# مطالعه تاثیر ضدباکتریایی وزیکول‌های خارج‌سلولی *Lactobacillus casei* و کاربرد آن در افزایش کیفیت فیله ماهی

نسرین تجدد[۱] و **لاله رومیانی**[۲*]

[۱]گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

[۲]گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

**تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۰۶**

## چکیده

باکتری‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا وزیکول‌های غشایی را به محیط خارج سلولی رها می‌کنند، اما فعالیت آنها مشخص نیست. هدف از انجام این پژوهش، مطالعه فعالیت ضدباکتریایی وزیکول‌های خارج سلولی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* و تاثیر آن بر افزایش ماندگاری فیله ماهی شوریده بود. وزیکول‌ها از طریق اولتراسانتریفیوژ جدا شدند. فعالیت ضدباکتریایی وزیکول‌ها بر *شیوانلا پوترفاسینس* مطالعه شد. فیله ماهی شوریده به وزن ۳۰۰-۲۵۰ gr تهیه شد. هر فیله شوریده در ۱۰ ml محلول تهیه شده از غلظت‌های متفاوت وزیکول ($10^{11}$، $10^{10}$، $10^{9}$ vesicles/ mL) تا جذب کامل محلول توسط فیله‌ها قرار داده و سپس در دمای ۴ °C نگهداری شدند. شاخص‌های ماندگاری فیله شامل میزان پراکسید، بازهای نیتروژنی فرار کل، مالون دی‌آلدئید و میزان کل باکتری‌ها بود. نتایج نشان داد که اندازه وزیکول‌ها تا ۴۸ h پس از انکوباسیون افزایش معنی‌دار ($p<0.05$) و سپس روند تغییرات معنی‌دار نبود ($p>0.05$). میزان $10^{11}$ vesicles/ mL سبب مهار رشد *S. putrefaciens* شد. نتایج کیفیت فیله نشان داد که دوز $10^{11}$ vesicles/ mL نسبت به گروه شاهد و دوزهای پایین‌تر، منجر به بهبود شاخص‌های کیفی فیله شد وماندگاری را نسبت به گروه شاهد تا ۴ روز افزایش داد. نتایج این مطالعه نشان داد که وزیکول‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* می‌توانند در جهت بهبود کیفیت و ماندگاری آبزیان کاربرد داشته باشند.

**واژگان کلیدی:** *لاکتوباسیلوس کازئی*، وزیکول های خارج سلولی، ماندگاری، ماهی شوریده

* l.roomiani@iauahvaz.ac.ir

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

## مقدمه

وزیکول‌های خارج‌سلولی به عنوان اجزای تکاملی حفاظت‌شده بین‌سلولی هستند. باکتری‌های گرم منفی، گرم مثبت و یوکاریوت‌ها به شکل فعال وزیکول‌هایی با اندازه ۲۰۰-۲۰ nm ترشح می‌کنند. وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌های گرم منفی نخستین بار در سال ۱۹۶۰ در مطالعات ساختارهای باکتریایی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مشاهده شدند. این ساختارها گرد، دولایه و حاوی مواد فعال بیولوژیکی از جمله پروتئین، لیپید، اسیدنوکلئیک و متابولیت‌ها می‌باشند (۱). آنها می‌توانند مسیرهای بیوژنز متنوعی داشته باشند و مهمتر از همه، می‌توانند حامل مولکول‌هایی با ظرفیت اطلاعاتی بالا مانند پروتئین‌ها و انواع مختلفی از RNA ها، از جمله miRNA ها باشند. همچنین، آنها در فعل و انفعالات بین میکروارگانیسم های بیماری‌زا و حیوانات یا گیاهان میزبان آنها نقش دارند (۲). اگرچه بیشتر اطلاعات وزیکول‌های خارج سلولی مربوط به باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت است، تاکنون اطلاعات اندکی درخصوص وزیکول های خارج سلولی پروبیوتیک ها ثبت شده است (۳).

باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای ویژگی‌های پروبیوتیک هستند که برای سلامت انسان مفید و در غذای روزانه بکار می‌روند. پیش‌بینی می‌شود که ارزش گردش مالی بازار جهانی پروبیوتیک‌ها تا سال ۲۰۲۳ به ۴۷ میلیارد دلار برسد. این بازار تحت سلطه شرکت‌های تولیدکننده پروبیوتیک، مکمل‌ها و صنایع غذایی است (۱). *لاکتوباسیلوس کازئی*[1] باکتری گرم مثبت، مزوفیل، هموفرمانتاتیو اجباری، میکروآئروفیل، کاتالاز منفی و فاقد اسپور بوده و ظرفیت بالایی برای تولید اسید دارد. بیشترین قابلیت بقا در فراورده‌های شیری تخمیری را به آن نسبت می دهند. فعالیت این باکتری بیش از سایر گونه‌های لاکتوباسیلوس یافت شده در فراورده‌های تخمیری شیر بوده و قادر به تخمیر طیف وسیعی از کربوهیدارت‌های موجود در محیط است (۸). Grande و همکاران (۲۰۱۷) ویژگی های وزیکول‌های جداشده از *لاکتوباسیلوس روتری*[2] مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج آنها نشان داد که وزیکول های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس روتری* دارای خواص درمانی است و می‌تواند در صنایع غذایی و پزشکی مورد استفاده قرار بگیرد (۴). فعالیت اگزوزوم‌های لاکتوباسیلوس‌های جداشده از شیر بررسی و نشان داده شد که توانستند رشد سلولی را تقویت کرده و مسیر پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن را فعال کنند (۵). فعالیت ضدباکتریایی (۶)، ضدسرطانی و افزایش تقویت ایمنی وزیکول‌های جدا شده از لاکتوباسیلوس‌ها به اثبات رسیده است (۷). چنین مطالعاتی ثابت کردند که وزیکول‌های خارج سلولی می توانند پتانسیل کاربرد در صنعت غذا را داشته باشند، اما مطالعات در این خصوص بسیارکم انجام نشده است.

