

جداسازی و شناسایی سویه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس تولید کننده نایسین از پنیر ليقوان

خسرو محمدی

گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: mohammadi.kh@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۵/۴/۲۷ پذیرش نهایی: ۹۵/۶/۱۹)

چکیده

نایسین یک پپتید ضدباکتریایی است که توسط گونه‌های خاصی از باکتری‌های لاکتیکی تولید می‌شود. در این مطالعه سویه‌هایی از باکتری‌های اسید لاکتیک با قابلیت تولید باکتریوسین از نمونه‌های پنیر ليقوان جداسازی شدند. در ابتدا از ۱۶ 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*، *کلیستریدایوم پرفرینجنس* و *لیستریا مونوسیتوجنز* اثر بازدارندگی نشان دادند. در جدایه‌های انتخاب شده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن *kds* مشاهده 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 به مدت ۳۰ دقیقه مشخص گردید. فعالیت ضدباکتریایی وابسته به pH بود و در pH های ۳ و ۶ 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 ليقوان

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 وافر 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 ليقوان 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 ليقوان از توابع تبریز به روش سنتی تهیه می‌شود و به لحاظ خوش طعم بودن از مقبولیت زیادی برخوردار است. در تهیه پنیر ليقوان 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 محافظت‌کننده‌های بیولوژیکی (biopreservative) می‌نامند (Ammor *et al.*, 2006). از جمله ترکیباتی مانند اسیدهای آلی، دی‌استیل، 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 (Bactericidal) 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 آنجایی که باکتری‌های لاکتیک با منشأ غذایی، بی‌ضرر

مواد و روش‌ها

- جداسازی سویه‌های لاکتوکوکوس

چهار نمونه پنیر لیقوان از روستای لیقوان در استان آذربایجان شرقی تهیه و در کنار یخ خشک در دمای 4°C به آزمایشگاه منتقل گردید. به منظور جداسازی گونه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس، مقدار 10 گرم از هر نمونه پنیر در کیسه‌های زیپ‌دار استریل حاوی 90 میلی‌لیتر مایع رقیق کننده پنیر (کلرید سدیم $0/5$ درصد، کازیتون 1 درصد و سیترات سدیم 2 درصد) توزین شده و به مدت 2 دقیقه در استومیکر همگن گردید. به منظور تهیه سوسپانسیون یکنواخت به مدت 20 دقیقه در حمام آب 37°C گرمخانه گذاری شد. پس از تهیه رقت‌های سریال، مقدار $0/1$ میلی‌لیتر از هر رقت در سطح دو پلیت حاوی محیط کشت M17 آگار (Merck) پخش گردید و در دمای 30°C به مدت سه روز در شرایط هوازی گرمخانه گذاری شد (Hanifian and Khani 2012).

- آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

پس از چند بار پاساژ دادن کلونی‌های رشد کرده در محیط M17 آگار و خالص سازی آن‌ها، سویه‌ها از نظر مورفولوژی، رنگ آمیزی 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 10 ، 40 و 45°C ، رشد در نمک 4 و $6/5$ درصد، رشد در $9/2$ pH، رشد در حضور $0/1$ درصد متیلن بلو در شیر، هیدرولیز آرژنین، تولید CO_2 از سیترات، تولید دی‌استیل و استوئین، تخمیر مالتوز و هیدرولیز نشاسته (Dworkin, et al., 2006). سویه‌ها پس از شناسایی در

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 به عنوان یک افزودنی ایمن (GRAS) تأیید شده و تنها باکتریوسین خالص سازی شده است که به صورت تجاری موجود بوده و به عنوان نگه‌دارنده مواد غذایی در بیش از 50 کشور مورد استفاده است (Bari, et al., 2005). این ترکیب دارای دامنه عملکرد وسیع بر روی باکتری‌های گرم مثبت و اسپوره‌های باکتری‌های مقاوم به حرارت مانند کلاستریدیوم بوتولینوم و باکتری‌های بیماری‌زای غذایی مانند لیستریا مونوسیتوجنز، استافیلوکوکوس اورئوس یا باسیلوس سرئوس می‌باشد (Brewer et al., 2002; Lopez- Pedemonte et al., 2003; Sobrino-Lopez and Martin-Belloso, 2006).

