

## بررسی ویژگی‌های شبه انتروسین‌های تولید شده توسط دو سویه از انتروکوکوس‌های جدا

### شده از شیرمیش و بز

لیلا یوسفی<sup>۱</sup>، محمدرضا احسانی<sup>۲</sup>، محمدرضا فاضلی<sup>۳</sup>، ناهید مژگانی<sup>۳</sup>، حمید عزت پناه<sup>۵</sup>

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات
- ۲- نویسنده مسئول: استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، پست الکترونیکی: mehsani@ut.ac.ir
- ۳- دانشیار دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۴- استادیار بخش بیوتکنولوژی، مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی
- ۵- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۱۳

تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۳

### چکیده

**سابقه و هدف:** شیر خام می‌تواند منبعی برای سویه‌های جدید باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسین با توانایی مهار میکروارگانیسم‌های نامطلوب باشد. این تحقیق با هدف جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسین از شیر خام میش و بز و تعیین ویژگی‌های باکتریوسین‌های جدا شده انجام گرفت.

**مواد و روش‌ها:** به منظور جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسین ۱۰۰ نمونه شیر میش و بز مورد بررسی قرار گرفتند. دو سویه انتخاب شدند و شناسایی آن‌ها بر اساس ویژگی‌های فوتیپی در حد جنس صورت گرفت. برای بررسی ماهیت ترکیبات ضد میکروبی دو سویه مورد نظر، عصاره کشت آن‌ها با آنزیم‌های مختلف تیمار شد. طیف بازدارندگی این ترکیبات با روش نشرحفره‌ای بررسی و پایداری آن‌ها در دمای H<sub>2</sub>O<sup>۰</sup> و pH<sup>۳</sup> متفاوت تعیین شد. تخلیص نسبی ترکیبات ضد میکروبی مورد نظر با آمونیوم سولفات و پلی اتیلن گلیکول (PEG) صورت گرفت و تیتر آن‌ها مشخص شد. وزن ملکولی این ترکیبات با روش SDS-PAGE تعیین و پایداری آن‌ها طی نگهداری در دمای C<sup>۰</sup> تخمین زده شد.

**یافته‌ها:** دو سویه از انتروکوکوس (L<sub>40</sub> و L<sub>۵۰</sub>) در تکرارهای متعدد، فعالیت ضد میکروبی بالایی از خود بروز دادند. حساسیت ترکیبات بازدارنده تولید شده توسط این سویه‌ها به آنزیم‌های پروتولیتیک، تولید ترکیبات شبه انتروسین توسط این سویه‌ها را تأیید کرد. این ترکیبات روی لیستریا مونوسیتیوژنر و استافیلکوکوس اورئوس اثر بازدارندگی داشتند. هر دو شبه انتروسین در pH ۳ تا ۱۰ پایدار بودند و شبه انتروسین جدا شده از L<sub>۵۰</sub> به دمای H<sub>2</sub>O<sup>۰</sup> تا ۲۹ کیلو دالتون تخمین زده شد. این دو ترکیب، فعالیت خود را به مدت ۲۸ روز در دمای C<sup>۰</sup> حفظ کردند.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به فعالیت ضد میکروبی و خصوصیات فیزیکی شیمیایی مطلوب شبه انتروسین‌های جدا شده، با مطالعه وسیع‌تر می‌توان از این ترکیبات به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در صنایع غذایی استفاده کرد.

**واژگان کلیدی:** شبه انتروسین، انتروکوکوس، شیر، استافیلکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتیوژنر

### • مقدمه

یا از رشد آن‌ها جلوگیری می‌کنند. برخی از این ترکیبات به دلیل امکان استفاده در مواد غذایی مختلف و فعالیت علیه باکتری‌های بیماری‌زاکی کلیدی مانند لیستریا مونوسیتیوژنر و استافیلکوکوس اورئوس مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند (۱-۴).

باکتری‌های اسید لاکتیک از اجزای اصلی فلور میکروبی شیر خام و فراورده‌های شیری هستند. برخی از سویه‌های این باکتری‌ها می‌توانند باکتریوسین تولید کنند. باکتریوسین‌ها پروتئین‌های فعال بیولوژیک یا توده‌هایی پروتئینی هستند که برای سایر باکتری‌ها به خصوص باکتری‌های گونه‌های نزدیک، گشنه هستند

سویه‌ها همراه با لیستریا مونوسیتوفیزن در شیر بی‌چربی به تأخیر ۶ ساعته در رشد لیستریا در مقایسه با نمونه شاهد منجر شد. این محققان امکان استفاده از این سویه‌ها را به همراه کشت‌های آغازگر برای افزایش ایمنی فراورده‌های شیری مطرح کردند (۸).

هدف از این مطالعه، جداسازی سویه‌های برتر باکتری‌های اسیدلاکتیک تولید کننده باکتریوسین از شیر با توانایی مهار برخی باکتری‌های بیماری‌زای غذایی و شناسایی برخی ویژگی‌های باکتریوسین‌های تولیدی بود.

