خالص سازی نسبی و بررسی خصوصیات باکتریوسین های تولید شده توسط دو ایزوله *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بومی آذربایجان شرقی

شیوا خالدزاده[۱]، محمد امین حجازی[۲*]، رضا معصومی جهاندیزی[۲]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست فناوری- بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه
۲- دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور
۳- استادیار گروه زیست فناوری- بیوتکنولوژی میکروبی دانشگاه مراغه
(تاریخ دریافت: ۹۵ /۰۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۲۹)

چکیده

در این تحقیق، برخی خصوصیات باکتریوسین‌های تولید شده توسط دو سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بررسی شدند. ابتدا، دوسویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* BL1 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* EL3بومی آذربایجان شرقی از کلکسیون میکروبی پژوهشکده کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور انتخاب، و خاصیت ضد باکتریایی و طیف مهاری باکتریوسین های تولید شده توسط آن ها،تعیین شد. سپس حساسیت باکتریوسین های تولید شده به دو آنزیم پروتئازی (پروتئیناز K و آلفا کیموتریپسین) و فعالیت باکتری کشی یا مهار رشدی باکتریوسین های تولید شده، و نیز پایداری حرارتی آن‌ها در دماهای مختلف تعیین شد.وزن مولکولی باکتریوسین ها، با تکنیک SDS-PAGE تخمین زده شد. طبق نتایج به دست آمده مشخص شد که باکتریوسین های تولیدی هر دو سویه علیه تمام پاتوژن های به کار رفته در پژوهش فعال بوده و طیف مهاری وسیع داشتند، و همچنین بعد از اعمال تیمارهای دمایی مختلف همچنان فعالیت ضد باکتریایی خود را حفظ کردند.همچنین مشاهده شد که باکتریوسین های تولید شده به آنزیم پروتئیناز K حساس بوده و کاملا تخریب شدند. در مقابل، آلفا کیموتریپسین قادر به تخریب کامل باکتریوسین های تولید شده نبود. از طرف دیگرمشخص شد که باکتریوسین *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* BL1 روی پاتوژن نشانگر *اشریشیاکلی*(ATCC 1399) اثر کشندگی داشته در حالی که اثر مهار رشدی بر علیه *یرسینیاانتروکولیتیکا*(ATCC 35669)نشان داد. باکتریوسین سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* EL3 نیز بر روی هر دو پاتوژن نشانگر مذکور اثر مهار رشدی نشان داد.باکتریوسین های تولید شده توسط هر دو سویه*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مورد مطالعه، وزن مولکولی کمتر از۱۰ کیلودالتون (۱۰کیلودالتون> باکتریوسین های تولید شده > ۵ کیلو دالتون) داشته و در محدوده تعیین شده باکتریوسین های گروه IIb قرار گرفتند.

کلید واژگان: باکتری های اسید لاکتیک، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، باکتریوسین،خالص‌سازی نسبی،فعالیت ضدباکتریایی

*مسئول مکاتبات:aminhejazi@yahoo.com

۱- مقدمه

باکتری های اسید لاکتیک به طور گسترده در صنعت غذا به عنوان کشت های آغازگر برای فرآیند های تخمیری، به کار می روند. لاکتوباسیلوس ها دهه هاست که بر علیه بیماری های عفونی استفاده می شوند [۱] و توانایی آن ها برای حفاظت مواد مختلف بر علیه پاتوژن ها، به طور وسیع مورد مطالعه قرار گرفته است. مشخص شده که بسیاری از این باکتری های اسید لاکتیک مواد ضد میکروبی از جمله باکتریوسین ها تولید می کنند که، قادر به مهار رشد باکتری های بیماری زای مختلفی می باشند. باکتریوسین جدا شده از باکتری های اسیدلاکتیک، پپتید ها یا پروتئین های کوچک ضد میکروبی طبیعی هستند که فعالیت باکتری کشی یا مهار رشد باکتریایی بر علیه گونه های مرتبط ژنتیکی از خود نشان می دهند [۲]. از میان باکتریوسین هایی که توسط ارگانیسم های گرم مثبت سنتز می شوند، باکتریوسین های لاکتوباسیلوس ها ارزش تجاری دارند [۳]. انواع مختلفی از باکتریوسین ها از باکتری های اسید لاکتیک همراه غذا، شناسایی و تعیین خصوصیت شده اند که از جمله مهمترین آن ها نایسین، دیپلوکوکسین، اسدوفیلین، بولگاریکان، هلوتیسین، لاکتاسین و انواع مختلف پلانتاراسین ها می باشند[٤]. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*به عنوان شناخته شده ترین عضو باکتری های اسیدلاکتیک، از بوم های متنوعی جدا شده اند و پلانتاراسین های متعددی از سویه های موجود در شیر [٦-٥]، پنیر[۷]، آبجو [۸] و خیار تخمیر شده [۹] شناسایی شده اند. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* حداقل ٦ باکتریوسین مجزا تولید می کنند. از جمله شایع ترین پلانتاراسین هایی که توسط *لاکتوباسیلوسپلانتارم* تولید شده اند می توان به پلانتاراسین EF، پلانتاراسین W، پلانتاراسین JK و پلانتاراسین S اشاره کرد که همگی جزو باکتریوسین های دو پپتیدی می باشند[۱۰]. باکتریوسین های لاکتوباسیلوس در گروه هایی تحت عنوان دسته I باکتریوسین ها (لانتی بیوتیک ها)، دسته II باکتریوسین ها (شامل باکتریوسین های غیر لانتی بیوتیک، مقاوم به حرارت با وزن مولکولی ۱۰kDa>باکتریوسین >kDa ٥ می باشند)، دسته III (پروتئین های حساس به حرارت با وزن مولکولی بالا را شامل می شوند) و دسته IV (پروتئین هایی که همراه با یک بخش لیپیدی یا کربوهیدراتی می باشند و وزن مولکولی بالایی دارند)، دسته بندی می شوند[۱۱].