با توجه به صید قابل‌توجه ماهی شوریده[3] در جنوب کشور و اهمیت آن به‌عنوان یک گونه اقتصادی مهم، برای افزایش ماندگاری، حفظ کیفیت و کاهش فسادپذیری، این مطالعه با به‌کارگیری وزیکول‌های خارج سلولی *لاکتوکوکوس کازئی* و اثر آنها بر فیله شوریده بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه *لاکتوباسیلوس کازئی*

سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* (ATCC 39392) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های سازمان پژوهش‌های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه و در محیط‌کشت مایع MRS آگار کشت داده شد. برای تهیه سوپرناتانت باکتری در ml ۳۰۰ محیط MRS کشت شد و در °C ۳۷ برای h ۴۸ انکوبه شد.

### جداسازی وزیکول‌های خارج سلولی *لاکتوباسیلوس کازئی*

وزیکول‌های پروبیوتیک *L. casei* با استفاده از اولتراسانتریفیوژ استخراج شدند. باکتری برای رسیدن به فاز پایداری کشت داده شده و سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰×g برای min ۱۵ جداسازی و سپس

[1] *Lactobacillus casei*

[2] *Lactobacillus reuteri*

[3] *Otolites ruber*

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

با دور g×۳۵۰۰ برای ۶۰ min به شکل متوالی و به منظور حذف بقایای بزرگ باکتری و اندامک‌های دست نخورده، سانتریفیوژ شد. مایع رویی با استفاده از اولتراسانتریفیوژ با دور g×۲۰۰۰۰۰ برای ۶۰ min جداسازی و سپس با استفاده از فیلتر µ ۰/۲۲ عبور داده تا وزیکول‌های خالص پروبیوتیک تهیه شدند. تعداد وزیکول‌ها و اندازه آنها با استفاده ازNano-ZS 90 dynamic light scattering (Malvern, UK) شناسایی شد. وزیکول‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عکس‌برداری شدند. همچنین، ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی وزیکول به وسیله تکنیک آنالیز تراکینگ نانوپارتیکل بررسی شد(۹).

## تعیین درصد بازدارندگی رشد *شیوانلا پوترفاسینس* توسط وزیکول‌های پروبیوتیک

*شیوانلا پوترفاسینس*[1] از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری‌های صنعتی ایران، کرج تهیه شد. این گونه باکتری در محیط‌کشت براث در دمای °C ۲۸ انکوبه شد. برای آزمایش ضدباکتری، *S. putrefaciens* با وزیکول در غلظت‌های مختلف ($10^{7}$، $10^{8}$، $10^{9}$، $10^{10}$، $10^{11}$ vesicles/ mL) برای دوره‌های زمانی متفاوت در لوله‌های با حجم ml ۱/۵ کشت داده شد و ناحیه مهار با استفاده از تست انتشار دیسک تعیین شد. برای تعیینMBC، سوسپانسیون‌های باکتریایی از هر چاه بر روی صفحات آگار ریخته و به مدت h ۲۴ دیگر انکوبه شدند. MBC هر وزیکول به‌عنوان کمترین غلظتی تعریف شد که در آن کلنی قابل مشاهده نباشد. برای تعیین اثرات بازدارندگی غلظت‌های مختلف وزیکول بر *S. putrefaciens*، غلظت اولیه تلقیح شده $10^{6}$ CFU/mL بود. درصد رشد در هر غلظت با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (۱۰).

رابطه ۱

/ جذب نوری رشد وزیکول در۶۰۰)-۱] = (٪)

[۱۰۰ × (جذب نوری رشد وزیکول در محیط براث

## پوشش‌دهی فیله ماهی با وزیکول‌های پروبیوتیک

ماهی شوریده تازه از بازار آبادان خریداری شد. سپس در یونولیت‌های حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل و تا شروع آزمایش در دمای °C ۱۸- نگهداری شد. بعد از یخ زدایی، هر قطعه فیله شوریده با وزن متوسط gr ۳۰۰-۲۵۰ تهیه و درون محلول ml ۱۰ سوسپانسیون آماده‌شده از غلظت‌های مختلف وزیکول پروبیوتیک$^{10^{9}}$(دوز پایین)، $10^{10}$ (دوز متوسط) و $10^{11}$ (دوز بالا) vesicles/ mL قرار داده شد تا جذب همه محلول توسط فیله‌ها انجام شود، سپس در دمای °C ۴ نگهداری شدند. آنتی اکسیدان سدیم اریتوربات (sodium erythorbate) به‌عنوان گروه کنترل مثبت انتخاب و فیله‌های ماهی درون محلول ۰/۵ ٪ سدیم اریتوربات غوطه‌ور شدند.

## تعیین مقدار بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N)

در روز پنجم نگهداری، gr ۵ فیله شوریده در ml ۸ بافر تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ۴ ٪ به مدت min ۳۰ هموژنیزه شد. پس از فیلترکردن بافت هموژنیزه شده، مقدار نهایی با استفاده از محلول TCA به حجم ml ۱۰ رسید. میزان TVBN فیله ماهی با استفاده از روش کانوی تعیین شد (AOAC, 2000). میزان TVBN نمونه به وسیله بوریک اسید جذب و سپس با اسیدکلریدریک N ۰/۰۲ تیتر شد. میزان این پارامتر پس از محاسبه، بر حسب mg/100g نمونه گزارش شد (۱۱).

