزمایش	محیط کشت	دمای گرماگذاری (درجه سلسیوس)
L. monocytogenes PTCC 1298	BHI	۳۷
S. aureus ATCC 13565	BHI	۳۷
B. cereus PTCC 1015	BHI	۳۰
C. Perfringens PTCC 1765	BHI	۳۷ (جار بی‌هوازی)
E. coli PTCC 1399	TSBye	۳۷
Salmonella enterica serovar Paratyphi A (PTCC 1230)	TSBye	۳۷

TSBye: Tryptic Soy Broth Yeast Extract (Merck); BHI: Brain Heart Infusion (Merck).

- شناسایی ژن بیوسنتز نایسین

یک میلی‌لیتر از کشت جدایه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* در ۱٤۰۰۰ g به‌مدت دو دقیقه سانتریفوژ شد و سپس پلت DNA حاصله با استفاده از کیت (Cinnapure-DNA) استخراج شد. الیگونوکلئوتیدها در محدوده ۱۷ جفت باز ارائه شده‌اند (Rodríguez *et al.*, 1995) جدول (۲). پرایمر توسط شرکت سیناژن سنتز گردید و در حجم نهایی ۱۰۰ pmol/µl در آب مقطر استریل مخلوط شد.

جدول (۲)- توالی پرایمر مورد استفاده در این مطالعه

ژن باکتریوسین	توالی پرایمر	اندازه قطعه (bp)	سویه مرجع
Nisin	nisF 5'-AAGAATCTCTCATGAGT-3' nisR 5'-CCATGTCTGAACTAACA-3'	۹۰۰	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DY13

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در میکروتیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری طبق روش هاینک و همکاران انجام شد (Hyink *et al.*, 2005). ۰/۳ میکرولیتر DNA الگو، ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix (2x)، ۱ میکرولیتر پرایمر (ده پیکومول در میکرولیتر) با یکدیگر مخلوط شده و با آب دو بار تقطیر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. واکنش در ۳۰ چرخه طبق جدول (۳) انجام گردید.

جدول (۳)- مراحل انجام واکنش PCR

ردیف	مرحله	دما (درجه سلسیوس)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه‌ها
۱	واسرشته‌سازی اولیه	۹۵	۱	۱
۲	واسرشته‌سازی	۹۵	۱	۳۰
	اتصال	۵۵	۱	
	بسط	۷۲	۱	
۳	بسط نهایی	۷۲	٤	۱

محصول واکنش در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی (Sinaclon) DNA safe stain (۳ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ژل آگارز) با ولتاژ ۱۰۰ به‌مدت ٤۰ دقیقه الکتروفورز گردید. سپس در دستگاه عکس‌برداری از ژل (UVItec, UK) زیر نور UV بررسی شد.

- تأثیر آنزیم، دما، pH و دترجنت‌ها بر فعالیت ضدباکتریایی

حساسیت مواد ضدباکتریایی تولید شده از جدایه‌ها به آنزیم‌های پروتئولیتیک و سایر آنزیم‌ها آزمایش شد. مقادیر ۱۰۰ میکرولیتری از مایع رویی فاقد سلول حاصل از کشت ۲٤ ساعته سویه‌های تولید کننده باکتریوسین (روش تهیه توضیح داده شد) در مجاورت آنزیم‌های پروتئیناز K (Sinaclon)، تریپسین و آلفا آمیلاز (Sigma) در غلظت نهایی ۱ mg/ml در دمای °C ۳۷ به‌مدت ۲ ساعت گرماگذاری شدند. متعاقباً با تیمار حرارتی در دمای °C ۱۰۰ به‌مدت ۲ دقیقه آنزیم‌ها غیرفعال شدند. مقاوت حرارتی مواد ضدباکتریایی، با گرماگذاری مایع رویی فاقد سلول در دمای ٦۰ و °C ۱۰۰ به‌مدت ۳۰ و ٦۰ دقیقه و دمای اتوکلاو در °C ۱۲۱ به‌مدت ۱۵ دقیقه ارزیابی شد.