هدف از این پژوهش تجربی، خالص سازی نسبی و بررسی برخی خصوصیات کیفی و کمی باکتریوسین های تولید شده توسط دو ایزوله *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بومی آذربایجان شرقی بود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- سویه های باکتریایی

دو سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* BL1 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* EL3به عنوان سویه های تولید کننده باکتریوسین، از کلکسیون میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال-غرب و غرب کشور جهت بررسی خصوصیات باکتریوسین ها انتخاب شدند. پنج پاتوژن عامل مسمومیت غذایی شامل *اشریشیاکلی*[۳](ATCC 1399)، *باسیلوس سرئوس*[٤](ATCC 1431)، *استافیلوکوکوس آرئوس*[٥](ATCC 29213)، *یرسینیا انتروکولیتیکا*[٦](ATCC 35669) و *شیگلا فلکسنری*[۷] (PTCC 1234) به عنوان باکتری های هدف (نشانگر) نیز از کلکسیون میکروبی انتخاب شدند. سویه های پاتوژن انتخاب شده هم حاوی باکتری های گرم مثبت و هم باکتری های گرم منفی بودند.

۲-۲- تولید باکتریوسین

جهت تهیه مایع رویی حاوی باکتریوسین از سویه‌های تولید کننده باکتریوسین، باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* BL1 و*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* EL3 تحت شرایط استریل به میزان ۱٪ در محیط کشت MRS Brothتلقیح شدند و به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند.بعد از گرمخانه گذاری، سوسپانسیون‌های باکتریایی حاضر به مدت ۲۰ دقیقه در g ٦۰۰۰ در دمای ٤ °C سانتریفیوژ شده و با عبور از فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲µm (بیوفیل) استریل شدند. مایع‌هایرویی عاری از سلول استریل هر کدام از سویه‌ها علت تولید اسید توسط سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* BL1 و EL3دارای pH اسیدی داشت، که با استفاده از NaOH 4 M خنثی شده، و

3. Eschrichia coli
4. Bacillus cereus
5. Staphylococcus areus
6.Yerssiniaenterocolitica
5. Shigellaflexneri
6. Disk diffussion

عصاره نهایی به عنوان باکتریوسین خام جهت بررسی خصوصیات در بقیه آزمایش ها مورد استفاده قرار گرفت [۱۲].

۲-۳- بررسی فعالیت ضد باکتریایی و تعیین طیف مهاری باکتریوسین‌ها

فعالیت ضد باکتریایی و طیف مهاری باکتریوسین‌های تولید شده توسط دو سویه مولد مورد مطالعه، با استفاده از تست انتشار از دیسک[۸] تعیین شد[۱۳]. برای انجام مرحله دیسک گذاری، ابتدا محیط کشت مولر هینتونبه شکل آگار نرم[۹] با افزودن ۰/۷٪ آگار تهیه، استریل و خنک گردید. سپس ۲۰ میلی لیتر از این محیط کشت، به میزان ۱٪ با پاتوژن های مورد نظربا کدورت ۰/۳ (OD_{600nm}=0/3) تلقیح شده و درون پلیت‌ها ریخته شد. پلیت‌ها یک ساعت درون یخچال باقی ماندند تا آگار کاملاً بسته شود. علت استفاده از آگار نرم این است که باکتریوسین بتواند به راحتی در آن انتشار یافته و به اطراف دیسک نفوذ کند. پس از گذشت مدت زمان مقرر، دیسک های بلانک استریل با ۵۰µl از باکتریوسین خام تهیه شده به صورت جداگانه آغشته شده و تحت شرایط استریل بر روی پلیت های حاوی محیط کشت، قرار داده شدند و به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور با دمای $37\ ^0C$ انکوبه شدند. نتایج با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر (mm) با استفاده از کولیس با دقت ۰/۱ میلی متر اندازه گیری شدند[۱۳].