## • مواد و روش‌ها

**سویه‌های میکروبی و شرایط کشت:** باکتری‌های اسیدلاکتیک از ۱۰۰ نمونه شیر میش و بز با استفاده از محیط کشت MRS (Merck, آلمان) در دمای ۳۷ °C و شرایط میکروآئروفیل (۶٪ اکسیژن) جدا شدند (۷). کشت باکتری‌های شاخص استافیلوکوکوس/ورئوس ۶۵۳۸ ATCC، سالمنولا اتری سودمناز آئروزینوزا/ ATCC ۲۷۸۵۳، ATCC ۸۷۳۹ تیدیس (جدایه بومی)، اشرشیاکلی ATCC در محیط کشت Muller Hilton (Merck, آلمان) و کشت لیستریا مونوسیتوفیزن PTCC ۱۲۹۸ در محیط کشت TS حاوی ۰/۶ درصد عصاره مخمر در دمای ۳۰-۳۵ °C و شرایط هوایی صورت گرفت (۸). دو باکتری شاخص اسیدلاکتیک لاکتوپاسیلوس اسیدوفیلوس PTCC ۱۶۴۳ در محیط MRS دمای ۳۷ °C و شرایط کازی ۱۶۰۸ میکروآئروفیل کشت داده شدند (۸).

**قابلیت بازدارندگی:** برای این منظور از روش نشرحفره‌ای (well diffusion) استفاده شد. کشت ۱۶ تا ۱۸ ساعته سویه‌های جدا شده در محیط کشت MRS براث حاوی ۰.۲٪ گلوكز سانتریفیوژ (۵۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه) و عصاره کشت جدا شد. pH عصاره با استفاده از هیدروکسید سدیم ۲ مولار در محدوده ۶/۵ تا ۷ تنظیم شد. سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته استافیلوکوکوس/ورئوس (باکتری شاخص) معادل  $10^8$  CFU/mL تهیه شد و با استفاده از سواب استریل، کشت یکنواختی روی پلیت‌های حاوی محیط کشت تهیه شد. چاهک‌هایی به قطر ۵mm روی محیط کشت ایجاد شد و  $100\mu\text{L}$  از عصاره خنثی شده کشت سویه‌های لاکتیک جدا شده، درون آن‌ها ریخته شد. برای جذب عصاره به درون محیط کشت، پلیت‌ها به مدت ۲ تا ۴ ساعت در یخچال قرار داده شدند و سپس به مدت ۱۸ تا ۲۴ pH ۴/۵ تا ۸ فعالیت خود را حفظ کرد. کشت همزمان این

پژوهش‌های متعدد نشان داده‌اند که گونه‌های تولید کننده باکتریوسین شامل همه جنس‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌شود؛ مانند: لاکتوکوکوس، استرپتوكوس، لاکتوپاسیلوس، لوکونوس‌توك، پدیوکوکوس و انتروکوکوس. تاکنون، باکتریوسین‌های مختلفی از این باکتری‌ها شناسایی شده‌اند. به طور مثال: تولید نیسین از لاکتوکوکوس لاکتیس، لاکتاصلین B از لاکتوپاسیلوس اسیدوفیلوس، پدیووسین ۱-PA از پدیوکوکوس اسیدیلاکتیس، مزنتریسین Y105 از لوکونوس‌توك مزنترؤیلس و انتروسین AS-48 از گونه‌های مختلف انتروکوکوس. در بین باکتریوسین‌های شناخته شده نیسین، تنها باکتریوسینی است که به طور گسترده به عنوان یک نگهدارنده طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴، ۵).

امروزه، با توجه به عملکرد محدود باکتریوسین‌های شناخته شده، دستیابی به سویه‌های لاکتیک با توانایی تولید باکتریوسین‌های مناسب در مقادیر زیاد و فعالیت ضد میکروبی بالا علیه میکرارگانیسم‌های ناخواسته، مطلوب است. در این راه، محققان در بیشتر نقاط جهان سویه‌های بومی را بررسی کرده‌اند و از آنجا که شیر و فراورده‌های آن می‌توانند منبعی برای سویه‌های جدید لاکتیک با توانایی بالقوه برای مهار میکروارگانیسم‌های عامل فساد و بیماری‌زای غذایی باشند، این گروه از مواد غذایی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (۷).

در تحقیقی که توسط Rodriguez و همکاران در سال ۲۰۰۰ روی ۲۹۸ نمونه شیر خام گونه‌های مختلف حیوانی (بز، میش و گاو) در اسپانیا انجام شد ۸۲ سویه تولید کننده باکتریوسین به صورت ژنوتیپی و فتوتیپی شناخته شدند و شبه باکتریوسین‌های تولیدی توسط ۱۶ سویه لاکتیک، طیف ضد میکروبی وسیعی از خود نشان دادند (۷).

Coccolin و همکاران در سال ۲۰۰۷ در اسپانیا دو سویه انتروکوکوس فاسییوم M241 و M249 را از شیر بز جدا کردند. این دو سویه روی لیستریا مونوسیتوفیزن و کلستریدیوم بوتیریکوم اثر بازدارندگی داشتند، در حالی که بر باکتری‌های اسیدلاکتیک بی‌اثر بودند. باکتریوسین تولید شده توسط هر دو سویه در دمای ۱۰۰ °C را به مدت ۱۰ دقیقه تحمل و در pH ۴/۵ تا ۸ فعالیت خود را حفظ کرد. کشت همزمان این