## تعیین میزان مالون دی‌آلدئید

برای تعیین غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA)، یکی از محصولات پراکسیدسیون چربی، فیله ماهی با استفاده از mmol ۲۰ بافر اسیدکلریدریک (pH= ۷,۴) هموژنیزه شده و پس از فیلترشدن با تری‌کلرواستیک سرد (۷۵ mg/ml) مخلوط شد تا پروتئین‌ها رسوب کنند. محلول بالایی با TBA (۸ mg/l) در دمای °C ۹۵ برای min ۴۵ انکوبه شد. محصول پراکسیداسیون لیپید براساس غلظت MDA در نمونه تعیین شد. محصول پراکسیداسیون لیپید در nm ۵۳۰ قرائت شد (۱۲).

## تعیین مقدار پراکسید (PV)

[1] *Shewanella putrefaciens*



[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

مقدار g ۱۰ فیله ماهی توسط دستگاه چرخ گوشت، چرخ شده و g ۵۰ از آن با cc ۱۰۰ متانول با همزن برقی در min ۳ با دور تند هم‌زده شد. مخلوط در دکانتور ریخته شده تا روغن از گوشت جدا و روغن و حلال توسط قیف دارای کاغذ صافی شماره ۴ وارد بالن شیشه‌ای دستگاه روتاویپور با دمای آب °C ۵۰ تا ۶۰ شده و سپس حلال از روغن جدا شد. برای اندازه‌گیری پراکسید، g ۳ روغن به ظرف mL ۲۵۰ منتقل شده و سپس مقدار mL ۱۰ مخلوط کلروفرم و اسیداستیک به آن اضافه و mL ۱ از محلول یدیدپتاسیم اشباع به مخلوط اضافه و برای مدت min ۵ در شرایط تاریک نگهداری شد. مقدار mL ۲۰ آب مقطر به مخلوط اضافه و با استفاده از تیوسولفات سدیم ۱ ٪ نرمال تا مرحله ناپدید شدن رنگ زرد تیتر شد. مقدار mL ۱ محلول نشاسته ۱/۵ ٪ به مخلوط اضافه و تیتراسیون ادامه یافت تا رنگ آبی تیره از بین برود. نمونه شاهد فاقد روغن ماهی بود. میزان پراکسید بر حسب mEq/1000 g محاسبه شد (۱۳).

### اندازه‌گیری میزان باکتری‌های زنده کل (Total Viable Count)

فیله‌های شوریده در هر تیمار به شکل مجزا با محلول نمکی ۰/۸۵ ٪ استریل در کیسه استومیکر (BagMixer400 VW, Interscience, SaintNorm-La-Breteche, France) هموژنیزه و سپس در محیط آگار کشت داده شد. این پلیت ها در دمای °C ۳۷ به مدت h ۲۴ انکوبه شدند.

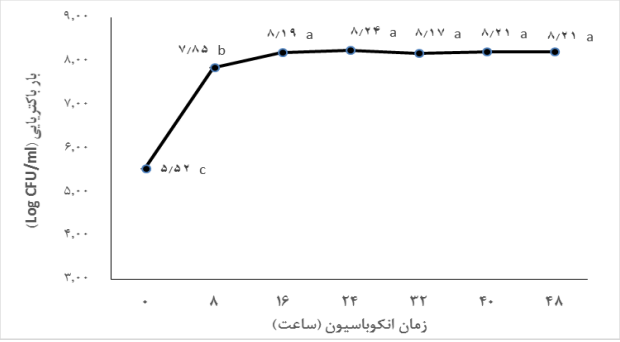
### تجزیه‌وتحلیل آماری

همه داده‌ها به شکل میانگین± انحراف معیار با ۳ تکرار به‌دست آمد. سطح معنی‌داری با استفاده از آنالیز واریانس ANOVA Ony-way و تست تکمیلی دانکن و با استفاده از نرم‌افزارSPSS23 تعیین شد.

## نتایج

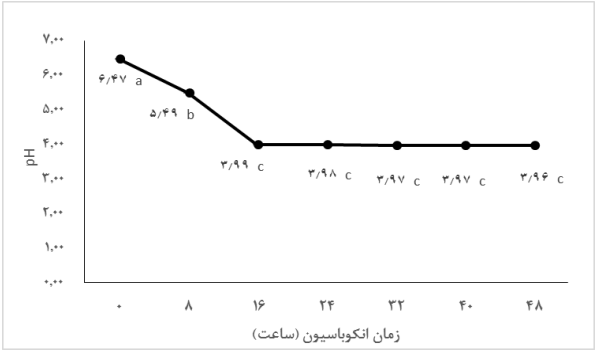
روند تغییرات میزان باکتری *L. casei* که به مدت h ۴۸ در دمای °C ۳۷ انکوبه شد، در شکل ۱ مشخص شده است. میزان باکتری از Log CFU/mL $۱۰^{۸}$× ۵/۵۲ در ساعت صفر تا Log CFU/mL $۱۰^{۸}$× ۸/۱۹ در ساعت ۱۶ افزایش پیدا کرد و سپس، بدون تغییرات معنی‌دار ادامه داشت ($p>0.05$). میزان pH از زمان صفر تا ۱۶ ساعت پس از انکوباسیون روند کاهشی داشت و از ۶/۴۷ به ۳/۹۹ رسید. سپس، در محدوده ۳/۹۹ تا ۳/۹۶ ثابت باقی ماند (شکل ۲).

در شکل ۳ اندازه وزیکول‌های *L. casei* در h ۸ ،۲۴ و ۴۸ پس از انکوباسیون نشان داده شده است. در هشتمین ساعت از انکوباسیون میانگین اندازه وزیکول‌ها nm ۱۷۵/۱±۲/۲۵، h ۲۴ پس از انکوباسیون به nm ۱۸۷/۷±۳/۱۴ و h ۴۸ پس از انکوباسیون به nm ± ۱/۹۹ ۱۹۷/۶ رسید. وزیکول‌های *L. casei* توسط لایه لیپیدی (فلش روی عکس) پوشیده شده بودند (شکل ۴).

