

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ И  
ФУНГИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЕЙ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ  
ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ АЗЕРБАЙДЖАНСКИХ СЫРОВ**

**С.Г.ГЮЛЬАХМЕДОВ, Т.А.ДЖАЛИЛОВА, Н.Ф.АБДУЛЛАЕВА,  
Н.Ф.ГУСЕЙНОВА, Р.С.МУСТАФАЕВА, А.А.КУЛИЕВ**

*Бакинский Государственный Университет*

*Продолжен поиск молочнокислых бактерий (МКБ) в двух видах сыров Азербайджана, продуцирующих бактериоциноподобные ингибирующие вещества (БПИВ). Выделены ранее не идентифицированные 4 штамма МКБ. Три из них (S1, S2, M1) идентифицировались как *Lactobacillus buchneri*, а штамм M3 - как *L. pentosus*. Рост бактерий *Lactobacillus bulgaricus* 340, *Echerichia coli*, *Enterococcus durans* и *Listeria innocua* был подавлен антимикробными агентами всех выделенных штаммов МКБ. *Sacharomyces cerevisiae* и *Candida pseudotropicalis* оказались резистентными по отношению к ним. Протеиназа К и трипсин полностью, а липаза и  $\alpha$ -амилаза частично инактивировали БПИВ.*

**Введение**

Способность молочнокислых бактерий (МКБ) продуцировать ряд биологически-активных веществ с антимикробными свойствами, уже давно известна науке [1-3]. Однако, возможность использования антимикробных агентов МКБ в решении проблем, связанных с экологической безопасностью пищевых продуктов, до сих пор сохраняет их в центре внимания ведущих лабораторий во всем мире [4-8]. Антагонизм МКБ в ферментированных продуктах ассоциируется с главными конечными продуктами их метаболизма, такими, как молочная и уксусная кислоты, перекись водорода, ферменты, литические агенты и/или бактериоцины.

Бактериоцины – это синтезируемые на рибосомах биологически-активные вещества белковой природы, обладающие антибактериальной и фунгицидной активностями. Некоторые представители активных веществ данной группы используются даже с 1950-ых годов в качестве естественного пищевого консерванта [9-11].

В настоящей работе изложены результаты исследований по скринингу МКБ из двух местных азербайджанских сыров, продуцирующих бактериоциноподобное ингибирующее вещество (БПИВ), а также частично охарактеризована их ингибирующая активность.

**Материалы и методы**

*Индикаторные штаммы, питательные среды, условия культивирования и реактивы.* Образование БПИВ МКБ было выявлено методом антагонизма с

клетками тест-культур, список которых приводится в табл.1. Все используемые питательные среды были производства Difco (Detroit, США). Остальные реактивы – фирмы Sigma-Aldrich (США).

Таблица 1

**Список микроорганизмов, используемых в качестве тест-культур**

Штаммы и микроорганизмы	Среда
1. <i>Lactobacillus bulgaricus</i> 340	MPC (De Man, Rogosa and Sharpe)
2. <i>Listeria innocua</i> CIP 80.11	BH (Brain-Heart)
3. <i>Escherichia coli</i> ATCC 23355	LB (Luria-Bertani)
4. <i>Enterococcus durans</i>	MPC (De Man, Rogosa and Sharpe)
5. <i>Sacchromyces cerevisiae</i>	IPD(Yeast extract/Peptone/Dextroza)
6. <i>Candida pseudotropicalis</i>	IPD(Yeast extract/Peptone/Dextroza)

Штаммы МКБ и *Enterococcus* культивировали при 37<sup>0</sup>С в MPC-среде (De Man, Rogosa and Sharpe) следующего состава (в %): дрожжевой экстракт-0.5; мясной экстракт-1.0; пептон-1.0; глюкоза-2.0; лимоннокислый аммоний-0.2; уксуснокислый натрий-0.5; твин-80-0.1; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-0.2; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O-0.02; MnSO<sub>4</sub>•4H<sub>2</sub>O; *Listeria innocua* – при 37<sup>0</sup>С в BH-среде (Brain-Heart) следующего состава (в %): смесь мозгового и сердечного экстракта-3.7; 87%-ный раствор глицерола-1; цистеин-HCl-0.02; Na<sub>2</sub>S•9H<sub>2</sub>O; *Escherichia coli* – при 30<sup>0</sup>С в LB-среде (Luria-Bertani) следующего состава (в %): дрожжевой экстракт с триптоном-3; NaCl-1; остальные (*Sacchromyces serevisiae*, *Candida pseudotropicalis*) – при 30<sup>0</sup>С в YPD среде (Yeast extract/Peptone/Dextroza) следующего состава (в %): дрожжевой экстракт-2; пептон-4; декстроза-4; L-триптофан-0.06.