کاربرد باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسین و یا باکتریوسین خالص سازی شده آن‌ها مورد توجه است زیرا جداسازی و شناسایی گونه‌های قادر به تولید باکتریوسین و ذخیره سازی 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.

به منظور غیرفعال سازی پروتئازهای خارج سلولی و پراکسید هیدروژن، به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری °C ۸۰ قرار گرفت و در نهایت از فیلتر میلی پور (۰/۲۲) میکرون) عبور داده شد (Todorov, 2008). میکروارگانیسم های شاخص در غلظت نهایی حدود 10^5 cfu/ml در داخل محیط های کشت تلقیح شده و در پلیت ها ریخته شد. مقدار ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی فاقد سلول در سطح پلیت ها قرار داده شد و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای توصیه شده گرمخانه گذاری شدند (جدول ۱). هاله های عدم رشد بزرگ تر از ۵ میلی متر به عنوان مثبت در نظر گرفته شدند (Todorov, 2008).

M17 broth (Merck) حاوی گلیسرول (۰/۲۰ v/v) در °C ۷۰- نگهداری شدند.

- سنجش طیف اثر باکتریوسین

قابلیت تولید باکتریوسین توسط جدایه ها روی شش ارگانسیم جدول (۱) با استفاده از روش لکه گذاری روی آگار (agar spot test) انجام شد (Todorov, 2008). در این روش سویه های جداسازی شده در داخل محیط کشت MRS broth در °C ۳۷ به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. سپس کشت ها در 10000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۴ 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 ۶ تنظیم شد. سپس

جدول (۱)- ارگانسیم های مورد آزمایش، نوع محیط کشت و شرایط گرمخانه گذاری جهت تعیین فعالیت ضدباکتریایی جدایه های لاکتوکوکوس لاکتیس

ارگانسیم های مورد آزمایش	محیط کشت	دمای گرمخانه گذاری (درجه سلسیوس)
<i>L. monocytogenes</i> PTCC 1298	BHI	۳۷
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	BHI	۳۷
<i>B. cereus</i> PTCC 1015	BHI	۳۰
<i>C. perfringens</i> PTCC 1765	BHI	۳۷ (جار بی هوازی)
<i>E. coli</i> PTCC 1399	TSBye	۳۷
<i>Salmonella enterica</i> serovar Paratyphi A (PTCC 1230)	TSBye	۳۷

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

محدوده ۱۷ جفت باز ارائه شده اند (Rodríguez et al., 1995) (جدول ۲). پرایمر توسط شرکت سیناژن سنتز گردید و در حجم نهایی 100 pmol/μl در آب مقطر استریل مخلوط شد.

- شناسایی ژن بیوستنز نایسین

یک میلی لیتر از کشت جدایه های لاکتوکوکوس لاکتیس در 14000 g به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس DNA پلت حاصله با استفاده از کیت (Cinnapure-DNA) استخراج شد. الیگونوکلئوتیدها در

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	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DY13

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در میکروتیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری طبق روش قبلی انجام شد (Hyink *et al.*, 2005). مقدار 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	
	اتصال	۵۵	۱	۳۰
	بسط	۷۲	۱	
۳	بسط نهایی	۷۲	۴	۱

(Sinaclon)، تریپسین و آلفا آمیلاز (Sigma) در غلظت نهایی ۱ mg/ml در دمای ۳۷ °C به مدت ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. متعاقباً با تیمار حرارتی در دمای ۱۰۰ °C به مدت ۲ دقیقه آنزیم‌ها غیرفعال شدند. مقاوت حرارتی مواد ضدباکتریایی، با گرمخانه‌گذاری مایع رویی فاقد سلول در دمای ۶۰ و ۱۰۰ °C به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه و دمای اتوکلاو در ۱۲۱ °C به مدت 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، ۶ و ۹ تنظیم شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شد.