برای تعیین اثر pH بر پایداری ماده ضدباکتریایی، مایع رویی فاقد سلول با اسید کلریدریک یا هیدروکسید سدیم ۱ مولار به pH های ۳، ٦ و ۹ تنظیم شد و به‌مدت ۲ ساعت در دمای °C ۳۷ گرماگذاری شد. پس

از تنظیم مجدد pH روی ٦، فعالیت ضدباکتریایی آزمایش شد.

در آزمایش جداگانه مایع رویی فاقد سلول جدایه‌ها با دترجنت‌های SDS، tween 20، Tween 80، Triton X-100 و اوره (در غلظت ١٪) و بازدارنده پروتئاز EDTA در غلظت‌های ٠/١، ٢ و ٥ میلی‌مولار مخلوط شدند. باکتریوسین‌های تیمار نشده و محلول دترجنت‌ها و FDTA به‌عنوان کنترل استفاده شد. همه نمونه‌ها به‌مدت ٥ ساعت در دمای ٣٧ °C گرماگذاری شده و سپس فعالیت ضدباکتریایی روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس طبق روش لکه‌گذاری روی آگار ارزیابی شد (Todorov, 2008).

- لیز سلولی

توانایی باکتریوسین‌های تولید شده توسط جدایه‌های مورد نظر در انهدام دیواره سلولی با افزودن ٢٠ میلی‌لیتر از مایع رویی خنثی و استریل شده (فیلتراسیون از طریق فیلتر میلی‌پور ٠/٢٢ میکرون) به ١٠٠ میلی‌لیتر کشت فعال *استافیلوکوکوس اورئوس* در ابتدای فاز رشد لگاریتمی (OD_{600nm}=٠/١) و گرماگذاری در ٣٧ °C انجام شد. جذب نوری در هر ساعت به‌مدت ١٢ ساعت توسط اسپکتروفتومتری (S 2100 Diode Array spectrophotometer) اندازه‌گیری شد. کشت میکروارگانیسم مورد آزمایش (*استافیلوکوکوس اورئوس*) بدون افزودن باکتریوسین به‌عنوان کنترل استفاده شد. اثر باکتریوسین‌ها با روش رقیق‌سازی و به‌صورت واحد در میلی‌لیتر (AU/ml) بیان شد. کنترل‌های موازی با نایسین ٢٥ mg/ml (Sigma) انجام شد (Todorov, 2008).

یافته‌ها

- شناسایی جدایه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس*

براساس ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از چهار نمونه پنیر در مجموع ١٦ سویه به‌عنوان *لاکتوکوکوس لاکتیس* تحت گونه *لاکتیس* انتخاب شدند. سویه‌ها قادر به رشد در دمای ١٠ °C، ٤٠ °C، غلظت ٤ درصد کلرید سدیم، pH ٩/٢، شیر حاوی ٠/١ درصد متیلن بلو، غلظت ٤٠ درصد صفرا و دآمیناسیون آرژنین بودند. اما قادر به رشد در دمای ٤٥ °C، غلظت ٦/٥ درصد نمک، هیدرولیز نشاسته، تولید CO2 از سیترات، دی‌استیل و استوئین نبودند.