۲-٤- بررسی پایداری حرارتی باکتریوسین ها

برای بررسی پایداری حرارتی باکتریوسین های تولید شده توسط دو سویه مورد مطالعه، باکتریوسین خام بدست آمده از سویه ها طبق آنچه گفته شد تهیه [۱۲]، و پایداری حرارتی آن ها در دماهای مختلف ($70\ ^0C$، $100\ ^0C$، $121\ ^0C$) به مدت ۱۵ دقیقه، سنجیده شد. جهت بررسی حفظ فعالیت ضدباکتریایی باکتریوسین ها بعد از تیمار های دمایی، از تست انتشار از دیسک استفاده شد[۱۳].

۲-۵- بررسی حساسیت آنزیمی و تعیین فعالیت باکتری کشی یا مهار رشد باکتریایی باکتریوسین ها

فعالیت باکتری کشی یا مهار رشد باکتریایی باکتریوسین های تولید شده توسط سویه های مورد مطالعه، طبیعت پروتئینی مواد همستیز تولید شده توسط لاکتوباسیلوس ها و انتروکوکوس ها قبلا نشان داده شده است[١٤]. در این تحقیق حساسیت باکتریوسین های تولید شده به آنزیم های پروتئازی بررسی شد و نیز فعالیت باکتری کشی یا مهار رشد باکتریایی باکتریوسین های تولید شده طبق آنچه توسط دمارتینز [۱۵] توضیح داده شده، تعیین شد. فعالیت ضد باکتریایی مایع رویی‌های عاری از سلول استریل (باکتریوسین خام) مربوط به هر کدام از دو سویه، در pH خنثی بررسی شدند و بعد از گذشت مدت زمان ۱۲ساعت انکوباسیون در دمای $37\ ^0C$ و مشاهده هاله‌های عدم رشد، پلیت‌ها از انکوباتور خارج شده و تحت شرایط استریل تیمار آنزیمی با آنزیم های پروتئازی بر روی پلیت‌های دارای هاله عدم رشد، انجام شد. به این صورت که ۵µl از آنزیم پروتئیناز K^{10} ($20mg.ml^{-1}$) و ۵ µl از آنزیم آلفا کیموتریپسین[۱۱] ($20mg.ml^{-1}$) تحت شرایط استریل با سمپلر به طور مجزا در اطراف هاله های عدم رشد مربوط به باکتریوسین‌های تولیدی هر کدام از سویه ها، ریخته شد (در هر پلیت برای باکتریوسین خام یک سویه دو تکرار قرار داده شد و هر کدام از آنزیم‌ها به طور مجزا در اطراف هاله‌ها ریخته شدند). سپس پلیت‌ها دوباره به مدت ۱۲ ساعت در 37^0C انکوبه شدند. بعد از گذشت مدت زمان مقرر، به بررسی فعالیت باکتری کشی یا مهار رشدی باکتری‌های پاتوژن در اطراف هاله ها پرداخته شد. تمامی مراحل آزمایش سه بار و به طور مستقل از هم انجام شدند[۱۵].

۲-٦- تخمین وزن مولکولی باکتریوسین‌ها

برای تخمین وزن مولکولی مایع رویی های خنثی شده عاری از سلول استریل (باکتریوسین خام) مربوط به هر کدام از دو سویه، به میزان ٦۰٪ با پودر سولفات آمونیوم اشباع، و جهت رسوب باکتریوسین به مدت ٢٤ ساعت در $4\ ^0C$ نگهداری شدند. بعد از گذشت مدت زمان مقرر فالکون های مذکور به مدت ۳۰ دقیقه در g ۵۵۰۰ در دمای ٤ °C سانتریفیوژ شده و رسوب هایی در ته فالکون ها تشکیل شدند. سپس مایع رویی دور ریخته شده و رسوب ها در حداقل میزان بافر فسفات سالین (pH: ٧/٤) به مدت ٢٤ ساعت در٤°C حل

6. Disk diffussion
7. Soft agar

10. Proteinase K
11. α-chymotrypsin

شدند[۱۰].وزن مولکولی باکتریوسین هایی که به صورت نسبی خالص سازی شدند، با استفاده از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) طبق روش لاملی، تعیین شدند[۱۶]. بعد از الکتروفورز، ژل با رنگ کوماسی بلو R-250 رنگ آمیزی شد و از طریق شستشو با مخلوط استیک اسید- متیل الکل – آب (۵:۵:۱) به مدت ۲٤ ساعت، رنگ بری شد. از مارکری با محدوده وزن مولکولی پایین به عنوان مارکر استاندارد استفاده شد (سینا ژن ایران).