**جداسازی و تخلیص نسبی ترکیبات شبه انتروسین:** به عصاره کشت هر دو سویه تا غلظت نهایی ۴۵٪ سولفات آمونیوم اضافه شد. سپس روی همزن مغناطیسی با دور کم در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. بعد از این مدت، نمونه‌ها سانتریفیوز ( $g \times 30,000$  دقیقه،  $4^{\circ}\text{C}$ ) شدند. رسوبات حاصل در دو فاز رویی و تنهشین شده در بافر فسفات پتاسیم ( $\text{pH}=7/4$ ) حل شد. برای حذف نمک-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> به مدت ۱۰۰۰۰ cut ۱۰۰۰ دالتون در مقابل بافر فسفات پتاسیم ( $\text{pH}=7/4$ ) به مدت ۲۴ ساعت دیالیز شدند. طی دیالیز، سه مرتبه بافر تعویض شد. ایجاد فشار اسمزی به علت غلظت بالای نمونه‌های درون کیسه‌های دیالیز حجم محتویات داخل کیسه‌های دیالیز را افزایش داد. برای تغليظ نمونه‌ها کیسه‌ها را به مدت ۲ ساعت در ارلن حاوی پلی اتیلن گلیکول خشک (PEG) قرار دادند و سپس قابلیت بازدارندگی آن‌ها باکتری‌های شاخص به روش نشرحفره‌ای بررسی شد (۱۵-۱۶).

**تعیین تیتر ترکیبات شبه انتروسین:** تیتر باکتریوسین‌ها برای ارزیابی فعالیت آن‌ها به کار می‌رود. برای این منظور از عصاره خنثی شده کشت دو سویه  $\text{Le}^{40}$  و  $\text{Le}^{50}$  و نمونه‌های نسبتاً تخلیص شده حاصل از مرحله قبل، رقت‌های متوالی دوتایی (two fold serial dilution) در بافر فسفات پتاسیم ( $\text{pH}=7/4$ ) تهیه شد. سپس فعالیت رقت‌های تهیه شده به روش نشرحفره‌ای روی باکتری‌های شاخص تعیین شد. تیتر یک باکتریوسین عکس بالاترین رقتی از باکتریوسین است که در آن، هاله مهار رشد میکرووارگانیسم مشاهده و به صورت AU/mL بیان می‌شود (۱۶).

**تعیین وزن ملکولی شبه انتروسین‌ها:** برای تعیین دقیق وزن ملکولی شبه انتروسین‌های جدا شده از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) با تکنیک رنگ آمیزی کوماسی بلو استفاده شد. برای این کار از نمونه‌های نسبتاً خالص شده حاصل از مرحله قبل استفاده شد (۱۷).

**پایداری ترکیبات شبه انتروسین طی نگهداری:** شبه انتروسین‌های نسبتاً خالص شده در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. قابلیت بازدارندگی آن‌ها هر ۷ روز یک بار به روش نشرحفره‌ای روی باکتری شاخص بررسی می‌شد (۸).

ساعت در دمای  $30-35^{\circ}\text{C}$  ۳۰-۳۵ گرمخانه گذاری شدند. بعد از این مدت، قطر هاله مهار رشد میکرووارگانیسم شاخص با استفاده از خطکش مدرج میلی‌متری اندازه‌گیری شد. قابلیت بازدارندگی دو سویه  $\text{Le}^{40}$  و  $\text{Le}^{50}$  بر استافیلوکوکوس اورئوس مطلوب ارزیابی شد. به همین دلیل، برای آزمایشات بعد انتخاب شدند (۹).

**شناسایی سویه‌های منتخب بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی:** برای این منظور از آزمون‌های متعدد استفاده شد مانند: بررسی تولید گاز از گلوكز، رشد در دماهای  $10^{\circ}\text{C}$  و  $45^{\circ}\text{C}$ ، رشد در غلظت  $6/5$  درصد نمک، هیدرولیز آرژنین، تولید سولفید هیدروژن، تولید ایندول، حرکت، و گس پروسکوئر (Voges-Proskauer) و تولید اسید اسید از کربوهیدرات‌های مختلف (۱۰-۱۲).

**حساسیت عوامل بازدارنده به آنزیم‌های مختلف:** برای مشخص کردن ماهیت عوامل بازدارنده سویه‌های منتخب، حساسیت آن‌ها در حضور آنزیم‌های کاتالاز، پیپسین، تریپسین و لیزوزیم بررسی شد. آنزیم‌ها با غلظت نهایی  $1\text{ mg/mL}$  به عصاره خنثی شده سویه‌های مورد نظر اضافه شدند. بعد از انکوباسیون به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق، فعالیت باقیمانده به روش نشرحفره‌ای بررسی شد (۸).

**طیف بازدارندگی:** با توجه به نتایج آزمایش‌های قبل، تولید ترکیبات شبه انتروسین توسط این سویه‌ها مشخص شد. برای بررسی طیف بازدارندگی شبه انتروسین‌های مورد نظر از روش نشرحفره‌ای استفاده شد. قابلیت بازدارندگی این ترکیبات روی باکتری‌های شاخص اسید لاکتیک و غیر اسید لاکتیک ذکر شده در جدول ۳ مورد بررسی قرار گرفت.

**مقاومت ترکیبات شبه انتروسین در دماهای مختلف:** عصاره خنثی شده کشت سویه‌های مورد نظر، در دماهای  $20^{\circ}\text{C}$ ،  $10^{\circ}\text{C}$  و  $100^{\circ}\text{C}$ ،  $90^{\circ}\text{C}$ ،  $80^{\circ}\text{C}$ ،  $70^{\circ}\text{C}$  و  $60^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شد. سپس فعالیت باقیمانده به روش نشرحفره‌ای مورد بررسی قرار گرفت (۸).

