# بررسی ماهیت بیوشیمیایی و طیف میزبانی ترکیبات آنتی‌باکتریایی تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک بومی

پریسا پورعبدی سرابی[۱]، علیرضا تاری‌نژاد[۲*]، محمدامین حجازی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

۲- دانشیار و عضو هیات علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهد مدنی آذربایجان

۳- دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنایع غذایی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران

**(تاریخ دریافت: ۱۱/۰۷/ ۹۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۲۹)**

## چکیده

باکتریوسین‌ها به ترکیبات آلی یا پپتیدهای سنتز شده توسط باکتری‌ها اطلاق می‌گردد که به عنوان سموم از طریق حمله به یک بافت خاص در برابر گونه‌های باکتریایی یکسان و یا میکروارگانیسم‌ها تولید و منجر به مرگ یا بازدارندگی رشد آنها می‌شوند. بهره گیری از خواص آنتی باکتریایی و نگهدارندگی باکتریوسین‌های باکتری‌های اسید لاکتیک با طیف میزبانی وسیع با توجه به ظهور باکتری‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین لزوم امنیت غذایی بیشتر، یک ضرورت محسوب می‌شود. هدف این پژوهش تعیین ماهیت ترکیب آنتی باکتریایی تولید شده توسط پنج سویه لاکتوباسیلوس و پنج سویه انتروکوک بومی ایران با استفاده از تیمارهای آنزیمی کاتالاز، لیپاز، آلفا آمیلاز، تریپسین و آلفاکیموتریپسین و همچنین ارزیابی طیف میزبانی باکتریوسین تولید شده توسط سویه‌های بومی با روش انتشار از دیسک بود.نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های تیمارهای آنزیمی بر روی سوپرناتانت سویه‌های E6، DL3 ، H20 ، N ، M ، T2، AE2 و L27 نشان داد که بین قطر هاله عدم رشد حاصل از سوپرناتانت تنظیم pH شده و سوپرناتانت تیمار شده با سایر آنزیم‌ها اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۱٪ وجود دارد. مقایسه میانگین بین داده‌های تیمارهای آنزیمی صورت گرفته بر روی سوپرناتانت سویه 15E و EL1نشان داد که بین قطر هاله عدم رشد حاصل از سوپرناتانت تنظیم pH شده و سوپرناتانت تیمارشده باآنزیم‌های لیپاز، تریپسین و آلفاکیموتریپسین اختلاف معنی داری وجود دارد. هریک از باکتری‌های اسید لاکتیک بومی الگوی مهار رشد گسترده‌ای علیه سویه‌های پاتوژن گرم مثبت و گرم منفی نشان دادند. به طور کلی نتایج به دست آمده نشان داد سوپرناتانت خنثی شده‌ی سویه‌های اسید لاکتیک بومی بعد از تیمار با آنزیم‌های لیپاز، آلفاآمیلاز و کاتالاز از پایداریآنتی باکتریایی کامل و یا نسبی برخوردار بود و بیانگر این موضوع است که باکتریوسین تولید شده توسط این سویه‌ها غالبا ماهیت پپتیدی دارد.

**کلید واژگان:** باکتری اسید لاکتیک، باکتریوسین، تیمار آنزیمی، ماندگاری مواد غذایی

* مسئول مکاتبات: atarinejad@yahoo.com

## ۱- مقدمه

در سال‌های اخیر تلاش‌های قابل توجهی برای یافتن ترکیبات آنتی‌میکروبی طبیعی انجام گرفته است که با ممانعت از رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها در مواد غذایی منجر به بهبود کیفیت و عمر مفید مواد غذایی می‌گردد. ترکیبات ضد باکتریایی طبیعی را می‌توان از منابع مختلف از جمله گیاهان، حیوانات، باکتری‌ها، جلبک‌ها و قارچ‌ها به دست آورد. میکروب‌ها به خصوص باکتری‌های اسید لاکتیک طیف وسیعی از مواد شیمیایی با فعالیت ضد میکروبی تولید می‌نمایند [۱]،از آن جمله می‌توان به باکتریوسین، اسیدهای چرب کوتاه (SCFA) (اسید لاکتیک و اسید استیک) و پراکسید هیدروژن اشاره نمود که دارای خاصیت آنتی باکتریایی در برابر چندین میکروارگانیسم بیماری زا و عامل فساد مواد غذایی هستند[۲]. باکتریوسین به عنوان یکی از مهم‌ترین مهارکننده‌های رشد و توسعه سایر گونه‌های میکروبی، به عنوان نگه‌دارنده‌های طبیعی با منشأ باکتریایی کاربرد دارد [۱]. باکتری‌های اسید لاکتیک کلاس بزرگی از باکتری‌ها هستند که به طور قابل توجهی به عنوان آغازگر به منظور نگه‌دارنده غذا و به عنوان پروبیوتیک برای غذای انسان و فرآوری غذای دام استفاده می‌شوند. تولید باکتریوسین توسط این باکتری‌ها به عنوان یکی از پتانسیل‌های پروبیوتیک به موضوع تحقیقاتی روز تبدیل شده است [۳]. امروزه پروبیوتیک‌های شاخص متعلق به سویه‌های جنس Lactobacillus ، Enterococcus و Bifidobacterium هستند، همچنین سویه‌هایی نظیر Saccharomyces boulardii ،Bacillus و یا Escherichia coli غیر بیماریزا نیز به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند. از میان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، باکتری‌های اسیدلاکتیک به عنوان مهم‌ترین گروه شناخته شده هستند که در این میان دو جنسLactococcus و Enterococcus جزو فلور طبیعی دستگاه گوارش و غذاهای تخمیریبوده و گزینه‌های خوبی برای پروبیوتیک محسوب می-شوند.جنسن و همکاران (۲۰۰۰) باکتریوسینی به نام enterocin 012 را که توانایی مهار بسیاری از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت را داشت از سویه باکتریایی Enterococcus012 gallinarumموجود در دوازده‌ی شترمرغ جداسازی کردند. این باکتریوسین در تیمار با آنزیم‌های لیزوزیم، کاتالاز و لیپاز مقاوم اما نسبت به پروتئیناز k، آلفاکیموتریپسین و تریپسین و پپسین حساس بود. تیمار enterocin 012 با آنزیم‌های دوازدهه، ۵۰٪ فعالیت آنتی باکتریایی آن را کاهش داد [٤]. در بررسی دیگری باکتریوسین جداسازی شده ازباکتری اسید لاکتیک$Lactobacillus\ plantarum\ F_{12}$ بازدارندگی وسیعی را در برابر بسیاری از سویه‌های شاخص نشان داد. تنها سوپرناتانت خنثی شده و تیمار شده با کاتالاز شش سویه در برابر سویه‌های شاخص از خود بازدارندگی نشان دادند. خصوصیات باکتریوسین تولید شده توسط Lactobacillus plantarum $F_{12}$ تعیین و مشخص گردید که به هیدرولیزپروتئولیتیک (تریپسین، کیموتریپسین و پروناز) حساس می‌باشد و در برابر آلفا آمیلاز و لیپاز مقاوم است [۵]. باکتریوسین‌های متعددی از غذاهای تهیه شده از باکتری‌های اسید لاکتیک شناسایی و تعیین ویژگی شده‌اند که مهمترین آن‌ها عبارتند از nisin ، diplococcin، acidophilin ، bulgaricanhelveticins, lactacins و plantaricins[٦].به عنوان مثال باکتریوسین Lactacin F با proteinase K،trypsin، subtilisin و ficin غیرفعال می‌گردد و با تیمار آنزیم‌های lysozyme، lipase و a-amylase فعال باقی می‌ماند [۷]. ویژگی‌های بیوشیمیایی باکتریوسین leuconocin S به دست آمده از باکتری Leuconostoc paramesenteroides نشان داد که این باکتریوسین با آنزیم‌های a-amylase، trypsin، a-chymotrypsin و proteinase K غیرفعال می‌گردد، اما با آنزیم لیپاز همچنان فعال بود، بررسی‌ها ماهیت گلیکوپروتئینی این باکتریوسین را تایید نموده است [۸]. سه سویه Lactobacillus sakeiST22Ch، ST153Chو ST154Ch از محصولات گوشتی سنتی شمال غرب کشور پرتغال جداسازی و باکتریوسین‌های هر سه سویه بعد از تیمار با آنزیم‌ها Proteinase K, pronase, trypsin, pepsin و papain فعالیت خود را از دست دادند اما وقتی با آنزیم‌های a-amylase ، lipase وcatalase تیمار شدند فعالیت خود را حفظ کردند. سوپرناتانت حاصل از این سویه‌ها بر روی سویه‌های شاخص Enterococcus spp، Listeria spp ، Escherichia coli، Klebsiella spp، Pseudomonas spp،