محصول واکنش در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی DNA safe stain (Sinaclon) (۳ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ژل آگارز) با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۴۰ 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 ۲۴ ساعته سویه‌های تولید کننده باکتریوسین در مجاورت آنزیم‌های پروتئیناز K

استفاده شد. اثر باکتریوسین‌ها با روش رقیق‌سازی و به صورت واحد در میلی‌لیتر (AU/ml) بیان شد. کنترل‌های موازی با نایسین ۲۵ mg/ml (Sigma) انجام شد (Todorov, 2008).

یافته‌ها

- شناسایی جدایه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس

بر اساس ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از چهار نمونه پنیر در مجموع ۱۶ سویه به‌عنوان لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه لاکتیس انتخاب شدند. سویه‌ها قادر به رشد در دمای ۱۰ °C، ۴۰ °C، غلظت ۴ درصد کلرید سدیم، pH= ۹/۲، شیر حاوی ۰/۱ درصد متیلن بلو، غلظت ۴۰ درصد صفرا و دامیناسیون آرژینین بودند. اما قادر به رشد در دمای ۰C ۴۵، غلظت ۶/۵ درصد نمک، هیدرولیز نشاسته، تولید CO₂ از سیترات، دی‌استیل و استوئین نبودند.

- قابلیت تولید باکتریوسین

حدود ۲۵ درصد از جدایه‌هایی که از نظر تولید باکتریوسین غربالگری شدند، باکتریوسین مثبت بودند و از میان ۱۶ سویه انتخاب شده چهار سویه مواد ضدباکتریایی تولید کردند که رشد طیف وسیعی از ارگانسیم‌های گرم مثبت را متوقف کردند (جدول ۴).

پس از تنظیم مجدد pH روی ۶، 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 ۱٪) و بازدارنده پروتئاز EDTA در غلظت‌های ۰/۱، ۲ و ۵ میلی‌مولار مخلوط شدند. باکتریوسین‌های تیمار نشده و محلول دترجنت‌ها و FDTA به‌عنوان کنترل استفاده شد. همه نمونه‌ها به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری 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 ۲۰ میلی‌لیتر از مایع رویی خنثی و استریل شده (فیلتراسیون از طریق فیلتر میلی‌پور ۰/۲۲ میکرون) به ۱۰۰ میلی‌لیتر کشت فعال استافیلوکوکوس اورئوس در ابتدای فاز رشد لگاریتمی (OD_{600nm}=۰/۱) و گرمخانه‌گذاری در ۳۷ °C انجام شد. جذب نوری در هر ساعت به مدت ۱۲ ساعت توسط اسپکتروفتومتری (S 2100 Diode Array spectrophotometer) اندازه‌گیری شد. کشت میکروارگانسیم مورد آزمایش (استافیلوکوکوس اورئوس) بدون افزودن باکتریوسین به‌عنوان کنترل

جدول (۴) - دامنه فعالیت ضدباکتریایی مایع رویی جدایه‌های لاکتوکوکوس لاکتیس به روش لکه‌گذاری روی آگار (میلی‌متر هاله عدم رشد)

