



## تولید باکتریوسین با استفاده از باسیلوس لکینی فورمیس ATCC 9789 و تعیین ویژگی‌های ساختاری و ضد میکروبی آن

امین خلیلی<sup>۱</sup>، محمود رضازاد باری<sup>۲\*</sup>، سعید حسامی تکلو<sup>۳</sup>، صابر امیری<sup>۴</sup>

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.

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

### چکیده

### اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۲۱

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 خلص 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 آگزوترمال 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 لکینی فورمیس دارای اثر ضد میکروبی قابل توجهی روی باکتری‌های پاتوژن‌های منتقله از غذا داشت.

کلمات کلیدی:

باکتریوسین،

نگهدارنده زیستی،

پاتوژن‌های منتقله از غذا،

باسیلوس لکینی فورمیس.

DOI: 10.22034/FSCT.19.131.319

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.131.25.6

\* مسئول مکاتبات:

[m.rezazadehbari@urmia.ac.ir](mailto:m.rezazadehbari@urmia.ac.ir)

## ۱- مقدمه

محیط جامد یک منطقه‌ی رشد ایجاد می‌کند [۱۳ و ۱۴]. مقاومت آنتی بیوتیکی با توجه به مصرف بی‌رویه 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 ضد میکروبی 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 لکینی فورمیس ATCC 9789 و بررسی اثر ضد میکروبی 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 روش‌ها

## ۲-۱- مواد

باکتری باسیلوس لکینی فورمیس (ATCC 9789)، باکتری‌های بیماری‌زای منقله از مواد غذایی شامل *اشرشیا کلای* (PTCC 1553)، *استافیکوکوس 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 هیتون 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 پیپسین (EC 3.4.23.1) از شرکت سیگما آلد ریچ آمریکا خریداری گردید.

## ۲-۲- روش‌ها

## ۲-۲-۱- فعال سازی باکتری باسیلوس لکینی فورمیس

باکتریوسین‌ها گروهی از مولکول‌های کوچک پپتیدی منحصر بفرد هستند که توسط برخی باکتری‌ها تولید می‌شوند و به عنوان نگهدارنده زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱ و ۲]. 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 [۳-۷]. باکتریوسین‌ها دارای گروه‌های متفاوتی هستند. پپتیدهای کوچکی که تغییرات پس از همانندسازی زیادی را متحمل شده‌اند تا پپتیدهای فعالی مانند نسیسین<sup>۱</sup> تولید کنند که به عنوان باکتریوسین‌های دسته اول طبقه بندی می‌شوند [۸]. پپتیدهای فعال غشاء با پایداری حرارتی و وزن ملکولی اندک، در باکتریوسین‌های دسته دوم طبقه بندی می‌شوند. 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 لکینی فورمیس 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 [۱۰-۱۳]. 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 لکینی فورمیس تقریباً در ۸۰ درصد توالی کد کننده با گونه باسیلوس سوبتیلیس همسانی دارد. یک باسیلوس نسبتاً کوچک (با قطر حدود ۱ μm) است که می‌تواند به طور فعال روی پلتهای مرطوب آگار تجمع یابد و در کشت روی

شد. در این روش ماده ته نشین شده در ۱۰ برابر حجم خود بافر سدیم فسفات ۱۰ میلی مولار (pH ۶/۵) حل شد. سوسپانسیون حاصله در داخل کیسه دیالیز Da ۱۰۰۰ ریخته شد. هر دو طرف کیسه دیالیز توسط نخ بسته شد. بعد به مدت ۲۴ 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 ضد میکروبی ماده باقیمانده در داخل کیسه دیالیز مورد آزمایش قرار گرفت [۲۴-۲۱].

#### ۲-۲-۴-فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین

فعالیت ضد میکروبی با استفاده از میکروارگانسیم‌های نشانگر به روش رقیق سازی محیط کشت مایع انجام شد. به طور خلاصه، میکروارگانسیم‌های نشانگر ابتدا در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت برای باکتری‌ها و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت برای مخمر در محیط‌های کشت انتخابی استریل تا به دست آوردن غلظت نهایی  $10^7$  CFU.mL<sup>-1</sup> کشت شدند. همچنین محلول‌های حاوی باکتریوسین با رقت‌های مختلف در لوله‌های آزمایش تهیه شدند. پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت، رشد میکروارگانسیم‌ها با استفاده از اندازه‌گیری OD<sup>3</sup> در ۶۰۰ نانومتر توسط اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد. حداقل غلظتی که از رشد میکروارگانسیم‌ها جلوگیری کرد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC<sup>4</sup>) بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر از هر باکتریوسین تعیین شد. غلظت‌هایی که پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۶ ساعت در آنها رشد میکروبی صورت نگرفته بود، به عنوان حداقل غلظت باکتری کُشی (MBC<sup>5</sup>) بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید [۲۳].

#### ۲-۲-۵-اندازه‌گیری 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

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 ۲۴ 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 لکنینی فورمیس پس از فعال‌سازی در محیط کشت BHI، در محیط کشت نوترینت برات<sup>۲</sup> به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ۱۵۰ دور بر دقیقه کشت داده شد [۱۹ و ۲۰].