Staphylococcus spp و Streptococcus spp اثرات بازدارندگی رشد نشان دادند و مبین این است که فعالیت این سه باکتریوسین وابسته به گلیکوزیلاسیون و اثر هیدروژن پراکسید نیست [۹].

استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها و فشار تکاملی ناشی از آن‌ها متاسفانه باعث ظهور باکتری‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها شده است که استفاده از درمان‌های جایگزین ضروری به نظر میرسد[۱۰]. اگرچه وجود آنتی‌بیوتیک‌ها با طیف میزبانی وسیع امیدوارکننده هستند، اما وجود پاتوژن‌های چند مقاومتی همواره نگران کننده است [۱۱]. از طرفی بیماری‌های منتقل شونده از مواد غذایی نگرانی بزرگی برای مصرف‌کننده‌ها، صنایع غذایی و مقامات ایمنی غذایی محسوب می‌شود. مصرف کنندگان مواد غذایی در مورد ایمنی مواد نگهدارنده شیمیایی نظیر دی‌اکسید گوگرد، اسید بنزوئیک، سوربیک اسید، نیتریت، نیترات و...که ممکن است تاثیر منفی بر سلامتی داشته باشد، ابراز نگرانی کردهو متقاضی استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی (bio-preservative) هستند [۱۲, ۱۳]. در نتیجه جست و جو برای یافتن ترکیبات آنتی باکتریایی مشتق شده از منابع طبیعی مختلف و لزوم امنیت غذایی بیشتر یک ضرورت احساس می‌شود. هدف از این پژوهش تعیین ماهیت ترکیب آنتی باکتریایی موجود در سوپرناتانت پنج سویه لاکتوباسیلوس و پنج سویه انتروکوک بومی می‌باشد. بنابراین سوپرناتانت حاصل از باکتری‌های اسیدلاکتیک بعد از خنثی سازی pH با آنزیم‌های کاتالاز، آلفاآمیلاز، لیپاز، تریپسین و آلفاکیموتریپسین به صورت جداگانه تیمار گردید و ماهیت بیوشیمیایی ترکیب آنتی باکتریایی موجود در سوپرناتانت باکتری‌های اسید لاکتیک بومی ارزیابی گردید. با استفاده از روش انتشار از دیسک قطر هاله بازدارندگی سوپرناتانت‌های تیمار شده باکتری‌های بومی علیه باکتری‌های شاخص Listeria innocua، Bacillus cereus، Shigella flexneri ، Klebsiella pneumonia، Staphylococcus aureus، Escherichia coli، Yersinia entrocolitica ارزیابی شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- سویه‌های باکتری

در این تحقیق از پنج سویه‌ی لاکتوباسیل و پنج سویه انتروکوک بومی جدا سازی شده از محصولات لبنی استفاده گردید. سویه استاندارد Lactobacillus plantarum (IBRC-M 10817) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. سویه بومی استاندارد Lactobacillus plantarum $L_{28}$ و هفت سویه شاخص عامل مسمویت غذایی موجود در مجموعه میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور نیز مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

**Table 1**Bacterial strains used in this study

| Collection | Micro-organism |
|---|---|
| ATCC 33090 | Listeria innocua |
| IBRC-M 10746 | Shigella flexneri |
| ATCC1431 | Bacillus cereus |
| ATCC 29213 | Staphylococcus aureus |
| PTCC 1290 | Klebsiella pneumonia |
| ATCC 1399 | Escherichia coli |
| ATCC 35669 | Yersinia entrocolitica |
| IBRC-M 10817 | Lactobacillus plantarum |
| Native of ABRII | Lactobacillus plantarum $L_{28}$ |

### ۲-۲- محیط‌های کشت و شرایط کشت

باکتری‌های اسید لاکتیک به کار رفته در این پژوهش قبلاً از محصولات شیر و ماست محلی مناطق مختلف آذربایجان شرقی جداسازی شده و در محیط کشت MRS مایع (SharpMan, Rogosa and) (شرکت سیگما-آلدریچ آمریکا) و حاوی ۳۰٪ حجمی گلیسرول در فریزر۸۰- نگهداری شده بودند. سویه‌های شاخص به کار رفته در این پژوهش در محیط کشتمولر هینتونمایع (شرکت مرک-آلمان) و حاوی ۳۰٪ حجمی گلیسرول در فریزر ۸۰- نگهداری شده بودند. قبل از انجام آزمایش، به منظور دستیابی به کشت تازه و فعال، باکتری‌های اسید لاکتیک و باکتری‌های شاخص فریز شده را در دمای آزمایشگاه بر روی یخ، از انجماد خارج کرده و پس از کشت سطحی آن‌ها به ترتیب بر روی محیط کشت MRS آگار و مولر هینتون آگار(شرکت سیگما-آلدریچ آمریکا) ، به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری (شرکت Binder آلمان، مدل B34) شد. از کشت‌های ۱۸ ساعته، مقادیر

مختلف به محیط کشت MRS مایع منتقل و جذب نوری با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ٦٢٥ نانومتر تعیین و سوسپانسیون باکتری با کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه شد [١٤].

## ٢-٣- تولید باکتریوسین از باکتری‌های اسید لاکتیک

برای تولید باکتریوسین از کشت‌های فعال شده باکتری‌های اسید لاکتیک به نسبت ١٠٪ حجمی محیط کشت MRS مایع تلقیح تهیه و در شرایط کم هوازی ( شرایط اتمسفری با فشار اکسیژن پایین) در دمای ٣٧ درجه سانتی گراد به مدت ٤٨ ساعت انکوبه گردید، تمامی این مراحل در زیر هود لامینار و شرایط استریل انجام شد.

## ٢-٤- جداسازی سوپرناتانت حاوی باکتریوسین

به منظور جداسازی سوپرناتانت کشت حاوی باکتریوسین و حذف سلول‌های باکتری، محیط کشت ٤٨ ساعت حاوی سلول‌های باکتریایی با دور٦٠٠٠rpm در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٠ دقیقه سانتریفوژ گردید.