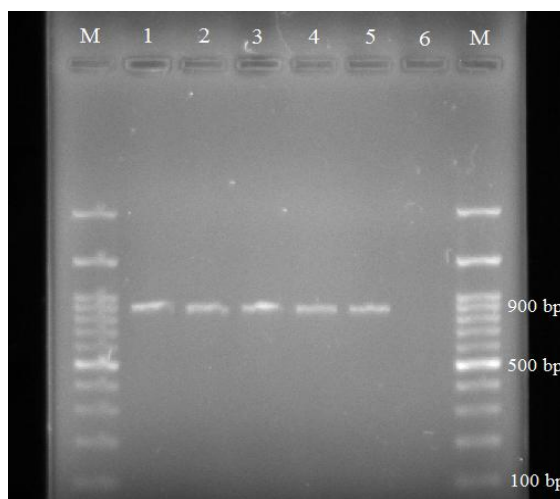
Lcl10	Lcl07	Lcl04	Lcl03	ارگانسیم
۱۰	۱۵	۱۱	۸	<i>S. aureus</i> ATCC 13565
۱۱	۱۰	۷	۵	<i>B. cereus</i> PTCC 1015
۷	۱۲	۸	۱۰	<i>C. Perfringens</i> PTCC 1765

۷	۸	-	۵	<i>L. monocytogenes</i> PTCC 1298
-	-	-	-	<i>E. coli</i> PTCC 1399
-	-	-	-	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Paratyphi A</i> (PTCC 1230)

استفاده ژن کد کننده نایسین را در سویه‌های مورد آزمایش تکثیر داد. در الگوی الکتروفورزی محصول PCR هر ۴ جدایه بانندی به اندازه ۹۰۰ جفت باز مشاهده شد که با قطعه مورد نظر انطباق داشت (شکل ۱).

- ردیابی مولکولی ژن‌های کدکننده نایسین

بر اساس نتایج به دست 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



شکل (۱)- ژل الکتروفورز محصول PCR ستون M: سایز مارکر 100 bp plus، ستون ۱: ژن نایسین در سویه مرجع (900 bp)، ستون ۲-۵: ژن نایسین در جدایه‌های *lcl03*، *lcl04*، *lcl07* و *lcl10* ستون ۶: آب مقطر به عنوان کنترل منفی

به مدت ۱۵ دقیقه فعالیت آن‌ها از بین رفت. باکتریوسین‌ها در شرایط مختلف pH فعالیت متفاوتی نشان دادند. در pH برابر با ۳ و ۶ تفاوت معنی داری در فعالیت بازدارندگی مشاهده نشد اما در pH قلیایی ۹ فعالیت ضدباکتریایی به طور معنی دار کاهش یافت. هر ۴ باکتریوسین پس از تیمار با SDS، Tween 20، Triton X-100، Tween 80، اوره و EDTA پایدار بودند.

- تأثیر عوامل مختلف بر پایداری باکتریوسین‌ها

در جدول (۵) اثر فاکتورهای مؤثر بر فعالیت باکتریوسین جدایه‌ها نشان داده شده است. هر ۴ 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 به مدت ۳۰ دقیقه پایدار بودند اما پس از تیمار در ۱۰۰ °C به مدت ۶۰ دقیقه و ۱۲۱ °C

جدول (۵) - تعیین نسبی ویژگی‌های مواد ضد میکروبی جدایه‌های lcl03

فعالیت باکتریوسین‌ها	تیماز
	آنزیم‌ها
-	پروتئیناز K
-	تریپسین
+	آلفا آمیلاز
	دما
+	۶۰ °C به مدت ۳۰ دقیقه
+	۶۰ °C به مدت ۶۰ دقیقه
+	۱۰۰ °C به مدت ۳۰ دقیقه
-	۱۰۰ °C به مدت ۶۰ دقیقه
-	۱۲۱ °C به مدت ۱۵ دقیقه
	pH
+	۳
+	۶
-	۹
	دترجنت‌ها
+	SDS
+	Tween 20
+	Tween 80
+	Triton X-100
+	اوره
	بازدارنده پروتئاز
+	EDTA (۰/۱، ۲ و ۵ میلی‌مولار)

