مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

تولید باکتریوسین با استفاده از *باسیلوس* لکینی‌فورمیس ATCC 9789 و تعیین ویژگی‌های ساختاری و ضدمیکروبی آن

امین خلیلی[۱]، محمود رضازاد باری[۲*]، سعید حسامی تکلو[۳]، صابر امیری [٤]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران.

۲-استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران.

٤- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱ /۰٦/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۲۱

کلمات کلیدی:

باکتریوسین،

نگهدارنده زیستی،

پاتوژن‌های منتقله از غذا،

باسیلوس لکینی‌فورمیس.

DOI: 10.22034/FSCT.19.131.319

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.25.6

* مسئول مکاتبات:

m.rezazadehbari@urmia.ac.ir

چکیده

باکتریوسین‌ها گروهی از مولکول‌های منحصر بفرد هستند که توسط برخی از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و به عنوان بخشی از ایمنی ذاتی میزبان در نظر گرفته می‌شوند. امروزه استفاده از نگهدارنده‌های زیستی در صنایع غذایی به طور گسترده در حال افزایش است. در پژوهش حاضر برای تولید باکتریوسین از که *باسیلوس لکینی* فورمیس ATCC 9789 استفاده شد. فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین تولیدی در برابر پاتوژن‌های منتقله از غذا بررسی شد. در ادامه پس از خالص سازی، ویژگی‌های باکتریوسین تولید شده شامل پایداری در برابر حرارت، pH، آنزیم و اشعه فرابنفش و نیز minimal inhibitory concentration (MIC) و minimal bactericidal concentration (MBC) تعیین شد. همچنین وزن مولکولی، گروه‌های عاملی و ویژگی‌های دمایی باکتریوسین توسط آزمون sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-Page)، Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) و Differential scanning calorimetry (DSC) تعیین گردید. این باکتریوسین در حرارت‌ها و pHهای مختلف، تحت تابش اشعه فرابنفش و همچنین تحت تیمار با آنزیم‌های تریپسین و پپسین پایداری بسیار خوبی نشان دادند. آزمون SDS-Page نشان داد که باکتریوسین تولیدی از دو بخش با وزن مولکولی ۱۷ و ۲۰ کیلودالتون تشکیل شده است. نتایج آنالیز FTIR نشان دهنده ویژگی پپتیدی بود و نتایج DSC دو پیک‌های اگزوترمال به ترتیب در ۱۹۰ و ۳۲۵ درجه سانتی‌گراد داشت. به طور کلی در این پژوهش بعد از استخراج و اطمینان از وجود باکتریوسین، اثر ضد میکروبی آن با تعیین MIC و MBC بر روی پاتوژن‌های منتقله از غذا مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که باکتریوسین تولیدی توسط *باسیلوس لکینی‌فورمیس* دارای اثر ضدمیکروبی قابل توجهی روی باکتری‌های پاتوژن‌های منتقله از غذا داشت.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.25.6]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.131.319]

۱- مقدمه

باکتریوسین‌ها گروهی از مولکول‌های کوچک پپتیدی منحصر بفرد هستند که توسط برخی باکتری‌ها تولید می‌شوند و به عنوان نگهدارنده زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲و۱]. باکتریوسین‌های باکتری‌های گرم مثبت در برابر ایزوله‌های مقاوم به آنتی بیوتیک، فعال بوده و مقاومت باکتریایی طبیعی اندکی دارند و اثبات شده است که باکتری‌ها در مدل حیوانی را می‌کشند [۷-۳]. باکتریوسین‌ها دارای گروه‌های متفاوتی هستند. پپتیدهای کوچکی که تغییرات پس از همانندسازی زیادی را متحمل شده‌اند تا پپتیدهای فعالی مانند نیسین[1] تولید کنند که به عنوان باکتریوسین‌های دسته اول طبقه بندی می‌شون [۸]. پپتیدهای فعال غشاء با پایداری حرارتی و وزن ملکولی اندک، در باکتریوسین‌های دسته دوم طبقه بندی می شوند. اعضای دسته سوم، پروتئین‌های با قابلیت حرارتی زیاد بوده و دسته چهارم (باکتریوسین‌های پیچیده)، که برای فعالیت به نصف نانوپروتئین نیاز دارند. باکتریوسین‌هایی که توسط باکتری‌های گرم مثبت تولید می‌شوند مورد بررسی زیادی قرار گرفته و از نظر بیوشیمیایی و ژنتیکی توصیف یا ارزیابی شده‌اند. فعالیت باکتریوسین‌ها ، بسیار ویژه می‌باشد. با توجه به ترکیب دیواره سلولی، طیف فعالیت باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی، گسترده تر است [۹].

باسیلوس لکینی‌فورمیس ATCC 978 ، یک باکتری گرم مثبت، میله‌ای و هوازی اختیاری است که به طور گسترده به عنوان ارگانیسم ساپروفیت در محیط پراکنده است. این باکتری در خاک به فرم اسپور تبدیل می‌شود، ویژگی که آن را برای استفاده‌های صنعتی و بیوتکنولوژیکی از جمله تولید آنزیم‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و برخی متابولیت‌ها ساخته است[۱۳-۱۰]. این باکتری به طور معمول در خاک یافت می‌شود. اپتیمم دمای رشد آن حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد است اما در دماهای بالاتر نیز قادر به حیات است. *باسیلوس لکینی‌فورمیس* تقریبا در ۸۰ درصد توالی کد کننده با گونه باسیلوس سوبتیلیس همسانی دارد. یک باسیلوس نسبتا کوچک (با قطر حدود ۱μm) است که می‌تواند به طور فعال روی پلیت‌های مرطوب آگار تجمع یابد و در کشت روی محیط جامد یک منطقه‌ی رشد ایجاد می‌کند[۱۳و ۱٤].