**مقاومت ترکیبات شبه انتروسین در pH‌های مختلف:** ابتدا pH عصاره کشت سویه‌های مورد نظر با استفاده از ۰/۱ HCl و ۲ NaOH مولار ۰/۱ نرمال از ۲ تا ۱۱ تنظیم شد و بعد از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، عصاره‌ها خنثی شدند. سپس فعالیت باقیمانده به روش نشرحفره‌ای بررسی شد (۷).

نتیجه بررسی اثر آنزیم‌های مختلف بر عصاره کشت این دو سویه که در جدول ۲ ارائه شده است، تولید انتروسین (باکتریوسین) را توسط هر دو سویه تأیید کرد، اما با توجه به عدم شناسایی ساختار ژنتیکی این ترکیبات، از اصطلاح "شبه انتروسین" به جای "انتروسین" استفاده شد.

جدول ۲- حساسیت عوامل بازدارنده دو سویه Le<sub>40</sub> و Le<sub>50</sub> به آنزیم‌های مختلف

Le <sub>50</sub>	Le <sub>40</sub>	آنزیم
-	-	کاتالاز
+/-	-	لیزوزیم
+	+	پیپسین
+	+	تریپسین

+: از دست دادن قابلیت بازدارندگی

-: حفظ قابلیت بازدارندگی

-/-: کاهش قابلیت بازدارندگی

در بررسی طیف بازدارندگی شبه انتروسین‌های دو سویه مورد نظر مشخص شد که هر دو شبه انتروسین بر باکتری‌های سالمونلا اتری تیدیس، سودمنزار آئروژینوزا، اشرشیاکلی، لاکتوباسیلیوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلیوس کازئی بی اثر بودند، در حالی که بر لیستریا مونوستیتوئنر و استافیلوکوکوس اورئوس اثر قابل توجهی داشتند (جدول ۳).

نتایج مربوط به مقاومت شبه انتروسین‌های مورد نظر در ماهای مختلف نشان داد که شبه انتروسین تولید شده توسط Le<sub>50</sub> در دمای C ۱۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه مقاوم بود، درحالی که شبه انتروسین تولید شده توسط Le<sub>40</sub> در دمای C ۷۰ به مدت ۱۰ دقیقه فعالیت خود را از دست داد.

در بررسی اثر pH بر شبه انتروسین‌های دو سویه مورد نظر مشخص شد که هر دو ترکیب در pH بین ۳ تا ۱۰ توانستند فعال بمانند. البته، شبه انتروسین تولید شده توسط Le<sub>50</sub> در pH=۲ نیز فعالیت خود را حفظ کرد. بالاترین قابلیت بازدارندگی بر باکتری شاخص در مورد هر دو شبه انتروسین در pH=۵ مشاهده شد (نمودار ۱).

## ۰ یافته‌ها

در این مطالعه ۸۷ سویه گرم مثبت و کاتالاز منفی به عنوان باکتری اسید لاكتیک از ۱۰۰ نمونه شیر میش و بز جدا شد. از مجموع سویه‌های جدا شده در ۲۴ سویه بعد از خنثی سازی عصاره کشت، اثر ضد میکروبی مشاهده شد. قابلیت بازدارندگی بیشتر این سویه‌ها در طول تحقیق تغییراتی کرد و برخی از آن‌ها این قابلیت را به سرعت از دست دادند. دو سویه Le<sub>40</sub> و Le<sub>50</sub> با توجه به حفظ خاصیت پاکیزگی خود در تکرارهای متعدد و قابلیت بازدارندگی مطلوب برای مطالعات بعدی انتخاب شدند. شناسایی فنوتیپی این سویه‌ها که بر اساس ویژگی‌های ارائه شده در جدول ۱ انجام گرفت، تعلق این دو سویه را به جنس انتروکوکوس مشخص کرد.

جدول ۱- ویژگی‌های فنوتیپی دو سویه Le<sub>40</sub> و Le<sub>50</sub>

Le <sub>50</sub>	Le <sub>40</sub>	نوع آزمون
-	-	تولید گاز از گلوکز
+	+	رشد در دمای ۴۵ °C
+	+	رشد در دمای ۱۰ °C
+	+	رشد در ۶/۵٪ نمک
+	+	تولید آمونیاک از آرژنین
-	-	تولید سولفید هیدروژن
-	-	تولید ایندول
-	-	توانایی حرکت
+	+	وگس- پروسکوئر
		تولید اسید از:
		گلوکز
		فروکتوز
		مالتوز
		مانیتول
		سوربیتول
		سوکروز
		رافینوز
		آراینوز
		لاکتوز
		ریبوز

