بررسی ویژگی‌های باکتریوسین تولید شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی آن بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا

بهروز علیزاده بهبهانی*[1]، محمد نوشاد[1]

[1]گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰٤/۳۰

چکیده

باکتریوسین‌ها ترکیبات پپتیدی زیست‌فعالی هستند که توسط ریبوزم باکتری‌ها تولید می‌شوند و دارای اثرات مهارکنندگی و کشندگی روی برخی از میکروارگانیسم‌های دیگر هستند. امروزه صنعت باکتریوسین به‌عنوان نگهدارنده های طبیعی به طور قابل ملاحظه‌ای جایگزین نقش نگهدارنده‌های شیمیایی در ماندگاری و ایمنی مواد غذایی شده است. پیشرفت در مطالعه باکتریوسین‌ها با افزایش تقاضای مصرف‌کنندگان جهت کاربرد نگهدارنده‌های طبیعی در فراورده‌های غذایی همراه شده است. در این پژوهش، شناسایی باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* با استفاده از روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA انجام شد. فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت خنثی شده باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* علیه برخی از پاتوژن های شاخص بیماری‌زا بررسی شد. ویژگی‌های مختلف این ترکیب باکتریوسینی از قبیل ماهیت پروتئینی آن، مقاومت به حرارت، pH و همچنین، اثر دمای نگهداری بر پایداری آن بررسی شد. سوپرناتانت فاقد سلول باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*، علیه ۶ باکتری فعالیت ضدمیکروبی با هاله ممانعت از رشد ۱۸/۸–۷/۵ mm داشت. باکتریوسین تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* به‌صورت کامل نسبت به آنزیم‌های پروتئیناز K، آلفا–کموتریپسین، پروتئاز، و تریپسین حساس بود؛ اگر چه پس از قرارگیری در معرض پپسین حدود ۴۱ ٪ برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و حدود ۳۰ ٪ برای *میکروکوکوس لوتئوس* کاهش فعالیت داشت. سوپرناتانت حاوی باکتریوسین نسبت به دماهای مختلف و همچنین pHهای ۲ تا ۱۱ مقاومت داشت. بهترین دما برای نگهداری باکتریوسین مورد مطالعه، ۸۰ °C– و به مدت ۱ ماه بود. توانایی باکتریوسین تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* در مهار پاتوژن‌های مختلف و همچنین پایداری بالا نسبت به pH و درجه حرارت می‌تواند آن را به‌عنوان نگهدارنده طبیعی معرفی کند.

واژگان کلیدی: باکتریوسین، *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*، پروتئاز، تریپسین.

* B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

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

مقدمه

باکتری‌های اسیدلاکتیک باکتری‌های گرم مثبت، غیرمتحرک، بی‌هوازی اختیاری، غیراسپورزا، کاتالاز منفی و اکسیداز منفی هستند که از کربوهیدرات به‌عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند و اسیدلاکتیک را به‌عنوان محصول نهایی حاصل از تخمیر کربوهیدرات تولید می‌کنند (۱). باکتری های اسید لاکتیک میکروآئروفیل بوده و در حضور مقادیر کم اکسیژن رشد می‌کنند و نیازهای تغذیه‌ای پیچیده‌ای دارند (۲). جنس *لاکتوباسیلوس* به‌طور گسترده‌ای در طبیعت پراکنده شده و در ارتباط با گیاهان، سبزی‌ها، دانه‌ها، بذرها، شیرخام، گوشت، گوشت‌های تخمیری، فراورده‌های شیری و سبزی‌ها تخمیری یافت می‌شوند. تعدادی از این باکتری‌ها در دستگاه گوارش انسان، حیوانات و پرندگان حضور دارند و تعدادی در فساد غذاها حائز اهمیت‌اند (۳). *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* یک باکتری تولید کننده اسید و میله‌ای شکل است که کاربرد اصلی آن در تولید پنیر سوئیسی و امنتال[۱] است اما گاهی اوقات در تهیه برخی دیگر از پنیرها از قبیل چدار[۲]، پارمیسان[۳]، رومانو[۴]، پراوولون[۵] و موزارلا[۶] شرکت دارد (۴).