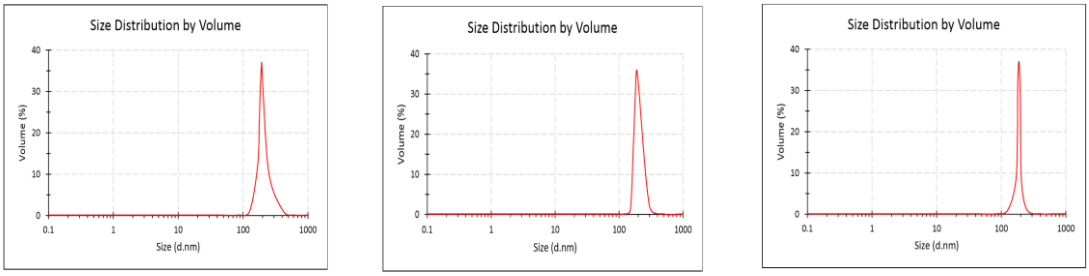



**شکل ۱.تغییرات میزان *L. casei* در طول انکوباسیون. حروف غیرمشابه به معنی اختلاف معنی‌دار است ($p<0.05$)**

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

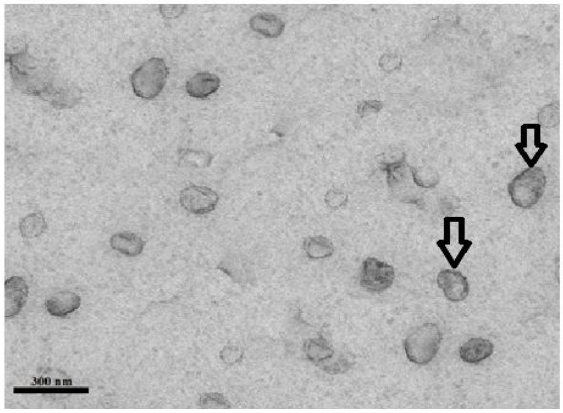



**شکل ۲. بررسی pH در طول رشد *L. casei* طی انکوباسیون. حروف غیرمشابه به معنی اختلاف معنی‌دار است ($p<0.05$).**




۴۸ h ۲۴ h ۸ h

**شکل ۳. گستره اندازه وزیکول‌های *L. casei* در طول انکوباسیون**

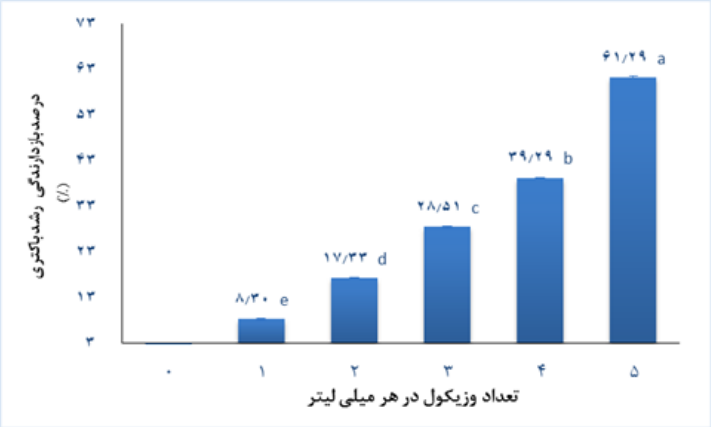



**شکل ٤. مورفولوژی وزیکول‌های *L. casei* توسط میکروسکوپ TEM**

نتایج آزمایش توانائی مهار *S. putrefaciens* توسط وزیکول‌های *L. casei* بعد از رشد در محیط براث در شکل ۵ نشان داده شده است. با افزایش میزان وزیکول از $10^{7}$ تا $10^{11}$ در هر ml، درصد بازدارندگی رشد باکتری به شکل معنی‌داری افزایش یافت ($p<0.05$). ناحیه منع‌کنندگی رشد ۲/۲ mm برای تیمار $10^{7}$ vesicles/ mL (۱)، ۳/۹ mm برای تیمار $10^{8}$ vesicles/ mL (۲)، ۵/۴ mm برای تیمار $10^{9}$ vesicles/ mL (۳)، ۶/۹۸ mm برای تیمار $10^{10}$ vesicles/ mL (۴) و ۷/۸۱ mm برای تیمار $10^{11}$ vesicles/ mL بود. در شکل ۶ میزان شاخص‌های کیفیت فیله شامل PV ، TVBN ، MDA و میزان باکتری کل پس از تیمار با وزیکول‌های *L. casei* نشان داده شده است. در هر ۴ شاخص، گروه‌های با دوز بالا ($10^{11}$ vesicles/ mL) کمترین میزان شاخص‌های کیفیت و تیمار شاهد بالاترین

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

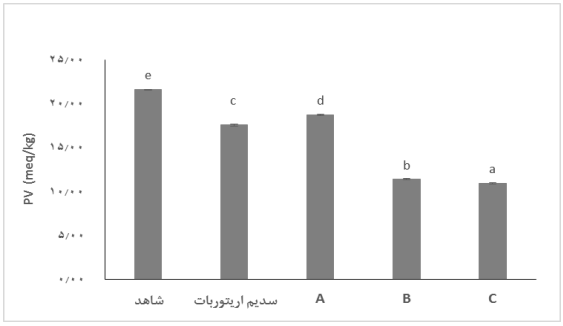
میزان این پارامترها را داشت. مقایسه بین گروه‌ها نشان داد که گروه دارای دوز پایین ($۱۰^{۹}$ vesicles/ mL) و به دنبال آن سدیم اریتوربات بعد از تیمار شاهد کمترین تاثیر را در کاهش میزان شاخص‌های TVBN، PV، MDA و میزان باکتری کل داشتند ($p<0.05$).