۳- نتایج

Table 1 Inhibitory specterum of the bacteriocin produced by two studied *L.plantarum* species

	L.plantarum EL3		*L.plantarum BL1*	
Selected species	**Acidic**	**Neutralized**	**Acidic**	**Neutralized**
E.coli (ATCC1399)	11mm	14mm	12mm	14mm
S.flexneri (PTCC1234)	11mm	13mm	13mm	**15mm**
Y.entrocolitica(ATCC35669)	13mm	13mm	12mm	12mm
B.cereus (ATCC1431)	8mm	**10mm**	9mm	**11mm**
S.aureus(ATCC29213)	12mm	**15mm**	11mm	14mm

Zone of inhibition> 2mm /(+)Zone of inhibition< mm ۲(-) ۲

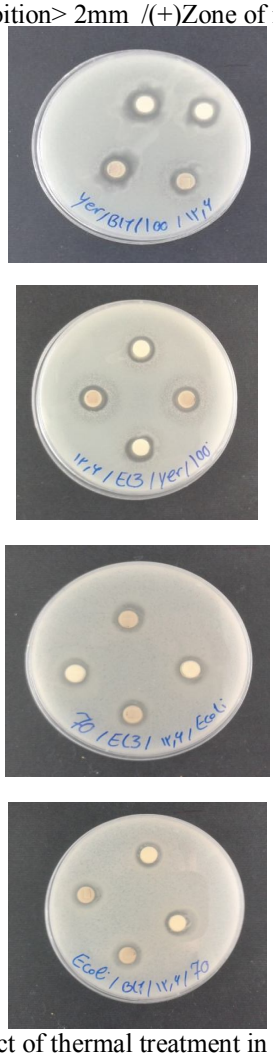

Fig 1 Effect of thermal treatment in stability of produced bacteriocins by two studied *L.plantarum* species, (A) 120°C, (B) 100°C, (C) 70°C

۳-۱- بررسی فعالیت ضد باکتریایی و تعیین طیف مهاری باکتریوسین‌ها

نتایج حاصل از تعیین طیف مهاری که در جدول (۱) نیز مشاهده می شود، نشان داد که باکتریوسین های تولید شده توسط هر دو سویه موردمطالعه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* BL1 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* EL3، بر علیه تمامی پاتوژن‌های گرم مثبت و گرم منفی به کار رفته در پژوهش فعال بودند.

طبق نتایج بدست آمده بیشترین میزان بازدارندگی باکتریوسین تولید شده توسط سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* BL1 در pHخنثی، مربوط به شیگلا *فلکسنری*(۱۵±۱/۳mm) و کمترین بازدارندگی برعلیه ب . *سرئوس* (۱۱±۱ mm)،و در مورد باکتریوسین سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* EL3 بیشترین میزان بازدارندگی برعلیه *استافیلوکوکوس آرئوس* (۱۵ ±۱ mm) و کمترین میزان مربوط به *باسیلوس سرئوس*(۱۰ ± ۱ mm) مشاهده شد.

۳-۲- بررسی پایداری حرارتی باکتریوسین‌ها

نتایج حاصل از بررسی پایداری دمایی باکتریوسین های تولید شده بعد از اعمال تیمارهای دمایی مختلف و سنجش فعالیت باکتریوسین ها، نشان داد که باکتریوسین های تولید شده توسط هر دو سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* EL3 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* BL1 بعد تیمارهای دمایی همچنان فعالیت ضد باکتریایی خود را حفظ کردند و قادر به مهار رشد پاتوژن های نشانگر بودند، هرچند که کاهش جزئی فعالیت با افزایش مداوم دما مشاهده شد(شکل ۱)(جدول۲).

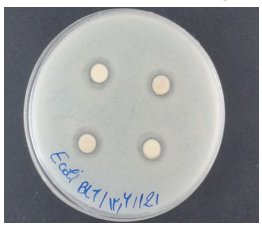

Table 2 Effect of thermal treatment in stability of produced bacteriocins by two studied *L.plantarum* species

	L.plantarum BL1			*L.plantarum*EL3		
	70°C	**100°C**	**120°C**	**70°C**	**100°C**	120°C
E.coli	13 mm	10 mm	8mm	12 mm	9 mm	7 mm
Sh.flexneri	11 mm	8.5 mm	8.5mm	13 mm	10 mm	8 mm
Y.entrocolitica	13 mm	10 mm	9 mm	10 mm	9 mm	6.5 mm
B.cereus	8 mm	8 mm	6 mm	10.5 mm	8 mm	6.5 mm
S.aureus	14 mm	11 mm	8 mm	13 mm	11 mm	9 mm

۳-۳- بررسی حساسیت آنزیمی و تعیین فعالیت باکتری کشی یا مهار رشد باکتریایی باکتریوسین ها

