مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال ششم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰، صفحات ۴۲-۳۳

بررسی ویژگی‌های شبه انتروسین‌های تولید شده توسط دو سویه از انتروکوکوس‌های جدا شده از شیرمیش و بز

لیلا یوسفی[۱]، محمدرضا احسانی[۲]، محمدرضا فاضلی[۳]، ناهید مژگانی[۴]، حمید عزت پناه[۵]

۱- دانش‌آموخته 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 دریافت: ۸۹/۳/۳ تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۱۳

چکیده

سابقه و هدف: شیر خام می‌تواند منبعی برای سویه‌های جدید باکتری‌های اسید لاکتیک تولیدکننده باکتریوسین با توانایی مهار میکروارگانیسم‌های نامطلوب باشد. این تحقیق با هدف جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیکِ 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 فنوتیپی 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 دماها و pHهای 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 ۴ °C تخمین زده شد.

یافته‌ها: دو سویه از *انتروکوکوس* (Le۴۰ و Le۵۰) در تکرارهای متعدد، فعالیت ضد میکروبی بالایی از خود بروز دادند. حساسیت ترکیبات بازدارندهٔ تولید شده توسط این سویه‌ها به آنزیم‌های پروتئولیتیک، تولید ترکیبات شبه انتروسین توسط این سویه‌ها را تأیید کرد. این ترکیبات روی *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر بازدارندگی داشتند. هر دو شبه انتروسین در pH ۳ تا ۱۰ پایدار بودند و شبه انتروسین جدا شده از Le۵۰ به دمای بالا مقاوم بود. تخلیص نسبی هر دو ترکیب موجب افزایش تیتر و فعالیت آن‌ها شد. وزن ملکولی هر دو شبه انتروسین ۲۴ تا ۲۹ کیلو دالتون تخمین زده شد. این دو ترکیب، فعالیت خود را به مدت ۲۸ روز در دمای ۴ °C حفظ کردند.

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

واژگان کلیدی: شبه انتروسین، *انتروکوکوس*، شیر، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*

• مقدمه

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، کُشنده هستند یا از رشد آن‌ها جلوگیری می‌کنند. برخی از این ترکیبات به دلیل امکان استفاده در مواد غذایی مختلف و فعالیت علیه باکتری‌های بیماری‌زای کلیدی مانند *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیکوکوس اورئوس* مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند (۴-۱).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-06-22]

پـژوهش‌هـای متعـدد نـشان داده‌انـد کـه گونـه‌هـای تولیدکننـده باکتریوسـین شـامل همـه جـنس‌هـای بـاکتری‌هـای اسـید لاکتیـک مـی‌شـود؛ ماننـد: *لاکتوکوکـوس*، *اسـترپتوکوکوس*، *لاکتوباسـیلوس*، *لوکونوسـتوک*، *پـدیوکوکوس* و *انتروکوکـوس*. تـاکنون، باکتریوسـین‌هـای مختلفـی از ایـن بـاکتری‌هـا شناسـایی شـده‌انـد. بـه طـور مثـال: تولیـد نیـسین از *لاکتوکوکـوس لاکتـیس*، لاکتاسـین B از *لاکتوباسـیلوس اسـیدوفیلوس* ، پدیوسـین PA-1 از *پـدیوکوکوس اسـیدیلاکتیس* ، مزنتریـسین Y105 از *لوکونوسـتوک مزنتروئیـدس* و انتروسـین AS-48 از گونـه‌هـای مختلـف *انتروکوکـوس*. در بـین باکتریوسـین‌هـای شـناخته شـده نیـسین، تنهـا باکتریوسـینی اسـت کـه بـه طـور گـسترده بـه عنـوان یـک نگهدارنده طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۶، ۵).