## ٢-٥- تیمار سوپرناتانت با سدیم هیدروکسید ٤ مولار

سوپرناتانت باکتری‌های اسیدلاکتیک با استفاده از NaoH ٤ نرمال به pH شش تنظیم شد تا اثر آنتی باکتریایی حاصل از اسیدهای آلی تولید شده در طی فرایند تخمیر خنثی گردد. برای اطمینان از عدم حضور باکتری، سوپرناتانت تنظیم pH شده از فیلتر غشایی ٠/٢٢ میکرومتر عبور داده شد و فعالیت آنتی باکتریایی سوپرناتانت حاصل بر روی باکتری‌های شاخص با روش انتشار از دیسک (disk diffusion assay) مورد ارزیابی قرار گرفت [١٥].

## ٢-٦- تعیین اثرآنتی باکتریایی سوپرناتانت

برای تعیین فعالیت آنتی باکتریایی از روش انتشار از دیسککامپوسو همکاران با تغییرات جزئی استفاده شد [١٦]. به این ترتیب که ١٠٠میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری شاخص با کدورت معادل نیم مک فارلند در پلیت‌های حاوی ٢٠ میلی‌لیتر محیط کشت مولر هینتون آگار نرم (حاوی ٠/٨٪ آگار) پورپلیت گردید. دیسک‌های کاغذی استریل( پادتن طب)، با فاصله مناسب از یکدیگر و از لبه پلیت بر سطح محیط کشت جامد قرار داده شد و سپس ٢٠ میکرولیتراز سوپرناتانت جداسازی شده از باکتری‌های اسید لاکتیک بر روی دیسک‌ها قرار داده شد. به منظور انتشار باکتریوسین از دیسک بر روی محیط کشت، پلیت‌ها به مدت ١ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از ١٢ ساعت فعالیت آنتی‌باکتریایی سوپرناتانت با اندازه گیری قطر هاله مهار رشدی با استفاده از کولیس تعیین شد. به این ترتیب فعالیت آنتی باکتریال ١٠ سویه اسید لاکتیک علیه هفت باکتری شاخص عامل مسمومیت غذایی بررسی گردید.

## ٢-٧- تیمار سوپرناتانت با آنزیم کاتالاز

به منظور خنثی کردن اثر آنتی باکتریایی حاصل از پراکسید هیدروژن تولید شده در طی فرایند تخمیر، سوپرناتانت تنظیم pH شده با آنزیم کاتالاز (سیگما –آلدریچ، آلمان) تیمار گردید. ابتدا مقدار یک میلی‌گرم از آنزیم پودری کاتالاز طبق پروتکل محلول سازی سیگما- آلدریچ، در یک میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ٥٠ میلی مولار (pH ٦)حل شد و محلول آنزیمی حاصل به نسبت ٠/١ میلی‌لیتر به تیوب‌های حاوی ١میلی لیتر سوپرناتانت با (pH ٦) افزوده گردید. سوپرناتانت تیمارشده با آنزیم کاتالاز به مدت یک ساعت در بن ماری ٣٧ درجه سانتی گراد تیمار و سپس به مدت ١٠ دقیقه در ١٠٠ درجه سانتی گراد جوشانده شد تا آنزیم کاتالاز افزوده شده غیرفعال گردد [١٧] و فعالیت آنتی باکتریایی سوپرناتانت تیمار شده با روش انتشار از دیسک مطابق روش ذکر شده سنجیده شد.

## ٢-٨- تیمار سوپرناتانت با آنزیم لیپاز

به منظور خنثی کردن اثر آنتی باکتریایی حاصل از اسیدهای چرب کوتاه تولید شده در طی فرایند تخمیر، سوپرناتانت تنظیم pH شده با آنزیم لیپاز (سیگما –آلدریچ، آلمان) تیمار گردید. ابتدا مقدار یک میلی‌گرم از آنزیم پودری لیپاز، در یک میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ١٠ میلی مولار (pH ٦) حل شد و محلول آنزیمی حاصل به نسبت ٠/١ میلی‌لیتر به تیوب‌های حاوی ١میلی لیتر سوپرناتانت با (pH ٦) افزوده گردید. سوپرناتانت تیمارشده با آنزیم لیپاز به مدت یک ساعت در بن ماری ٣٧ درجه سانتی گراد

تیمار گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰درجه سانتی گراد جوشانده شد تا آنزیم لیپاز افزوده شده غیرفعال گردد [۱۷] و فعالیت آنتی باکتریایی سوپرناتانت تیمار شده با روش انتشار از دیسک مطابق روش ذکر شده سنجیده شد.

## ۲-۹- تیمار سوپرناتانت با آنزیم آلفا آمیلاز

به منظور خنثی کردن اثر آنتی باکتریایی کربوهیدرات‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، سوپرناتانت تنظیم pH شده با آنزیمآلفا آمیلاز (type II-A ، سیگما –آلدریچ، آلمان) تیمار گردید. شرایط آماده سازی آنزیم، نسبت حجمی سوپرناتانت و آنزیم آلفا آمیلازتیمار شده و همچنین ارزیابی فعالیت آنتی باکتریایی سوپرناتانت تیمار شده مطابق بند ۲-۸ صورت گرفت. برای آماده سازی آنزیم، ابتدا مقدار یک میلی‌گرم از آنزیم پودری آلفا آمیلاز، در یک میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار (pH ٦)حل و محلول آنزیمی حاصل به نسبت ۰/۱ میلی‌لیتر به تیوب‌های حاوی ۱میلی لیتر سوپرناتانت با (pH ٦) افزوده گردید. سوپرناتانت تیمارشده با آنزیم آلفاآمیلاز به مدت یک ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد تیمار و در مرحله بعد به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰درجه سانتی گراد جوشانده شد تا آنزیم لیپاز افزوده‌شده غیرفعال گردد [۱۷]. سپس فعالیت آنتی باکتریایی سوپرناتانت تیمار شده با روش انتشار از دیسک مطابق روش ذکر شده سنجیده شد.

## ۲-۱۰- تیمار سوپرناتانت با آنزیم آلفا کیموتریپسین

به منظور خنثی کردن اثر آنتی باکتریایی پپتیدها و یا پروتئین‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، سوپرناتانت تنظیم pH شده با آنزیم آلفاکیموتریپسین (سیگما –آلدریچ، آلمان) تیمار گردید. شرایط آماده سازی آنزیم، نسبت حجمی سوپرناتانت و آنزیم آلفا کیموتریپسین تیمار شده و همچنین ارزیابی فعالیت آنتی باکتریایی سوپرناتانت تیمار شده مطابق بند ۲-۸ صورت گرفت. ابتدا مقدار یک میلی‌گرم از آنزیم پودری آلفاکیموتریپسین، در یک میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار (pH ٦)حل و محلول آنزیمی حاصل به نسبت ۰/۱ میلی‌لیتر به تیوب‌های حاوی ۱میلی لیتر سوپرناتانت با (pH ٦) افزوده گردید. سوپرناتانت تیمارشده با آنزیم آلفاکیموتریپسین به مدت یک ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد تیمار و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰درجه سانتی گراد جوشانده شد تا آنزیم لیپاز افزوده‌شده غیرفعال گردد [۱۷] و فعالیت آنتی باکتریایی سوپرناتانت تیمار شده با روش انتشار از دیسک مطابق روش ذکر شده سنجیده شد.