استفاده از میکروارگانیسم‌ها و یا فراورده‌های طبیعی آن‌ها جهت افزایش زمان ماندگاری موادغذایی عملی متداول در صنایع غذایی است. برخی از جنس و گونه‌های متعلق به باکتری‌های اسیدلاکتیک، باکتریوسین‌های ضدمیکروبی تولید می‌کنند. باکتریوسین‌ها، پروتئین‌ها یا پپتیدهای ضدمیکروبی سنتزشدهٔ ریبوزومی هستند. باکتری‌های اسیدلاکتیک چندین ویژگی مطلوب ارائه می‌دهند که آن‌ها را به یک نگهدارنده مطلوب تبدیل کرده است. این ویژگی‌ها عبارت‌اند از: به‌عنوان GRAS[۷] شناخته می‌شوند؛ بر روی سلول‌های یوکاریوت فعال نیستند و غیرسمی هستند؛ توسط آنزیم‌های هضم‌کننده (مثل پروتئازها) غیرفعال می‌شوند؛ تأثیر کمی بر فلور میکروبی دستگاه گوارش دارند؛ معمولاً pH و حرارت را تحمل می‌کنند؛ دارای طیف ضدمیکروبی نسبتاً گسترده‌ای در برابر بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا و عامل فساد هستند؛ طعم یا رنگ نامطلوب روی فراورده‌های غذایی ایجاد نمی‌کنند؛ اثر باکتری‌کشی نشان می‌دهند و مقاومت متقابل با آنتی‌بیوتیک‌ها ندارند (۸-۵). لاکتوباسیل‌ها با منشاء انسانی اثر آنتاگونیستی بر پاتوژن های گوارشی-رودهای مختلف نظیر *کلستریدیوم دیفسیل*، *هلیکوباکترپیلوری*، *اشرشیا کلی* و *کامپیلوباکتر ژژونی* دارند. باکتریوسین‌های تولید شده توسط این باکتری‌ها، پپتیدها یا پروتئین های ضدمیکروبی هستند که معمولا از رشد باکتری های گرم مثبت جلوگیری می‌کنند در حالی که ترکیبات اسید لاکتیکی توسط لاکتوباسیلوس‌ها تولید می‌شوند و وزن مولکولی کمی دارند از رشد باکتری‌های گرم منفی جلوگیری می‌نمایند (۹). باکتریوسین‌هایی که توسط باکتری های لاکتوباسیلوس تولید می‌شوند در ۴ گروه طبقه‌بندی می شوند: گروه I باکتریوسینی یا همان لانتی بیوتیک‌ها[۸]، دسته II باکتریوسین‌ها که وزن مولکولی بین ۵ و ۱۰ کیلودالتون داشته و مقاوم به حرارت هستند، دسته باکتریوسین‌ها که مقاومت حرارتی کم ولی وزن مولکولی بالایی دارند و گروه IV که وزن معمولا با یک بخش لیپیدی همراه بوده و وزن مولکولی بالایی دارند (۱۰).

Savadogo و همکاران (۲۰۰۴) فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک بر علیه نژادهای استاندارد *باسیلوس سرئوس*، *انتروکوکوس فکالیس*، *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بررسی قرار دادند که هاله ممانعت از رشد ۸-۱۲ mm گزارش شد. استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک به واسطه افزایش تعداد و تنوع باکتری‌های فلور روده، می‌توانند اثرات سلامتی‌بخش داشته باشند. از سویی دیگر، به دلیل ترکیبات باکتریوسینی می توانند عمر نگهداری محصولات غذایی را افزایش دهند. هدف از این مطالعه، بررسی پتانسیل باکتری *لاکتوباسیلوس*

[۱] Emmental
[۲] Cheddar
[۳] Parmesan
[۴] Romano
[۵] Provolone
[۶] Mozzarella
[7] Generally recognized as safe
[۸] Lantibiotic

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

هلویتیکوس در تولید باکتریوسین و همچنین ارزیابی ویژگی های مختلف این ترکیب ضدمیکروبی بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بود.

مواد و روش‌ها

آماده سازی سوپرناتانت فاقد سلول باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*

شناسایی باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* با استفاده از روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA انجام شد. *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* به محیط MRS براث تلقیح شده (۱ ٪) و به صورت بی‌هوازی در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ h گرم‌خانه گذاری شد. سپس محیط کشت در ۶۰۰۰rpm به مدت min ۱۰ و در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت برای آزمون‌های بعدی جمع‌آوری شد. جهت جلوگیری از اثر ممانعتی اسیدهای ارگانیک و پراکسید هیدروژن، pH سوپرناتانت با استفاده از هیدروکسید سدیم ۵ M روی ۶/۵ تنظیم شد و همچنین کاتالاز با غلظت ۱ mg/µg اضافه شد. سوپرناتانت فاقد سلول در مرحله بعد توسط فیلر سرسرنگی با قطر ۰/۲۲ µm فیلتر شد (۱۲).

فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت فاقد سلول جدا شده از باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*

برای تعیین فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت فاقد سلول، از روش انتشار چاهک در آگار استفاده شد. باکتری های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *میکروکوکوس لوتئوس*، *لیستریا اینوکوا*، *انتروکوکوس فکالیس* و *استرپتوکوکوس موتانس* ابتدا در محیط نوترینت براث (مرک، آلمان) کشت داده شدند. تعداد نهایی باکتری‌ها با استفاده از استاندارد مک‌فارلند روی ۱۰۶ CFU/mL تنظیم شد. سپس ۱۰۰ µL از آن به محیط نوترینت آگار مذاب (نوترینت براث + ۰/۷ ٪ آگار) اضافه شد. پس از هوموژن کردن، آگار نرم تلقیح شده به سرعت به پلیت‌های حاوی نوترینت آگار اضافه شد. پس از جامد شدن، پلیت حاوی آگار نرم به مدت ۱ h ساعت در دمای ۴ °C قرار داده شد. سپس، با انتهای پیپت استریل چاهک‌هایی به قطر ۶ mm در پلیت ایجاد شد و ۱۰۰ µL از سوپرناتانت فاقد سلول به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ h در دمای ۳۷ °C گرم‌خانه گذاری و سپس قطر هاله بازدارندگی بر حسب mm اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری شد (۱۳).

بررسی ویژگی‌های باکتریوسین

در این پژوهش تاثیر آنزیم‌های هیدرولیتیک، حرارت، pH، لیوفیلیزه کردن و دمای نگهداری بر پایداری باکتریوسین تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* بررسی شد. *استافیلوکوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتئوس* به‌عنوان پاتوژن شاخص جهت بررسی تیمارهای مختلف بر فعالیت باکتریوسین انتخاب شدند.