امروزه، با توجـه بـه عملکـرد محـدود باکتریوسـین‌هـای شناخته شده، دستیابی بـه سـویه‌هـای لاکتیـک بـا توانـایی تولید باکتریوسـین‌هـای مناسـب در مقـادیر زیـاد و فعالیـت ضـد میکروبـی بـالا علیـه میکرارگانیـسم‌هـای ناخواسـته، مطلـوب اسـت. در ایـن راه، محققـان در بیـشتر نقـاط جهان سـویه‌هـای بـومی را بررسـی کـرده‌انـد و از آنجـا کـه شیر و فراورده‌های آن مـی‌تواننـد منبعـی بـرای سـویه‌هـای جدیـد لاکتیـک بـا توانـایی بـالقوه بـرای مهـار میکروارگانیـسم‌هـای عامـل فـساد و بیمـاری‌زای غـذایی باشند، ایـن گـروه از مـواد غـذایی بیـشتر مـورد توجـه قـرار گرفته‌اند(۷).

در تحقیقـی کـه توسـط Rodriguez و همکـاران در سـال ۲۰۰۰ روی ۲۹۸ نمونـه شـیر خـام گونـه‌هـای مختلـف حیـوانی (بـز ، مـیش و گـاو) در اسـپانیا انجـام شـد ۸۲ سـویهٔ تولیـد کننـدهٔ باکتریوسـین بـه صـورت ژنـوتیپی و فنـوتیپی شـناخته شـدند و شـبه باکتریوسـین‌هـای تولیـدی توسـط ۱۶سـویه لاکتیـک، طیف ضد میکروبی وسیعی از خود نشان دادند (۷).

Cocolin و همکاران در سال ۲۰۰۷ در اسپانیا دو سـویه *انتروکوکـوس فاسـیوم* M241 و M249 را از شـیر بـز جـدا کردند. این دو سویه روی *لیستریا مونوسیتوژنز* و کلستریدیوم *بوتیریکوم* اثر بازدارندگی داشتند، در حالی که بر باکتری‌های اسید لاکتیک بی‌اثر بودند. باکتریوسین تولید شده توسط هر دو سویه دمای ۱۰۰ °C را به مـدت ۱۰ دقیقـه تحمـل و در pH ۴/۵ تا ۸ فعالیت خود را حفظ کرد. کشت همزمان ایـن سویه‌ها همراه با *لیستریا مونوسیتوژنز* در شیر بـی‌چربـی بـه تأخیر۶ ساعته در رشد *لیستریا* در مقایـسه بـا نمونـه شـاهد منجر شد. این محققان امکان استفاده از این سـویه‌هـا را بـه همراه کشت‌های آغازگر بـرای افـزایش ایمنـی فـراورده‌هـای شیری مطرح کردند (۸).

هـدف از ایـن مطالعـه، جداسـازی سـویه‌هـای برتـر باکتری‌های اسیدلاکتیک تولید کنندهٔ باکتریوسین از شیر بـا توانایی مهار برخی باکتری‌های بیماری‌زای غذایی و شناسایی برخی ویژگی‌های باکتریوسین‌های تولیدی بود.

• مواد و روش‌ها

سویه‌های میکروبی و شرایط کشت: بـاکتری‌هـای اسـید لاکتیک از ۱۰۰ نمونه شیر میش و بز بـا اسـتفاده از محـیط کـشت MRS (Merck، آلمـان) در دمـای ۳۷ °C و شـرایط میکروآئروفیـل (۶٪ اکـسیژن) جـدا شـدند(۷). کـشت باکتری‌های شاخص *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۶۵۳۸، *سـودموناز آئروژینـوزا* ATCC ۲۷۸۵۳ ، *سـالمونلا انتـری تیدیس* (جدایه بومی)، *اشرشیاکلی* ATCC۸۷۳۹ در محـیط کـشت Muller Hilton (Merck، آلمـان) و کـشت *لیـستریا مونوسیتوژنز* PTCC۱۲۹۸ در محـیط کـشت TS حـاوی۰/۶ درصد عـصاره مخمـر در دمـای۳۵°C-۳۰ و شـرایط هـوازی صـورت گرفـت (۸، ۷). دو بـاکتری شـاخص اسـید لاکتیـک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC ۱۶۴۳ و *لاکتوباسـیلوس کازیی* PTCC ۱۶۰۸ در محیط MRS دمای ۳۷ °C و شرایط میکروآئروفیل کشت داده شدند(۸).