- قابلیت تولید باکتریوسین

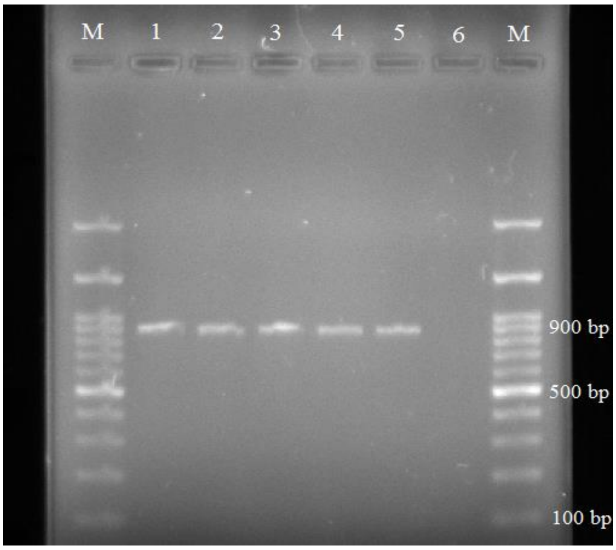
حدود ٢٥ درصد از جدایه‌هایی که از نظر تولید باکتریوسین غربالگری شدند، باکتریوسین مثبت بودند و از میان ١٦ سویه انتخاب شده چهار سویه مواد ضدباکتریایی تولید کردند که رشد طیف وسیعی از ارگانیسم‌های گرم مثبت را متوقف کردند جدول (٤).

جدول (٤)- دامنه فعالیت ضدباکتریایی مایع رویی جدایه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* به روش لکه‌گذاری روی آگار (میلی‌متر هاله عدم رشد)

ارگانیسم	Lcl03	Lcl04	Lcl07	Lcl10
S. aureus ATCC 13565	۸	۱۱	۱۵	۱۰
B. cereus PTCC 1015	۵	۷	۱۰	۱۱
C. Perfringens PTCC 1765	۱۰	۸	۱۲	۷
L. monocytogenes PTCC 1298	۵	–	۸	۷
E. coli PTCC 1399	–	–	–	–
Salmonella enterica serovar *Paratyphi A* (PTCC 1230)	–	–	–	–

– ردیابی مولکولی ژن‌های کدکننده نایسین

براساس نتایج به‌دست آمده از فعالیت ضدباکتریایی، چهار جدایه (lcl03، lcl04، lcl07 و lcl10) که دارای بیشترین هاله عدم رشد بودند، برای ردیابی ژن‌های نایسین به روش PCR انتخاب شدند. پرایمر مورد استفاده ژن کد کننده نایسین را در سویه‌های مورد آزمایش تکثیر داد. در الگوی الکتروفورزی محصول PCR هر چهار جدایه تک باند به اندازه ۹۰۰ جفت باز مشاهده شد که با قطعه مورد نظر انطباق داشت شکل (۱).



شکل (۱)- ژل الکتروفورز محصول PCR. ستون M: سایز مارکر 100bp plus، ستون ۱: ژن نایسین در سویه مرجع *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PTCC 1336 (۹۰۰ bp)، ستون ۵-۲: ژن نایسین در جدایه‌های lcl03، lcl04، lcl07 و lcl10، ستون ٦: آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی

- تأثیر آنزیم، دما، pH و دترجنت بر پایداری باکتریوسین‌ها

در جدول (۵) اثر فاکتورهای مؤثر بر فعالیت باکتریوسین جدایه‌ها نشان داده شده است. هر چهار باکتریوسین پس از تیمار با پروتئیناز K و تریپسین کاملاً غیرفعال شدند اما آنزیم آلفا آمیلاز بر فعالیت ضدباکتریایی اثری نداشت. باکتریوسین جدایه‌ها تا حرارت ۱۰۰ °C به‌مدت ۳۰ دقیقه پایدار بودند اما پس از تیمار در ۱۰۰ °C به‌مدت ۶۰ دقیقه و ۱۲۱ °C به‌مدت ۱۵ دقیقه فعالیت آن‌ها از بین رفت. باکتریوسین‌ها در شرایط مختلف pH فعالیت متفاوتی نشان دادند. در pH ۳ و ٦ تفاوت معنی‌داری در فعالیت بازدارندگی مشاهده نشد اما در pH قلیایی ۹ فعالیت ضدباکتریایی به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. هر چهار باکتریوسین پس از تیمار با SDS، Tween 20، Tween 80، Triton X-100، اوره و EDTA پایدار بودند.