+ فعال، - غیر فعال

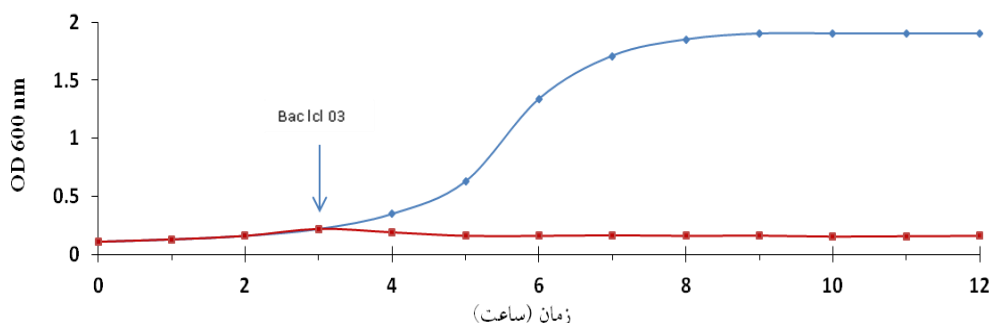
- لیز سلولی

اثر ضدباکتریایی باکتریوسین lcl03 با ثبت دانسیته سلولی (OD_{600nm}) استافیلوکوکوس اورئوس به مدت ۱۲ ساعت ارزیابی شد (شکل ۲). تعداد سلول‌های

استافیلوکوکوس اورئوس قبل از افزودن باکتریوسین مابین $۶/۸ \times 10^6$ تا $۷/۹ \times 10^6$ cfu/ml ($OD_{600nm}=0/1$) و در کشت کنترل $۸/۱ \times 10^6$ cfu/ml بود (بدون افزودن باکتریوسین). با افزودن مایع حاوی فاقد سلول حاوی

جذب نوری کشت کنترل (بدون باکتریوسین) به $3/1 \times 10^8$ cfu/ml با $OD_{600nm} = 0/35$ افزایش یافت که با $3/1 \times 10^8$ cfu/ml مطابق بود.

باکتریوسین (۳۲۰۰ AU/ml) به فاز رشد لگاریتمی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (کشت ۳ ساعته) پس از یک ساعت باعث توقف کامل رشد شد. در حالی که



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.

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).

به دلیل این که نایسین یک نوع لنتی بیوتیک می‌باشد، انتظار می‌رود که این جدایه‌ها قادر به سنتز حداقل یک نوع لنتی بیوتیک دیگر نیز باشند (اطلاعات نشان داده نشده است). با توجه به این که لنتی بیوتیک‌های B و C بر روی یک اپرون واقع شده‌اند این احتمال وجود دارد که این ژن‌ها به طور هم‌زمان بیان شوند. طبق گزارشی نتیجه مثبت برای تکثیر هر یک از سه پرایمر لنتی-بیوتیک‌ها (B, C و M) کافی است تا جدایه به‌طور

بحث و نتیجه‌گیری

نایسین باکتریوسینی هست که معمولاً در سویه‌های لاکتوکوکوس شناسایی شده است (Rodríguez *et al.*, 2000; Alegria *et al.*, 2010; Bello *et al.*, 2010). طبق یک مطالعه ۱۸ جدایه از شیر خام و پنیر به روش PCR برای این باکتریوسین مثبت بوده‌اند (Perin *et al.*, 2012). در مطالعه حاضر ۴ جدایه برای این باکتریوسین مثبت شناسایی شدند. مایع رویی خنثی شده حاصل از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها، رشد ارگانیزم‌های گرم مثبت بیماریزای غذایی شامل استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، کلوستریدیوم پرفرینجنس و لیستریا مونوسییتوجنز را با روش لکه گذاری روی آگار متوقف کرد که با تعریف کلن‌ها از باکتریوسین‌ها مطابقت دارد (Klaenhammer 1988). نتایج حاصل از طیف اثر بازدارندگی هر چهار باکتریوسین نشان می‌دهد استافیلوکوکوس اورئوس حساس‌ترین باکتری بود که