قابلیت بازدارندگی: برای این منظـور از روش نـشرحفره‌ای (well diffusion) اسـتفاده شـد. کـشت ۱۶ تـا ۱۸ سـاعته سویه‌های جدا شده در محیط کشت MRS بـراث حـاوی۲٪ گلوکز سانتریفوژ (۵۰۰۰×g) بـه مـدت ۲۰ دقیقـه) و عـصاره کشت جدا شد. pH عصاره با استفاده از هیدروکسید سدیم ۲ مولار در محدوده ۶/۵ تـا ۷ تنظـیم شـد . سوسپانـسیونی از کشت ۲۴ ساعته *استافیلوکوکوس اورئوس* (باکتری شـاخص) معـادل 10^8 CFU/mL تهیـه شـد و بـا اسـتفاده از سـوآب استریل، کشت یکنـواختی روی پلیـت‌هـای حـاوی محـیط کشت تهیه شد. چاهـک‌هـایی بـه قطـر ۵mm روی محـیط کشت ایجـاد شـد و ۱۰۰µL از عـصاره خنثـی شـده کـشت سویه‌های لاکتیک جدا شده، درون آن‌ها ریختـه شـد. بـرای جذب عصاره به درون محیط کشت، پلیت‌ها به مدت ۲ تـا ۴ ساعت در یخچال قرار داده شدند و سپس به مدت ۱۸ تا ۲۴

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-06-22]

ساعت در دمای ۳۰-۳۵°C گرمخانه گذاری شدند. بعد از این مدت، قطر هاله مهار رشد میکروارگانیسم شاخص با استفاده از خط‌کش مدرج میلی‌متری اندازه‌گیری شد. قابلیت بازدارندگی دو سویه Le۴۰ و Le۵۰ 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 متعددی استفاده شد مانند: بررسی تولید گاز از گلوکز، رشد در دماهای ۱۰°C و ۴۵°C ، رشد در غلظت ۶/۵ درصد نمک، هیدرولیز آرژنین، تولید سولفید هیدروژن، تولید ایندول، حرکت، وگس پروسکوئر(Voges-Proskauer) و تولید اسید از کربوهیدرات‌های مختلف (۱۲-۱۰).

حساسیت عوامل بازدارنده به آنزیم‌های مختلف: برای مشخص کردن ماهیت عوامل بازدارندهٔ سویه‌های منتخب، حساسیت آن‌ها در حضور آنزیم‌های کاتالاز، پپسین، تریپسین و لیزوزیم بررسی شد. آنزیم‌ها با غلظت نهایی ۱ mg/mL به عصاره خنثی شدهٔ 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 بازدارندگیِ شبه انتروسین‌های مورد نظر از روش نشرحفره‌ای استفاده شد. قابلیت بازدارندگی این ترکیبات روی باکتری‌های شاخص اسید لاکتیکِ و غیر اسید لاکتیک ذکر شده در جدول ۳ مورد بررسی قرار گرفت.

مقاومت ترکیبات شبه انتروسین در دماهای مختلف: عصاره خنثی شدهٔ کشت سویه‌های مورد نظر، در دماهای ۶۰°C ، ۷۰°C ، ۸۰°C ، ۹۰°C و ۱۰۰°C به مدت ۱۰ ، ۲۰ و 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 NaOH ۲ مولار و HCl 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).