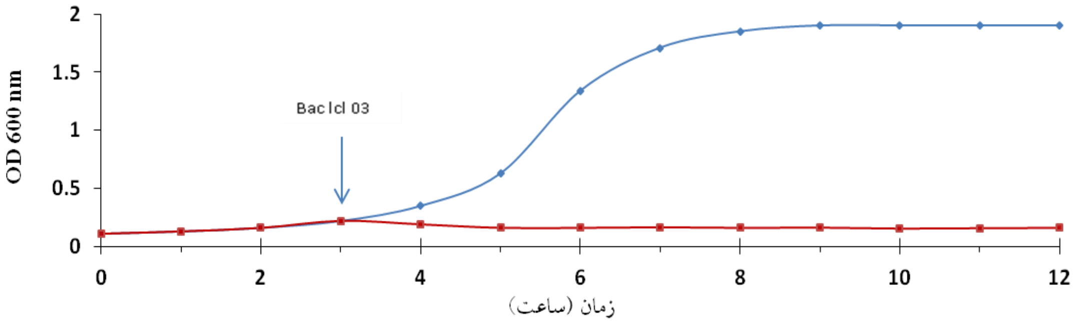
جدول (۵)- تعیین نسبی ویژگی‌های مواد ضد میکروبی جدایه‌های lcl03، lcl04، lcl07 و lcl10

تیمار	فعالیت باکتریوسین‌ها
آنزیم‌ها	
پروتئیناز K	–
تریپسین	–
آلفا آمیلاز	+
دما	
٦۰ °C به‌مدت ۳۰ دقیقه	+
٦۰ °C به‌مدت ٦۰ دقیقه	+
۱۰۰ °C به‌مدت ۳۰ دقیقه	+
۱۰۰ °C به‌مدت ٦۰ دقیقه	–
۱۲۱ °C به‌مدت ۱۵ دقیقه	–
pH	
۳	+
٦	+
۹	–
دترجنت‌ها	
SDS	+
Tween 20	+
Tween 80	+
Triton X-100	+
اوره	+
بازدارنده پروتئاز	
EDTA (۰/۱، ۲ و ۵ میلی‌مولار)	+

+ فعال، – غیرفعال

- لیز سلولی

اثر ضدباکتریایی باکتریوسین lcl03 با ثبت دانسیته سلولی (OD$_{600nm}$) *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌مدت ۱۲ ساعت ارزیابی شد (شکل ۲). تعداد سلول‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* قبل از افزودن باکتریوسین مابین $۶/۸\times۱۰^{۶}$ تا $۷/۹\times۱۰^{۶}$ cfu/ml (OD$_{600nm}$=۰/۱) و در کشت کنترل $۸/۱\times۱۰^{۶}$ cfu/ml بود (بدون افزودن باکتریوسین). با افزودن مایع رویی فاقد سلول حاوی باکتریوسین (۳۲۰۰ AU/ml) به فاز رشد لگاریتمی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (کشت ۳ ساعته) پس از یک ساعت باعث توقف کامل رشد شد. در حالی‌که جذب نوری کشت کنترل (بدون باکتریوسین) به OD$_{600nm}$=۰/۳۵ افزایش یافت که با $۳/۱\times۱۰^{۸}$ cfu/ml مطابق بود.



شکل (۲)- اثر باکتریوسین lcl03 بر *استافیلوکوکوس اورئوس* رشد یافته در BHI broth در دمای ۳۷ °C بدون باکتریوسین (♦) و در حضور باکتریوسین (■). باکتریوسین پس از سه ساعت رشد اضافه شد.