## ۲-۱۱- تیمارسوپرناتانت با آنزیم تریپسین

به منظور خنثی کردن اثر آنتی باکتریایی پپتیدها و یا پروتئین‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، سوپرناتانت تنظیم pH شده با آنزیم تریپسین (سیگما –آلدریچ، آلمان) تیمار گردید. شرایط آماده سازی آنزیم، نسبت حجمی سوپرناتانت و آنزیم تریپسینتیمار شده و همچنین ارزیابی فعالیت آنتی باکتریایی سوپرناتانت تیمار شده مطابق بند ۲-۸ صورت گرفت. ابتدا مقدار یک میلی‌گرم از آنزیم پودری تریپسین، در یک میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار (pH ٦)حل و محلول آنزیمی حاصل به نسبت ۰/۱ میلی‌لیتر به تیوب‌های حاوی ۱میلی لیتر سوپرناتانت با (pH ٦) افزوده گردید. سوپرناتانت به مدت یک ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد تیمار گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰درجه سانتی گراد جوشانده شد تا آنزیم تریپسین افزوده‌شده غیرفعال گردد [۱۷]. سپس فعالیت آنتی باکتریایی سوپرناتانت تیمار شده با روش انتشار از دیسک مطابق روش ذکر شده سنجیده شد. برای اطمینان بیشتر از حساسیت آنزیمی، تمام تیمارهای آنزیمی بر روی باکتری شاهد نیز بررسی شدند.

## ۲-۱۲- تجزیه آماری و مقایسات میانگین‌ها

قبل از انجام تجزیه آماری نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آماره‌های چولگی و کشیدگی مورد بررسی قرار گرفت و برای تجزیه آماری داده‌هابصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی از نرم‌افزار آماریMSTAT-C استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت [۱۸]. گراف‌ها با نرم‌افزارExcel 2013 ترسیم شدند.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- تعیین ماهیت ترکیب آنتی باکتریایی

ماهیت ترکیب آنتی باکتریایی تولید شده توسط ۱۰ سویه اسید لاکتیک بومی بعد از تنظیم pHسوپرناتانتبا استفاده از آنزیم‌های کاتالاز، لیپاز، آلفاآمیلاز، آلفاکیموترپسین و ترپسین تعیین شد. باکتری‌شاخص Shigella flexneri (IBRC-M 10746) (به دلیل حساسیت بالا در برابر سوپرناتانت باکتری‌های شاهد) برای ارزیابی تیمارهای آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه واریانس فاکتوریل اثرات سویه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک و ۵ آنزیم مختلف نشان داد که بین سویه‌ها و نیز اثرمتقابل آنزیم×سویه در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد (داده‌ها آورده نشده است). روی این اصل تجزیه واریانس جداگانه برای هر کدام از سویه‌ها برای پنج نوع تیمار آنزیمی انجام گرفت (جدول ۲). نتایج نشان داد که بین تیمارهای آنزیمی از نظر خاصیت آنتی‌باکتریایی یا قطر هاله‌های عدم رشد، در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌داری برای تمام سویه‌ها وجود دارد. بنابراین، با توجه به معنی‌دار بودن اثرات تیمارهای آنزیمی روی هر کدام از سویه‌ها، مقایسه میانگین این اثرات بر روی پاتوژن S. flexneri (IBRC-M 10746)بصورت جداگانه انجام گرفت (جدول ۳).

**Table 2** Variance analysis of enzyme treatments among different strains of Lactic Acid bacteria

| MS of lactic acid bacteria strains | | | | | | df | S.O.V |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $E_6$ | $H_{20}$ | 15E | $DL_3$ | N | M | | |
| 3.76** | 9.97** | 20.12** | 14.92** | 9.38** | 10.49** | 5 | Enzyme treatments |
| 0.111 | 0.127 | 0.115 | 0.183 | 0.056 | 0.111 | 12 | Error |

** is significant at 1% probability level

**Table 2 continued-**

| MS of lactic acid bacteria strains | | | | | df | S.O.V |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $T_2$ | $AE_2$ | $L_{28}$ | $L_{27}$ | $EL_1$ | | |
| 10.68** | 11.43** | 18.27** | 15.03** | 20.22** | 5 | Enzyme treatments |
| 0.124 | 0.244 | 0.083 | 0.161 | 0.153 | 12 | Error |

** is significant at 1% probability level

**Table 3** Mean comparisons among enzyme treatments for 12 lactic acid strains

| Strain | α-kimyo trypsin | Trypsin | Lipase | α-amylase | Catalase | pH 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **$E_6$** | 0±0 D | 1.16± 0.17 C | 2.16±0.1 B | 2.67±0.1 AB | 2.67±0. AB | 2.83±0.1 A |
| **$H_{20}$** | 0±0 C | 0.33±0.33 C | 2.67±0.1 B | 4±0 A | 3.67±0.33 A | 3.93±0.0 A |
| **15E** | 0±0 E | 1±0 D | 2.33±0.1 C | 5.33±0.33 B | 5.5±0.28 AB | 6.03±0.0 A |
| **$DL_3$** | 0±0 C | 0.33±0.33 C | 2.83±0.1 B | 4.33±0.33 A | 4.67±0.33 A | 5.6±0.06 A |
| **N** | 0±0 D | 1.17±0.17 C | 3.67±0.1 B | 4.00±0 AB | 3.83±0.17 AB | 4.17±0.1 A |
| **M** | 0±0 D | 0.67±0.17 C | 2.67±0.1 B | 3.83±0.17 A | 4.17±0.17 A | 4.33±0.3 A |
| **$T_2$** | 0±0 D | 0.67±0.17 C | 2.67±0.17 B | 3.83±0.1A | 4.33±0.7 A | 4.26±0.37 A |
| **$AE_2$** | 0±0 C | 0.33±0.17 BC | 1.17±0.60 B | 3.67±0.1A | 4±0 A | 4.27±0.27 A |
| **$L_{28}$** | 0±0 D | 0.17±0.17 D | 2.47±0.17 C | 4.83±0.17 B | 4.83±0.1 B | 5.57±0.23 A |
| **$L_{27}$** | 0±0 C | 0.66±0.17 C | 1.67±0.33 B | 4.67±0.33 A | 4.67±0.1 A | 4.9±0.20 A |
| **$EL_1$** | 0±0 D | 0.17±0.17 D | 2.33±0.17 C | 5.33±0.33 AB | 4.67±0.3 B | 5.83±0.17 A |

The numbers with similar letters in each row are not significant at 5% probability level.

مقایسه میانگین بین داده‌های تیمارهای آنزیمی به روش دانکن در سطح احتمال ۵٪ بر روی سوپرناتانت سویه شاهد $L_{28}$ نشان داد که بین قطر هاله عدم رشد حاصل از سوپرناتانت تنظیم pH شده و بین سوپرناتانت تیمار شده با آنزیم‌های کاتالاز، آلفاآمیلاز، لیپاز، تریپسین و آلفا کیموتریپسین اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳). با توجه به اینکه سویه بومی $L_{28}$ مولد باکتریوسین گروه IIb بوده و باکتریوسین گروه IIb کمپلکسی از دو رشته پپتیدی است [۱۹, ۲۰]. از نتایج به دست آمده از تیمارهای آنزیمیصورت گرفته بر روی سوپرناتانتاین سویه می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که اسیدهای چرب در جذب سطحی باکتریوسین به غشای باکتری شاخص تاثیر دارند. با توجه به معنی دار بودن نتایج بعد از تیمار با آلفا آمیلاز چنین نتیجه‌گیری می‌شود که ترکیباتی با ماهیت کربوهیدراتی و هیدروژن پراکساید تأثیر هم افزایی اندکی بر خاصیت آنتی باکتریایی باکتریوسین گروه IIb داشته است. با توجه به کاهش شدید بازدارندگی با تیمارهای تریپسین و آلفا کیموتریپسین می‌توان نتیجه گیری نمود که باکتریوسین IIb نقش بیشتری در بازدارندگی بر عهده داشته است.