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 ۴ °C به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. بعد از این مدت، نمونه‌ها سانتریفوژ (۵۰۰۰×g ، ۳۰ دقیقه ،۴ °C) شدند. رسوبات حاصل در دو فاز رویی و ته‌نشین شده در بافر فسفات پتاسیم (pH=۷/۴) حل شد. برای حذف نمک سولفات آمونیوم ، نمونه‌ها در کیسه دیالیز با off-cut ۱۰۰۰۰ دالتون در مقابل بافر فسفات پتاسیم (pH=۷/۴) 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 تغلیظ 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 (۱۵-۱۳).

تعیین تیتر ترکیبات شبه انتروسین: تیتر باکتریوسین‌ها برای ارزیابی فعالیت آن‌ها به کار می‌رود. برای این منظور از عصاره خنثی شدهٔ کشت دو سویه Le۴۰ و Le۵۰ و نمونه‌های نسبتاً تخلیص شدهٔ حاصل از مرحله قبل، رقت‌های متوالی دوتایی (two fold serial dilution) در بافر فسفات پتاسیم (pH=۷/۴) 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 میکروارگانیسم شاخص مشاهده و به صورت AU/mL بیان می‌شود (۱۶).

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

پایداری ترکیبات شبه انتروسین طی نگهداری: شبه انتروسین‌های نسبتاً خالص شده در دمای ۴°C نگهداری شدند. قابلیت بازدارندگی آن‌ها هر۷ روز یک بار به روش نشرحفره‌ای روی باکتری شاخص بررسی می‌شد (۸).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-06-22]

• یافته‌ها

در این مطالعه ۸۷ سویه گرم مثبت و کاتالاز منفی به عنوان باکتری اسید لاکتیک از ۱۰۰ نمونه شیر میش و بز جدا شد. از مجموع سویه‌های جدا شده در۲۴ 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 Le۴۰ و Le۵۰ با توجه به حفظ خاصیت پادزیستی 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 Le۴۰ و Le۵۰

نوع آزمون	Le۴۰	Le۵۰
تولید گاز از گلوکز	-	-
رشد در دمای ۴۵ °C	+	+
رشد در دمای ۱۰ °C	+	+
رشد در۶/۵٪ نمک	+	+
تولید آمونیاک از آرژنین	+	+
تولید سولفید هیدروژن	-	-
تولید ایندول	-	-
توانایی حرکت	-	-
وگس- پروسکوئر	+	+
تولید اسید از:		
گلوکز	+	+
فروکتوز	+	+
مالتوز	+	+
مانیتول	-	-
سوربیتول	-	-
سوکروز	+	+
رافینوز	+	-
آرابینوز	-	-
لاکتوز	+	+
ریبوز	+	+

نتیجه بررسی اثر آنزیم‌های مختلف بر عصاره کشت این دو سویه که در جدول۲ 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 "شبه‌انتروسین" به جای "انتروسین" استفاده شد.

جدول۲- حساسیت عوامل بازدارنده دو سویه Le۴۰ و Le۵۰ به آنزیم‌های مختف

آنزیم	Le۴۰	Le۵۰
کاتالاز	-	-
لیزوزیم	-	+/-
پپسین	+	+
تریپسین	+	+

+ : از دست دادن قابلیت بازدارندگی

- : حفظ قابلیت بازدارندگی

-/+: کاهش قابلیت بازدارندگی

در بررسی طیف بازدارندگی شبه انتروسین‌های دو سویهٔ مورد نظر مشخص شد که هر دو شبه‌انتروسین بر *باکتری‌های سالمونلا انتری تیدیس، سودوموناز آئروژینوزا، اشرشیاکلی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* بی اثر بودند، در حالی که بر *لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس* اثر قابل توجهی داشتند (جدول۳).

نتایج مربوط به مقاومت شبه انتروسین‌های مورد نظر در دماهای مختلف نشان داد که شبه‌انتروسین تولید شده توسط Le۵۰ در دمای ۱۰۰ °C به مدت ۱۰ دقیقه مقاوم بود، درحالی که شبه‌انتروسین تولید شده توسط Le۴۰ در دمای ۷۰ °C به مدت ۱۰ دقیقه فعالیت خود را از دست داد.