مقاومت آنتی بیوتیکی با توجه به مصرف بی رویه انواع آنتی بیوتیک‌ها در دنیا رو به افزایش است، این افزایش در کشور ما نیز مشاهده می‌شود. با توجه به اهمیت بیماری‌های عفونی و عوامل دخیل در ایجاد این عارضه‌ها که می‌تواند جزو باکتری‌های منتقله از غذا باشد از یک سو و نیز با در نظر گرفتن این موضوع که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنایع غذایی مجاز نیست از سوی دیگر، تولید ترکیبات ضدمیکروبی نوین و به ویژه طبیعی موثر در مقابل انواع عفونت‌ها می‌تواند استراتژی نوید بخشی باشد[۹]. هدف اصلی این پژوهش تولید باکتریوسین توسط گونه *باسیلوس لکینی‌فورمیس* ATCC 9789 و بررسی اثر ضدمیکروبی آن بر انواع مختلف باکتری‌های بیماری‌زای منتقله از غذا می‌باشد. همچنین برخی ویژگی‌های باکتریوسین تولیدی نیز به طور نسبی مورد بررسی قرار می‌گیرد[۱۷-۱۵].

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

باکتری *باسیلوس لکینی‌فورمیس* (ATCC 9789)، باکتری‌های بیماریزای منقله از مواد غذایی شامل *اشرشیا کلای* (PTCC 1553)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1113)، *سودوموناس آئروژنزا* (PTCC 1707) و *سالمونلا انتریکا* (PTCC 1093) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران خریداری شد. محیط‌های کشت میکروبی پودری شامل نوترینت براث و آگار، BHI، مولر هینتون آگار و تریپل شوگر آیرون آگار (تولیدی شرکت Merck آلمان) از نمایندگی شرکت تولید کننده در ایران تهیه شد. آب دیونیزه (شرکت زلال، کرج، ایران) و سایر مواد شیمیایی آزمایشگاهی اتانول، گلوکز، آگارز، سدیم دودسیل سولفات، سولفات آمونیوم و قرص رینگر از شرکت Merck آلمان و همچنین آنزیم‌های تریپسین (EC 3.4.21.4) و پپسین (EC 3.4.23.1) از شرکت سیگما آلدریچ آمریکا خریداری گردید.

۲-۲-روش‌ها

۲-۲-۱-فعال سازی باکتری *باسیلوس لکینی‌فورمیس*

1. Nisin

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.25.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.131.319]

برای این منظور ویال حاوی باکتری لیوفیلیزه مطابق دستورالعمل شرکت فروشنده تحت شرایط استریل شکسته و محتوای آن به محیط کشت Brain Heart Infusion (BHI) اضافه شد و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه انکوباسیون گرمخانه‌گذاری شد و به فرم فعال باکتری در آمدند[۱۸].

۲-۲-۲-تولید باکتریوسین

جهت تولید باکتریوسین، باکتری *باسیلوس لکینی‌فورمیس* پس از فعالسازی در محیط کشت BHI، در محیط کشت نوترینت براث[2] به مدت ٤۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ۱۵۰ دور بر دقیقه کشت داده شد [۱۹و ۲۰].

۲-۲-۳-خالص‌سازی جزئی باکتریوسین

برای این منظور، پس از اتمام مدت زمان گرمخانه‌گذاری و با استفاده از سانتریفیوژ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و در ۹۰۷۲ ×g به مدت ۳۰ دقیقه بیومس از محیط کشت جداسازی شد. سپس محلول رویی به وسیله سیستم فیلتراسیون غشایی با فیلتر ٤۵/۰ میکرومولار استریل گردید و pH آن به وسیله هیدروکسید سدیم یا اسید هیدروکلریدریک یک نرمال خنثی شد. برای ته نشین کردن و بالا بردن غلظت پروتئین‌ها از پودر سولفات آمونیوم استفاده گردید. برای مشخص کردن غلظت مناسب سولفات آمونیوم از غلظت های ٤۰ تا ۷۰ درصد آن استفاده شد. بدین ترتیب که کریستال های آمونیوم سولفات در ٤ درجه سانتی‌گراد کم کم به محلول رویی اضافه گردید. سپس بر روی دستگاه شیکر به مدت دو ساعت در داخل یخ همزده شد. بعد از دو ساعت به داخل یخچال انتقال یافته و به مدت ۱۸ ساعت در داخل یخچال نگهداری شد. بعد از اتمام مدت زمان لازم نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه با g × ۱۱۲۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس اثر ضدمیکروبی ماده ته نشین شده و محلول رویی باقی مانده به صورت مجزا آزمایش گردید. به این ترتیب مقدار غلظت مورد استفاده از سولفات آمونیوم که کمترین مقدار اثر ضدمیکروبی را برای محلول رویی داشت مشخص شد. برای حذف سولفات آمونیوم موجود در ماده ته نشین شده و همچنین خالص‌سازی جزئی ماده ته نشین شده از روش دیالیز استفاده شد. در این روش ماده ته نشین شده در ۱۰ برابر حجم خود بافر سدیم فسفات ۱۰ میلی مولار (pH ٦/۵) حل شد. سوسپانسیون حاصله در داخل کیسه دیالیز Da ۱۰۰۰ ریخته شد. هر دو طرف کیسه دیالیز توسط نخ بسته شد. بعد به مدت ۲٤ ساعت در داخل بافر سدیم فسفات با حجم ۱۰۰ برابر حجم اولیه نگهداری شد. در طول دیالیز بافر مورد استفاده هر سه ساعت یک بار تعویض شد. بعد از دیالیز اثر ضدمیکروبی ماده باقیمانده در داخل کیسه دیالیز مورد آزمایش قرار گرفت[۲٤-۲۱].

۲-۲-٤-فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین

فعالیت ضد میکروبی با استفاده از میکروارگانیسم‌های نشانگر به روش رقیق سازی محیط کشت مایع انجام شد. به طور خلاصه، میکروارگانیسم‌های نشانگر ابتدا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت برای باکتری‌ها و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۸ ساعت برای مخمر در محیط‌های کشت انتخابی استریل تا به دست آوردن غلظت نهایی 10^{7} $CFU.mL^{-1}$ کشت شدند. همچنین محلول‌های حاوی باکتریوسین با رقت های مختلف در لوله‌های آزمایش تهیه شدند. پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸ ساعت، رشد میکروارگانیسم‌ها با استفاده از اندازه گیری OD^{3} در ٦۰۰ نانومتر توسط اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد. حداقل غلظتی که از رشد میکروارگانیسم‌ها جلوگیری کرد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC^{4}) بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر از هر باکتریوسین تعیین شد. غلظت‌هایی که پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹٦ ساعت در آنها رشد میکروبی صورت نگرفته بود، به عنوان حداقل غلظت باکتری کُشی (MBC^{5}) بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر تعیین گردید[۲۳].