مقایسه میانگین بین داده‌های تیمارهای آنزیمی صورت گرفته بر روی سوپرناتانت سویه‌های $E_6$، $DL_3$، $H_{20}$، N ، M ، $AE_2$،$T_2$، $L_{27}$ نشان داد که بین قطر هاله عدم رشد حاصل از سوپرناتانت تنظیم pH شده و سوپرناتانت تیمارشده باآنزیم‌های لیپاز، تریپسین و آلفاکیموتریپسین اختلاف معنی داری وجود دارد. از نتایج به دست آمده از تیمارهای آنزیم یصورت گرفته بر سوپرناتانتاین سویه‌ها می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که علاوه بر باکتریوسین، ترکیباتی با ماهیت لیپیدی تاثیر هم افزایی بیشتری بر خاصیت آنتی باکتریایی باکتریوسین تولید شده داشته است. ولی با توجه به از بین رفتن کامل اثر آنتی باکتریایی سوپرناتانت با تیمار آنزیم‌های تریپسین و آلفاکیموتریپسین می‌توان نتیجه گرفت که عمل اصلی آنتی‌باکتریایی بر عهده بخش باکتریوسینی می‌باشد.

مقایسه میانگین بین داده‌های تیمارهای آنزیمی صورت گرفته بر روی سوپرناتانت سویه 15E نشان داد که بین قطر هاله عدم رشد حاصل از سوپرناتانت تنظیم pH شده و سوپرناتانت تیمارشده باآنزیم‌های آلفاآمیلاز، لیپاز، تریپسین و آلفاکیموتریپسین اختلاف معنی‌داری وجود دارد. می‌توان چنین فرض کرد که اسیدهای چرب در جذب سطحی باکتریوسین به غشای باکتری شاخص تاثیر دارند و یا باکتریوسین تولید شده یک لیپوپپتید است. از نتایج به دست آمده از تیمارهای آنزیمیصورت گرفته بر سوپرناتانتاین سویه‌ها می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که علاوه بر باکتریوسین، و احتمالا حضور یک قسمت گلیکوئیدی است که برای فعالیت آن مورد نیاز است. ترکیباتی با ماهیت لیپیدی و کربوهیدراتی تاثیر هم افزایی بیشتری بر خاصیت آنتی باکتریایی باکتریوسین تولید شده داشته است. ولی با توجه به از بین رفتن کامل اثر آنتی باکتریایی سوپرناتانت با تیمار آنزیم‌های تریپسین و آلفاکیموتریپسین می‌توان نتیجه گیری کرد که عمل اصلی آنتی‌باکتریایی بیشتر بر عهده بخش پپتیدی باکتریوسینی می‌باشد.

مقایسه میانگین بین داده‌های تیمارهای آنزیمی صورت گرفته بر روی سوپرناتانت سویه $EL_1$ نشان داد که بین قطر هاله عدم رشد حاصل از سوپرناتانت تنظیم pH شده و سوپرناتانت تیمارشده باآنزیم‌های کاتالاز، لیپاز، تریپسین و آلفاکیموتریپسین با سوپرناتانت تنظیم pH شده اختلاف معنی داری وجود دارد. از نتایج به دست آمده از تیمارهای آنزیمیصورت گرفته بر سوپرناتانتاین سویه می‌توان چنین فرض نمود که اسیدهای چرب در جذب سطحی باکتریوسین به غشای باکتری شاخص تاثیر دارند و یا باکتریوسین تولید شده یک لیپوپپتید است. علاوه بر باکتریوسین، ترکیباتی با ماهیت لیپیدی تاثیر هم افزایی بیشتر و تاثیر هم افزایی اندک ترکیباتی چون هیدروژن پراکسید عامل دیگری بر خاصیت آنتی باکتریایی سوپرناتانت محسوب می‌گردد. با توجه به از بین رفتن کامل اثر آنتی باکتریایی سوپرناتانت با تیمار آنزیم‌های تریپسین و آلفاکیموتریپسین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که عمل اصلی آنتی‌باکتریایی بر عهده بخش باکتریوسینی می‌باشد.

نتایج بررسی ماهیت ترکیب آنتی‌باکتریایی تولید شده از باکتری‌های اسید لاکتیک بومی نشان داد که تیمار آنزیم کاتالاز در دو سویه $L_{28}$و $EL_1$کاهش اندکی را ایجاد کرد که حاکی از تولید بسیار اندک هیدروژن پراکساید توسط این دو سویه در مقایسه با سویه‌های دیگر است. تیمار آنزیم آلفاآمیلاز در دو سویه $L_{28}$ و 15E کاهش اندکی را ایجاد کرد که حاکی از تولید بسیار کم عوامل کربوهیدراتی دخیل در بازدارندگی می‌باشد. تیمار با آنزیم لیپاز در تمامی سویه‌های بومی کاهش بسیاری را ایجاد کرد که