در بررسی اثر pH بر شبه انتروسین‌های دو سویهٔ مورد نظر مشخص شد که هر دو ترکیب در pH بین ۳ تا ۱۰ توانستند فعال بمانند. البته، شبه انتروسین تولید شده توسط Le۵۰ 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).

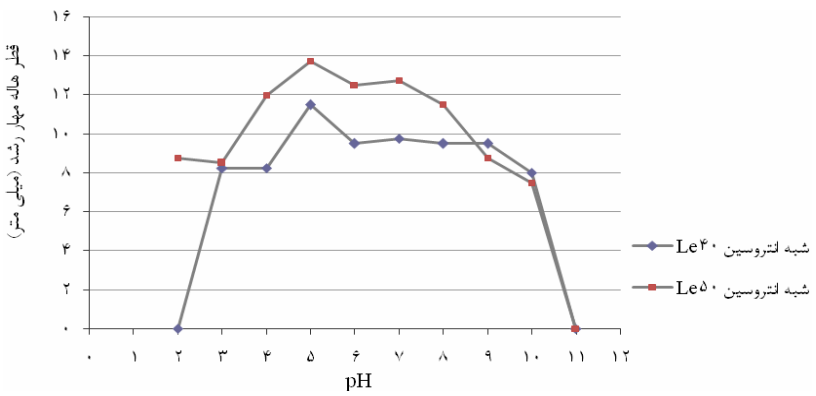
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-06-22]

بعد از تیمار عصاره‌های کشت حاوی شبه انتروسین با آمونیوم سولفات(۴۵٪) سه فاز جدا شد: فاز سبک تشکیل شده در سطح، فاز ته‌نشین شده و فاز مایع. در فاز سبک تشکیل شده در سطح هر دو عصاره، قابلیت بازدارندگی بر دو باکتری شاخص *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* مشاهده شد، در حالی که قابلیت بازدارندگی در فاز مایع، ناچیز بود و در فاز ته‌نشین شده وجود نداشت. در ارزیابی فعالیت رقت‌های تهیه شده از عصاره‌های خنثی شدهٔ کشت دو سویه (که حاوی ترکیبات شبه انتروسین بودند) و شبه انتروسین‌های نسبتاً تخلیص شده، افزایش قابل توجهی 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 (نمودار۲). وزن ملکولی هر دو شبه انتروسین با روش SDS-PAGE ۲۹-۲۴ کیلو دالتون تخمین زده شد. همان طور که در نمودار۳ 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 (نمودار۳).