۲-۲-۵-اندازه گیری وزن مولکولی باکتریوسین

با انجام روش SDS-PAGE بر روی نمونه به دست آمده هم عمل خالص‌سازی انجام شد و هم وزن مولکولی پروتئین‌ها مشخص گردید. در این روش بافر ژل پایین ۱۲ درصد (pH ۸/۸) تهیه و در داخل محفظه ریخته شد به طوری که حدود ۳

2. Nutrient broth

3. Optical density
4. Minimum inhibitory concentration
5. Minimum bactericidal concentration

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.25.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.131.319]

سانتیمتر فضا برای محلول ژل باقی بماند. حدود ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر با سمپلر به آرامی بر روی سطح ژل ریخته شد به طوری که با ژل مخلوط نگردد. این کار به منظور صاف شدن سطح ژل و جلوگیری از تماس هوا با ژل می‌باشد. بعد از انعقاد ژل پایین آب مقطر از کنار محفظه شیشه‌ای خالی شد و بافر ژل بالا ٦ درصد (pH ٦/٨) تهیه شده و داخل محفظه ریخته شد و شانه بر روی آن قرار می‌گیرد. بعد از انعقاد بافر ژل بالا شانه خارج شد و نمونه ها به داخل چاهک ها تزریق شدند. روش آماده کردن نمونه‌ها بدین صورت است که ۱۵ میکرولیتر از نمونه با ۵ میکرولیتر از بافر نمونه حل شده سپس به مدت ۵ دقیقه جوشانده شد. غالباً بر روی ژل دو چاهک ابتدا و انتها خالی می مانند و مارکر نیز درون سومین چاهک ریخته شد. سپس محفظه شیشه‌ای با استفاده از گیره‌هایی به نام تانک الکتروفورز متصل شدند و مخزن با بافر الکترود پُر شد. نمونه‌ها ابتدا در ولتاژ ۱۲۰ به مدت ٦۰ دقیقه مسیر ژل را تا انتها طی کردند. بعد از اتمام الکتروفورز برای دیده شدن پروتئین‌ها در داخل ژل از رنگ کوماسی آبی G-250 استفاده شد. بدین ترتیب که به داخل هر چاهک ۰/۲ – ۰/۱ میکروگرم از رنگ کوماسی آبی اضافه شد. در آخر مراحل تثبیت به مدت یک شبانه روز، شستشو به مدت ۳۰ دقیقه، رنگ آمیزی به مدت ٦ ساعت و رنگ‌بری تا زمانی که ژل سفید شود، انجام شد. در مرحله آخر ژل به دست آمده در اسید استیک ۳ درصد نگه داری شد [۲۵].

۲-۲-٦-آزمایش حساسیت باکتریوسین

به منظور تعیین اثر دما بر روی فعالیت باکتریوسین‌ها، باکتریوسین که تا اندازه‌ای خالص شده بود در دماهای مختلف ٤۰، ٦۰، ۸۰ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه تیمار شد. فعالیت باکتری‌کشی باقی‌مانده با روش دیسک اندازه‌گیری شد. برای بررسی تأثیر pH بر اثر باکتری‌کشی باکتریوسین تولیدی، با HCl یا NaOH در pH ۳، ٤، ٥، ٦، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت تیمار قرار گرفت. سپس pH نمونه‌ها دوباره در pH خنثی تنظیم شده فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها بررسی گردید. برای بررسی اثر آنزیم، باکتریوسین که تا اندازه ای خالص شده بود به مدت ۲ ساعت با آنزیم تریپسین و پپسین در غلظت نهایی ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تحت تیمار قرار گرفت. همچنین اثر اشعه فرابنفش پس تیمار در زمان های مختلف بررسی شد. سپس فعالیت باکتری‌کشی آن در برابر باکتری‌های شاخص، تعیین شد[۲٦-۲۸].

۲-۲-۷- آزمون FTIR

برای این منظور، نمونه باکتریوسین خشک شده (۱ میلی گرم) با ۲۰۰ میلی گرم پودر پتاسیم بروماید و با یک پرس هیدرولیک به صورت قرص فشرده شد. تکه های قرص در محدوده cm^{-1} ٤۰۰ – ٤۰۰۰ اسکن شدند [۲۹].

۲-۲-۸-آزمون DSC

برای بررسی پایداری و مقاومت نمونه باکتریوسین به دما از روش اسکن کالریمتری تفاضلی استفاده شد. برای این منظور، ۵ میلی گرم نمونه باکتریوسین خشک شده در کروزه اکسید آلومینیوم (Al_2O_3) ریخته و پرس شد. سپس کروزه حاوی نمونه از دمای ۳۰ تا ٤۰۰ درجه سانتی گراد با سرعت گرمایش ۱۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه در فضای نیتروژن، در مقابل یک کروزه Al_2O_3 خالی به عنوان مرجع حرارت داده شد [۲۳].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تولید باکتریوسین توسط *باسیلوس لکینی فورمیس*

برای این منظور پس کشت *باسیلوس لکینی فورمیس* در محیط کشت نوترینت براث به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ابتدا محیط کشت شده به مدت ۳۰ دقیقه در ۹۰۷۲ ×g سانتریفیوژ شد تا سلول‌های میکروبی و محلول رویی آنها جداسازی شود. سپس اثر ضد میکروبی محلول رویی جدا شده پس از حذف اثر ضد میکروبی اسیدهای آلی با روش دیسک بر روی باکتری‌های پاتوژن‌های منتقله از غذا مورد آزمایش قرار گرفت و پلیت‌ها به مدت ۱۲-۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. در این آزمایش میزان قطر هاله عدم رشد به وجود آمده از فعالیت ضدمیکروبی *باسیلوس لکینی فورمیس* در مقابل پاتوژن های منتقله از غذا بر حسب میلی‌متر و در سه تکرار اندازه‌گیری شد و به صورت میانگین قطر هاله‌های عدم رشد بدست آمده مشخص گردید. نتایج مشابه انجام شده توسط Jinjin pei و همکاران (۲۰۱۸) نشان دهنده خاصیت

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.25.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.131.319]

ضد میکروبی باکتریوسین تولیدی توسط *باسیلوس لکینی فورمیس* بر باکتری‌های پاتوژن حاصل از کشت باکتری‌های پاتوژن منتقله از غذا بود[۳۰].