در مطالعه حاضر پایداری ترکیبات تولید شده وابسته به pH بود. این ترکیبات پس از گرمخانه‌گذاری به مدت دو ساعت در pH های ۳ و ۶ پایدار باقی ماندند. اما در pH ۹ کاهش معنی‌دار در فعالیت بازدارندگی مشاهده شد. در سایر مطالعات نتایج مشابه به دست 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 بزاسین B14 (Ivanova et al., 2000) نتایج مشابه به دست آمده است. بنابراین جدایه‌های مطالعه شده قابلیت استفاده در مواد غذایی به عنوان نگه‌دارنده طبیعی را دارند. هم‌چنین امکان غنی‌سازی و خالص‌سازی باکتریوسین آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی و کاربرد آن جهت کنترل باکتری‌های بیماری‌زای غذایی وجود دارد.

بالقوه قادر به سنتز سایر لنتی‌بیوتیک‌ها باشد (Hyink et al., 2005; Wirawan et al., 2006).

پس از تأیید ژن نایسین لازم است بیان ژن با آزمون‌های بیوشیمیایی 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 به مدت ۳۰ دقیقه تحت تأثیر قرار نگرفتند اما با گرمخانه‌گذاری در ۱۰۰ °C به مدت ۶۰ دقیقه و یا ۱۲۱ °C به مدت ۱۵ دقیقه فعالیت علیه استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده نشد. در مطالعه‌ای لاکتوسین NK24 تولید شده توسط لاکتوکوکوس لاکتیس NK24 پس از گرمخانه‌گذاری در ۱۰۰ °C به مدت 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 گرمخانه‌گذاری در ۱۲۱ °C و pH=۷ به مدت ۱۵ دقیقه غیرفعال شد اما با گرمخانه‌گذاری در pH=۳ فعال باقی ماند (Noonpakdee et al., 2003).

سپاسگزاری

تعارض منافع

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

نویسندگان تعارض منافع 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): 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): 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): 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): 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-Food Science and Technology*, 43: 1151–1159.
- Bergogne-Bérézin, E. and Joly-Guillou, M.L. (1991). Hospital infection with *Acinetobacter* spp.: an increasing problem. *Journal of Hospital Infection*, 18: 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): 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): 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): 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*, Springer, Netherlands, pp. 89–113.
- 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): 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): 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): 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): 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): 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): 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): 657–662.
- Klaenhammer, T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3): 337–349.
- Kruger, M.F., de Souza Barbosa, M., Miranda, A., Landgraf, M., Destro, M.T., Todorov, S.D. et al. (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): 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): 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): 3075–3081.
- Marshall, V.M. (1991). Inoculated ecosystems in milk environments. *Journal of Applied Bacteriology*, 73: 127–135.
- Mannu, L. and 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., et al. (1999). Food related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5: 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): 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): 79-92.
- 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): 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): 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): 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): 7–15.
- Rodríguez, J. M., Cintas, L. M., Casaus, P., Horn, N., Doodl, H. M. and Hernandez, P. E. (1995). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(2): 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): 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): 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): 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): 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): 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): 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): 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): 1148–1156.
- Wise, K.A. and Tosolini, F.A. (1990). Epidemiological surveillance of *Acinetobacter* species. *Journal of Hospital Infection*, 16(4): 319–329.

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

Mohammadi, K.

Assistant professor of Department of Food Hygiene and Aquatics, College of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
Corresponding Author's E.mail: mohammadi.kh@gmail.com
(Received: 2016/7/17 Accepted: 2016/9/9)

Abstract

Nisin is an antibacterial peptide produced by certain species of lactic bacteria. 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 phenotypically determined as bacteriocinogenic. The isolates showed inhibitory effect on the growth of Gram-positive foodborne pathogens including *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* and *Listeria monocytogenes* by the agar spot test. Selected isolates were PCR-positive for the 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 preservatives in food products.

Conflict of interest: None declared.

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