جدول۳- طیف بازدارندگی شبه انتروسین‌های دو سویهLe۴۰ وLe۵۰ روی باکتری های شاخص

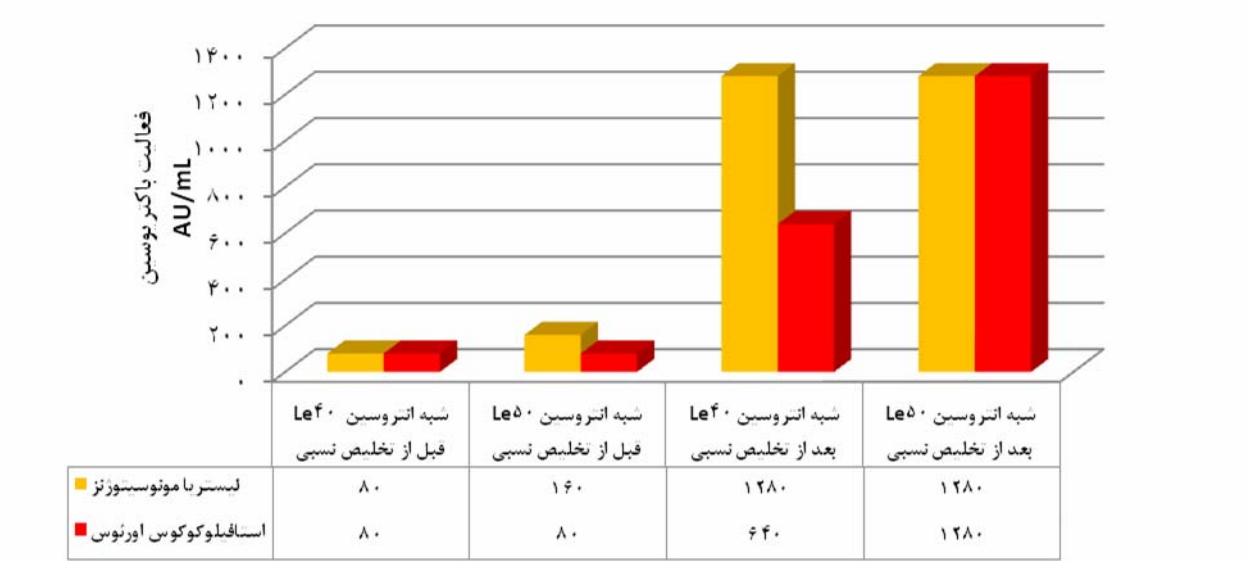
باکتری شاخص	قابلیت بازدارندگی شبه انتروسین	
	Le۴۰	Le۵۰
سالمونلا انترایتیدیس (جدایه بومی)	-	-
سودموناز آئروژینوزا ATCC۲۷۸۵۳	-	-
*اشرشیا کلی*ATCC۸۷۳۹	-	-
لیستریا مونوسیتوژنز PTCC۱۲۹۸	+	+
استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۶۵۳۸	+	+
لاکتوباسیلوس کازئی PTCC۱۶۰۸	-	-
*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*PTCC۱۶۴۳	-	-

- : قابلیت بازدارندگی مشاهده نشده است.

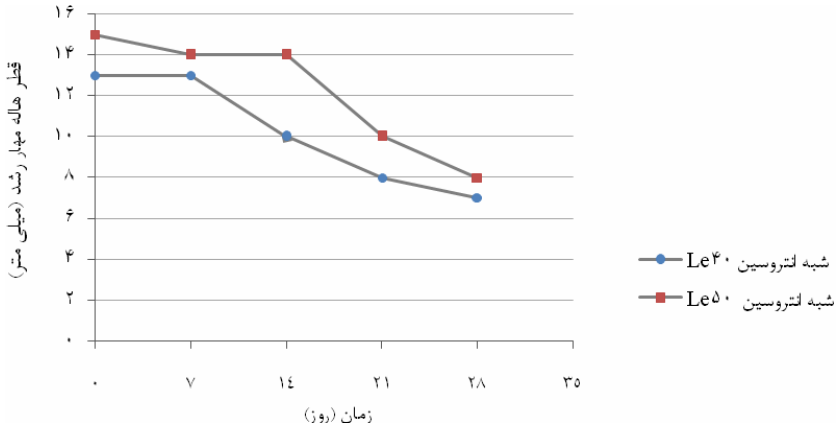


شکل ۱- مقاومت ترکیب شبه انتروسین تولید شده توسط دو سویه Le۴۰ وLe۵۰ در pHهای مختلف

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-06-22]



شکل ۲- فعالیت شبه انتروسین‌های دو سویه Le۴۰ و Le۵۰ قبل و بعد از تخلیص نسبی روی باکتری‌های شاخص *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز*



شکل ۳- پایداری شبه انتروسین‌های تولید شده توسط دو سویه Le۴۰ و Le۵۰ در طول نگهداری

بحث

باکتری‌های اسید لاکتیک، کوکوس ها، کوکوباسیلوس‌ها و باسیلوس‌های میکروآئروفیل و گرم مثبتی هستند که قادر به تولید کاتالاز نیستند(۲). در این تحقیق به منظور یافتن سویه‌های تولید کنندهٔ باکتریوسین، باکتری‌های اسید لاکتیکِ 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 باکتری، فاقد جسم باکتری است، قابلیت بازدارندگی باکتری‌های اسید لاکتیک 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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-06-22]

تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک 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 باکتریوسین مربوط است.