۳-۱-۱- خالص سازی جزئی باکتریوسین‌ها

برای بدست آوردن پروتئین‌هایی با درجه خلوص بالا و حذف ناخالصی‌های مربوط به محیط کشت و سلول‌ها، عمل خالص‌سازی بر روی محلول رویی بدست آمده از کشت *باسیلوس لکینی فورمیس* انجام می‌گیرد. در این مرحله پروتئین‌هایی که دارای خاصیت ضد میکروبی بودند خالص‌سازی شدند. برای این آزمایش از مراحل ته نشین کردن با سولفات آمونیوم، دیالیز و الکتروفورز SDS-PAGE برای خالص‌سازی جزئی پروتئین ها استفاده شد.

۳-۱-۲- ته نشین کردن با سولفات آمونیوم

اولین مرحله و یکی از مهمترین مراحل خالص سازی پروتئین ها ته نشین کردن آنها توسط سولفات آمونیوم می‌باشد. در این آزمایش برای شناسایی غلظت مناسب برای ته نشین کردن پروتئین ها از غلظت های مختلف سولفات آمونیوم استفاده شد. در جدول ۱ نتایج این آزمایش نشان داده شده است.

Table 1 Antimicrobial activity test in different concentrations of ammonium sulfate

Diameters of inhibition zone (mm)		
Amount of ammonium sulfate (percentage)	Supernatant solution	sedimented matter
40	4	6
60	3	4
80	3	4

طبق نتایج جدول ۱، بین درصد سولفات آمونیوم و قطر هاله عدم رشد رابطه مستقیم برقرار است. به صورتی که هرچه غلظت سولفات آمونیوم چه در محلول فوقانی و چه در ماده ته نشین شده بیشتر باشد قطر هاله عدم رشد کمتر می باشد. آزمایش فعالیت ضد باکتریایی در غلظت های متفاوت سولفات آمونیوم نشان داد که در تمام غلظت‌ها هم در ماده ته نشین شده و هم در محلول رویی خاصیت ضد میکروبی دیده می‌شود. بطوریکه در غلظت ۴۰٪ سولفات آمونیوم، خاصیت ضد میکروبی ظاهر شده (برحسب اندازه قطر هاله عدم رشد) بالا می‌باشد. بعد از انجام مرحله جداسازی ماده ته نشین شده توسط سولفات آمونیوم ماده رسوبی بدست آمده در داخل بافر فسفات سدیم ۱۰mM نگهداری شد.

۳-۱-۳- دیالیز

در این مرحله ماده پروتئینی بدست آمده از مرحله ته نشین سازی با سولفات آمونیوم، در بافر فسفات سدیم (۱۰ میلی مولار) حل شده و مورد جداسازی دیالیز قرار می‌گیرد. افزایش حجم داخل کیسه دیالیز بعد از انجام عمل دیالیز ثابت می‌کند که آب خالص وارد کیسه دیالیز شده و سولفات آمونیوم از آن خارج شده است. همچنین مشخص شد حجم کیسه دیالیز در نظر گرفته شده باید بزرگتر از حجم ماده ته نشین شده باشد. در طی انجام عمل دیالیز کیسه دیالیز باید به بطور کامل در داخل بافر سدیم فسفات قرار گیرد چون در غیر این صورت کیسه ترک بر می‌دارد.

در نهایت بر روی ماده خالص سازی شده بعد از عمل دیالیز آزمایش ضد میکروبی انجام می‌گیرد. از مهمترین نتایج این مرحله می‌توان به این نکته اشاره کرد که در طی آزمایش‌های فعالیت ضد میکروبی که قبل از مرحله دیالیز انجام گرفته است مشخص شد که بعد از ٦-٨ ساعت اثر ضد میکروبی کاملاً مشهود بوده ولی بعد از گذشت زمان اثر آن کم کم ناپدید شده و جای آنرا میکروارگانیسم‌های حساس می‌گیرند. در صورتیکه بعد از انجام مراحل خالص سازی و دیالیز نه تنها بعد از ٦-٨ ساعت بلکه حتی بعد از ۱۲ ساعت نیز این اثر ضد میکروبی باقی می‌ماند.

۳-۱-٤- تعیین وزن مولکولی باکتریوسین

در این مرحله برای ارزیابی خلوص باکتریوسین‌های بدست آمده از مراحل قبلی خالص سازی و تعیین وزن مولکولی آنها از روش الکتروفورز استفاده شد. لازم به ذکر است به علت وزن مولکولی کم نمونه‌های پروتئینی خالص سازی شده روش SDS-PAGE برای الکتروفورز انتخاب شد. نمونه ها به طور متوسط در طی ۲ ساعت مسیر عمودی ژل را طی کردند. سپس این ژل توسط رنگ

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.25.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.131.319]

کوماسی آبی، رنگ آمیزی شد. در نهایت باکتریوسین تولیدی دو وزن مولکولی به ترتیب در ۱۷ و ۲۰ KDa نشان داد شد. در شکل ۱ باندهای مربوط به نمونه‌ها بر روی ژل الکتروفورز دیده می‌شود و با نتایج Kaboré و همکاران (۲۰۱۳) مورد بررسی قرار داده شد [۳۱].

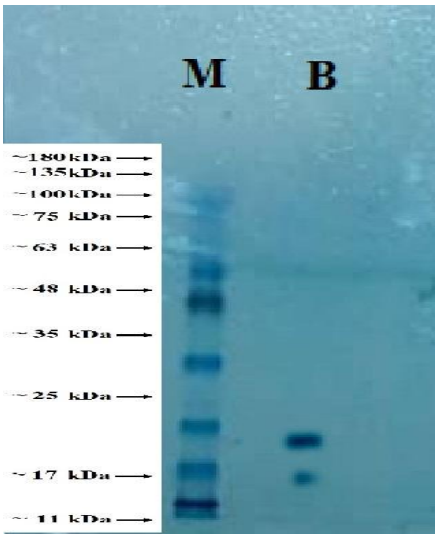

Fig 1 The result of SDS-Page test and staining with Coomassie Blue on the gel

با توجه به شکل ۱ نتایج بدست آمده از مراحل خالص سازی می‌توان به این نکته اشاره کرد که باکتریوسین‌های تولید شده دارای وزن مولکولی در محدوده ۱۷ و ۲۰ کیلودالتون می‌باشند.