تاثیر آنزیم‌های هیدرولیتیک بر فعالیت باکتریوسین

برای بررسی اثر آنزیم‌های هیدرولیتیک بر فعالیت باکتریوسینی، از آنزیم‌های پروتئیناز K، آلفا-کموتریپسین، پروتئاز، پپسین و تریپسین، استفاده شد. تمامی آنزیم‌ها از شرکت سیگما آلدریچ، آلمان خریداری شد. آنزیم‌ها تا غلظت نهایی ۱ mg/mL رقیق و سپس فیلتر شدند. هر آنزیم به‌صورت جداگانه به سوپرناتانت حاوی باکتریوسین اضافه و به مدت ۲ h در دمای ۳۷ °C قرار داده شد. در مرحله بعد آنزیم با ۳ min حرارت در دمای ۱۰۰ °C غیرفعال شد. pH نمونه‌ها روی ۶/۵ تنظیم و سپس فعالیت ضد میکروبی آن‌ها بررسی شد (۱۳).

پایداری باکتریوسین در دماهای مختلف

مقاومت حرارتی باکتریوسین با حرارت دادن آن در دماهای ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ °C (۳۰min و ۶۰) و ۱۲۱ °C به مدت ۱۵ min و ۳۰ بررسی شد. سپس فعالیت ضدمیکروبی آن با روش انتشار چاهک در آگار بررسی شد. باکتریوسین حرارت ندیده به عنوان کنترل استفاده شد (۱۴). درصد فعالیت برای هر تکرار به اساس معادله ۱، محاسبه شد.

معادله (۱)

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

قطرهاله بازدارندگی برای نمونه تیمار شده / قطر هاله بادارندگی برای نمونه کنترل= پایداری دمایی باکتریوسین

تاثیر pH بر روی پایداری باکتریوسین

pH سوپرناتانت حاوی باکتریوسین بر ۲، ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ تنظیم شد و نمونه‌ها در دمای ۴ °C به مدت h صفر، ۶، ۱۲ و ۲۴ قرار داده شدند. بعد از اتمام بازه زمانی مشخص شده، pH مجدد روی ۶/۵ تنظیم و فعالیت ضدمیکروبی آن ارزیابی شد (۱۴).

تاثیر لیوفیلیزه کردن و دمای نگهداری بر پایداری باکتریوسین

۵ mL از باکتریوسین فیلتر شده لیوفیلیزه شد و به ترتیب در دمای‌های ۴ °C، ۲۰- و ۸۰- جهت فرایند انجام نگهداری شد. در نهایت فعالیت ضدمیکروبی آن ارزیابی شد (۱۳).

تجزیه و تحلیل آماری

در پژوهش حاضر نمونه‌برداری با استفاده طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تجزیه‌وتحلیل واریانس (ANOVA) در سطح احتمال ۵ ٪ و آزمون دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ انجام شد. همچنین، برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel ۲۰۱۹ استفاده شد.

نتایج

فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت حاوی باکتریوسین

نتایج مربوط به فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت فاقد سلول باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* در جدول ۱، مشخص شده است. در مطالعه ما، سوپرناتانت فاقد سلول، علیه *سودوموناس ائروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *میکروکوکوس لوتئوس*، *لیستریا اینوکوا*، *انتروکوکوس فکالیس* و *استرپتوکوکوس موتانس* فعالیت ضدمیکروبی با هاله ممانعت از رشد ۷/۵ mm–۱۸/۸ نشان داد. برای سویه *اشرشیا کلی* هاله عدم رشد مشاهده نشد.

تعیین ویژگی‌های باکتریوسین تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*

اثر آنزیم‌های پرتئولیتیک بر پایداری باکتریوسین

در این مطالعه، برای اثبات ماهیت پروتئینی باکتریوسین، سوپرناتانت فاقد سلول با آنزیم‌های پروتئولیتیک تیمار شده و سپس فعالیت ضدمیکروبی آن علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *میکروکوکوس لوتئوس* بررسی شد (جدول ۲).

جدول ۱. فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت فاقد سلول باکتری *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*

باکتری	هاله ممانعت از رشد (mm)
اشرشیا کلی ATCC۲۵۹۲۲	–
استافیلوکوکوس اورئوس *ATCC* ۲۵۹۲۳	۱۶/۲ ± ۰/۶۵[b]
سودوموناس آئروژینوزا PTCC۱۷۰۷	۸/۵ ± ۰/۲۸[d]
میکروکوکوس لوتئوس PTCC ۱۱۱۰	۱۸/۷ ± ۰/۵۶[a]
لیستریا اینوکوا ATCC ۳۳۰۹۰	۱۴/۶ ± ۰/۲۳[c]
انتروکوکوس فکالیس ATCC۲۹۲۱۲	۱۶/۱ ± ۰/۲۹[b]
استرپتوکوکوس موتانس ATCC ۳۵۶۸۸	۱۴/۷ ± ۰/۴۲[c]