در بررسی حساسیت آنزیمی باکتریوسین های تولید شده و فعالیت باکتری کشی یا مهار رشد باکتریایی پس از گذشت مدت زمان مقرر، مشاهده شد که باکتریوسین های تولید شده توسط هر دو سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*مورد مطالعه به آنزیم پروتئازی پروتئیناز K کاملا حساسیت داشتند اما آنزیم آلفا کیموتریپسین قادر به تخریب باکتریوسین های تولید شده به صورت کامل نبوده است. آنزیم پروتئیناز K وسیع طیف بوده و قادر به تخریب باکتریوسین های تولید شده بوده است، اما پروتئاز آلفا کیموتریپسین به دلیل اختصاصیت بالا در عملکرد، قادر به تخریب کامل باکتریوسین ها نبوده است و می توان نتیجه گرفت که ساختار باکتریوسین های تولید شده، سوبسترای متناسب این آنزیم نبوده اند.

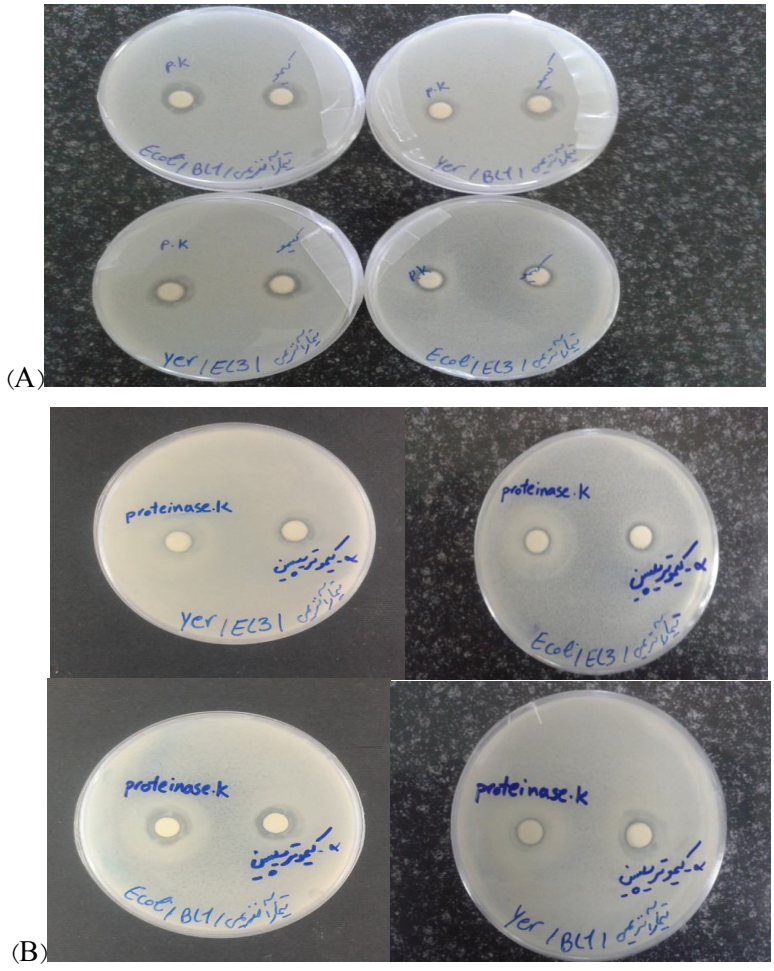

Fig 2 Determination of bactericidal or bacteriostatic activity of produced bacterions, (A) Zone of inhibition before enzymatic treatment, (B) After enzymatic treatment, Bactericidal activity of plantaracinBL1 on *E.coli* andbacteriostatic activity of plantaracinBL1 on *Y.entrocolitica,* and bacteriostatic activity of plantaracin EL3against *E.coli* and *Y.entrocolitica* are shown

همچنین با توجه به نتایج به دست آمده بعد از تیمارهای آنزیمی، مشخص شد که باکتریوسین تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*BL1، روی پاتوژن *E.coli* (ATCC 1399) اثر کشندگی داشته و بعد از تیمار باکتریوسین با آنزیم های پروتئازی، با توجه به ماهیت پروتئینی این پپتیدهای ضد باکتریایی و تجزیه آن ها، پاتوژن*E.coli*(ATCC 1399) در هاله عدم رشد تکثیر نیافت. در مقابل، همین باکتریوسین خاصیت مهارکنندگی رشد بر روی ATCC (35669) *Y.entrocolitica* داشت و بعد از تیمارهای آنزیمی و از بین رفتن باکتریوسین، این باکتری در هاله عدم رشد تکثیر پیدا کرد. باکتریوسین تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*EL3 بر روی هر دو سویه پاتوژن نشانگر (*E.coli* و *Y.entrocolitica*) خاصیت مهار کنندگی رشد نشان داد و بعد از تیمار با آنزیم های پروتئازی، رشد این پاتوژن ها در هاله های عدم رشد مشاهده شد.