بحث و نتیجه‌گیری

نایسین باکتریوسینی هست که معمولاً در سویه‌های *لاکتوکوکوس* شناسایی شده است (Rodríguez *et al.*, 2000; Alegría *et al.*, 2010; Bello *et al.*, 2010). طبق مطالعه پرین و همکاران ۱۸ جدایه از شیر خام و پنیر به روش PCR برای این باکتریوسین مثبت بوده‌اند (Perin *et al.*, 2012). در مطالعه حاضر چهار جدایه برای این باکتریوسین مثبت شناسایی شدند. مایع رویی خنثی شده حاصل از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها، رشد ارگانیسم‌های گرم مثبت بیماریزای غذایی شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *کلستریدیوم پرفرینجنس* و *لیستریا مونوسیتوجنز* را با روش لکه‌گذاری روی آگار متوقف کرد که با تعریف کلنهامر از باکتریوسین‌ها مطابقت دارد (Klaenhammer 1988). نتایج حاصل از طیف اثر بازدارندگی هر چهار باکتریوسین نشان می‌دهد *استافیلوکوکوس اورئوس* حساس‌ترین باکتری بود که در سایر مطالعات نیز گزارش شده است (Millette *et al.*, 2007; Nwuche 2013). اثر روی باکتری‌های گرم منفی غیرمعمول است. در مطالعات معدودی باکتریوسین باکتری‌های اسید لاکتیک با دامنه اثر وسیع گزارش شده‌اند (Wise and

Tosolini 1990; Bergogne-Berezin and Joly-Guillou 1991; Bergogne-Berezin 1995).

به‌دلیل این‌که نایسین یک نوع لنتی‌بیوتیک می‌باشد، انتظار می‌رود که این جدایه‌ها قادر به سنتز حداقل یک نوع لنتی‌بیوتیک دیگر نیز باشند (اطلاعات نشان داده نشده است). با توجه به اینکه لنتی‌بیوتیک‌های B و C بر روی یک اپرون واقع شده‌اند این احتمال وجود دارد که این ژن‌ها به‌طور هم‌زمان بیان شوند. طبق گزارشی نتیجه مثبت برای تکثیر هر یک از سه پرایمر لنتی‌بیوتیک‌ها (B، C و M) کافی است تا جدایه به‌طور بالقوه قادر به سنتز سایر لنتی‌بیوتیک‌ها باشد (Hyink *et al.*, 2005; Wirawan *et al.*, 2006).

پس از تأیید ژن نایسین لازم است تا بیان ژن با انجام آزمون‌های بیوشیمیایی روی مواد ضدباکتریایی تولید شده اثبات شود چراکه وجود ژن لنتی‌بیوتیک به تنهایی دلیل بر بیان آن نمی‌باشد (Kruger *et al.*, 2013). در این مطالعه مواد ضدباکتریایی تولید شده نسبت به آنزیم‌های پروتئولیتیک حساس بودند. این نتیجه به علت ماهیت پروتئینی این ترکیبات می‌باشد که مختص باکتریوسین‌ها است (Bromberg *et al.*, 2005). تیمار با آنزیم آلفا آمیلاز تغییری در فعالیت مواد ضدباکتریایی ایجاد نکرد. این نتیجه بیانگر این است که برای فعالیت بازدارندگی بخش کربوهیدراتی در ساختمان باکتریوسین‌ها مورد نیاز نمی‌باشد (Todorov and Dicks, 2005).

مواد ضدباکتریایی تولید شده پس از تیمار حرارتی تا دمای ۱۰۰ °C به‌مدت ۳۰ دقیقه تحت تأثیر قرار نگرفتند اما با گرماگذاری در ۱۰۰ °C به‌مدت ٦٠ دقیقه و یا ۱۲۱ °C به‌مدت ۱۵ دقیقه فعالیت علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده نشد. در مطالعه‌ای لاکتوسین NK24 تولید شده توسط *لاکتوکوکوس لاکتیس* NK24 پس از گرماگذاری در ۱۰۰ °C به‌مدت ۳۰ دقیقه ۸۷/۵ درصد کاهش فعالیت نشان داد و پس از ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ °C کاملاً غیرفعال شد (Lee and Paik, 2001). در تحقیقی دیگر نایسین تولید شده توسط *لاکتوکوکوس لاکتیس* تحت گونه *لاکتیس* WNC20 بعد از گرماگذاری در ۱۲۱ °C و pH ۷ به‌مدت ۱۵ دقیقه غیرفعال شد اما با گرماگذاری در pH ۳ فعال باقی ماند (Noonpakdee *et al.*, 2003).