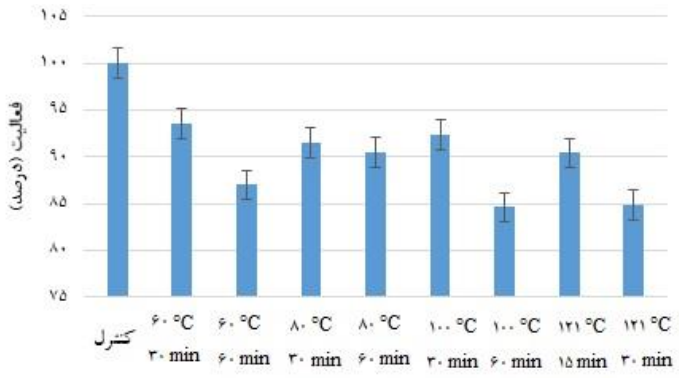
●حروف غیر مشابه در یک ستون نشان‌دهنده تفاوت در سطح معنی‌داری ۵ ٪ (آنالیز واریانس یک‌طرفه، آزمون دانکن) است. ●(–) هاله عدم رشد مشاهده نشد.

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

جدول ۲. اثر آنزیم‌های هیدرولیتیک (با غلظت نهایی 1 mg/mL) بر فعالیت باکتریو سین موجود در سوپرناتانت سلولی باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*

تیمارها	*استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۳	*میکروکوکوس لوتئوس* PTCC ۱۱۱۰
سوپرناتانت فاقد سلول (کنترل)	۱۵/۸ ± ۰/۶۲	۱۶/۹ ± ۰/۵۳
تریپسین	–	–
پپسین	۹/۲ ± ۰/۳۶	۱۱/۷ ± ۰/۴۵
آلفا-کموتریپسین	–	–
پروتئاز	–	–
پروتئیناز K	–	–

(–) فعالیت ضدمیکروبی مشاهده نشد.



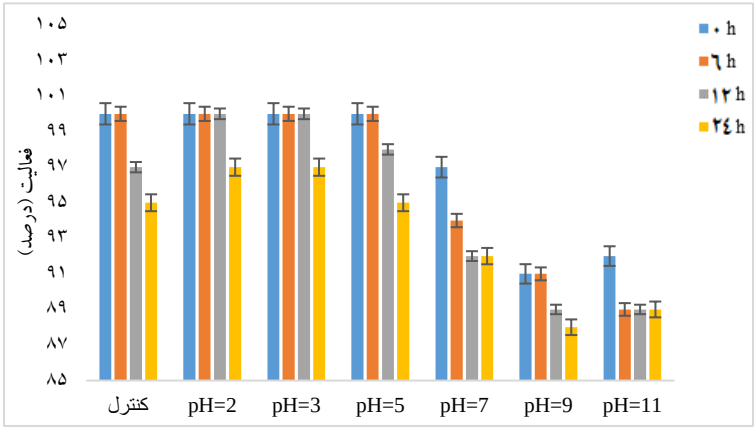
شکل ۱. تاثیر تیمارهای دمایی مختلف بر پایداری باکتریوسین تولید شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* (سوپرناتانت حرارت داده نشده به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شد؛ ۶/۵-۱۵/۱ ٪ از فعالیت باکتریوسین بعد از قرارگیری در دماهای مختلف و در مقایسه با نمونه کنترل کاسته شد).

فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین، پس از قرارگیری در معرض پپسین حدود ۴۱ ٪ برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و حدود ۳۰ ٪ برای *میکروکوکوس لوتئوس* کاهش داشت. همچین، باکتریوسین تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* به صورت کامل نسبت به آنزیم‌های پروتئیناز K، آلفا-کموتریپسین، پروتئاز و تریپسین حساس بود.

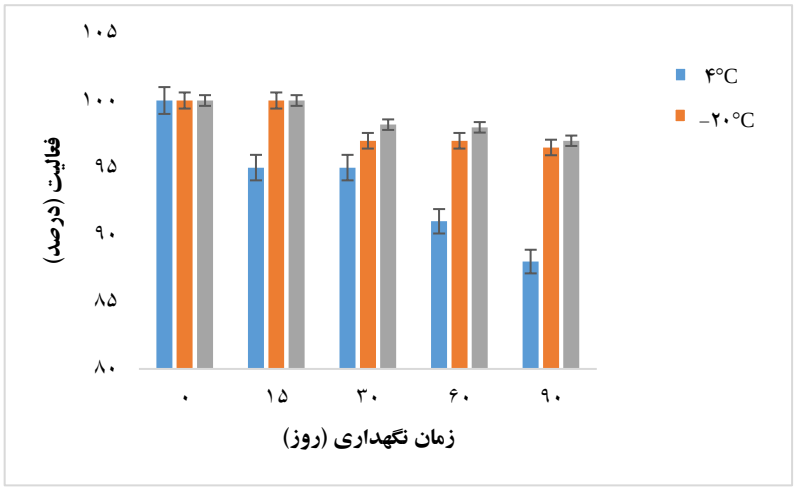
بررسی اثر تیمار دمایی و pH بر پایداری باکتریوسین

باکتریوسین تولیده شده توسط سویه مورد نظر به مدت ۳۰ min و ۶۰ در معرض دماهای ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ °C و همچنین به مدت ۱۵ min و ۳۰ دمای ۱۲۱ °C قرار گرفت. سپس، فعالیت ضدمیکروبی آن علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش انتشار چاهک در آگار بررسی شد (شکل ۱). نتایج نشان دهنده مقاومت حرارتی بالای این ترکیب پروتئینی بود به‌طوری که دمای ۱۲۱ °C را بعد از ۳۰ min دقیقه تحمل کرد. اگر چه ۶/۵-۱۵/۱ ٪ از فعالیت آن پس از قرارگیری در دماهای مختلف و در مقایسه با نمونه کنترل کاسته شد.