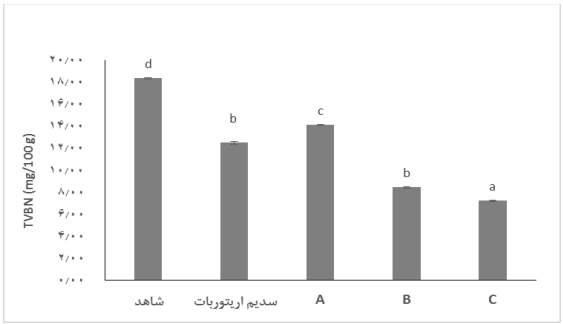

**شکل۵. بررسی توانایی مهار *S. putrefaciens* توسط وزیکول‌های *L. casei* در غلظت‌های مختلف.**

حروف غیرمشابه به معنی اختلاف معنی‌دار است (**$p<0.05$**).

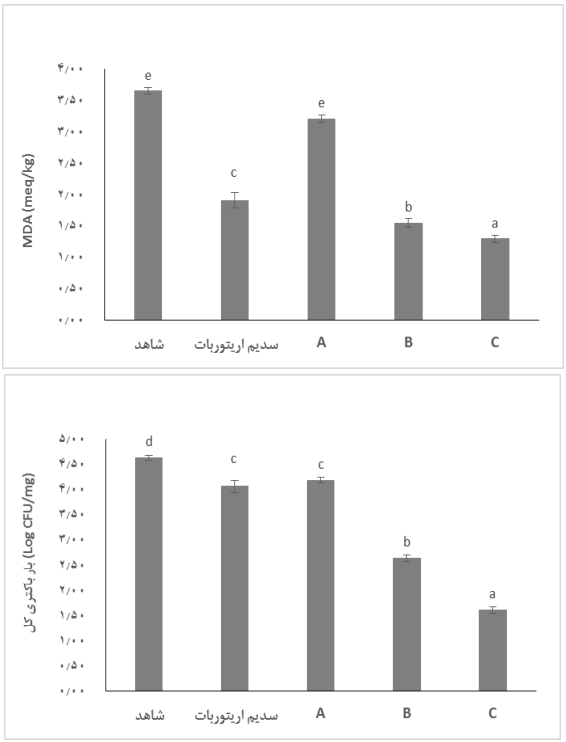
الف




ب




[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]




**شکل٦. تغییرات شاخص‌های کیفیت فیله شوریده نگهداری شده به مدت ٥ روز در دمای ٤ °C . الف: میزان پراکسید، ب- میزان بازهای نیتروژنی فرار، ج- میزان مالون دی‌آلدئید، د- میزان بار باکتری کل**

اطلاعات به شکل میانگین± انحراف معیار (n=۳) هستند. حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ ٪ است. تیمارها شامل: شاهد، سدیم اریتوربات ۰/۵ ٪، A: دوز پایین وزیکول‌های *L. casei* ($10^{9}$ vesicles/ mL)، B: دوز متوسط وزیکول‌های *L. casei* (vesicles/ mL)، C: دوز بالای وزیکول‌های *L. casei* ($10^{11}$ vesicles/ mL).

## بحث

از آنجاکه نگهدارنده‌های شیمیایی مواد غذایی باعث ایجاد اختلالات در سلامت انسان می‌شوند، توجه مصرف کنندگان به سمت نگهدارنده‌های زیستی جلب شده است (۱۴). با این‌حال، میکروارگانیسم‌ها برای واجد شرایط بودن به عنوان یک نگهدارنده زیستی، خودشان یا متابولیت‌های آنها باید اثر ضدمیکروبی گسترده‌ای در برابر میکروارگانیسم‌های عامل فساد و بیماری‌زا نشان داده و همچنین برای مصرف‌کنندگان ایمن باشند. علاوه براین، نگهدارنده‌های زیستی و یا متابولیت‌های آنها باید در شرایط مختلف فراوری پایدار و نباید خواص حسی غذا را تغییر دهند. باکتری‌های اسیدلاکتیک به دلیل ویژگی‌های ضدمیکروبی مربوط به آزادسازی متابولیت‌ها و ترکیبات ثانویه تولید شده، که به عنوان نگهدارنده‌های زیستی شناخته می‌شوند، مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۵).

پروبیوتیک‌ها نقش مهمی در تنظیم میکروبیوتا و حفظ هموستازی روده جانوران دارند. وزیکول پروبیوتیک ها به عنوان واسطه‌های بالقوه برای پاسخ ایمنی میزبان و تاثیرات ضدالتهابی آنها شناخته شده‌اند (۱۶). اگرچه وزیکول‌های خارج سلولی باکتری‌های گرم مثبت ۳۰ سال دیرتر از همتایان گرم منفی خود کشف شدند، اما در سال‌های اخیر توجه بیشتری را به خود جلب کرده‌اند. وزیکول‌های باکتری‌های گرم منفی یا گرم مثبت عملکردهای فیزیولوژیک یا پاتولوژیک در تعاملات باکتری- باکتری یا باکتری-میزبان نشان داده‌اند (۱۷). در یک مطالعه نشان داده شد که وزیکول‌های جداشده از *L. casei* BL23 که حامل پروتئین بودند، خواص پروبیوتیکی نشان دادند (۱۸). سویه‌های *Bifidobacterium longum*، *Lactobacillus rhamnosus*، *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus plantarum* وزیکول‌هایی تولید می‌کنند

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

که با خواص پروبیوتیکی این باکتری‌ها در ارتباط هستند (۱۹). وزیکول‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[1] میزبان را علیه عفونت باکتری‌های بیماری‌زا مانند *Entrococcus faecium* محافظت می‌کنند (۲۰).