در مطالعه حاضر پایداری ترکیبات تولید شده وابسته به pH بود. این ترکیبات پس از گرماگذاری به‌مدت دو ساعت در pH های ۳ و ٦ پایدار باقی ماندند. اما در pH قلیایی ۹ کاهش معنی‌دار در فعالیت بازدارندگی مشاهده شد. در سایر مطالعات نتایج مشابه به‌دست آمده است (Kelly *et al.*, 1996; Todorov *et al.*, 1999).

دترجنت‌ها آنیونی با باز کردن چین‌های پروتئین‌ها و ظاهر شدن هسته هیدروفوب آن‌ها، ساختار سه بعدی و عملکرد آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. در این مطالعه هر چهار ترکیب ضدباکتریایی نسبت به تیمار با محلول ۱٪ (وزنی/حجمی) دترجنت‌های آنیونی SDS، Tween 20، Tween 80، Triton X-100 و اوره یا بازدارنده پروتئاز EDTA پایدار بودند. پایداری ترکیبات ضدباکتریایی تولید شده از هر چهار جدایه نسبت به دترجنت‌های مطالعه شده بیانگر این واقعیت است که ماهیت آن‌ها از اغلب باکتریوسین‌های تولید شده توسط لاکتوکوکوس‌ها متفاوت نمی‌باشد. برای باکتریوسین J46 تولید شده توسط *لاکتوکوکوس لاکتیس* تحت گونه *کرموریس* (Huot *et al.*, 1996)، پلانتاریسین C19

(Atrih *et al.*, 1993)، انتروسین EJ97 تولید شده توسط *انتروکوکوس فکالیس* EJ97 (Gálvez *et al.*, 1998)، پدیوسین ST18 (Todorov and Dicks, 2005)، پلانتاریسین ST31 (Todorov *et al.*, 1999) و براسین B14 (Ivanova *et al.*, 2000) نتایج مشابه به‌دست آمده است. بنابراین جدایه‌های مطالعه شده قابلیت استفاده در تولید مواد غذایی به عنوان نگه‌دارنده طبیعی را دارا می‌باشند. هم‌چنین امکان غنی‌سازی و خالص‌سازی باکتریوسین آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی و کاربرد آن جهت کنترل باکتری‌های بیماریزای غذایی و افزایش مدت زمان ماندگاری مواد غذایی وجود دارد.

تشکر و سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به خاطر تأمین اعتبار این تحقیق، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Alegría, A., Delgado, S., Roces, C., López, B. and Mayo, B. (2010). Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1), pp. 61–66.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food control*, 17(6), pp. 454–461.
- Atrih, A., Rekhif, N., Milliere, J.B. and Lefebvre, G. (1993). Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(12), pp. 1173–1179.
- Bari, M.L., Ukuku, D.O., Kawasaki, T., Inatsu, Y., Isshiki, K. and Kawamoto, S. (2005). Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. *Journal of Food Protection*, 68(7), pp.1381–1387.
- Bello, B. D., Rantsiou, K., Bellio, A., Zeppa, G., Ambrosoli, R., Civera, T., et al. (2010). Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. LWT e Food Science and Technology, 43, pp. 1151–1159.
- Bergogne-Bérézin, E. and Joly-Guillou, M.L. (1991). Hospital infection with Acinetobacter spp.: an increasing problem. *Journal of Hospital Infection*, *18*, pp. 250–255.
- Bergogne-Bérézin, E. (1995). Outbreaks caused by bacteria with novel multiple resistance: towards zero therapeutical options? The increased significance of outbreaks of *Acinetobacter* spp.: the need for control and new agents. *Journal of Hospital Infection*, 30, pp. 441–452.
- Bromberg, R., Moreno, I., Delboni, R.R., Cintra, H.C. and Oliveira, P.T.V. (2005). Characteristics of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CTC 204 and the effect of this

compound on the mesophilic bacteria associated with raw beef. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(3), pp. 351–358.