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



شکل ۲. پایداری باکتریوسین تولید شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* در pHهای مختلف (نمونه تیمار نشده به عنوان کنترل استفاده شد؛ میزان فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت تیمار شده در شرایط pHهای اسیدی ۳ تا ۵ ٪ و در شرایط pHهای قلیایی ۳ تا ۱۲ ٪ کاهش یافت)



شکل ۳. بررسی اثر ضدمیکروبی سوپرناتانت لیوفیلیزه شده باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* طی ۳ ماه نگهداری در دماهای ٤ °C، ۲۰- و ۸۰- (میزان کاهش فعالیت سوپرناتانت لیوفلیزه شده طی ۳ ماه نگهداری در دماهای ٤ °C، ۲۰- و ۸۰- به ترتیب ۵ تا ۱۲ ٪، ۳ تا ۳/۵ ٪ و ۱/۸ تا ۳ ٪ بود).

نتایج مربوط به پایداری سوپرناتانت باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* نسبت به pHهای ۲ تا ۱۱ و طی ۲۴ h در شکل ۲، نشان داده شده است. نمونه‌های مختلف پس از قرار گیری در معرض pHهای ۲ تا ۱۱ فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند. اگر چه در شرایط اسیدی پایداری باکتریوسین، بیشتر از شرایط بازی بود. پس از قرارگیری در معرض pH اسیدی، میزان فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت تیمار شده ۳ تا ۵ درصد و پس از قرارگیری در معرض pHهای قلیایی ۳ تا ۱۲ ٪ از اثر ضدمیکروبی و فعالیت آن‌ها کاهش یافت.

زمان نگهداری بهینه برای نمونه‌های لیوفیلیزه شده باکتریوسین

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

جهت استفاده‌های کاربردی، ترکیب ضدمیکروبی باید بتواند به‌صورت تغلیظ شده در زمان‌های طولانی نگهداری شود. در حالی‌که فعالیت و پایداری آن کاهش نیابد. به این منظور، باکتریوسین تولید شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* لیوفیلیزه شده و به مدت ۹۰ روز در دماهای ۴ °C، ۲۰- و ۸۰- نگهداری شد. در روزهای صفر، ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ نمونه برداری انجام و فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها مطالعه شد. با نگهداری سوپرناتانت لیوفلیزه شده این باکتری در دمای ۴ °C، فعالیت آن طی ۳ ماه نگهداری ۵ تا ۱۲ ٪ کاهش داشت. زمانی‌که سوپرناتانت لیوفلیزه شده این باکتری در دمای ۴ °C نگهداری شد فعالیت آن طی ۳ ماه نگهداری ۵ تا ۱۲ ٪ کاهش داشت. طی ۳ ماه نگهداری سوپرناتانت لیوفلیزه شده در دمای ۲۰ °C- ، فعالیت آن ۳ تا ۳/۵ ٪ کاهش نشان داد و این مقدار برای پودر لیوفلیزه نگهداری شده در دمای ۸۰ °C- ، ۱/۸ تا ۳ ٪ بود (شکل ۳).

بحث

لاکتوباسیلوس هلویتیکوس در خانواده باکتری‌های اسید لاکتیک طبقه‌بندی می‌شود. این باکتری به‌صورت گسترده‌ای در محصولات لبنی تخمیری و مخصوصا پنیر یافت می‌شود و مسئول ایجاد عطر و طعم در محصولات لبنی می‌باشد. باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند ترکیبات محدودکننده رشد از قبیل باکتریوسین، پراکسید هیدروژن و اسیدهای آلی در محیط کشت تولید کنند (۱۵). نتایج نشان داد که فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* بر سویه‌های گرم مثبت بیشتر از سویه‌های گرم منفی بود. امروزه مشخص شده است که اثر ممانعتی باکتریوسین‌ها بیشتر روی باکتری‌های گرم مثبت است در حالی‌که لایه لیپوپلی‌ساکاریدی غشای باکتری‌های گرم منفی به عنوان یک خنثی کننده جهت ورود باکتریوسین‌ها به درون سلول عمل می‌کند (۱۶). Heredia-Castro و همکاران (۲۰۱۵)، فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات باکتریوسینی تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس*‌های جدا شده از نوعی پنیر محلی مکزیکی را با روش انتشار در دیسک بررسی و بیان کردند این ترکیبات دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا اینوکووا*، *اشرشیا کلی* و *سالمونلا تایفی موریوم* هستند (۱۷). مقایسه نتایج این پژوهشگران با مطالعه ما نشان داد که قطر هاله عدم رشد مشاهده شده در مطالعه حاضر بزرگتر از پژوهش Heredia-Castro و همکاران (۲۰۱۵)، بود. علت این امر را می‌توان به تفاوت روش ارزیابی فعالیت فعالیت ضدمیکروبی (انتشار در دیسک و چاهک آگار) مرتبط دانست. در روش چاهک آگار ماده ضدمیکروب به طور مستقیم با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در ارتباط است در حالی که در روش انتشار در دیسک لازم است ماده ضدمیکروب از دیسک کاغذی (به طور غیرمستقیم) به سطح محیط کشت نفوذ کند. طق مطالعات Simova و همکاران (۲۰۰۹)، سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در برابر باکتری‌های *لیستریا اینوکوا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی* فعالیت ضد میکروبی از خود نشان داد. در حالی‌که، *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* و *سالمونلا تایفی موریوم* فعلیت ضد میکروبی داشت (۱۸). مقایسه نتایج این پژوهشگران با یافته‌های مطالعه ما تا حدودی مطابقت داشت. در پژوهش حاضر فعالیت ضدمیکروبی بر باکتری گرم منفی *اشرشیا کلی* مشاهده نشد. تاکنون باکتری‌های اسید لاکتیک ترکیبات ضدمیکروبی متنوعی سنتز می‌کنند و بسیاری از این ترکیبات پروتئینی هستند؛ در حالی‌که باقی این ترکیبات ضدمیکروبی مانند اسید لاتیک، دی‌استیل و پراکسید هیدروژن غیر پروتئینی می باشند. در پژوهش حاضر، باکتریوسین مورد مطالعه نسبت به تمامی آنزیم‌های پروتئولیتیک به جز پپسین حساسیت ۱۰۰ درصدی داشت به‌گونه‌ای که بعد از تیمار با آنزیم‌های پروتئیناز K، آلفا-کموتریپسین، پروتئاز و تریپسین هیچ فعالیت ضد میکروبی از خود بروز نداد. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با پژوهش Isleroglu و همکاران (۲۰۱۱)، که نشان دادند انتروسین KP جداشده از *انتروکوکوس فکالیس* KP بعد از تیمار با پپسین پایدار و فعال است مطابقت داشت (۱۹). Ghanbari و همکاران (۲۰۱۳)، نشان دادند ترکیبات ضدمیکروبی موجود در سوپرناتانت سلولی باکتری