МКБ изолировали из 2 разных сортов традиционных сыров Азербайджана, приготовленных в домашних условиях. Скрининг активных штаммов проводили методом реплик [5]. Культуральную жидкость получали центрифугированием (10 мин) клеточной суспензии при 7000 g.

Для определения активности БПИВ использовали метод диффузии в агар. Активность БПИВ определяли как величину, обратную наивысшему разбавлению культуральной жидкости, проявляющую зону ингибирования индикаторных штаммов больше чем на 2 мм и выражали в произвольных единицах деленных на миллилитр культуральной жидкости (ПЕ•мл<sup>-1</sup>).

Для того, чтобы исключить ингибиторный эффект молочной кислоты и/или H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH культуральной жидкости доводили до 6,5 с 1M NaOH и инкубировали с раствором каталазы (КФ 1.11.1.6 из печени быка, 2,39 Е/мг) в течение 2 ч при 37<sup>0</sup> С. Культуральную жидкость стерилизовали фильтрацией с использованием фильтра размером пор 0,22 мкм. Химическую природу активного компонента проверяли инкубацией культуральной жидкости растворами протеиназы К (КФ 3.4.21.64 из *Tritirachium album*, 33 Е/мг), проназы (КФ 3.4.21.14 из *Bacillus licheniformis*, 11,4 Е/мг), трипсина VIII (КФ 3.4.21.32 из поджелудочной железы быка, 16 Е/мг), α-амилазы II-A (КФ 3.2.1.1 из *Bacillus subtilis*, 15 Е/мг) и липазы VII (КФ 3.1.1.3 из *Candida rugosa*, 50 Е/мг) в течение 1,5 ч при 37<sup>0</sup> С. Растворы используемых ферментов, конечные концентрации которых составили 1 мг/мл, готовили в стерильном 20 мМоль К-фосфатном буфере, pH 7.0. Последний, без добавления фермента, служил контрольным вариантом.

Неидентифицированные грамположительные и каталазаотрицательные палочки, дающие положительный результат при анализе картины диффузии подвергались фенотипической идентификации. Фенотипическую идентификацию изолированных штаммов проводили по методу и критериям Sharpe [12].

Перечень ферментированных углеводных субстратов была проверена с помощью API 50 CHL системы (bioMérieux, Lyon, France).

### Результаты и их обсуждение

Источниками МКБ служили 2 различных вида сыра, приобретенных из разных регионов Азербайджана, с типичной экологической характеристикой. Источником первого образца сыра была окрестность города Сумгаит. Он расположен на берегу Каспия и характеризуется сложными неблагоприятными экологическими условиями из-за развития химической промышленности. Вторым образцом мы приобрели из Шекинского района, находящегося приблизительно на высоте 1500 м над уровнем моря. Технология приготовления этого вида сыра отличается от технологии первого источника. Его созревание происходит в течение 5-6 месяцев в овечьей шкуре, в присутствии 3% поваренной соли. Созревший сыр называется «Мотал» и имеет твердую консистенцию, интенсивный вкус и аромат. Поиск БПИВ осуществляли методом реплик против штамма *L. bulgaricus* 340, который был использован в качестве тест-культуры. На этой стадии возможный ингибирующий эффект молочной кислоты и перекиси водорода не были исключены. После инкубации с каталазой и нейтрализации кислотности до pH 6.5, культуральная жидкость активных МКБ была проверена против *L. bulgaricus* 340 методом диффузии в агар. Были обнаружены 4 ранее не идентифицированные штаммы МКБ (S1, S2, M1 и M3), способных подавлять рост клеток тест-культуры. Перечень сбраживаемых углеводных субстратов, проверенных с помощью API 50 CHL системы (bioMérieux, Lyon, France) (табл. 2), а также признаков, перечисленных в табл.3, позволяют отнести штаммы S1, S2, M1 к виду *Lactobacillus buchneri*, а штамм M3 - как *L. pentosus*. Исследования, проводимые с целью фенотипической идентификации штаммов, показали, что все они являются грамположительными, каталазаотрицательными, неподвижными, не образующие споры, палочковидными бактериями. Эти показатели наводят на мысль, что они относятся к роду *Lactobacillus*. Таким образом, из традиционных азербайджанских сыров были изолированы еще 4 штамма МКБ, продуцирующих БПИВ. Ранее мы сообщали о 4 штаммах МКБ (3 из них - *L. paracasei* subsp. *paracasei* и 1 - *L. rhamnosus*), обладающие антимикробными свойствами и способными выделять БПИВ в культуральную жидкость [13]. Тогда в качестве источника были использованы образцы сыра, отличающиеся от ныне используемых как по технологии возделывания, так и по экологическим характеристикам мест их приобретения. По этим причинам, видимо, отсутствует совпадение по видовым составам МКБ. По литературным данным микробиота ферментированных пищевых и кормовых продуктов, а также способность МКБ секретировать БПИВ строго зависят от экологических характеристик мест их среды обитания и производства [2,4,13]. В табл.1 приводится список микроорганизмов, используемых в качестве тест-культур для определения спектра антимикробной активности. В этот список включены некоторые потенциально патогенные грамположительные и грамотрицательные бактерии, а также микроскопические грибы, способные в той или иной степени отрицательно влиять на качество пищевых и кормовых продуктов, значительно сокращать сроки их хранения, а также приводить к отравлению потребителей этих продуктов. Результаты этих экспериментов суммированы в табл.4.