قابلیت بازدارندگی برخی سویه‌ها دچار تغییراتی شد که در برخی پژوهش‌های علمی نیز به آن اشاره شده است. وجود ژن تولید باکتریوسین روی پلاسمید در این سویه‌ها و ناپایداری پلاسمیدها از عواملی است که می‌تواند در بروز این تغییرات مؤثر باشد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که شاید فقط برخی از سلول‌های باکتریایی در سویه‌های مذکور قادر به تولید عوامل بازدارنده هستند. البته، سرعت نفوذ باکتریوسین 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 باکتریوسین، قابل تشخیص نباشد که می‌تواند ناشی از تجمع و غیر قابل نفوذ بودن باکتریوسین‌های تولید شده و غلظت آن‌ها باشد (۱۹، ۲).

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 بازدارندگیِ ترکیبات بازدارنده در حضور آنزیم کاتالاز عدم دخالت پراکسید هیدروژن در فعالیت ضدمیکروبی 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 باکتریوسین است، می‌توان گفت هر دو سویه مورد نظر قادر به تولید باکتریوسین هستند.

برخی باکتریوسین‌ها 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 Leدر 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 (۲۳-۲۰).

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

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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-06-22]

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

شبه انتروسین تولید شده توسط سویه Le۵۰ 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 ۱۰۰°C-۶۰ به مدت ۳۰ دقیقه یا دمای اتوکلاو (۱۲۱°C) به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه متفاوت باشد. مقاوت دمایی ممکن است به دلیل تشکیل ساختمان‌های گلبولی، حضور نواحی هیدروفوبیک قوی، ایجاد اتصالات عرضی پایدار، محتوای گلیسین بالا و عوامل دیگر باشد(۲). مقاومت بالاتر شبه انتروسین Le۵۰ نسبت به Le۴۰ را می‌توان ناشی از تفاوت در ساختار این دو ترکیب و همچنین وجود شبه انتروسین Le۵۰ 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 سبک 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 تغلیظ با PEG را می‌توان به کارایی این روش در تخلیص نسبی و بازیافت شبه انتروسین‌ها از عصاره کشت نسبت داد.

وزن ملکولی شبه انتروسین‌های جدا شده با روش SDS-PAGE که روش دقیقی در تعیین وزن ملکولی پروتئین‌هاست ۲۴ تا ۲۹ کیلو دالتون تعیین شد. تاکنون، انتروسین‌ها و شبه انتروسین‌هایی با وزن ملکولی متفاوت از سویه‌های مختلف *انتروکوکوس* گزارش شده است (۲۳، ۱۷، ۸، ۲).

هر دو ترکیب مورد نظر توانستند به مدت ۲۸ روز فعالیت خود را در دمای ۴ °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 *Cocolin* و همکاران در سال ۱۹۹۷ از شیر بز جدا شدند، بعد از ۳۰ روز نگهداری در دمای ۴°C فعالیت خود را از دست دادند. پایداری بیشتر این ترکیبات در دمای انجماد در برخی از مقالات گزارش شده است. پایداری باکتریوسین‌ها در طی نگهداری در انتخاب این ترکیبات به عنوان نگهدارنده مؤثر است (۲۵، ۸).

با توجه به قابلیت بازدارندگی شبه انتروسین‌های دو سویه مورد نظر بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* 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 Le۵۰ تحقیقات وسیع‌تری 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.1st 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.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-06-22]

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. 9th 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. 2nd 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-*Listerria 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)

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-06-22]

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

*Yousefi L[1], Ehsani MR[*2], Fazeli MR[3], Mojgani N[4], Ezatpanah H[5]*

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 detrmine 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 molcular 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 sensivity 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 molcular 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*

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-06-22]