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

های *لاکتوباسیلوس* جداشده از ماهی خاویار پس از تیمار آنزیمی هیچ فعالیت ضدمیکروبی از خود بروز نمی‌دهد که نشان دهنده ماهیت پروتئینی این ترکیبات است (۲۰). از آنجا که ترکیبات باکتریوسینی دارای ماهیت پروتئینی هستند لذا تیمار آن با آنزیم‌های پروتئولیتیک باعث غیر فعال شدن آن ها می‌شود. Gupta و همکاران (۲۰۱۶)، نشان دادند باکتریوسین موجود در سوپرناتانت سلولی *انتروکوکوس هیرا* LD3 فعالیت ضدمیکروبی خود را بعد از تیمار با آنزیم‌های پروتئولیتیک از دست داد (۲۱). نتایج به دست آمده از پژوهش‌های ذکر شده با یافته‌های مطالعه ما همخوانی داشت.

در این مطالعه مقاومت باکتریوسین تولید شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* نسبت به دما و pHهای مختلف بررسی شد. نتایج نشان داد بعد از تیمار حرارتی و همچنین قرارگیری آن در شرایط مختلف اسیدی، خنثی و بازی، باکتریوسین همچنان فعالیت ضدمیکروبی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد؛ اگر چه درصدهای متفاوتی از کاهش در میزان فعالیت در تیمارهای مختلف مشاهده شد. نتایج مشابهی در مطالعه سایر محققین به دست آمده است. Adesina و Enerijiofi (۲۰۱۶)، اثر دما و pH را بر باکتریوسین تولید شده توسط سه سویه *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* IO1، *تتراژنوکوکوس هالوفیلوس* PO9 و *لاکتوباسیلوس سلوبیوسوس* BE1 که از منابع تخمیری متفاوتی جداسازی شده بودند، مورد بررسی قرار دادند. نتایج این محققین نشان داد باکتریوسین اولیه تولیدی توسط سویه های اسید لاکتیک نسبت به حرارت مقاومت بالایی داشته به طوری که پس از ۱۵ min قرارگیری در دمای ۱۲۱ °C همچنان فعالیت ضدمیکروبی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت. همچنین در pHهای ۲-۹ (با درصد فعالیت بالاتر در شرایط اسیدی) توانست اثر ضدمیکروبی خود را بروز دهد (۲۲). در مطالعه ما نیز فعالیت ضدمیکروبی بر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده شد. Saad و همکاران (۲۰۱۵)، اثر حرارت و pH را بر باکتریوسین تولید شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بررسی کردند. نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد فعالیت ضدمیکروبی بعد از ۳۰ min حرارت در دمای ۱۰۰ °C مشاهده شد و پس از آن کاهش داشت. همچنین فعالیت ضدمیکروبی آن در pH=۸-۲ وجود داشت (۲۳). Zhang و همکاران (۲۰۱۸)، فعالیت باکتریوسین تولید شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* J23 جدا شده از نوعی شیر تخمیری تولید شده در کشور چین را در شرایط دمایی و pHهای مختلف مورد بررسی قرار دادند. این محققین نشان دادند باکتریوسین Lac-B23 مقاومت حرارتی بالایی داشته و بعد از ۳۰ min حرارت در ۱۰۰ °C توانست اثر ضد میکروبی خود را حفظ کند. همچنین این باکتریوسین دارای پایداری قابل قبولی در در pHهای ۲ تا ۱۲ بود اگر چه پس از قرارگیری در معرض تریپسین، پروتئیناز K و پروتئیناز E پایداری خود را از دست داد (۲۴). با توجه به ماهیت پروتئینی باکتریوسین از دست رفتن پایداری در برابر آنزیم‌ها قابل توجیه است. یافته‌های این پژوهشگران با مطالعه ما همخوانی داشت. Banerjee و همکاران (۲۰۱۳)، به بررسی ویژگی‌های باکتریوسین تولید شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شده از آب های شیرین پرداختند. فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت جداشده از این باکتری بعد از ۶۰ min حرارت در دمای °C ۱۲۱ پایدار بود و بعد از آن کاهش یافت. همچنین این باکتریوسین در محدوده pH ۲ تا ۸ نیز پایدار بوده و فعالیت ضد میکروبی از خود نشان داد (۲۵). یافته‌های این پژوهشگران با نتایج ما مطابقت داشت. Sivakumar و همکاران (۲۰۱۰)، به بررسی ویژگی‌های باکتریوسین تولید شده توسط باکتری‌های *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* پرداختند. نتایج این محققین نشان داد باکتریوسین مورد آزمایش، پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در pHهای ۳ تا ۹ و همچنین دمای ۱۰۰ °C پایدار است. این باکتریوسین توانست در دمای ۲۰ °C- به مدت ۴۵ روز، دمای ۴ °C را به مدت ۲۰ روز و دمای ۳۷ °C را به مدت ۵ روز نگهداری شود (۲۶). Sidek و همکاران (۲۰۱۸)، ویژگی‌های مختلف باکتربوسین تولید شده توسط باکتری *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی* را در شرایط مختلف مورد بررسی قرار دادند. این محققین نشان دادند باکتریوسین تولید