مراحل انجام شده برای شناسایی فعالیت ضد میکروبی باکتری جداسازی شده شامل مراحل ذیل می‌باشد. تولید کشت تازه و فعال از سویه جداسازی شده، سانتریفیوژ کردن آن، حمام آب گرم محلول رویی، سانتریفیوژ تغییرات pH و خنثی کردن محلول رویی بدست آمده، خالص سازی، آماده سازی کشت‌های تازه از کشت پاتوژن های منتقله از غذا، آماده سازی محیط کشت برای انجام آزمایش دیسک، انجام عمل تلقیح پاتوژن های منتقله از غذا در داخل محیط کشت، قرار دادن دیسک بر روی محیط کشت برای انجام عمل دیسک گذاری از دیسک آغشته به پلاک بدست آمده از سویه *باسیلوس لکینی فورمیس* در داخل محیط کشت. برای انجام هر بار آزمایش فعالیت ضد میکروبی در مقابل هر یک از سویه های منتقله از غذا، تمام مراحل بالا به ترتیب و به طور دقیق انجام می‌گیرند. در مراحل خالص سازی مواد ضد میکروبی روش استفاده از سولفات آمونیوم برای ته نشین کردن پروتئین‌های دارای فعالیت ضد میکروبی در تحقیقات زیادی انجام گرفته بود [۳۶-۳۲]. بعد از این مرحله خالص سازی جزئی با کیسه دیالیز انجام شد که در پی آن هم سولفات آمونیومی که برای ته نشین سازی استفاده شده بود از ماده پروتئینی جدا شد. همچنین غلظت ماده ضد میکروبی پروتئینی نیز افزایش یافت. بعد از این ۲ مرحله خالص سازی جزئی اثر ضد میکروبی هر کدام بررسی شد و مشاهده شد که فعالیت ضد میکروبی آنها افزایش یافته (افزایش قطر هاله رشد) و همچنین بعد از مرحله دیالیز اثر ضد میکروبی یعنی همان هاله‌های عدم رشد بلافاصله بعد از ۸ ساعت از بین نرفته و تا ۱۲ ساعت اثر خود را حفظ می‌کنند.

در طی مراحل خالص سازی جزئی هم برای کنترل خلوص ماده بدست آمده و هم برای تعیین وزن مولکولی نمونه ها روش SDS-PAGE الکتروفورز بکار گرفته شد. در نهایت مشخص شد که وزن مولکولی نمونه های بدست آمده در محدوده KDa ۱۵ مشترک بوده و همچنین باندهایی نیز در ۲ وزن مولکولی ۱۷ و ۲۰ KDa مشاهده شد. باید توجه داشت که بعضی از سویه‌های *باسیلوس لکینی فورمیس* توانایی تولید فقط یک باکتریوسین و تعدادی توانایی تولید بیشتر از یک باکتریوسین را دارند. با توجه به این مطلب در نمونه‌های بررسی شده وجود فقط تعداد باندهای محدود برای هر کدام از نمونه ها نشان از خلوص ماده پروتئینی بعد از مراحل خالص سازی را داشت.

۳-۲- تست مقاومت باکتریوسین در دماها و pHهای مختلف

به منظور بررسی بیشتر سویه دارای فعالیت ضد میکروبی، آزمایش‌های مقاومت در دماها و pHهای مختلف انجام گردید. برای بررسی مقاومت سویه‌های جداسازی شده در برابرحرارت بعد از کشت در دماهای مختلف نگهداری شده سپس خاصیت ضد میکروبی آنها بررسی شد و همچنین مقاومت محلول‌های رویی در pHهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در جداول ۲ و ۳ نتایج آزمایش‌های مقاومت انجام شده بر روی محلول‌های رویی جدا شده نشان داده شده است. با توجه به اینکه کاربرد باکتریوسین‌ها به عنوان نگهدارنده زیستی در صنایع غذایی مورد توجه می‌باشد لذا بهتر است که مقاومت سویه‌های جداسازی

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.25.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.131.319]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.25.6]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.131.319]

شده در دماها و pHهای مختلف مورد بررسی قرار گیرد.

Table 2 Resistance tests at different temperatures

temperature (degrees Celsius)	time (minutes)	Antimicrobial effect		
		Gram-positive aerobic cocci	Gram-negative aerobic bacillus	Gram-positive aerobic bacillus
40	30	+	+	+
60	30	+	+	+
80	30	+	+	+
100	30	+	+	+
121	15	+	+	+

Table 3 Resistance tests at different pH

pH	Antimicrobial effect		
	Gram-positive aerobic cocci	Gram-negative aerobic bacillus	Gram-positive aerobic bacillus
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+

۳-۳- تعیین فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین در برابر باکتری های بیماری زا

فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین تولیدی در جدول ٤ ذکر شده است. این باکتریوسین دارای فعالیت مهاری در برابر هر دو گروه باکتری گرم مثبت و گرم منفی مورد مطالعه بودند. به طور کلی باکتری های گرم مثبت مورد بررسی در این مطالعه به باکتریوسن تولیدی حساس تر بودند، نتایج مشابهی با نیاسین، باکتریوسین RC20975، باکتریوسین R1333 و غیره [۷]. مهم تر از همه این باکتریوسین‌های تولید شده، درای فعالیت ضد باکتریهای گرم منفی بودند که توسط Pie و همکاران در سال ۲۰۱۸ برای باکتریوسین Plantaricin SLG1 و سایر محققین نیز نشان داده شده است [۳۰].