- Brewer, R., Adams, M.R. and Park, S.F. (2002). Enhanced inactivation of *Listeria monocytogenes* by nisin in the presence of ethanol. *Letters in applied microbiology, 34*(1), pp.18–21.
- Corroler, D., Mangin, N., Desmasures, N., Gueguen, M. (1998). An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (12), pp. 4729–4735.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. and Stackebrandt, E. (2006). The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 4: 212.
- Forde, A. and Fitzgerald, G.F., 1999. Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 89–113). Springer Netherlands.
- Gálvez, A., Valdivia, E., Abriouel, H., Camafeita, E., Mendez, E., Martínez-Bueno, M. and Maqueda, M. (1998). Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. *Archives of microbiology,* 171(1), pp. 59–65.
- Gaya, P., Babin, M., Medina, M., Nunez, M. (1999). Diversity among lactococci isolated from ewe's raw milk cheese. *Journal of Applied Microbiology,* 87(6), pp. 849–855.
- Hanifian, S., and Khani, S. (2012). Fate of *Yersinia enterocolitica* during manufacture, ripening and storage of Lighvan cheese. *International Journal of Food Microbiology,* 156(2), pp. 141–146.
- Huot E., Maghrous J., Barena-Gonzalez, C. (1996). Bacteriocin J46, a new bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46: isolation and characterization of the protein and its gene. *Anaerobe,* 2(3): pp. 137–145.
- Hyink, O., Balakrishnan, M., and Tagg, J.R. (2005). *Streptococcus rattus* strain BHT produces both a class I two-component lantibiotic and a class II bacteriocin. *FEMS Microbiology Letters*, 252(2), pp. 235–241.
- 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*, 41(6), pp. 47–53.
- Kelly, W.J., Asmundson, R.V. and Huang, C.M., 1996. Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Bacteriology,* 81(6), pp. 657–662.
- Klaenhammer, T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, *70*(3), pp. 337–349.
- Kruger, M.F., de Souza Barbosa, M., Miranda, A., Landgraf, M., Destro, M.T., Todorov, S.D. and de Melo Franco, B.D.G. (2013). Isolation of bacteriocinogenic strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from Rocket salad (Eruca sativa Mill.) and evidences of production of a variant of nisin with modification in the leader-peptide. *Food control,* 33(2), pp. 467–476.
- Lee, N.K. and Paik, H.D. (2001). Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal. *Food Microbiology*, 18(1), pp. 17–24.
- López-Pedemonte, T.J., Roig-Sagués, A.X., Trujillo, A.J., Capellas, M. and Guamis, B. (2003). Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. *Journal of dairy science, 86*(10), pp. 3075–3081.
- Marshall, V.M. (1991). Inoculated ecosystems in milk environments. *Journal of Applied Bacteriology,* 73, pp. 127–135.
- Mannu, L., Paba, A. (2002). Genetic diversity of lactococci and enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo ewe's milk cheese. *Journal of Applied Microbiology,* 92(1), pp. 55–62.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaige, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. and Tauxe, R. V. (1999). Food related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5, pp. 607–625.