**Спектр потребляемых углеводов изолированными штаммами молочнокислых бактерий**

Таблица 2

Углеводы	Штаммы				Углеводы	Штаммы				Углеводы	Штаммы			
	S1	S2	M1	M3		S1	S2	M1	M3		S1	S2	M1	M3
Гликоген	+	-	-	+	Маннитол	-	-	-	+	Раффиноза	+	+	+	-
Эритритол	-	-	-	-	Сорбитол	-	-	-	+	Крахмал	-	-	-	-
D-Арабиноза	-	-	-	-	$\alpha$ Метил-D-маннозид	-	-	-	+	Глицерол	-	-	-	-
L-Арабиноза	+	+	+	+	$\alpha$ Метил-D-глюкозид	-	-	-	+	Ксилитол	-	-	-	+
Рибоза	+	+	+	+	N Ацетил глюкозамин	-	-	-	+	Гентибиоза	-	-	-	-
D-Ксилоза	+	+	+	+	Амигдалин	-	-	-	+	Тураноза	-	-	-	-
L-Ксилоза	-	-	-	-	Арбутин	-	-	-	+	Ликсоза	-	-	-	+
Адонитол	-	-	-	-	Эскулин	-	-	-	+	Тагагоза	-	-	-	-
$\beta$ Метил-D-Гликозид	-	-	-	-	Салицин	-	-	-	+	D-Фукоза	-	-	-	-
Галактоза	+	+	+	+	Целлобиоза	-	-	-	+	L-Фукоза	-	-	-	-
Глюкоза	+	+	+	+	Мальтоза	+	+	+	+	D-Арабитол	-	-	-	-
Фруктоза	+	+	+	+	Лактоза	+	+	+	+	L-Арабитол	-	-	-	-
Манноза	-	-	-	+	Мелибиоза	+	+	+	+	Глюконат	+	+	+	+
Сорбоза	-	-	-	-	Сахароза	+	+	+	+	2Кето глюконат	-	-	-	-
Рамноза	-	-	-	+	Трегалоза	-	-	-	+	5Кето-глюконат	-	-	+	-
Дульцитол	-	-	-	-	Инулин	-	-	-	-	Инозитол	-	-	-	-

**Свойства активных штаммов для идентификации молочнокислых бактерий**

Таблица 3

Штаммы	Грамтест	Морфология клетки	Каталаза тест	Подкисление среды	Температура, °C					
					15	30	37	45	60	65
S1	+	Палочки	-	4.38	+	+	+	+	-	-
S2	+	Палочки	-	4.41	+	+	+	+	-	-
M1	+	Palaçki	-	4.22	+	+	+	+	-	-
M3	+	Palaçki	-	4.19	+	+	+	+	-	-