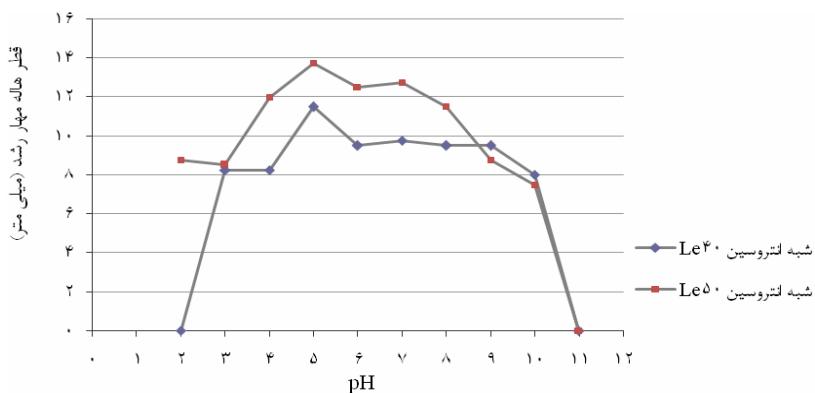
در تیتر این ترکیبات بعد از تخلیص نسبی مشاهده شد و قطر هاله‌های مهار رشد باکتری‌های شاخص افزایش یافت همچنین، این هاله‌ها با شفافیت بیشتری نمودار شدند (نمودار ۲). وزن ملکولی هر دو شبه انتروسین با روش- SDS-PAGE ۲۴-۲۹ کیلو دالتون تخمین زده شد. همان طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود، هر دو شبه انتروسین به مدت ۲۸ روز فعالیت خود را حفظ کردند و بعد از این مدت به طور کامل فعالیت خود را از دست دادند (نمودار ۳).

بعد از تیمار عصاره‌های کشت حاوی شبه انتروسین با آمونیوم سولفات(۰.۴٪) سه فاز جدا شد: فاز سبک تشکیل شده در سطح، فاز تهشین شده و فاز مایع. در فاز سبک تشکیل شده در سطح هر دو عصاره، قابلیت بازدارندگی بر دو باکتری شاخص/استافیلوكوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتیوژن مشاهده شد، در حالی که قابلیت بازدارندگی در فاز مایع، ناچیز بود و در فاز تهشین شده وجود نداشت. در ارزیابی فعالیت رقت‌های تهیه شده از عصاره‌های خنثی شده کشت دو سویه (که حاوی ترکیبات شبه انتروسین بودند) و شبه انتروسین‌های نسبتاً تخلیص شده، افزایش قابل توجهی

**جدول ۳- طیف بازدارندگی شبه انتروسین‌های دو سویه Le<sup>۴۰</sup> و Le<sup>۵۰</sup> روی باکتری‌های شاخص**

قابلیت بازدارندگی شبه انتروسین		باکتری شاخص
Le <sup>۵۰</sup>	Le <sup>۴۰</sup>	
-	-	سامونلا انتراپیدیس (جدایه بومی)
-	-	سودمناز آنروینوزا ATCC۲۷۸۵۳
-	-	اشرشیا کلی ATCC۸۷۳۹
+	+	لیستریا مونوسیتیوژن PTCC۱۲۹۸
+	+	استافیلوكوکوس اورئوس ATCC ۶۵۳۸
-	-	لاکتوپاسیلوس کازئی PTCC۱۶۰۸
-	-	لاکتوپاسیلوس اسیدوفیلوس PTCC۱۶۴۳

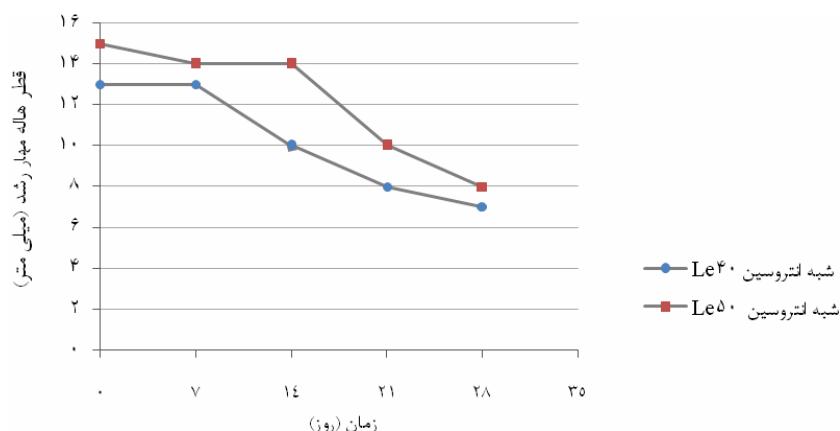
-: قابلیت بازدارندگی مشاهده نشده است.



**شکل ۱- مقاومت ترکیب شبه انتروسین تولید شده توسط دو سویه Le<sup>۴۰</sup> و Le<sup>۵۰</sup> در pHهای مختلف**



شکل ۲- فعالیت شبه انتروسین‌های دو سویه Le<sup>40</sup> و Le<sup>50</sup> قبل و بعد از تخلیص نسبی روی باکتری‌های شاخص استافیلوکوکوس اورنوس و لیستریا مونوسمیتوئنر



شکل ۳- پایداری شبه انتروسین‌های تولید شده توسط دو سویه Le<sup>40</sup> و Le<sup>50</sup> در طول نگهداری

## بحث

باکتری، فاقد جسم باکتری است، قابلیت بازدارندگی باکتری‌های اسید لاكتیک به دلیل ترشح ماده ای به خارج سلول است. از جمله این مواد می‌توان به پراکسید هیدروژن، اسیدهای آلی و باکتریوسین‌ها اشاره کرد. اسید، بخش عمده ترکیبات تولید شده توسط این باکتری‌ها است(۱۸). بعد از خنثی کردن مایع رویی که موجب حذف اثر اسید در عصاره‌ها شد، در ۲۴ سویه قابلیت بازدارندگی مشاهده شد. از آنجا که طبق گزارش‌های علمی، غلظت پراکسید هیدروژن