نتایج مطالعه روده موش نشان داد که وزیکول‌های خارج سلولی پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* توانستند باکتری‌های ایجاد کننده التهاب روده (پروتئوباکترها) را کاهش و باکتری‌های ضدالتهاب (Bifidobacteria وMuribaculaceae) را افزایش دهند (۱۹). وزیکول‌های خارج سلولی *Lactobacillus rhamnosus* نقش مهمی در سرکوب تکثیر سلول‌های سرطانی HepG2 داشتند (۷). مطالعات بسیار نادری تاثیر وزیکول‌ها در مواد غذایی را گزارش کرده‌اند. مطالعه‌ای نشان داد که *Pseudomonas* spp. آنزیم لیپاز و فسفولیپاز تولید می‌کند که در اکسیداسیون چربی نقش مهمی دارند (۲۱). در مطالعه‌ای نشان داده شد که *Bifidobacterium longum* می‌تواند از طریق سرکوب mast cell آلرژی غذایی را کاهش دهد (۲۲).

باکتری‌های سرمادوست می‌توانند باعث فساد ماهیان تازه در دماهای پایین شوند (۲۳). ثابت شده است که باکتری‌های شاخص فساد مانند *Shewanella putrefaciens* و *Pseudomonas* spp. مسئول تغییرات عمده در کیفیت فیله ماهیان در دماهای پایین هستند، در حالی‌که باکتری‌های اسیدلاکتیک سبب کاهش فساد فیله ماهیان توسط باکتری‌های ذکرشده می‌شوند (۲۴). مطالعات نشان دادند که متابولیت‌های مختلف ترشح شده از میکروب‌ها که به دلیل هیدرولیز پروتئین ایجاد می‌شوند، باعث ایجاد ویژگی های حسی نامطلوب در محصولات غذاهای دریایی می گردند. نتایج این مطالعات نشان داد که بازدارندگی رشد باکتری های متولی فساد و کاهش متابولیت های مرتبط با آنها در ماهیان می تواند ماندگاری آنها را افزایش دهد (۲۵،۲۶،۲۷). بالاترین سطح قابل قبول بازهای نیتروژنی فرار در گوشت ماهی ۲۵ mg نیتروژن به ازای ۱۰۰ gr گوشت پیشنهاد شده است (۲۸) که در تمام تیمارهای دارای وزیکول این میزان پایین‌تر از حد مجاز بود. یکی از محصولات نهایی پراکسیداسیون چربی‌ها مالون دی‌آلدئید است که علاوه بر شاخص پراکسید، یکی از معیارهای رایج جهت ارزیابی اکسیداسیون می‌باشد. ماهیان به علت دارابودن اسیدهای چرب غیراشباع با پیوند چندگانه مستعد فساد و اکسیدشدن هستند. میزان مجاز مالون دی‌آلدئید در آبزیان ۲-۱ µg مالون دی‌آلدئید بر گرم گوشت است (۲۹). در تیمار vesicles/ mL $10^{10}$ و $10^{11}$ میزان مالون دی‌آلدئید فیله‌ها کمتر از میزان مجاز تعیین شده بود. استفاده از پروبیوتیک *L.plantarum* طی بسته بندی، ماندگاری فیله تیلاپیا با کاهش و کنترل رشد باکتری‌های عامل فساد افزایش پیدا کرد (۳۰). در بررسی تاثیر پوشش‌دهی فیله سالمون با پروبیوتیک *L. plantarum*، کاهش میزان TBA و TVBN را گزارش و عنوان کردند که استفاده از پروبیوتیک ماندگاری فیله را در طول نگهداری در یخچال افزایش داد که با روند مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (۳۱).

علاوه بر این، مطالعات نشان می‌دهد اکسیداسیون لیپید توسط *Pseudomonas spp.* به دلیل فعالیت لیپاز و فسفولیپاز می‌باشد (۳۲). همچنین، باکتری Psychrophilic با فساد ماهی تازه در طول نگهداری در دمای پایین ارتباط دارد (۳۳). نتایج حاکی از آن است که وزیکول‌های پروبیوتیک *B. licheniformis* به کمک آنزیم تخریب کننده پپتیدوگلیکان دیواره سلولی از رشد باکتری‌های عامل فساد جلوگیری کرده و روند فساد را کند می‌کنند (۳۴) و می‌توانند ماندگاری و کیفیت ظاهری فیله ماهی را افزایش دهند.

نتایج مطالعه دیگر نشان داد که فیله خام و پخته نشده کپور نقره‌ای، ناقل مهم عوامل پاتوژن‌زا مانند ویبریو، سالمونلا، استافیلوکوکوس و لیستریا هستند. اما استفاده از پروبیوتیک‌ها در بسته‌بندی‌های مختلف توانست ماندگاری فیله ماهیان را افزایش دهد. فیلم پلی‌وینیل همراه با *L.rhamnosus* (۳۵) و *B.bifidum* همراه با کربوکسی متیل

[1] *Lactiplantibacillus plantarum*

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

سلولز (۳۶) از اکسیداسیون و تخریب مواد غذایی تازه جلوگیری کرد.