Таблица 4

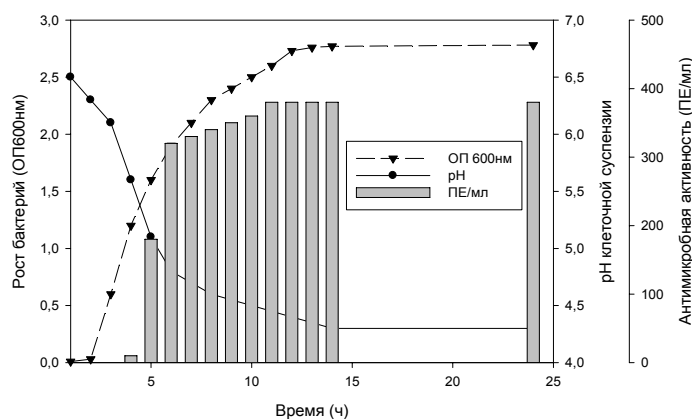
**Спектр антимикробной активности изолированных штаммов  
молочнокислых бактерий, определённых методом диффузии в агар (ПЕ/мл)**

Тест-культуры	Выделенные штаммы МКБ			
	M1b	M3a	S1a	S2
<i>L.bulgaricus 340</i>	240	280	240	380
<i>E.coli</i>	100	135	100	180
<i>Enterococcus durans</i>	90	240	200	310
<i>Listeria innocua</i>	90	230	85	200
<i>Sac.serevisiae</i>	-	-	-	-
<i>C.pseudotropicalis</i>	-	-	-	-

Выделенные штаммы МКБ ингибировали рост тест-организмов, хотя степень ингибирования варьировала у разных штаммов в зависимости от видовой принадлежности тест-культур.

Клетки *Sac.serevisiae* и *C.pseudotropicalis* в этом смысле составили исключение. Они оказались резистентными к влиянию БПИВ.

Для дальнейших исследований мы выбрали наиболее активный S2 штамм, предварительно идентифицированный как *L. buchneri*. В этой серии экспериментов был использован метод диффузии в агар. Рис.1 отображает динамику роста штамма S2, синтез БПИВ и изменения значения pH клеточной суспензии в зависимости от времени культивирования исследуемого продуцента. Из рисунка видно, что уже после 4 часового культивирования, у штамма обнаруживается слабая антимикробная активность, которая повышается параллельно увеличению оптической плотности суспензии, т.е. накоплению биомассы продуцентов. В конце логарифмической фазы роста антимикробная активность продуцента достигает своего максимального значения. Факт обнаружения активных компонентов в составе первичных метаболитов наводит на мысль, что они относятся к бактериоцинам. Так, в отличие от синтеза антибиотиков, который осуществляется, в основном, в стационарной фазе и в фазе снижения темпа роста, синтез бактериоцинов идет в логарифмической фазе роста штаммов – продуцентов [13].



**Рис. 1.** Динамика роста, синтез бактериоциноподобного ингибирующего вещества и подкисление среды штаммом – продуцентом S2

Далее, с целью определения значения оптимальной температуры, было изучено влияние температурных условий культивирования на ингибирующее свойство данного штамма. Антимикробную активность и оптическую плотность клеточной суспензии измеряли после 24 часовой инкубации. Результаты исследования приведены в табл. 5.

Таблица 5

**Влияние температуры на рост и антимикробную активность штамма S2 (тест-культура *L.bulgaricus* 340)**

Temperatura, °S	Aktivnostġ, PE/ml	Rost, OP <sub>600nm</sub>
30	300	2,3
37	380	2,8
42	110	1,8

Как видно из таблицы, для проявления ингибирующей активности штамма S2, оптимальным является значение температуры 37<sup>0</sup>C. Отметим, что это значение также является оптимальным для роста штамма. При 42<sup>0</sup>C, его активность уменьшилась более чем на 70%.

Изучение влияний таких протеолитических ферментов, как протеиназа К, проназа и трипсин показало, что активный компонент исследуемого штамма при его инкубации с вышеперечисленными ферментами, потеряли практически всю свою антимикробную активность (табл. 6).