۳-٤- تخمین وزن مولکولی

وزن مولکولی باکتریوسین های تولید شده توسط سویه های لاکتوباسیلوس پلانتاروم مورد مطالعه، با الکتروفورز ژل -SDS PAGE تعیین شد (شکل ۳).

بعد از رنگ آمیزی ژل با کوماسی بلو، باکتریوسین های تولید شده توسط هر دو سویه تک باند پروتئینی در محدوده ۱۰-۵ kDa تشکیل دادند، که محدوده تعیین شده برای دسته II باکتریوسین ها می باشد.

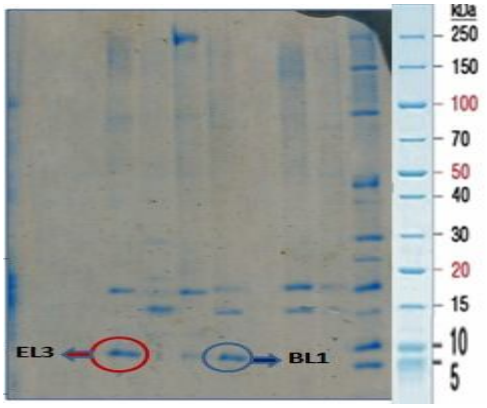

Fig 3. The SDS-PAGE analysis of partially purified bacteriocins produced by two studied *L.plantarum* species

٤- بحث و نتیجه گیری

انواع مختلفی از باکتریوسین ها از باکتری های اسید لاکتیک که در غذا های مختلف حضور دارند، شناسایی و خصوصیت یابی شده اند [۱۸-۱۷]. به دلیل افزایش تقاضا برای محصولات طبیعی تر و موادی که از لحاظ میکروبیولوژیکی ایمن باشند، نیاز به روش های نگهداری زیستی در صنعت غذا احساس می شود. باکتریوسین ها پتانسیل قابل توجهی برای نگهداری غذا، کاربرد های درمانی در انسان به عنوان مکمل ها یا جایگزینی برای آنتی بیوتیک های رایج مورد استفاده، دارند [۲۰-۱۹].

در پژوهش حاضر با توجه نتایج حاصل از تعیین طیف مهاری مشاهده شد که باکتریوسین های تولید شده توسط هر دو سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مورد مطالعه، بر علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی به کار رفته در پژوهش فعال بودند، این در حالی است که باکتریوسین باکتری های اسید لاکتیک معمولا بر علیه باکتری های گرم منفی فعال نیستند و تنها گزارشات اندکی از فعالیت بر علیه گونه های سالمونلا ارائه شده است[۲۱]. مهار باکتری های گرم منفی توسط باکتریوسین باکتری های اسید لاکتیک یک ویژگی منحصر به فرد می باشد که کاربرد های دارویی آن را نیز گسترش می دهد. اخیرا گزارشات متعددی در مورد مهار غشاهای گرم منفی ها ارائه شده اما جزئیات مکانیسم ها باید بیشتر مورد تحقیق قرار گیرد [۲۳-۲۲]. برخی تحقیقات فعالیت باکتریوسین های تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[۲٤LR14]، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[۲٥ZJ5] نیز بر علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی را گزارش داده اند. این در حالی است باکتریوسین های تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[۲٦SIK-8]، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[۲۷] تنها بر علیه باکتری های گرم مثبت فعالیت نشان داده اند.

در بررسی پایداری حرارتی با توجه به نتایج به دست آمده، مشخص شد که باکتریوسین های تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[۲۸LP31]، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[۲۹TF711]، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[۱NCIM2084]نیز همانند باکتریوسین های تولید شده توسط دو سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مورد مطالعه در این پژوهش، به حرارت های بالا تا ۱۲۱°C مقاوم بودند. در مقابل باکتریوسین تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*LC74 به حرارت بالا حساس بوده و در ۹٥°C فعالیت ضد باکتریایی نشان نداد [٥].

بر اساس نتایج به دست آمده از حساسیت به آنزیم های پروتئازی و بررسی خاصیت باکتری کشی یا مهار رشد

باکتریایی باکتریوسین های تولید شده، مشاهده شد که باکتریوسین های تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[۲۳C19] حساس به تیمار آنزیم پروتئازی بوده و عملکرد مهار رشدی بر علیه پاتوژن نشانگر *لیستریا مونوسیتوژنز*IP6818 داشت. در پژوهشی دیگر که روی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*LP84 انجام شد، مشخص شد که باکتریوسین تولیدی آن بر علیه *باسیلوس سرئوس*F4810 و *اشریشیاکلی*D21 فعالیت باکتری کشی داشته و نیز به آنزیم های پروتئازی حساس بود [۲۹].همانطور که گفته شد باکتریوسین ماهیتی پروتئینی دارد و با توجه به حساسیت آن به آنزیم های پروتئازی توسط آنزیم های گوارشی شکسته می شود. بنابراین می توان آن ها را برای مصرف در محصولات تخمیری، ایمن در نظر گرفت [۱۰]. توانایی باکتریوسین برای کشتن پاتوژن های عامل مسمومیت و فساد غذایی توانایی ارزشمند در زمینه صنعت و محصولات غذایی می باشد زیرا با احتمال از بین رفتن باکتریوسین طی فرآیند های نگهداری، تاثیر مواد شیمیایی و.... دیگر پاتوژن کشته شده قادر به تکثیر مجدد نخواهد بود.