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

شده طی حرارت دادن در دمای ۱۰۰ °C پایدار است اگر چه دمای ۱۲۱ °C توانست آن را نابود کند. این باکتریوسین در pHهای مختلف از ۲ تا ۷ پایدار بود. همچنین طی ۱ ماه نگهداری در دمای ۲۰ °C- و ۸۰- فعالیت خود را حفظ کرد. اگر چه پایداری و فعالیت آن بعد از ۳ تا ۶ ماه نگهداری در دمای ۴ °C، ۲۰- و ۸۰- تا ۸۰ درصد کاهش داشت (۲۷).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد ترکیب ضدمیکروبی تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* که در سوپرناتانت خنثی شده این باکتری وجود داشت ماهیت پروتئینی دارد و دارای مقاومت حرارتی بالایی است. همچنین این ترکیب می‌تواند در pHهای مختلف مخصوصا در شرایط اسیدی زنده مانده و بهترین شرایط نگهداری برای آن، دمای ۸۰ °C- به مدت ۱ ماه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1-Singhal N, Singh NS, Mohanty S, Singh P, Virdi JS. Evaluation of probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from two commercial preparations available in Indian market. Indian journal of microbiology. 2019, 5;59(1):112-5.
2-Wang Y, He L, Xing Y, Zhou W, Pian R, Yang F, Chen X, Zhang Q. Bacterial diversity and fermentation quality of Moringa oleifera leaves silage prepared with lactic acid bacteria inoculants and stored at different temperatures. Bioresource technology. 2019,1;284:349-58.
3-Soares MB, Martinez RC, Pereira EP, Balthazar CF, Cruz AG, Ranadheera CS, Sant'Ana AS. The resistance of Bacillus, Bifidobacterium, and Lactobacillus strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. Food Research International. 2019, 1;125:108542.
4-Ren H, Zentek J, Vahjen W. Optimization of Production Parameters for Probiotic Lactobacillus Strains as Feed Additive. Molecules. 2019;24(18):3286.
5-Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PL. Fundamentals of cheese science. New York: Springer; 2017.
6-Laiche AT, Khelef C, Daoudi H. Study of the Antimicrobial Activity of Bactericocins Produced by Lactic Bacteria Isolated from Camel Milk in Southern Algeria. J Pure Appl Microbiol. 2019;13(2):1285-92.
7-Rolhion N, Chassaing B, Nahori MA, de Bodt J, Moura A, Lecuit M, Dussurget O, Bérard M, Marzorati M, Fehlner-Peach H, Littman DR. A Listeria monocytogenes Bacteriocin Can Target the Commensal Prevotella copri and Modulate Intestinal Infection. Cell host & microbe. 2019, 13;26(5):691-701.
8-Đorđević V, Balanč B, Belščak-Cvitanović A, Lević S, Trifković K, Kalušević A, Kostić I, Komes D, Bugarski B, Nedović V. Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. Food Engineering Reviews. 2015, 1;7(4):452-90.
9-Strus M, Pakosz K, Goscinia H, Przondo Mordarska A. Antagonistic activity tract pathogens (Helicobacter pylori, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Closteridium difficle). Med Diew Microbiol. 2001;53(2):133-42.
10-Sankar NR, Priyanka VD, Reddy PS, Rajanikanth P, Kumar VK, Indira M. Purification and characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum isolated from cow milk. Int J Microbiol Res. 2012;3(2):133-7.
11-Savadogo A, Ouattara CA, Bassole IH, Traore AS. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. Pakistan Journal of nutrition. 2004;3(3):174-9.
12-Cherif A, Ouzari H, Daffonchio D, Cherif H, Ben Slama K, Hassen A, Jaoua S, Boudabous A. Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by Bacillus thuringiensis BMG1. 7, a new strain isolated from soil. Letters in Applied Microbiology. 2001, 11;32(4):243-7.
13-Cherif A, Chehimi S, Limem F, Hansen BM, Hendriksen NB, Daffonchio D, Boudabous A. Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, Bacillus thuringiensis ssp. entomocidus HD9. Journal of Applied Microbiology. 2003;95(5):990-1000.
14-Khalid F, Siddiqi R, Mojgani N. Detection and characterization of a heat stable bacteriocin (Lactocin LC-09) produced by a clinical isolate of lactobacilli. Medical Journal of Islamic Academy of Sciences. 1999;12(3):67-71.
15-Fusco V, Quero GM, Cho GS, Kabisch J, Meske D, Neve H, Bockelmann W, Franz CM. The genus Weissella: taxonomy, ecology and biotechnological potential. Frontiers in microbiology. 2015, 17;6:155.