Table 4 Determination of bacteriocin antimicrobial activity against pathogenic bacteria

Antimicrobial activity	Antimicrobial effect		
	Gram-positive aerobic cocci	Gram-negative aerobic bacillus	Gram-positive aerobic bacillus
MIC (µg/mL)	16	16	8
MBC (µg/mL)	32	32	16

۳-٤- اثر تیمار اشعه ماورای بنفش(UV) بر فعالیت باکتریوسین تولیدی

نتایج نشان داد که باکتریوسن تولید شده توسط سویه *باسیلوس لکینی‌فورمیس*، در برابر اشعه UV به طور کامل مقاوم است و تا ۳۰ دقیقه با قدرت ۲۰ ژول با حفظ فعالیت کامل تحمل می‌کند.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.25.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.131.319]

Table 5 Effect of UV treatment on bacteriocin activity

Irradiation time (minutes)	Antimicrobial effect		
	Gram-positive aerobic cocci	Gram-negative aerobic bacillus	Gram-positive aerobic bacillus
10	+	+	+
20	+	+	+
30	+	+	+

نتایج جدول ۵ نشان داد که باکتریوسن تولید شده توسط سویه *باسیلوس لکینی‌فورمیس* ، در زمان های ۱۰،۲۰ و ۳۰ دقیقه در برابر اشعه UV به طور کامل مقاوم است.

۳-۵- پایداری مواد ضد میکروبی تولید شده در مقابل آنزیم ها

بدین منظور حساسیت باکتریوسین تولید شده نسبت به آنزیم های ترپسین و پپسین بررسی شد که این آنزیم ها باعث از بین رفتن فعالیت ضد میکروبی آن شدند. این یافته تاکیدی بر پروتئینی بودن ترکیب ضد میکروبی تولید شده و نشان دهنده ماهیت پروتئینی این ترکیب است چرا که باکتریوسین ها از جنس پروتئین می باشند.

Table 6 Effect of enzyme treatment on bacteriocin activity

enzyme	Antimicrobial effect		
	Gram-positive aerobic cocci	Gram-negative aerobic bacillus	Gram-positive aerobic bacillus
trypsin	-	-	-
pepsin	-	-	-

۳-۶- ارزیابی گروه‌های عاملی باکتریوسین

طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) ابزاری مفید برای پیدا کردن گروه های عاملی پلیمرهای زیستی است. نتایج آنالیز FTIR برای باکتریوسین تولید شده در شکل ۵ نشان داده شده است، که نشان دهنده ویژگی پپتیدی است. پیک های cm^{-1} ۳۲۵۰ نشان دهنده گروه عاملی آمین (NH) بود [29]. Amiri و همکاران در سال (2021)، اظهار داشتند که پیک شدید در cm^{-1} ۳۶۰۰-۳۰۰۰ نشان می دهد پیوند کشش گروه عاملی آمین (NH) است. علاوه بر این آنها اظهار داشتند که پیک های بین cm^{-1} ۳۲۰۰ تا ۳۵۰۰ نشان دهنده حضور گروه آمید است. باکتریوسین تولیدی دارای یک پیک در cm^{-1} ۱۷۰۰ بود، که به دلیل ارتعاش پیوند C = O (کربنیل) در آمید نوع I است. باکتریوسین در منطقه cm^{-1} ۱۴۰۰ پیک داشت که به آمید نوع دوم نسبت داده می شود. پیک قوی در cm^{-1} ۱۱۰۰، مربوط به پیوند فسفو دی استر (P = O) می باشد [۲۹].

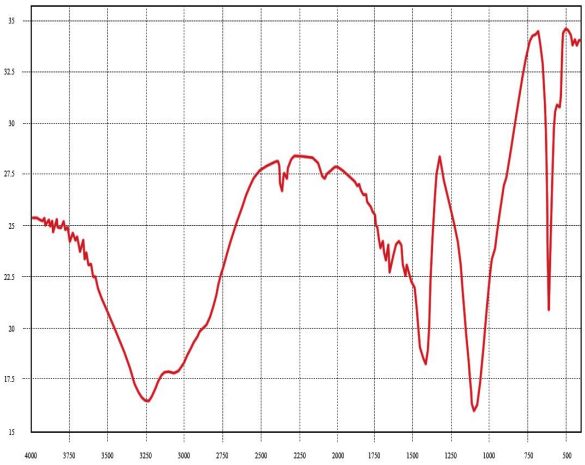

Fig 5 FTIR spectrogram of produced bacteriocin

۳-۷- ارزیابی ویژگی‌های دمایی باکتریوسین

تجزیه و تحلیل DSC برای بررسی تغییرات اندوترمال و اگزواترمالی با افزایش دما مورد استفاده قرار گرفت [۱۵و ۲۳]. در این مطالعه، ترموگرافی DSC برای باکتریوسین تولیدی دو پیک اگزوترم نشان داد که نشان دهنده دمای ذوب می‌باشد. پیک های اگزوترمال به ترتیب ۱۹۰ و ۳۲۵ درجه سانتی گراد بود (شکل ٦).

بنابراین، این باکتریوسین دارای پایداری حرارتی بالایی است.