نشان‌دهنده تولید اسید های چرب کوتاه آنتی‌باکتریایی ویا اسیدهای چرب دخیل در جذب سطحی باکتریوسین به سویه‌های شاخص و یا ماهیت لیپوپپتیدی باکتریوسین تولید شده در این-سویه‌ها می‌باشد. با تیمار دو آنزیم تریپسین و آلفا کیموترپسین قطر هاله‌ها کاملا صفر شد. نتایج به دست آمده نشان داد که عمل اصلی بازدارندگی در تمام سویه‌ها بر عهده بخش پپتیدی می‌باشد و در برخی سویه‌ها بخش‌های کربوهیدراتی و در همه سویه‌ها بخش لیپیدی اثر مثبتی بر فعالیت آنتی‌باکتریایی بخش پپتیدی آنتی باکتریال دارد. با توجه به بررسی سایر محققان، باکتریوسین‌های گروه IV تنها گروه باکتریوسینی است که طی تغییرات پس از ترجمه علاوه بر ساختار پپتیدی، به گروه‌های قندی یا اسیدهای چرب متصل هستند و کمپلکسی از پپتیدها و ماکرومولکول‌هایی نظیر لیپیدها یا کربوهیدرات‌ها را تشکیل می‌دهند. اومن واستیپر (۲۰۱۱) در تحقیقی جداگانه دو باکتریوسین Sublancin (یک S-linked glycopeptideمی‌باشد)، Glycocin Fرا شناسایی و در این گروه قرار داده‌اند [۲۱, ۲۲]. تحقیقات محققین دیگر نشان داده است که گلیکوزیله شدن این پپتید برای حفظ فعالیت آنتی‌باکتریایی آن ضروری است[۲۱]. باکتریوسین Glycocin Fتوسط باکتری Lactobacillus plantarum KW30 تولید می‌شود و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت فعال است و با آنزیم آلفاآمیلاز و لیزوزیم غیرفعال می‌شود [۲۳]. طی تحقیقی سویه Lactobacillus plantarum Lp6SH از یک نوشیدنی تخمیری مبتنی بر ذرتتوسط Marie و همکاران (۲۰۱۲) جداسازی شد، این باکتری باکتریوسینی تولید می‌کرد که در برابر باکتری‌های گرم منفی و مثبت از جمله L. innocua، S. aureus، Streptococcus mutans، E. coli، B. cereus، Salmonella typhi، S. flexneri، K. pneumonia فعال بود. باکتریوسین نیمه خالص شده bacteriocin Lp6SH با تیمار آنزیمی تریپسین، آلفاکیموتریپسین و پپسین غیرفعال گردید. تیمار با آلفاآمیلاز و لیپاز بر خاصیت آنتی باکتریایی آن تأثیری نداشت. در نتیجه نتایج آنزیمی به دست آمده توسط این محققین تأییدی بر ماهیت پروئینی باکتریوسین نیمه خالص شده بود و به نوعی نشان داد که باکتریوسین به کربوهیدرات و لیپید متصل نیست [۲٤]. در پژوهشی باکتری‌های Lactobacillus acidophilus و Pediococcus acidilactici به ترتیب از نمونه‌های شیر و گوشت جداسازی گردید. فعالیت مهار کنندگی هر دو ارگانیسم تولید کننده باکتریوسین بر روی پاتوژن‌های E. coli، Bacillus cereus، Staphylococcus aureus، Salmonella typhi، Vibrio cholerae، Shigella sp و Enterococcus faecalis بررسی شدند. تقریبا تمام پاتوژن-های آزمایش شده توسط این دو سویه مولد باکتریوسین مهار شدند. فعالیت آنتی باکتریایی باکتریوسین‌ها توسط آنزیم آلفا آمیلاز و پروتئاز غیر فعال گردید که نشان دهنده ماهیت پروتئینی و احتمالا حضور یک قسمت گلیکوئیدی است که برای فعالیت آن مورد نیاز است [۲۵]. در تحقیقی بازدارندگی سوپرناتانت دو باکتری Lactococcus lactis subsp. lactis MM19 و Pediococcus acidilactici MM33 علیه باکتری‌های شاخص بررسی شد. باکتریوسین تولید شده از باکتری L. lactis MM19 طیف مهاری علیه باکتری‌های شاخص Lactobacillus، Enterococcus, Kocuria، Pediococcus و Staphylococcus و باکتریوسین تولید شده توسط P. acidilactici MM33 طیف بازدارندگی علیه Enterococcus, Lactobacillus, Listeria و Pediococcus را نشان داد. هر دو باکتریوسین در برابر باکتری‌های گرم منفی بی‌تاثیر بودند. در مورد P. acidilactici MM33 بازدارندگی بعد از تیمار با پروتئاز به طور معنی داری کاهش، در حالی که فعالیت آنتاگونیستی L. lactis MM19 بعد از تیمار با پپسین و تریپسین باقی مانده بود. لیپاز فعالیت آنتی باکتریایی L. lactis MM19 را کاهش داده بود اما هیچ فعالیت مهار کنندگی برای باکتریوسین سوپرناتانت تولید شده از باکتری P. acidilactici MM33 نداشت. کاتالاز نیز تاثیری بر فعالیت بازدارندگی نشان نداد و با کاهش فعالیت باکتریوسین بعد از تیمار با لیپاز چنین فرض شد که اسیدهای چرب در جذب سطحی باکتریوسین به غشای باکتری شاخص تاثیر دارند و باکتریوسین تولید شده یک لیپوپپتید می‌باشد[۲٦]. باکتری‌های اسید لاکتیک در شرایط کشت هوازی پراکسید هیدروژن تولید می‌کنند. پراکسید هیدروژن یک ترکیب آنتی باکتریایی و بسیارسمی است و به هر علتی ممکن است درون سلول ایجاد شود. با کاربرد کاتالاز می‌توان پراکسید هیدروژن موجود در محیط را تجزیه و اثر بازدارندگی آن را حذف نمود [۲۷]. در تحقیقی دیگر، بعد از

تیمار سوپرناتانت باکتری‌های اسید لاکتیک با کاتالاز تمام سویه‌ها فعالیت آنتی باکتریایی خود را حفظ کردند. زمانی که سوپرناتانت خنثی شده این سویه‌ها با پروتئیناز k، پپسین و تریپسین تیمار شدند. فعالیت آنتی باکتریایی ۸ سویه کاهش و یا حذف گردید و باکتری L. plantarum IBRC-M 10817 که قبلاً به عنوان باکتری اسیدلاکتیکتولیدکننده باکتریوسین IIa معرفی شده استبه عنوان کنترل مثبت استفاده شد [۲۸]. سی‌فور و همکاران (۲۰۱۲) اثر آنزیم‌های مختلف بر روی عامل بازدارنده تولید شده از باکتری اسید لاکتیک را مورد مطالعه قرار دادند. بعد از تیمار محلول رویی این باکتری‌ها با آنزیم‌های کیموتریپسین، تریپسین و پروتئاز غیرفعال سازی کامل یا کاهش قابل‌توجه فعالیت مشاهده گردید که ماهیت پروتئینی عامل فعال را تأیید می‌کرد. تأثیر آنزیم-های دیگر از جمله لیپاز و آلفا آمیلاز نیز مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد این دو آنزیم مانع فعالیت عامل بازدارنده نمی-شوند. بنابراین این محققین ابراز داشتند که بخش کربوهیدراتی و لیپیدی موجود برای فعالیت بازدارندگی لازم نیست [۵]. هرناندز و همکاران (۲۰۰۵) ۱۰۸ باکتریاسید لاکتیک لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس و لوکونوستوک جداسازی شده از پنیرتنریف را براساس تولیدترکیب آنتی باکتریایی گزینش کردند و سویهLactobacillus plantarum TF711 را با طیف میزبانی وسیعی در برابر پاتوژن‌های مختلف، برای تعیین ویژگی‌های بعدی انتخاب کردند. ماهیت پروتئینی ترکیب آنتی باکتریایی با توجه به حساسیت آن به آنزیم‌های پروتئاز تعیین گردید[۱۷]. نتایج متفاوتی توسط تودورو و دیکس (۲۰۰۵) برای باکتریوسین‌های تولید شده توسط .Lactobacillus plantarum ST 13BR ثبت شده است. این گروه مشاهده کردند که تریپسین، کیموتریپسین و رنین هیچ تاثیری بر باکتریوسین تولید شده توسط باکتری جدا شده از غلات سنتی بلغارستان نظیر Lc. lactis subsp. Lactic b14 نداشت[۲۹].نتایج تحقیق حاضر با نتایج میلت و همکاران (۲۰۰۷) و سیواکومار و همکاران (۲۰۱۰) همخوانی و با نتایج تودورو و دیکس (۲۰۰۵) مغایرت داشت[۲۹, ۲۶-۲۵].