در این مطالعه ثابت شد که میزان vesicles/ mL $10^{11}$ ترشح شده از لاکتوکوکوس کازئی می‌تواند مانع رشد باکتری مولد فساد شود. باکتری‌های اسید لاکتیک به دلیل پتانسیل مهار رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به واسطه تولید متابولیت‌های مختلف (اسیدهای آلی و باکتریوسین‌ها) به عنوان باکتری‌های نگهدارنده زیستی شناخته شده‌اند (۲۷). در پژوهش حاضر، نشان داده شد که بیشترین میزان وزیکول *لاکتوکوکوس کازئی* توانست ماندگاری فیله ماهی را نسبت به گروه شاهد با اختلاف معنی‌دار ۴ روز افزایش دهد.

## منابع

1. Choi DS, Kim DK, Choi SJ, Lee J, Choi JP, and Rho S. Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from Pseudomonas aeruginosa. Proteomics. 2011; 11: 3424 –9.
2. Kim JH, Lee J, Park J, and Gho YS. Gram-negative and gram-positive bacterial extracellular vesicles. Seminars in Cell and Development Biology. 2015; 40: 97–104. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.006
3. Jang KS, Sweredoski MJ, Graham RLJ, Hess S, and Jr WMC. Comprehensive proteomic profiling of outer membrane vesicles from Campylobacter jejuni. Proteomics. 2014; 98: 90-98.
4. Grande R, Cella C, Minclone G, Stringaro A, Di-Marzlo L, and Colone M. Detection and physicochemical characterization of membrane vesicles (MVs) of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. Frontiers in Microbiology. 2017; 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01040.
5. Yu S, Zhao Z, Sun LM, and Li P. Fermentation results in quantitative changes in milk-derived exosomes and different effects on cell growth and survival. Agricultural and Food Chemistry. 2017; 56: 1220 –1228.
6. Li M, Lee K, Hsu M, Nau G, Mylonakis E, and Ramratnam B. Lactobacillus derived extracellular vesicles enhance host immune responses against vancomycin-resistant enterococci. BMC Microbiology. 2017; 17: 66.
7. Behzadi E, Hosseini HM, and Imani-Fooladi AA. The inhibitory impacts of Lactobacillus rhamnosus GG-derived extracellular vesicles on the growth of hepatic cancer cells. Microbial Pathogenesis. 2017; 110: 1–6.
8. Thorakkattu P, Khanashyam AC, Shah K, Babu KS, Mundanat AS, Deliephan A, Deokar GS, Santivarangkna C, and Nirmal NP. Postbiotics: Current Trends in Food and Pharmaceutical Industry. Foods. 2022; 11: 3094.
9. Brown L, Kessler A, Cabezas-Sanchez P, Luque-Garcia JL, and Casadevall A. Extracellular vesicles produced by the Gram-positive bacterium Bacillus subtilis are disrupted by the lipopeptide surfactin. Molecular Microbiology. 2014; 93: 183–98.
10. Zeng Y, Li Y, Wu QP, Zhang JM, Xie XQ, Ding Y, Cai SZ, Ye QH, Chen MT, Xue L, Wu S, and Zeng HY. Evaluation of the antibacterial activity and probiotic potential of Lactobacillus plantarum isolated from Chinese homemade pickles. Infectious diseases and medical microbiology. 2020; 2020: 1-11.
11. Bekhit AEA, Holman BWB, Giteru SG, and Hopkins DL. Total volatile basic nitrogen and its role in meat spoilage. Trends in Food Sciences and Technology. 2021; 109:280-302.
12. Ozyurt G, Gokdogan S, Simsek A, Yuvka I, Erguven M, and Boga EK. Fatty acid composition and biogenic amines in acidified and fermented fish silage: a comparison study. Archives of Animal Nutrition. 2016; 70:72-86.
13. [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. 2002. Offical methods of analysis. 16th ed. Washington (DC): AOAC.
14. Wiernasz N, Leroi F, Chevalier F, Cornet J, Cardinal M, Rohloff J, Passerini D, Skırnisdóttir S, and Pilet MF. Salmon Gravlax biopreservation with lactic acid bacteria: A polyphasic approach to assessing the impact on organoleptic properties, microbial ecosystem and volatilome composition. Frontiers in Microbiology. 2020; 10: 3103.
15. Kuley E, Özyurt G, Özogul I, Boga M, Akyol I, Rocha JM, and Özogul F. The role of selected lactic acid bacteria on organic acid accumulation during wet and spray-dried fish-based silages. Contributions to the winning combination of microbial food safety and environmental sustainability. Microorganisms. 2020; 8: 172.
16. Kim Y, Edwards N, and Fenselau C. Extracellular vesicle proteomes reflect developmental phases of Bacillus subtilis. Clinical Proteomics. 2016; 13:6. doi: 10.1186/s12014-016-9107-z
17. Liu Y, Defourny KAY, Smid EJ, and Abee T. Gram-positive bacterial extracellular vesicles and their impact on health and diseases. Frontiers in Microbiology. 2018; 9: 152.
18. Dominguez-Rubio AP, Martinez JH, Martinez DC, Coluccio-Leskow F, Piuri M, and Perez OE. Lactobacillus casei BL23 produces microvesicles carrying proteins that have been associated with its probiotic effect. Frontiers in Microbiology.2017; 8: Article e1783.
19. Hao H, Zhang X, Tong L, Liu Q, Liang X, Bu Y, Gong P, Liu T, Xia Y, Ai L, and Yi H. Effect of extracellular vesicles derived from Lactobacillus plantarum Q7 on gut microbiota and