با توجه به نتایج ژل SDS-PAGE و تشکیل تک باند پروتئینی باکتریوسین های هر دو سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مورد مطالعه در محدوده kDa ۱۰-۵، تودورو و همکاران (۲۰۰٤) نیز وزن مولکولی kDa ۱۰ را برای باکتریوسین تولید شده توسط سویه*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*ST13BR گزارش کردند. آلی و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که باکتریوسین تولید شده توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم*IIA-1A5* در محدوده kDa ٦/٥ تک باند پروتئینی تشکیل داد. وزن مولکولی kDa ۹/٥ برای باکتریوسین تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از شیر خام گاوگزارش شد که این نتیجه پیشنهاد می دهد که ممکن است این باکتریوسین نیز جزء دسته II باکتریوسین ها باشد[۱۰].

با توجه به نتایج به دست آمده مبنی بر طیف مهاری وسیع، پایداری حرارتی و حساسیت به آنزیم های پروتئازی و خاصیت باکتری کشی و مهار رشد باکتریایی باکتریوسین های تولید شده در این پژوهش، می توان نتیجه گرفت که با توجه به عوارض ناشی از مصرف ترکیبات ضد میکروبی شیمیایی و مصنوعی، این متابولیت ها می توانند به عنوان ترکیب های ضد میکروبی طبیعی کاربرد غذایی و دارویی داشته باشند.

۵- منابع

[1] Bernet M.F., Brassart D., Meeser J.R. and Servin A.L., 1994, *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell-attachment and cell-invasion by enterovirulent bacteria, *Gut*., 35: 483-489.

[2] Klaenhammer T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria, *Gordon Breach Science Publisher*.,*New York* 70: 337-349.

[3] Garneau S., Martin N.I. and Vederas J.C., 2002, Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *Biochem*., 84: 577-592.

[4] Nettles C., Barefoot S., 1993, Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria, *J. Food Prot.*, 56: 338-356.

[5] Rekhif N., Atrih A., Michel M. and Lefebvre G., 1995, Activity of plantaricin SA6, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* SA6 isolated from fermented sausages, *J. Appl. Bacteriol.*, 78: 349-358.

[6] Mohan Kumar A. and Murugalatha N., 2012, Isolation of *Lactobacillus plantarum* from cow milk and screening for the presence of sugar alcohol producing gene, *J. Microbiol. Antimicrobial*., 4: 16-22.

[7] Gonzales B., Arca P., Mayo B. and Suarez J., 1994, Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin, *Appl. Environ. Microbiol*., 6: 2158-2163.

[8] Van Reenen C.A., Dicks L.M.T. and Chikindas M.L., 1998, Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*, *J. Appl. Microbiol*., 84: 1131-1137.

[9] Todorov S.D., Van Reenen C.A. and Dicks L.M.T., 2004, Optimization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer, *J. Gen. Appl. Microbiol*., 50: 149-157.

[10] Zacharof M. P., Lovitt E.W., 2012, Bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *Elsevier*, 2: 50-56.

[11] Ravi Sankar N., Deepthi V., Priyanka P., Srinivas Reddy P., Rajanikanth V., Kiran K. and Indira M., 2012, Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by Lactobacillus

plantarum Isolated from Cow Milk, *Int. J. Microbiol.*, 3, 133-137.

[12] Ogunbanwo, S.T., A.I. Sanni and A.A. Onilude, Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OGI, 2003, *African J. Biotechnol.*, 2, 219-227.

[13] Ivanova I., Kabadjova P., Pantev A., Danova S. and Dousset X., 2000, Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. lactis b14 isolated from Boza-Bulgarian traditional cereal beverage, *Biocatal. J.*,41, 47-53.

[14] Gomes B. C., 2008, Characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods, *Food Microbiol.*,*25*, 668-675.

[15] DE MARTINIS E. C. P., SANTAROSA P. R. and FREITAS F. Z., 2003, Characterization preliminary of bacteriocin production by lactic acid isolates from Boza, *J. Food Prot.*, 23, 195-199.

[16] Lammeli U., 1997, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T, *Nature.*, 277, 680-685.