## ۳-۲- تعیین طیف میزبانی باکتریوسین

نتایج طیف بازدارندگی باکتریوسین تولید شده توسط ۵ سویه لاکتوباسیلوس و ۵ سویه انتروکوک بومی ایران بعد از خنثی سازی سوپرناتانت این باکتری‌ها با سدیم هیدروکسید، علیه ۷ باکتری پاتوژن نشان داده شده است (جدول ٤). یک سویه شاهد اسید لاکتیک به نام ( Lactobacillus IBRC-M 10817) plantarum (L.P) که تولید کننده باکتریوسین گروه IIa می‌باشد [۱۵] و همچنین سویه بومی Lactobacillus plantarum $L_{28}$ که تولید کننده باکتریوسین گروه IIb می‌باشد به عنوان باکتری‌های شاهد کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند[۳۰]. هریک از باکتری‌های اسید لاکتیک بومی الگوی مهار رشد گسترده‌ای علیه سویه‌های پاتوژن گرم مثبت و گرم منفی نشان دادند. این در حالی است که محققین بسیاری عنوان کرده‌اند که فعالیت باکتریوسین‌ها در برابر باکتری‌های گرم منفی مانند E. coli و Salmonella معمولا زمانی که یکپارچگی غشای خارجی آن‌ها تحت شرایطی نظیر شوک اسمزی یا تیمار با pH پایین، در حضور دترجنت‌ها یا عوامل شلاته کننده، یا بعد از تیمار با پالس میدان الکتریکی یا فشار بالا، از بین رفته است، مشاهده شده است[۳, ۳۱] . بر اساس مطالعات صورت گرفته توسط اینانو و همکاران (۲۰۰۰)، باکتری‌های شاخص گرم مثبت نسبت به باکتری‌های شاخص گرم منفی در برابر سوپرناتانت باکتری‌های اسیدلاکتیک حساس‌تر می‌باشند[۳۲].گارنئا و همکاران (۲۰۰۲) عنوان کرده‌اند که غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتریوسین‌ها غیر قابل نفوذ است که ممعمولا از فعالیت آنتی باکتریایی این پپتیدها جلوگیری می‌کند [۳۳].

نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر با نتایج اینانو و همکاران (۲۰۰۰) همچنین با نتایج گارنئا و همکاران (۲۰۰۲) مغایرت داشت[۳۲, ۳۳]. نتایج تحقیق حاضر حساسیت بالای باکتری‌های E. coliو K. pneumonia ،S. flexneri را در مقایسه با باکتری‌هایB. cereus و Y. entrocolitica نشان داد.تاثیر مثبت باکتریوسین‌های ۱۰ سویه اسید لاکتیک مطالعه حاضر بر روی باکتری‌های شاخص گرم منفی مشابه گزارش تودوروو همکاران (۲۰۱۳) می‌باشد. به این ترتیب که این محققین عنوان کردند که باکتریوسین‌های bacST202Ch و bacST216Ch تولید شده توسط L. plantarum فعالیت آنتی‌باکتریایی علیه باکتری E. coliو Salmonella spp دارند [۹].

**Table 3** Antimicrobial activity of lactic acid bacterial strains assessed in this study

| strains | Indicator strains | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | E. coli | Y. enterocolitica | s.aereu | L. innocua | K. pneumonia | B. cereus | S. flexneri |
| $E_6$ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ |
| $H_{20}$ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ |
| 15E | ++ | + | ++ | ++ | +++ | ++ | +++ |
| $DL_3$ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| N | ++ | + | ++ | ++ | ++ | + | ++ |
| M | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| $T_2$ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ |
| $AE_2$ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | ++ |
| $L_p$ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| $L_{28}$ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| $L_{27}$ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| $EL_1$ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |

Mean values (n = 3) for each experiment.
++ = inhibition zone diameter up to 4 mm.
+++ = inhibition zone diameter over 6 mm.
+ = inhibition zone diameter up to 2 mm.
Inhibition zone diameter did not include Oxford cup diameter

## ٤- نتیجه‌گیری کلی

با توجه به افزایش تقاضا برای مواد نگه دارنده طبیعی و لزوم امنیت غذایی بیشتر، شناسایی سویه‌های تولید کننده باکتریوسین یک ضرورت محسوب می شود. از سوی دیگر، با توسعه اقتصاد مدرن، صنعتیشدن و پیشرفت فنآوری، منابع غنی میکروبی نظیر محصولات سنتی می‌توانند به زودی از دست بروند.شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک تولید کنندهباکتریوسین با طیف میزبانی وسیع از محصولات لبنی تخمیری سنتی بومی می‌تواند به حفظ و گسترش منابع آنتی‌باکتریایی طبیعی در محصولات لبنی صنعتی بسیار مفید باشد.در پژوهش حاضر مشخص شد که همه ده سویه لاکتوباسیلوسو انتروکوک بومی ایران مولد باکتریوسین می‌باشند و ترکیباتی لیپیدی تاثیر هم افزایی بر خاصیت آنتی‌باکتریایی بخش پپتیدی اعمال می‌کند. سویه $El_1$ علاوه بر ترکیبات لیپیدی مقدار اندکی هیدروژن پراکسید نیز تولید می‌کند و سویه 15E علاوه بر ترکیبات لیپیدی، مولد مقدار اندکی ترکیبات گلیکوزیدی نیز می‌باشد. همچنین باکتری‌های اسید لاکتیک بومی طیف مهاری گسترده‌ای علیه سویه‌های پاتوژن گرم مثبت و منفی نشان دادند و مبین این موضوع است که سویه‌های بومی موجود در داخل کشور از پتانسیل پروبیوتیکی بالایی نسبت به سویه استاندارد موجود در کشور برخوردار می‌باشد. ماهیت باکتریوسین تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک بومی ایران پپتیدی بوده و برهم کنش مواد لیپیدی داخل سلولی در عملکرد باکتریوسین پپتیدی تاثیر هم افزایی دارد و با توجه به از بین رفتن اثر آنتی باکتریایی سوپرناتانت با آنزیم‌های تریپسین و آلفاکیموتریپسین عمل اصلی آنتی‌باکتریایی بر عهده بخش پپتیدی می‌باشد.

## ٥-تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و نیز ریاست محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور بخاطر در اختیار قرار دادن امکانات مالی و پژوهشی به شماره گرنت ٩٦-١٢-٣٧٤/١ تشکر و قدردانی می‌گردد.

## ٦- منابع


[1] Ghrairi T, Hani K. 2015. Enhanced bactericidal effect of enterocin A in combination with thyme essential oils against L. monocytogenes and E. coli O157: H7. Journal of food science and technology. 52: 2148-2156.

[2] Benabbou R. 2009. Développement et caractérisation de films antimicrobiens pour la biopréservation des produits marins prêts à consommerUniversité Laval.

[3] De Vuyst L, Leroy F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. Journal of molecular microbiology and biotechnology. 13: 194-199.

[4] Jennes W, Dicks L, Verwoerd D. 2000. Enterocin 012, a bacteriocin produced by Enterococcus gallinarum isolated from the intestinal tract of ostrich. Journal of applied microbiology. 88: 349-357.

[5] Sifour M, Tayeb I, Haddar HO, Namous H, Aissaoui S. 2012. Production and characterization of bacteriocin of Lactobacillus plantarum F12 with inhibitory activity against Listeria monocytogenes. Online J Sci Technol. 2: 55-61.

[6] Nettles CG, Barefoot SF. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. Journal of Food Protection. 56: 338-356.

[7] Muriana P, Klaenhammer T. 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus 11088. Applied and Environmental Microbiology. 57: 114-121.

[8] Lewus CB, Sun S, Montville TJ. 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical Leuconostoc paramesenteroides strain. Applied and Environmental Microbiology. 58: 143-149.

[9] Todorov SD, Vaz-Velho M, de Melo Franco BDG, Holzapfel WH. 2013. Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of Lactobacillus sakei, isolated from salpicao, a fermented meat product from North-West of Portugal. Food Control. 30: 111-121.