- Millette, M., Luquet, F.M. and Lacroix, M. (2007). In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* fermented milk. *Letters in applied microbiology*, 44(3), pp. 314–319.
- Mirdamadi, S. and Ghazvini, S.A., 2015. A comparative study between inhibitory effect of *L. lactis* and nisin on important pathogenic bacteria in Iranian UF Feta cheese. *Biological Journal of Microorganism*, 3(12).
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S. (2003). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 81(2), pp. 137–145.
- Nwuche, C.O., 2013. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from'Ugba'and'Okpiye', two locally fermented nigerian food condiments. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(1), pp. 101–106.
- Perin, L.M., Moraes, P.M., Viçosa, G.N., Júnior, A.S. and Nero, L.A. (2012). Identification of bacteriocinogenic *Lactococcus* isolates from raw milk and cheese capable of producing nisin A and nisin Z. *International Dairy Journal*, 25(1), pp. 46–51.
- Rodríguez, E., González, B., Gaya, P., Nuñez, M. and Medina, M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. International Dairy Journal, 10(1), pp. 07–15.
- Rodríguez, J. M., Cintas, L. M., Casaus, P., Horn, N., Doddl, H. M. and Hernandez, P. E. (1995). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(2), pp. 109–115.
- Sánchez, M.M., Delgado, T., Alonso, L. and Mayo, B. (2000). Phenotypic and genetic characterization of a selected set of *Lactococcus lactis* strains isolated from a starter-free farmhouse cheese. *Food microbiology*, 17(4), pp. 449–460.
- Sobrino-López, Á. and Martín-Belloso, O. (2006). Enhancing inactivation of *Staphylococcus aureus* in skim milk by combining high-intensity pulsed electric fields and nisin. *Journal of Food Protection*, 69(2), pp. 345–353.
- Tafreshi, S. H., Mirdamadi, S., Norouzian, D., Khatami, S. and Sardari, S. (2010). Effect on non-nutritional factors on nisin production. *Journal of Biotechnology*, 9(9), pp. 1382–1391.
- Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J.M., Ivanova, I. and Dousset, X. (1999). Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, 48(3), pp. 167–177.
- Todorov, S.D. and Dicks, L.M. (2005). Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. *Process Biochemistry*, 40(1), pp. 365–370.
- Todorov, S.D. (2008). Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. *Brazilian Journal of microbiology*, 39(1), pp. 178–187.
- Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I. and Lozo, J. (2006). Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 112(3), pp. 230–235.
- Wirawan, R. E., Klesse, N. A., Jack, R. W. and Tagg, J. R. (2006). Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), pp. 1148–1156.
- Wise, K.A. and Tosolini, F.A. (1990). Epidemiological surveillance of *Acinetobacter* species. *Journal of Hospital Infection*, 16(4), pp. 319–329.

Isolation and identification of nisin producer strains of *Lactococcus lactis* from Lighvan cheese

Mohammadi, K.

1. Department of Food Hygiene and Aquatics, College of Veterinary Medicine , Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
Corresponding Author: mohammadi@iaut.ac.ir

(Received: 2016/7/17 Accepted: 2016/9/9)

Abstract

In this study, strains of lactic acid bacteria capable of bacteriocin production were isolated from Lighvan cheese samples obtained from East Azerbaijan, Iran. Among 16 isolates initially identified as *Lactococcus lactis*, four isolates were phenotipically determined as bacteriocinogenic. The isolates showed inhibitory effect on the growth of Gram-positive food borne pathogens including *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* and *Listeria monocytogenes* by the agar spot test. Selected isolates were PCR-positive for nisin-encoding gene. The strains produced antibacterial substances resistant to α-amylase but sensitive to trypsin and proteinase K. Thermo-stability was indicated after treatment at 100 °C for 30 minutes. The antibacterial activity was pH dependent and occurred in pH 3 and 6, but at pH 9 the antibacterial activity was mainly restricted. No loss in antibacterial activity was recorded after treatment with SDS, Tween20, Tween 80, Triton X-100, urea and EDTA. The results suggest the potential application of these isolates as biopreservatives in food products.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: *Lactococcus lactis*, bacteriocin, nisin, biopreservative, Lighvan cheese