[17] Daeschel M.A., Mc Keney M.C. and Mc Donald L.C., 1990, Bactericidal activity of *Lactobacillusplantarum* C-11, *Food Microbiol.*, 7, 91-98.

[18] Ravi V., Prabhu M. and Subramanyam D., 2011, Isolation of bacteriocin producing bacteria from mango pulp and its antimicrobial activity, *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 1, 54-63.

[19] Fricourt B.V., Barefoot S.F., Testin R.F. and Haysaka S.S., 1994, Detection and activity of plantaricin F an antimicrobial substance from *Lactobacillusplantarum* BF001 isolated from processed channel catfish, *J. Food Protect.,* 57, 698-702.

[20] Ogunbanwo S.T., Sanni A.I. and Onilude A.A., 2003, Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and Lactobacillus brevis OGI, *African J. Biotechnol.*, 2, 219-227.

[21] Dick L.M.T, Heunis T., Staden D., Brand A., Noll K. and Chikindas M., 2011, Medical and Personal Care Application of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria, *Springer*, 14, 391-421.

[22] Kumar M., Tiwari SK. and Srivastava S., 2010, Purification and characterization of enterocin LR/6, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* LR/6. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160, 40-49.

[23] Atrih A., Rekhif N., Milliere J.B. and Lefebvre G., 1993, Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19, *Can. J. Microbiol.*, 39: 1173-1179.

[24] Tiwari SK. and Srivastava S., 2015, Broad Antimicrobial-spectrum of Plantaricin LR14 against Gram-positive and Gram-negative Bacteria, *Austin. J. Anal. Pharm. Chem.*, 2, 10-36.

[25] Todorov S. and Dicks L. M. T., 2004, Influence of Growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis subp. lactis ST 34BR*, a strain isolated from barley beer. *J. Basic. Microbiol.*, 44, 305-316.

[26] Avonts L. and De Vuyst L., 2001, Antimicrobial potential of probiotic lactic acid bacteria, *Appl. Biotechnol.*, 68, 543–550.

[27] Schnürer J. and Magnusson J., 2005, Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives,*Food Sci. Technol.*, 16, 70–78.

[28] Hernandez D, Cardell E, Zárate V., 2005, Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *J Appl. Microbiol.*, 99, 77-84.

[29] Stevens K., Sheldon B., Klapes N. and Klaenhammer T., 1991, Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gramnegative bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3613–3615.

[30] Todorov S. and Dicks L. M. T., 2004, Influence of Growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis subp. lactis ST 34BR*, a strain isolated from barley beer,*J. Basic. Microbiol.*, 44, 305-316.

[31] Aly, E. A., Characterization of a Bacteriocin-Like Inhibitory Substance Produced by *Lactobacillus plantarum* Isolated from Egyptian Home-Made Yogurt. *Science Asia*. 2007, *33*, 313-319.

Partial Purification and Characterization of produced Bacteriocins by Two East-Azarbayjan Native Isolates of *Lactobacillus plantarum*

Khaledzade, Sh.[1], Hejazi, M. A.[2*], Masoomi Jahandizi, R. [3]

1. MSc student of Microbial Biotechnology, Faculty of Basic Science, University of Maragheh
2. Associate Professor, Agriculture Biotechnology Research Institute of North and North-West (ABRII)
3. Assistant Professor, Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Basic science, University of Maragheh

(Received: 2016/08/09 Accepted:2018/10/21)

In this study, some characters of produced bacteriocins by two isolates of *L.plantarum* were studied. At fiest, two native isolates of *L.plantarum* BL1 and *L.plantarum* EL3 were selected from microbial collection of ABRII, and then the antibacterial trait and inhibitory spectrum of produced bacteriocins were determined. Therefore, bacteriocidal or bacteriostatic activity of produced bacteriocins, and thermal stability of them in different tempretures were studied. Molecular weight of bacteriocins were estimated by SDS-PAGE technique. According to achieved results, produced bacteriocins by two isolates were active against all used pathogens and had wide inhibitory spectrum, and even after different thermal treatments they retain their antibacterial activity. Also, it was observed that both produced bacteriocins were sensitive to proteinase-K and destroyed completely. In contrast, alpha-chymotrypsin was not able to destroy bacteriocins properly. On the other hand, it was revealed that *L.plantarum* BL1 bacteriocin had bacteriocidal effect on *Eschrichia coli* (ATCC 1399), but bacteriostatic activity against *Yerssinia entrocolitica* (ATCC 35669) as indicator pathogens. *L.plantarum* EL3 bacteriocin showed bacteriostatic activity on both noted indicator pathogens. Produced bacteriocins by both studied *L.plantarum* strains, had molecular weight lower than 10 kDa (5 kDa < produced bacteriocins < 10 kDa) and taked place in specified range of class IIb bacteriocins.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, Bacteriocin, Partial purification, Antibacterial activities

*Corresponding Author E-Mail Address: aminhejazi@yahoo.com