باکتری‌های اسید لاكتیک، کوکوس‌ها، کوکوباسیلوس‌ها و باسیلوس‌های میکروآروفیل و گرم مثبتی هستند که قادر به تولید کاتالاز نیستند(۲). در این تحقیق به منظور یافتن سویه‌های تولید کننده باکتریوسین، باکتری‌های اسید لاكتیک جدا شده از ۱۰۰ نمونه شیر میش و بز مورد بررسی قرار گرفتند. در بررسی قابلیت بازدارندگی سویه‌های جدا شده، برخی سویه‌ها قابلیت بازدارندگی بر باکتری شاخص از خود نشان دادند. با توجه به اینکه عصاره کشت

در حضور لیزوزیم می‌توان نتیجه گرفت که این ترکیب به یک بخش غیرپروتئینی مانند یک کربوهیدرات متصل است و در واقع این شبه‌انتروسین به شکل یک گلیکوپروتئین است. گزارش‌های متعددی در خصوص جداسازی گونه‌های مختلف انتروکوکوس از شیر و فراورده‌های شیری به عنوان باکتری‌های تولیدکننده انتروسین منتشر شده است (۲۰-۲۳).

دو شبه‌انتروسین تولیدی بر باکتری‌های گرم مثبت لیستریا مونوسیتیوژن و استافیلوکوکوس اورئوس که اهمیت ویژه‌ای در صنایع غذایی دارند، اثر بازدارندگی قابل توجهی داشتند. این دو ترکیب بر باکتری‌های گرم منفی مورد آزمایش، اثر بازدارندگی نداشتند. تاکنون، مهار باکتری‌های گرم منفی به وسیله باکتری‌های اسید لاكتیک بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است، ولی گزارش‌های محدودی مبنی بر اثر باکتری‌سینهای تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاكتیک علیه باکتری‌های گرم منفی وجود دارد. این مطالعات نشان می‌دهند که غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی به عنوان سدی در مقابل فعالیت باکتری‌سینهای غشای سیتوپلاسمی عمل می‌کند (۲۴). ترکیبات شبه‌انتروسین تولیدی توسط دو سویه مورد نظر بر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی اثر نداشتند که ممکن است ناشی از ویژگی‌های انفرادی سویه تولید کننده باکتری‌سین و اختصاصی بودن نحوه عملکرد هر سویه یا متابولیت‌های آن بر رشد هر باکتری شاخص باشد. در برخی مطالعات نیز باکتری‌سینهایی با عدم تأثیر ضد میکروبی بر باکتری‌های اسید لاكتیک گزارش شده است (۸).

شبه‌انتروسینهای به دست آمده در این تحقیق توانستند در طیف وسیعی از pH قابلیت بازدارندگی خود را حفظ کنند. به دلیل ساختار پروتئینی باکتری‌سینهای، تغییرات pH می‌تواند بر ساختار و فعالیت این ترکیبات، مؤثر باشد؛ اما حساسیت بیشتر این ترکیبات نسبت به تغییرات pH متفاوت است. بسیاری از باکتری‌سینهای در pH اسیدی و خنثی پایدارند، ولی در pH قلیایی غیرفعال می‌شوند؛ مانند: نیسین، لاکتواسترپسینهای، پدیوسین AcH و لوکوسین

تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاكتیک در کشت‌های مایع به حدی نیست که بر رشد باکتری‌ها اثر بازدارندگی داشته باشد، می‌توان نتیجه گرفت که بخشی از قابلیت بازدارندگی این سویه‌ها به ترکیبات شبه باکتری‌سین مربوط است.

قابلیت بازدارندگی برخی سویه‌ها دچار تغییراتی شد که در برخی پژوهش‌های علمی نیز به آن اشاره شده است. وجود ژن تولید باکتری‌سین روی پلاسمید در این سویه‌ها و نایابی‌داری پلاسمیدها از عواملی است که می‌تواند در بروز این تغییرات مؤثر باشد. بتایران، می‌توان نتیجه گرفت که شاید فقط برخی از سلول‌های باکتری‌ای در سویه‌های مذکور قادر به تولید عوامل بازدارنده هستند. البته، سرعت نفوذ باکتری‌سین به محیط کشت و سرعت رشد باکتری شاخص از عواملی هستند که می‌توانند قطر هاله مهار رشد را تحت تأثیر قرار دهند. از طرفی، گاهی اوقات ممکن است با روش نشرحفره ای تولید باکتری‌سین، قابل تشخیص نباشد که می‌تواند ناشی از تجمع و غیر قابل نفوذ بودن باکتری‌سینهای تولید شده و غلظت آن‌ها باشد (۲، ۱۹).

در بین سویه‌های جدا شده، دو سویه از انتروکوکوس قابلیت بازدارندگی مطلوبی از خود نشان دادند. برای اثبات تولید انتروسین توسط این سویه‌ها اثر آنزیم‌های مختلف بر عصاره کشت این سویه‌ها مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به حفظ قابلیت بازدارندگی ترکیبات بازدارنده در حضور آنزیم کاتالاز عدم دخالت پراکسید هیدروژن در فعالیت ضد میکروبی سویه‌های مورد نظر تأیید شد و از طرفی با مشاهده حساسیت این ترکیبات به پروتئازها که شاخصی کلیدی برای تعیین هویت ماده بازدارنده به عنوان باکتری‌سین است، می‌توان گفت هر دو سویه مورد نظر قادر به تولید باکتری‌سین هستند.