Таблица 6

**Влияние ферментов, pH и NaCl на антимикробную активность штамма S2 (тест-культура *L.bulgaricus* 340)**

Ферменты Активность (ПЕ/мл)	
Контроль (культ.жидкость)	380
Протеиназа К	-
Проназа	-
Трипсин	-
α-амилаза ПА	200
Липаза VII	230
<b>pH</b>	
3.0	180
5.0	280
6.5	380
9.0	260
11.0	110
12.0	-
<b>NaCl</b>	
0%	380
3%	260
6%	130

Кроме того,  $\alpha$  - амилаза и липаза также привели к уменьшению ее ингибирующей активности, что указывает на присутствии углеводов и липидных компонентов при формировании активного комплекса БПИВ.

При практическом использовании БПИВ, в зависимости от вида ферментированных продуктов и технологии их производства, бактериоцины могут подвергаться влиянию различных значений pH среды, а также концентраций минеральных солей, в частности, поваренной соли. В табл. 6 также приведены результаты влияния вышеуказанных физико-химических факторов среды на проявление ингибирующей активности исследуемого БПИВ. В пределах значений pH 3.0 – 11.0 штамм S2 проявляет антимикробную активность против тест-культуры, что имеет большое прикладное значение. Оптимальное значение pH среды для него находится ближе к нейтральной зоне. Ее низкое (pH 3.0) и высокие значения (pH 11.0) неблагоприятно воздействуют на проявления активности БПИВ. Что касается влияния концентраций хлористого натрия в пределах от 3% до 6%, здесь наблюдалась следующая картина: Если 3% NaCl оказывал слабый ингибирующий эффект на антимикробную активность штамма S2, то с повышением концентрации этой соли наблюдалось значительное подавление его антимикробной активности. Однако, рост исследуемого штамма в присутствии NaCl был значительно подавлен его высокими концентрациями (данные не показаны). Толерантность антимикробного компонента к NaCl позволяет использовать их продуценты в качестве стартовых культур при изготовлении различных кисломолочных и ферментированных растительных продуктов, в том числе сыров, оливок и соленой капусты [2,7,14].

В трудах Клейнхамера бактериоцины разделены на 4 класса. В отличие от представителей классов 1, 2 и 3, состоящих исключительно из аминокислотных остатков с низкими молекулярными массами, бактериоцины класса 4, в основном, имеют крупные молекулы с большой молекулярной массой. Последние пока полностью не изучены и охарактеризованы недостаточно. Однако к этой группе относятся те представители, в состав которых входят липидные и углеводные компоненты. К тому же, эти компоненты, по-видимому, не являются простыми составляющими, а играют важную роль при формировании активных доменов бактериоцинов [1]. Однако другие литературные источники свидетельствуют, что в связи с присутствием в их составе компонентов не пептидного происхождения, отнесение тех или иных бактериоцинов к отдельному классу не соответствует действительности. По мнению этих авторов 4 класс бактериоцинов не существует. Обнаружение липидных и углеводных компонентов в составе бактериоцинов является результатом их неполной очистки [17,18]. Как бы то ни было, результаты этих исследований доказывают, что основным действующим компонентом, обуславливающим антимикробную активность изолированного нами штамма S2, является веществом белковой природы и, следовательно, относится к бактериоцинам. Синтез этого компонента в логарифмической стадии роста штамма-продуцента тоже подтверждает это предположение.

Таким образом, из 2-х видов азербайджанского сыра изолированы 4 штамма МКБ, обладающие антимикробными свойствами. Активные компоненты этих штаммов полностью подавляли рост проверенных грамположительных и грамотрицательных бактерий, но не оказали заметного влияния на рост