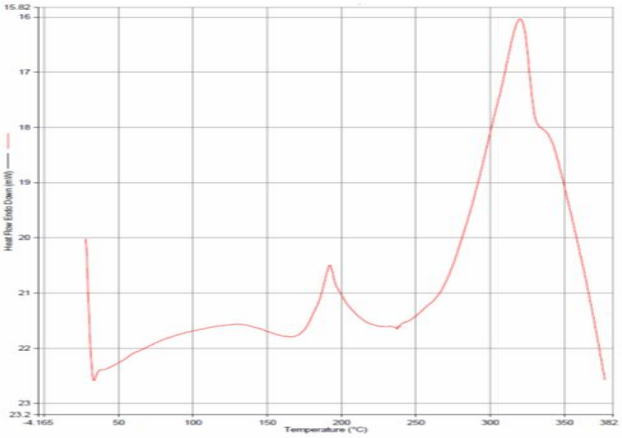

Fig 6 Thermogram obtained from DSC test

٤- نتیجه گیری کلی

تعداد کمی از گونه‌های جنس باسیلوس تولید باکتریوسین می‌کنند. با توجه به اهمیت این پپتیدهای ضدمیکروبی و فعالیت آن‌ها در غلظت‌های نانومولار باکتریوسین‌ها می‌توانند کاربرد گسترده‌ای در صنایع دارویی و غذایی جهت مهار پاتوژن‌های منتقله از غذا داشته باشند. با توجه به اهمیت پپتیدهای ضد میکروبی حاصل از باکتری‌ها و پتانسیل‌های آن‌ها در بازداری از رشد سایر میکروارگانیسم‌ها، این ترکیبات می‌توانند راه گشای تحقیقات وسیع در استفاده از این مواد زیست فعال بیولوژیک باشد. در این پژوهش توانایی باکتری *باسیلوس لکینی فورمیس* در تولید باکتریوسین به عنوان پپتیدهای زیست فعال با اثر ضدمیکروبی بررسی شد. پس از خالص سازی نسبی ویژگی‌های باکتریوسین تولیدی به طور جامع بررسی گردید. از آنجا که امروزه، اهمیت استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی اهمیت فراوانی یافته است. با توجه به اینکه باکتریوسین تولیدی توسط *باسیلوس لکینی فورمیس* خواص ممانعت کنندگی رشد در برابر پاتوژن‌های منتقله از غذا نشان داد، به عنوان افزودنی و نگهدارنده می‌تواند در صنایع غذایی به کار می‌روند.

٥- منابع

[1] Mercado, V., & Olmos, J. (2022). Bacteriocin Production by Bacillus Species: Isolation, Characterization, and Application. Probiotics and Antimicrobial Proteins , 1-19.

[2] Sabo S da S, Vitolo M, Domínguez González JM, de Souza RP. Overview of Lactobacillus plantarum as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. Food Res Int 2014; 64: 527-36. doi:10.1016/j.foodres.2014.07.041.

[3] Ahn, H., Kim, J., & Kim, W. J. (2017). Isolation and characterization of bacteriocin-producing Pediococcus acidilactici HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. Food Control, 80, 59-66.

[4] Amiri, S., Rezazadeh-Bari, M., Alizadeh-Khaledabad, M., Rezaei-Mokarram, R., & Sowti-Khiabani, M. (2021). Fermentation optimization for co-production of postbiotics by Bifidobacterium lactis BB12 in cheese whey. Waste and Biomass Valorization, 12(11), 5869-5884.

[5] Amiri, S., & Kazemi, S. (2022). Concept and potential applications of postbiotics in the food industry. Journal of food science and technology (Iran), 19(126), 87-101.

[6] Rezapour, S., Ghahremani, E., & Mardani, M. (2015). Analysis of antibiotic resistance and antimicrobial effects of Enterococcus faecium and Lactococcus lactis isolated from Khorramabad traditional cheeses. Journal of Applied Biotechnology Reports, 2(1), 211-214.

[7] Barbosa, A. A. T., de Melo, M. R., da Silva, C. M. R., Jain, S., & Dolabella, S. S. (2021). Nisin resistance in Gram-positive bacteria and approaches to circumvent resistance for successful therapeutic use. Critical Reviews in Microbiology, 47(3), 376-385.

[8] Zouhir, A., Hammami, R., Fliss, I., & Hamida, J. B. (2010). A new structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. The protein journal, 29(6), 432-439.

[9] Negash, A. W., & Tsehai, B. A. (2020). Current applications of bacteriocin. International Journal of Microbiology, 2020.

[10] Chien Thang Doan, Thi Ngoc Tran, Thi Thanh Nguyen, Thi Phuong Hanh Tran, Van Bon Nguyen, Trung Dung Tran, Anh Dzung Nguyen, San-Lang Wang. (2021) Production of Sucrolytic Enzyme by Bacillus licheniformis by the Bioconversion of Pomelo Albedo as a Carbon Source. Polymers 13:12, pages 1959.

[11] O'Sullivan, O., Begley, M., Ross, R. P.,

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.25.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.131.319]

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.25.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.131.319]

genetics of circular bacteriocins. Trends in microbiology, 19(8), 411-418.

[20] Senbagam, D., Gurusamy, R., & Senthilkumar, B. (2013). Physical chemical and biological characterization of a new bacteriocin produced by Bacillus cereus NS02. Asian Pacific journal of tropical medicine, 6(12), 934-941.

[21] Sonomoto, K., & Yokota, A. (Eds.). (2011). Lactic acid bacteria and bifidobacteria: current progress in advanced research. Horizon Scientific Press.

[22] Roces, C., Rodríguez, A., & Martínez, B. (2012). Cell wall-active bacteriocins and their applications beyond antibiotic activity. Probiotics and antimicrobial proteins, 4(4), 259-272.

[23] Amiri, S., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Bari, M. R., & Khaledabad, M. A. (2022). Characterization of antimicrobial peptides produced by Lactobacillus acidophilus LA-5 and Bifidobacterium lactis BB-12 and their inhibitory effect against foodborne pathogens. LWT, 153, 112449.

[24] Todorov, S. D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J. G., & Franco, B. D. (2011). Bacteriocinogenic Lactobacillus plantarum ST16Pa isolated from papaya (Carica papaya)—From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. Food Research International, 44(5), 1351-1363.

[25] He, L., Chen, W., & Liu, Y. (2006). Production and partial characterization of bacteriocin-like pepitdes by Bacillus licheniformis ZJU12. Microbiological Research, 161(4), 321-326.

[26] Feliatra, F., Muchlisin, Z. A., Teruna, H. Y., Utamy, W. R., Nursyirwani, N., & Dahliaty, A. (2018). Potential of bacteriocins produced by probiotic bacteria isolated from tiger shrimp and prawns as antibacterial to Vibrio, Pseudomonas, and Aeromonas species on fish. F1000Research, 7.

[27] Khochamit, N., Siripornadulsil, S., Sukon, P., & Siripornadulsil, W. (2015). Antibacterial activity and genotypic–phenotypic characteristics of bacteriocin-producing Bacillus subtilis KKU213: potential as a probiotic strain. Microbiological research, 170, 36-50.

Cotter, P. D., & Hill, C. (2011). Further Identification of novel lantibiotic operons using LanM-based genome mining. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 3(1), 27-40.

[12] Roces, C., Rodríguez, A., & Martínez, B. (2012). Cell wall-active bacteriocins and their applications beyond antibiotic activity. Probiotics and antimicrobial proteins, 4(4), 259-272.

[13] Gholam-Zhiyan, A., Amiri, S., Rezazadeh-Bari, M., & Pirsa, S. (2021). Stability of Bacillus coagulans IBRC-M 10807 and Lactobacillus plantarum PTCC 1058 in milk proteins concentrate (MPC)-based edible film. Journal of Packaging Technology and Research, 5(1), 11-22.