برخی باکتری‌سین‌ها حاوی کربوهیدرات، لیپید یا فسفر هستند. چنین بخش غیر پروتئینی با بررسی حساسیت این ترکیبات به آنزیم‌های گلیکولیتیک، لیپولیتیک و فسفولیتیک قابل تشخیص است (۲). به همین دلیل در این مطالعه برای بررسی بیشتر ساختمان ترکیبات ضد میکروبی تولید شده از آنزیم لیزوزیم استفاده شد. با کاهش قابلیت بازدارندگی ۵۰

وزن ملکولی شبه انتروسین‌های جدا شده با روش-SDS-PAGE که روش دقیقی در تعیین وزن ملکولی پروتئین‌هاست ۲۶ تا ۲۹ کیلو دالتون تعیین شد. تاکنون، انتروسین‌ها و شبه انتروسین‌هایی با وزن ملکولی متفاوت از سویه‌های مختلف انتروکوکوس گزارش شده است (۲۳، ۸، ۱۷).

هر دو ترکیب مورد نظر توانستند به مدت ۲۸ روز فعالیت خود را در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  حفظ کنند. البته، فعالیت ضد میکروبی این ترکیبات طی این مدت سیر نزولی داشت. انتروسین‌های جدا شده از دو سویه انتروکوکوس نیز که توسط *Coccolin* و همکاران در سال ۱۹۹۷ از شیر بز جدا شدند، بعد از ۳۰ روز نگهداری در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  فعالیت خود را از دست دادند. پایداری بیشتر این ترکیبات در دمای انجماد در برخی از مقاالت گزارش شده است. پایداری باکتریوسین‌ها در طی نگهداری در انتخاب این ترکیبات به عنوان نگهدارنده مؤثر است (۲۵).

با توجه به قابلیت بازدارندگی شبه انتروسین‌های دو سویه مورد نظر بر استافیلکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوئنر که دو باکتری بیماری‌زای مهم در مواد غذایی به شمار می‌آیند و ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی مطلوب ترکیبات جدا شده به ویژه شبه انتروسین تولید شده توسط سویه Le<sub>50</sub> تحقیقات وسیع تری برای شناسایی ویژگی‌های ژنتیکی این ترکیبات همراه با بهینه سازی شرایط تولید و افزایش فعالیت ضد میکروبی آن‌ها می‌تواند زمینه کاربرد این ترکیبات را به عنوان افزودنی‌های غذایی فراهم سازد.

### سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی برای تأمین بودجه لازم جهت انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

### • References

1. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 2001; 71: 1-20.
2. De vuyst L, Vandamme EJ. Bacteriocins of lactic acid bacteria. 1<sup>st</sup> ed. London: Blackie Academic and Professional; 1994: pp. 91-143.
3. Abee T, Krockel L, Hill C. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J Food Microbiol* 1995; 28: 169-85.
4. Chikindas ML, Montville TJ. Perspectives for application of bacteriocins as food preservatives. In: Juneja VK, Sofos JN. Editors. *Control of foodborne microorganisms*. New York: Marcel Dekker; 2002: pp. 303-21.

A-UAL187 که در pHهای بالای ۸ غیرفعال می‌شوند (۲).

شبه انتروسین تولید شده توسط سویه Le<sub>50</sub> مقاومت دمایی مطلوبی از خود نشان داد. مقاومت دمایی، ویژگی عمده بسیاری از باکتریوسین‌ها و شبه باکتریوسین‌های تولیدی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک است که می‌تواند از  $100^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ دقیقه یا دمای اتوکلاو ( $121^{\circ}\text{C}$ ) به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه متفاوت باشد. مقاومت دمایی ممکن است به دلیل تشکیل ساختمان‌های گلbuli، حضور نواحی هیدروفوبیک قوی، ایجاد اتصالات عرضی پایدار، محتوای گلیسین بالا و عوامل دیگر باشد (۲). مقاومت بالاتر شبه انتروسین Le<sub>50</sub> نسبت به Le<sub>40</sub> را می‌توان ناشی از تفاوت در ساختار این دو ترکیب و همچنین وجود شبه انتروسین Le<sub>5</sub> به شکل یک گلیکوپروتئین دانست. مقاومت در دماها و pHهای مختلف از ویژگی‌های مؤثر در کاربرد یک باکتریوسین به عنوان نگهدارنده غذایی است.

در این تحقیق برای تخلیص نسبی شبه انتروسین‌هایی به دست آمده از روش رسوب‌دهی با نمک استفاده شد که یکی از قدیمی‌ترین و در عین حال مهم‌ترین فنون مورد استفاده برای بازیافت پروتئین‌هاست، (۱۳، ۱۵). فعالیت عمده شبه انتروسین‌ها در فاز سیک تشکیل شده در سطح مشاهده شد. با توجه به اینکه باکتریوسین‌ها بیشتر کمپلکس‌ها و یا توده‌های پروتئینی هستند، به نظر می‌رسد که تجمع آن‌ها در فاز رویی یا تهنشین شده به ساختمان آن‌ها بستگی دارد (۲). افزایش قطر هاله‌های مهار رشد باکتری‌های شاخص و شفافیت بیشتر آن‌ها و افزایش تیتر این ترکیبات بعد از رسوب دهی شبه انتروسین‌ها با آمونیوم سولفات، دیالیز و تغليظ با PEG را می‌توان به کارایی این روش در تخلیص نسبی و بازیافت شبه انتروسین‌ها از عصاره کشت نسبت داد.