дрожжей. Наиболее активным среди них оказался штамм S2. Активный компонент этого штамма имеет пептидное происхождение и синтезируется в логарифмической стадии роста продуцента.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Klaenhammer, T.R. 1993. //FEMS Microbiol.Rev.12. P. 39-86.
2. Schillinger, U. 1990. //In: Bills, D.D., Kung, S. (eds). Biotechnology and Food Safety. Butterworth-Heinemann, Boston. P. 55-74.
3. Suma, K., Misra, M.C., Varadaraj, M.C. 1998. //Int. J Food Microbiol.40. P. 17-25
4. Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. 2001. //Int.J.Food Microbiol.71. P. 1-20.
5. Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B. 1995. //Microbiol. Rev.59. P. 171-200.
6. Messens, W., De Vuyst, L. 2002. //Int.J.Food Microbiol.72. P. 31-43.
7. Daeschel, M.A. 1989. //Food Technol.43. P. 164-167.
8. De Vuyst, L., Vandamme, E.J. 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. //In: De Vuyst & Vandamme (eds). Microbiology, Genetics and Application. Chapman & Hall, New York. P.1-12.
9. Piard, J., Desmazeaud, M. 1992. //Le lait.72. P. 113-142
10. Schillinger, U., Holzappel, W.H. 1996. //Int.J.Food Microbiol.33. P. 3-5.
11. Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A.J.G., Lebrihi, A., Lefebvre, G. 2001. //Int.J.Food Microbiol.68. P. 93-104.
12. Sharpe, M.E., 1979. // In: Skinner, F.A., Lovelock, D.W. (Eds), Identification methods for microbiologists, Academic Press, London, P. 233-259.
13. Gulahmadov, S.G., Batdorj, B., Dalgalarondo, M., Chobert, J-M., Kuliev, A.A., Haertlé, T. 2006. //Eur Food Res Technol.224. P.229-235.
14. Sambrook, J., Fitch, E.F., Maniatis, T. 1989. //Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press.
15. Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C. 2002. //Int.J.Food Microbiol.79. P. 3-16.
16. Webber, A., Osborn, M. J. 1969. //Biol. Chem.244. P. 4406-4412
17. Nes, I. F., Tagg, J.R. 1996. Novel lantibiotics and their pre-peptides. //Antonie van Leeuwenhok. V. 69. No. 2. P. 91-93.
18. Nes, I. F., Holo, H. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. //Biopolymers 55. P. 50-61.

#### AZƏRBAYCAN PENDİR NÖVLƏRİNDƏN İZOLƏ EDİLMİŞ SÜD TURŞUSU BAKTERİYALARININ ANTİBAKTERİYA VƏ FUNQİSİD FƏALLIQLARININ TƏDQIQI

S.Q.GÜLƏHMƏDOV, T.A.CƏLİLOVA, N.F.ABDULLAYEVA,  
N.F.HÜSEYNOVA, R.S.MUSTAFAYEVA, A.Ə.QULİYEV

#### XÜLASƏ

Azərbaycanın 2 pendir növündə bakteriosinəbənzər fəal maddələr (BFM) sintez edən süd turşusu bakteriyalarının (STB) axtarışı davam etdirilmişdir. Əvvəllər identifikasiya edilməmiş 4 STB ştamı izolə edilmişdir. Onların 3-ü (S1, S2 və M1) *Lactobacillus buchneri* növünə, dördüncüsü (M3) isə *L. pentosus* növünə aid edilmişdir. *Lactobacillus bulgaricus* 340, *Echerichia coli*, *Enterococcus durans* və *Listeria innocua* növlərinə aid olan bakteriya ştamlarının böyüməsinin qarşısı izolə edilmiş ştamlar tərəfindən tam alınmışdır. *Sacharomyces cerevisiae* və *Candida pseudotropicalis* maya göbələkləri onlara qarşı davamlı olmuşlar. Ştamların BFM-ləri proteinaza K və tripsin fermentləri ilə tam,  $\alpha$ -amilaza və lipaza ilə qismən inaktivləşmişlər.

**STUDY OF ANTIBACTERIAL AND FUNGICIDAL ACTIVITIES OF THE LACTIC ACID BACTERIA, ISOLATED FROM AZERBAIJANI CHEESES**

**S.Q.GULAHMADOV, T.A.DJALILOVA, N.F.ABDULLAYEVA,  
N.F.HUSEYNOVA, R.S.MUSTAFAYEVA, A.A.KULIEV**

**SUMMARY**

The bacteriocine-like inhibitory substance (BLIS) producing LAB, isolated from 2 varieties of Azerbaijani cheeses were studied. Four strains LAB not identified previously were isolated. Three of them (S1, S2 and M1) could be identified as *Lactobacillus buchneri* and one (M3) – as *L. pentosus*. Test strains such as *Lactobacillus bulgaricus* 340, *Echerichia coli*, *Enterococcus durans* and *Listeria innocua* were inhibited by the BLIS of all isolated LAB strains. The yeasts cells of *Sacharomyces serevisiae* and *Candida pseudotropicalis* were resistance to inhibitory effects of them. Complete inactivation or significant reducing in antibacterial activity of BLIS from isolated strains were observed after treatment proteolytic (Proteinase K and Tripsine), and nonproteolytic ( $\alpha$ -amylase and lipase) enzymes, respectively.