[14] Amiri, S., Nezamdoost-Sani, N., Mostashari, P., McClements, D. J., Marszałek, K., & Mousavi Khaneghah, A. (2022). Effect of the molecular structure and mechanical properties of plant-based hydrogels in food systems to deliver probiotics: an updated review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1-27.

[15] Amiri, S., Sowti Khiabani, M., Rezazadeh Bari, M., & Alizadeh, M. (2019). Production of bacteriocin in batch fermentation of dairy effluents by Lactobacillus acidophilus LA5 and Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB12. Journal of food science and technology (Iran), 16(90), 163-175.

[16] Amiri, S., Sowti Khiabani, M., Rezazadeh Bari, M., & Alizadeh, M. (2019). Development of the antioxidant activity in cheese whey and milk permeate using Lactobacillus acidophilus LA5 and Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB12. Journal of food science and technology (Iran), 16(91), 65-79.

[17] Amiri, S., & Rajabi, M. (2022). An overview of the application of natural antimicrobial compounds from plant, animal and microbial origin in foods. Journal of food science and technology (Iran), 18(119), 143-156.

[18] Malik, K. A. (1990). Use of activated charcoal for the preservation of anaerobic phototrophic and other sensitive bacteria by freeze-drying. Journal of Microbiological Methods, 12(2), 117-124.

[19] Van Belkum, M. J., Martin-Visscher, L. A., & Vederas, J. C. (2011). Structure and

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.25.6]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.131.319]

traditional China fermented meat product. Food Control, 19(4), 353-359.

[33] Martin-Visscher, L. A., Yoganathan, S., Sit, C. S., Lohans, C. T., & Vederas, J. C. (2011). The activity of bacteriocins from Carnobacterium maltaromaticum UAL307 against Gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. FEMS Microbiology Letters, 317(2), 152-159.

[34] Farajinejad, Z., Mohtarami, F., Pirouzifard, M., Amiri, S., & Hamishehkar, H. (2022). Evaluation of the effect of sourdough of whole wheat flour containing fructooligosaccharide and Bacillus coagulans IBRC-M 10807 on bulk bread. Journal of food science and technology (Iran), 19(125), 255-268.

[35] Martinez, R. C. R., Staliano, C. D., Vieira, A. D. S., Villarreal, M. L. M., Todorov, S. D., Saad, S. M. I., & de Melo Franco, B. D. G. (2015). Bacteriocin production and inhibition of Listeria monocytogenes by Lactobacillus sakei subsp. sakei 2a in a potentially synbiotic cheese spread. Food microbiology, 48, 143-152.

[36] Perumal, V., Repally, A., Dasari, A., & Venkatesan, A. (2016). Partial purification and characterization of bacteriocin produced by Enterococcus faecalis DU10 and its probiotic attributes. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 46(7), 686-694.

[28] Kaur, G., Singh, T. P., & Malik, R. K. (2013). Antibacterial efficacy of Nisin, Pediocin 34 and Enterocin FH99 against Listeria monocytogenes and cross resistance of its bacteriocin resistant variants to common food preservatives. Brazilian Journal of Microbiology, 44(1), 63-71.

[29] Amiri, S., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Bari, M. R., & Alizadeh, M. (2021). Optimization of food-grade medium for co-production of bioactive substances by Lactobacillus acidophilus LA-5 for explaining pharmabiotic mechanisms of probiotic. Journal of Food Science and Technology, 58(11), 1-12.

[30] Pei, J., Li, X., Han, H., & Tao, Y. (2018). Purification and characterization of plantaricin SLG1, a novel bacteriocin produced by Lb. plantarum isolated from yak cheese. Food Control, 84, 111-117.

[31] Kaboré, D., Nielsen, D. S., Sawadogo-Lingani, H., Diawara, B., Dicko, M. H., Jakobsen, M., & Thorsen, L. (2013). Inhibition of Bacillus cereus growth by bacteriocin producing Bacillus subtilis isolated from fermented baobab seeds (maari) is substrate dependent. International journal of food microbiology, 162(1), 114-119

[32] Liu, G., Lv, Y., Li, P., Zhou, K., & Zhang, J. (2008). Pentocin 31-1, an anti-Listeria bacteriocin produced by Lactobacillus pentosus 31-1 isolated from Xuan-Wei Ham, a

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Production of bacteriocin using *Bacillus licheniformis* ATCC 9789 and determination of its structural and antimicrobial properties

Khalili, A. [1], Rezazadeh Bari, M. [2]*, Tackallou, S. H. [3], Amiri, S. [4]

1. MSc, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
3. Assistant professor, Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 09/ 12
Accepted 2022/ 12/ 12

Keywords:

Bacteriocin,
Bio-preservative,
Foodborne pathogens,
Bacillus licheniformis

DOI: 10.22034/FSCT.19.131.319
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.25.6

*Corresponding Author E-Mail:
m.rezazadehbari@urmia.ac.ir

ABSTRACT

Bacteriocins are a group of unique molecules that are produced by some microorganisms and are considered as part of the host's innate immunity. Nowadays, the use of biological preservatives in the food industry is increasing widely. In the present study, *Bacillus laciniformis* ATCC 9789 was used to produce bacteriocin. The antimicrobial activity of produced bacteriocin was investigated against foodborne pathogens. Further, after purification, the characteristics of produced bacteriocin, including stability against heat, pH, enzyme and ultraviolet (UV) rays, as well as minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) were determined. Also, molecular weight, functional groups and temperature characteristics of bacteriocin were determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-Page), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) tests. This bacteriocin had very good stability in different temperatures, pHs and against trypsin and pepsin enzymes and under UV rays. The SDS-Page test showed that the produced bacteriocin consists of two parts with a molecular weight of 17 and 20 kDa. The results of FTIR analysis showed peptide characteristics and DSC results had two exothermic peaks at 190 and 325 C, respectively. In general, in this research, after extracting and ensuring the existence of bacteriocin, its antimicrobial effect was evaluated by determining MIC and MBC on foodborne pathogens. The results showed that the bacteriocin produced by *B. licheniformis* had a significant antimicrobial effect on foodborne pathogens.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.25.6]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.131.319]