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

ulcerative colitis in Mice. Frontiers in Immunology. 2021; 12: 777147.
20. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borras FE, and Buzas EI. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. Extracellular Vesicles. 2015; 4: 27066.
21- Nirmal NP, and Benjakul S. Retardation of quality changes of Pacific white shrimp by green tea extract treatment and modified atmosphere packaging during refrigerated storage. International Journal of Food Microbiology. 2011; 149: 247–253.
22- Kim JH, Jeun EJ, Hong CP, Kim SH, Jang MS, and Lee EJ. Extracellular vesicle-derived protein from Bifidobacterium longum alleviates food allergy through mast cell suppression. Allergy and Clinical Immunology. 2016; 137: 507–516
23- Rathod NB, Nirmal NP, Pagarkar A, Ozogul F, and Rocha JM. Antimicrobial impacts of microbial metabolites on the preservation of fish and fishery products; a review with current knowledge. Microorganisms. 2022; 10: 773.
24- Kannappan S, and Manja KS. Efficacy of lactic acid bacteria in the reduction of trimethylamine nitrogen-and related spoilage derivatives of fresh Indian mackerel fish chunks. African Journal of Biotechnology. 2011; 10: 42–47.
25. Agagündüz D, Yılmaz B, Sahin TÖ, Günesliol BE, Ayten S, Russo P, Spano G, Rocha JM, Bartkiene E, and Özogul F. Dairy lactic acid bacteria and their potential function in dietetics: The Food–Gut-Health Axis. Foods. 2021; 10: 3099.
26-Rathod NB, Phadke GG, Tabanelli G, Mane A, Ranveer RC, Pagarkar A, and Ozogul F. Recent advances in bio-preservatives impacts of lactic acid bacteria and their metabolites on aquatic food products. Food Biosciences. 2021; 44: 101-440.
27-Mei J, Ma X, and Xie J. Review on natural preservatives for extending fish shelf life. Foods. 2019; 8: 490.
28-Moosavi-Nasab M, Khoshnoudi-Nia S, Azimifar Z, and Kamyab S. Evaluation of the total volatile basic nitrogen (TVB-N) content in fish fillets using hyperspectral imaging coupled with deep learning neural network and meta-analysis. Scientific Reports. 2021; 11. doi:https://doi.org/10.1038/s41598-021-84659-y
29- Messina CM, Arena R, Ficano G, Randazzo M, Morghese M, La Barbera L, and Santulli A. Effect of cold smoking and natural antioxidants on quality traits, safety and shelf life of farmed meagre (Argyrosomus regius) fillets, as a strategy to diversify aquaculture products. Foods. 2021; 10(11).
doi:https://doi.org/10.3390/foods10112522
30- Samiullah K, Mehroz R, Yasin R, and Hussain, S. 2020. Combined effect of probiotics on prolonging the shelf life of GIFT tilapia fillets. Aquaculture Research. 2020; 51, 1–11.
31- Hua O, Wong CH, and Li Dan. Postbiotics enhance the functionality of a probiotic edible coating for salmon fillets and the probiotic stability during simulated digestion. Food Packaging and Shelf Life. 2022; 34, 100954.
32- Nirmal NP, and Benjakul S. Retardation of quality changes of Pacific white shrimp by green tea extract treatment and modified atmosphere packaging during refrigerated storage. International Journal of Food Microbiology. 2011; 149, 247–253.
33- Raeisi M, Tajik H, Aliakbarlu J, Mirhosseini SH, and Hosseini SMH. Effect of carboxy methyl cellulose-based coatings incorporated with Zataria multiflora Boiss. Essential oil and grape seed extracton the shelf life of rainbow trout fillets. LWT– Food Science and Technology. 2015; 64, 898–904.
34- Sheikhpour M, Barani L, and Kasaeian A. Biomimetics in drug delivery systems: A critical review. Journal of Controlled Release. 2017; 253, 97-109.
35- Ceylan Z, Meral R, Karakas CY, Dertli E, and Yilmaz MT. A novel strategy for probiotic bacteria: ensuring microbial stability of fish fillets using characterized probiotic bacteria-loaded nanofibers. Innovative Food Sci. 2018. Emerg. Technol; 48, 212–218.
36- Mozaffarzogh M, Misaghi A, Shahbazi Y, and Kamkar A. Evaluation of probiotic carboxymethyl cellulose-sodium caseinate films and their application in extending shelf life quality of fresh trout fillets. LWT. 2020; 126, 109305.

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

# Study effect of *Lactobacillus casei*-derived extracellular vesicles antibacterial and its application in increasing the quality of fish fillet

Nasrin Tajadod[1], **Laleh Roomiani**[2*]

[1]Department of Food Science and Technology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran
[2]Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

**Abstract**

Pathogenic and non-pathogenic bacteria release membrane vesicles into the extracellular environment, but their activity is not known. The purpose of this research was to study the antibacterial activity of the extracellular vesicles of the probiotic *Lactobacillus casei* and its effect on increasing the shelf life of *Otolites ruber* fillet. Vesicles were isolated through ultracentrifugation protocol. Antibacterial activity of vesicles on *Shewanella putrefaciens* was studied. Then fish fillet 250-300 g was prepared. Each fillet was placed in 10 mL of solution prepared from different concentrations of vesicles ($10^9$, $10^{10}$, $10^{11}$ vesicles/ mL) until the solution was completely absorbed by the fillets, and then they were kept at 4 °C. The shelf life indices of the fillet included the amount of peroxide, total volatile nitrogen bases, malondialdehyde, and the Total Viable Count. The results showed that the size of vesicles increased significantly up to 48 h after incubation ($P$<0.05) and then the trend of changes was not significant ($P$>0.05). The amount of $10^{11}$ vesicles/ mL could inhibit the growth of *S. putrefaciens*. The results of the fillet quality showed that the dose of $10^{11}$ vesicles/ mL could improve the shelf life indices of the fillet and increase it by 4 days compared to the control group and lower doses. The results of this study showed that *Lactobacillus casei*-derived extracellular vesicles can be used to improve the quality of fish fillet.

**Keywords:** *Lactobacillus casei*, extracellular vesicles, Shelf life, *Otolites ruber*

* l.roomiani@iauahvaz.ac.ir

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]