5. Delves-Broughton J. Nisin and its uses as a preservative. *Food Technol* 1990; 44: 100-102.
6. Delves-Broughton J, Blackburn P, Evans RJ, Hugenholtz J. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996; 69: 193-202.
7. Rodriguez E, González B, Gaya P, Nuñez M, Medina M. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int Dairy J* 2000; 10: 7-15.
8. Cocolin L, Foschino R, Giuseppe C, Grazia-Fortina M. Description of bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. *Food Microbiol* 2007; 24: 752-8.
9. Mayr-Harting A, Hedges AJ, Berkeley RCW. Methods for studying bacteriocins. *Methods Microbiol* 1972; 7A: 315-422.
10. Balow A. Manual of clinical microbiology. 5th ed. Washington: ASM; 1991: 251-3
11. Balow A, Ttuper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH. The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. New York: Springer; 2006. p. 163-74.
12. Kandler O, Weiss N. Bergey's manual of systematic bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williame and Wilkins; 1986. p. 1043- 62.
13. Parente E, Ricciardi A. Production, recovery and purification of bacteriocin from lactic acid bacteria. *Appl Microbial Biotechnol* 1999; 52: 628-38.
14. Harris E, Angel S. Protein purification methods. 2<sup>nd</sup> ed. New York: IRL press; 1989: p. 126-48.
15. Carolissen V, Arendse G, Hastings JW. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int J Food Microbiol* 1997; 16: 1-16.
16. Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *J Biotechnol* 2003; 2(8): 219-27.
17. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; p. 2001: 840-6.
18. Piard JC, Desmazeaud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria.2: bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait* 1991; 72: 113-42.
19. Ahn C, Stilles ME. Mobilization and expression of bacteriocin plasmids from *Carnobacterium piscicola* isolated from meat. *J Appl Bacteriol* 1992; 73: 217-28.
20. Rodriguez E, Martinez M, Medina M, Hernandez PE, Rodriguez JM. Detection of enterocin AS-48-producing dairy enterococci by dot-blot and colony hybridization. *J Dairy Res* 1998; 65: 143-8.
21. Lasagno M, Beoleito V, Sesma F, Raya R, Font de Valdez G, Eraso A. Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from a dairy environment. *New Microbiol* 2002; 25(1): 37- 44.
22. Casla D, Requena T, Gomez R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105. *J Appl Bacteriol* 1996; 81: 35-41.
23. Mirhosseini M, Nahvi I, Emtiazi G, Tavassoli M. Characterisation of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecium* strain isolated from dairy product. *J Dairy Technol* 2009; 63: 55-61.
24. Helander IM, Von Wright A, Mattila-Sandholm TM. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol* 1997; 8: 146-150.
25. Mojgani NG, Sabiri M, Ashtiani M, Torshizi M. Characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus brevis* NM 24 and *L. fermentum* NM 332 isolated from green olives in Iran. *Internet J Microbiol* 2009; 6(2)

## Characterization of enterocin-like substances produced by two strains of *Enterococci* isolated from ewe's and goat's milks

Yousefi L<sup>1</sup>, Ehsani MR<sup>\*2</sup>, Fazeli MR<sup>3</sup>, Mojgani N<sup>4</sup>, Ezatpanah H<sup>5</sup>

1- M.Sc in Food Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

2- \*Corresponding author: Prof, Dept. of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

E-mail: mehrdad\_ghavami@yahoo.com

3- Associate Prof, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

4- Assistant Prof, Dept. of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Tehran, Iran.

5- Assistant Prof, Dept. of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.

Received 24 May, 2010

Accepted 4 Sept, 2010

**Background and Objective:** Raw milk is a source of new strains of bacteriocin-producing lactic acid bacteria (LAB) with the potential to inhibit undesirable microorganisms. The aim of this work was to detect the bacteriocin-producing LAB from raw ewe's and goat's milks and characterize the isolated bacteriocins.

**Materials and Methods:** A total of 100 samples of ewe's and goat's milks were screened for bacteriocin-producing lactic acid bacteria. Two strains were selected and identified phenotypically to genus level. The serums of cultures of the selected strains were treated with various enzymes to determine the nature of their antimicrobial substances. The inhibition potential of the substances was investigated by agar well diffusion assay and their stability at different temperatures and pH's were determined. The antimicrobial substances were partially purified by ammonium sulphate and poly-ethylene gltcol (PEG) and the titer determined. In addition, their molecular weights were determined by SDS-PAGE analysis and their resistance estimated during storage at 4 °C.

**Results:** The two strains of *Enterococcus*, Le40 and Le50, exhibited a broad antimicrobial activity in several replicates. The sensitivity of the inhibitory substances to proteolytic enzymes confirmed the production of enterocin-like substances (ELS) by these strains. *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* were inhibited by the ELSs. The ELSs were both stable at a wide pH range (pH 3-10) and the one isolated from Le50 was resistant to heat. Partial purification of both the ELSs increased their activity and titer. Their molecular weights were between 24 and 29 KD. Finally, the ELS's activity was maintained during storage at 4 °C for 28 days.

**Conclusion:** Considering the desirable antimicrobial characteristics and biochemical properties of the isolated ELSs, further studies to explore the possibility of using them as biopreservatives in food processing is recommended.

**Keywords:** Enterocin-like, *Enterococcus*, Milk, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*