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

16-Gyawali R, Ibrahim SA. Natural products as antimicrobial agents. Food control. 2014 Dec 1;46:412-29.
17-Heredia-Castro PY, Méndez-Romero JI, Hernández-Mendoza A, Acedo-Félix E, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by Lactobacillus spp. isolated from artisanal Mexican cheese. Journal of dairy science. 2015, 1;98(12):8285-93.
18-Simova ED, Beshkova DB, Dimitrov ZP. Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. Journal of Applied Microbiology. 2009, ;106(2):692-701.
19-Isleroglu H, Yildirim Z, Tokatli M, Oncul N, Yildirim M. Partial characterisation of enterocin KP produced by Enterococcus faecalis KP, a cheese isolate. International journal of dairy technology. 2012;65(1):90-7.
20-Ghanbari M, Jami M, Kneifel W, Domig KJ. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocins produced by lactobacilli isolated from Sturgeon fish. Food Control. 2013, 1;32(2):379-85.
21-Gupta A, Tiwari SK, Netrebov V, Chikindas ML. Biochemical properties and mechanism of action of enterocin LD3 purified from Enterococcus hirae LD3. Probiotics and antimicrobial proteins. 2016, 1;8(3):161-9.
22-Adesina IA, Enerijiofi KE. Effect of pH and heat treatment on bacteriocin activity of Pediococcus pentosaceus IO1, Tetragenococcus halophilus PO9 and Lactobacillus cellobiosus BE1. SAU Science-Tech Journal. 2016, 18;1(1).
23-Saad MA, Abdelsamei HM, Ibrahim E, Abdou AM, El Sohaimy SA. Effect of pH, heat treatments and proteinase K enzyme on the activity of Lactobacillus acidophilus bacteriocin. Benha Veterinary Medical Journal. 2015, 1;28(1):210-5.
24-Zhang J, Yang Y, Yang H, Bu Y, Yi H, Zhang L, Han X, Ai L. Purification and Partial Characterization of Bacteriocin Lac-B23, a Novel Bacteriocin Production by Lactobacillus plantarum J23, Isolated from Chinese Traditional Fermented Milk. Frontiers in microbiology. 2018, 1;9:2165.
25-Banerjee SP, Dora KC, Chowdhury S. Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus brevis FPTLB3 isolated from freshwater fish. Journal of food science and technology. 2013, 1;50(1):17-25.
26-Sivakumar N, Saif AB. Partial characterization of bacteriocins produced by Lactobacillus acidophilus and Pediococcus acidilactici. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2010;53(5):1177-84.
27-Sidek M, Lyana N, Halim M, Tan JS, Abbasiliasi S, Mustafa S, Ariff AB. Stability of bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by Pediococcus acidilactici kp10 at different extreme conditions. BioMed research international. 2018;2018.

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

Investigation of bacteriocin properties produced by *Lactobacillus helveticus* and evaluation of its antimicrobial activity on pathogenic microorganisms

Behrooz Alizadeh Behbahani[1*], Mohammad Noshad[1]

[1]Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

Abstract

Bacteriocins are generally defined as peptides or proteins ribosomal synthesized by bacteria that inhibit or kill other microorganisms. Nowadays, bacteriocin industry as natural preservatives have substantially grown replacing the role of chemical preservatives in enhancing shelf-life and safety of food. The progress in bacteriocin study has been supported by the emerging of consumer demand on the applications of natural food preservatives. In this study, *Lactobacillus helveticus* were identified using the 16S rRNA gene sequencing method. The antimicrobial activity of the neutralized supernatant of *Lactobacillus helveticus* against some pathogenic microorganisms was investigated. Then, the different properties of this bacteriocin compound, such as its protein nature, heat and pH resistance, as well as the storage temperature on its stability, were examined. In this study, the supernatant of *L. helveticus*, showed antimicrobial activity against 7 pathogenic bacteria with 8.5-18.7 mm diameter in inhibition zone. The bacteriocin produced by *L. helveticus* was completely sensitive to proteinase K, α-chymotrypsin, protease, and trypsin; however, after exposure to pepsin, the activity was reduced by about 41% for *Staphylococcus aureus* and about 30% for *Micrococcus luteus*. Supernatants containing bacteriocin were resistant to different temperatures as well as pHs 2 to 11. Also, the best temperature for storing the studied bacteriocin was -80 ºC for 1 month. The ability of bacteriocin produced by *L. helveticus* to inhibit growth of various pathogens as well as high stability to pH and temperature can be introduced it as a natural preservative.

Keywords: Bacteriocin, *Lactobacillus helveticus*, Protease, Trypsin.

* B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

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