[10] Netz DJA, de Freire Bastos MdC, Sahl H-G. 2002a. Mode of action of the antimicrobial peptide aureocin A53 from Staphylococcus aureus. Applied and environmental microbiology. 68: 5274-5280.

[11] Netz DJA, Pohl R, Beck-Sickinger AG, Selmer T, Pierik AJ, de Freire Bastos MdC, Sahl H-G. 2002b. Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from Staphylococcus aureus. Journal of molecular biology. 319: 745-756.

[12] Liu Z, Ma P, Holtsmark I, Skaugen M, Eijsink VG, Brurberg MB. 2013. New Type of Antimicrobial Protein Produced by the Plant Pathogen Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis. Applied and environmental microbiology. 79: 5721-5727.

[13] Falguni P, Shilpa V, Mann B. 2010. Production of proteinaceous antifungal substances from Lactobacillus brevis NCDC 02. International journal of dairy technology. 63: 70-76.

[14] Akhondzade A, Razavi V, Misaghi A, AbbasiFar R, Radmehr B, Khalighi F. 2003. Effect of thyme essential oils on Salmonella typhimurium in brain and heart broth. Journal of Medicinal Plants. 8: 84-91.

[15] Liu W, Zhang L, Yi H, Shi J, Xue C, Li H, Jiao Y, Shigwedha N, Du M, Han X. 2014. Qualitative detection of class IIa bacteriocinogenic lactic acid bacteria from traditional Chinese fermented food using a YGNGV-motif-based assay. Journal of microbiological methods. 100: 121-127.

[16] Campos CA, Rodríguez Ó, Calo-Mata P, Prado M, Barros-Velázquez J. 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from Lactococcus lactis, Enterococcus faecium and Enterococcus mundtii strains isolated from turbot (Psetta maxima). Food Research International. 39: 356-364.

[17] Hernandez D, Cardell E, Zarate 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. Journal of applied microbiology. 99: 77-84.

[18] Alizadeh B, Tarinejad A. 2010. Application of MSTATC software in statistical analysis:

Setoodeh Pub. Tabriz.[In Persian with English Abstract].

[19] Banerjee SP, Dora KC, Chowdhury S. 2013. Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus brevis FPTLB3 isolated from freshwater fish. Journal of food science and technology. 50: 17-25.

[20] Gholamzadeh MA, Hejazi MA, Hosseinzadeh Gharaje N. 2017a. Determination of bacteriocin encoding gene in six native strains of Lactobacillus plantarum. JFST. 66: 17-25 [in persian].

[21] Oman TJ, Boettcher JM, Wang H, Okalibe XN, Van Der Donk WA. 2011. Sublancin is not a lantibiotic but an S-linked glycopeptide. Nature chemical biology. 7: 78-80.

[22] Stepper J, Shastri S, Loo TS, Preston JC, Novak P, Man P, Moore CH, Havlíček V, Patchett ML, Norris GE. 2011. Cysteine S‐glycosylation, a new post‐translational modification found in glycopeptide bacteriocins. FEBS letters. 585: 645-650.

[23] Kelly W, Asmundson R, Huang C. 1996. Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum. Journal of Applied Bacteriology. 81: 657-662.

[24] Marie KP, François ZN, Abbasi A, Anwar F, Ali SA, Victor SD, Félicité TM. 2012. Characterization of a Bacteriocin Produced by Lactobacillus plantarum Lp6SH Isolated from" Sha'a", a Maize-Based Traditionally Fermented Beverage from Cameroon. International Journal of Biology. 4: 149.

[25] Sivakumar N, Saif A-B. 2010. Partial characterization of bacteriocins produced by Lactobacillus acidophilus and Pediococcus acidilactici. Brazilian Archives of Biology and Technology. 53: 1177-1184.

[26] Millette M, Dupont C, Archambault D, Lacroix M. 2007. Partial characterization of bacteriocins produced by human Lactococcus lactis and Pediococccus acidilactici isolates. Journal of applied microbiology. 102: 274-282.

[27] Jiménez JJ, Diep DB, Borrero J, Gútiez L, Arbulu S, Nes IF, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. 2015. Cloning strategies for heterologous expression of the bacteriocin enterocin A by Lactobacillus sakei Lb790, Lb. plantarum NC8 and Lb. casei CECT475. Microbial cell factories. 14: 1.

[28] Van Reenen C, Chikindas M, Van Zyl W, Dicks L. 2003. Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from Lactobacillus plantarum 423, in Saccharomyces cerevisiae. International journal of food microbiology. 81: 29-40.

[29] Todorov SD, Dicks LM. 2005. Optimization of bacteriocin ST311LD production by Enterococcus faecium ST311LD, isolated from spoiled black olives. JOURNAL OF MICROBIOLOGY-SEOUL. 43: 370.

[30] Gholamzadeh MA, Hejazi MA, Hosseinzadeh Gharaje N. 2017a. Determination of bacteriocin encoding gene in six native strains of Lactobacillus plantarum. JFST. 66: 17-25 [in persian].

[31] Osmanagaoglu O, Beyatli Y. 1999. The Use of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria in Food Biopreservation. Türk. Mikrobiyol. Cem. Derg. 32: 295-306.

[32] Ivanova I, Kabadjova P, Pantev A, Danova S, 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. Biocatalysis. 41: 47-53.

[33] Garneau S, Martin NI, Vederas JC. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Biochimie. 84: 577-592.

# Survey on biochemical identification and hostage spectrum of produced antibacterial compounds by native lactic acid bacteria

**Pourabdi Sarabi, P.[1], Tarinejad, A. [2*], Hejazi, M. A. [3]**

1. MSc Student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University,Tabriz, Iran
2. Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan ShahidMadani University, Tabriz, Iran
3. Associate Professor, Food Biotechnology Research Institute, AgriculturalBiotechnology Research Institute of Iran (ABRII), AgriculturalResearch, Education and Extension Organization of Iran, Tabriz, Iran

**(Received: 2017/01/26 Accepted:2018/10/21)**

Bacteriocins are organic compounds or peptides synthesis via bacterial that kill or inhibit growth of microorganisms and identical species by attacking a specific target. To take into account of bacterial resistance to antibiotics and more demand to food immunity, identification of strains producing bacteriocin with wide spectrum of hostage is necessary. So in this research determined antibacterial identification of five native lactic acid and entrococcus strains by using enzyme treatments such as catalase, lipase, α-amylase, trypsin and α-kimyo-trypsin. Then hostage spectrum of produced bacteriocin by native strains identified by disk-diffusion test. Variance analysis of enzymatic treatment data on supernatant of E6, DL3, H20, N, M, T2, AE2, and L27 showed existence of significant difference at alpha=0.01 for diameter of growth inhibitory zone among supernatant with adjusted pH and other enzymatic treatments. Mean comparison among enzymatic treatment data on supernatant of 15E and EL1 strains showed between diameter of growth inhibitory zone of supernatant with adjusted pH and treated with Lipase, trypsin and alpha-chymotrypsin existed significant difference. Each of native lactic acid bacteria showed inhibitory growth pattern against positive and negative gram bacteria. Inhibitory zone of bacteria supernatant with pH=6 after treating with catalase, lipase and α-amylase was active with respect to antibacterial. This finding suggested that bacteriocin of this native strain has nature of peptide.

**Keywords:** Bacteriocin, Enzyme treatments, Food preservation, Lactic acid bacteria.

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