#### ۲-۲-۳-خالص‌سازی جزئی باکتریوسین

برای این منظور، پس از اتمام مدت زمان گرمخانه‌گذاری و با استفاده از سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در  $9072 \times g$  به مدت ۳۰ دقیقه بیومس از محیط کشت جداسازی شد. سپس محلول رویی به وسیله سیستم فیلتراسیون غشایی با فیلتر ۴۵/۰ میکرومولار استریل گردید و pH آن به وسیله هیدروکسید سدیم یا اسید هیدروکلریک 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 غلظت‌های ۴۰ تا ۷۰ درصد آن استفاده شد. بدین ترتیب که کریستال‌های آمونیوم سولفات در ۴ 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  $11200 \times g$  سانتریفیوژ شدند. سپس اثر ضد میکروبی 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 ضد میکروبی 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

3. Optical density

4. Minimum inhibitory concentration

5. Minimum bactericidal concentration

2. Nutrient broth

مختلف بررسی شد. سپس فعالیت باکتری‌کشی آن در برابر باکتری‌های شاخص، تعیین شد [۲۶-۲۸].

#### 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  $\text{cm}^{-1}$  ۴۰۰-۴۰۰۰ 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 ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) ریخته و پرس شد. سپس کروزه حاوی نمونه از دمای ۳۰ تا ۴۰۰ درجه سانتی گراد با سرعت گرمایش ۱۰ درجه سانتی گراد بر دقیقه در فضای نیتروژن، در مقابل یک کروزه  $\text{Al}_2\text{O}_3$  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 ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد ابتدا محیط کشت شده به مدت ۳۰ دقیقه در  $9.072 \times \text{g}$  آنها 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 ۱۲-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. در این آزمایش میزان قطر هاله عدم رشد به وجود آمده از فعالیت ضد میکروبی باسیلوس لکینی فورمیس در مقابل پاتوژن‌های منتقله از غذا بر حسب میلی متر و در سه تکرار اندازه گیری 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

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 ۶ درصد (pH ۶/۸) تهیه شده و داخل محفظه ریخته شد و شانه بر روی آن قرار می‌گیرد. بعد از انعقاد بافر ژل بالا شانه خارج شد و نمونه‌ها به داخل چاهک‌ها 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 می‌ماند 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 الکترو پُر شد. نمونه‌ها ابتدا در ولتاژ ۱۲۰ به مدت ۶۰ 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 ۶ 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].

#### ۲-۲-۶- آزمایش حساسیت باکتریوسین

به منظور تعیین اثر دما بر روی فعالیت باکتریوسین‌ها، باکتریوسین که تا اندازه‌ای خالص شده بود در دماهای مختلف ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درجه سانتی گراد 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، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد تحت تیمار قرار گرفت. سپس pH نمونه‌ها دوباره در pH خنثی تنظیم شده فعالیت ضد میکروبی آن‌ها بررسی گردید. برای بررسی اثر آنزیم، باکتریوسین که تا اندازه‌ای خالص شده بود به مدت ۲ ساعت با آنزیم تریپسین و پپسین در غلظت نهایی ۱ میلی گرم در میلی لیتر تحت تیمار قرار گرفت. همچنین اثر اشعه فرابنفش پس تیمار در زمان های

شدند. برای این آزمایش از مراحل ته نشین کردن با سولفات آمونیوم، دیالیز و الکتروفورز SDS-PAGE برای خالص سازی 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 می باشد. 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

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

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 می دارد. در نهایت بر روی ماده خالص سازی شده بعد از عمل دیالیز آزمایش ضد میکروبی انجام می گیرد. از مهمترین نتایج این مرحله می توان به این نکته اشاره کرد که در طی آزمایش های فعالیت ضد میکروبی که قبل از مرحله دیالیز انجام گرفته است مشخص شد که بعد از ۶-۸ ساعت اثر ضد میکروبی کاملاً مشهود بوده ولی بعد از گذشت زمان اثر آن کم کم ناپدید شده و جای آنرا میکروارگانسیم های حساس می گیرند. در صورتیکه بعد از انجام مراحل خالص سازی و دیالیز نه تنها بعد از ۶-۸ ساعت بلکه حتی بعد از ۱۲ ساعت نیز این اثر ضد میکروبی باقی می ماند.

### ۳-۱-۴- تعیین وزن مولکولی باکتریوسین

در این مرحله برای ارزیابی خلوص باکتریوسین های 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 نمونه های 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

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

### ۳-۱-۱- خالص سازی جزئی باکتریوسین ها

برای بدست آوردن پروتئین هایی با درجه خلوص بالا و حذف ناخالصی های مربوط به محیط کشت و سلول ها، عمل خالص سازی بر روی محلول رویی بدست آمده از کشت باسیلوس لکینی فورمیس انجام می گیرد. در این مرحله پروتئین هایی که دارای خاصیت ضد میکروبی بودند خالص سازی

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 غلظت ها هم در ماده ته نشین شده و هم در محلول رویی خاصیت ضد میکروبی دیده می شود. بطوریکه در غلظت ۴۰٪ سولفات آمونیوم، خاصیت ضد میکروبی ظاهر شده (برحسب اندازه قطر هاله عدم رشد) بالا می باشد. 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 می گیرد. افزایش حجم داخل کیسه دیالیز بعد از انجام عمل دیالیز ثابت می کند 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

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 آمونیوم 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 برابر حرارت 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

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].

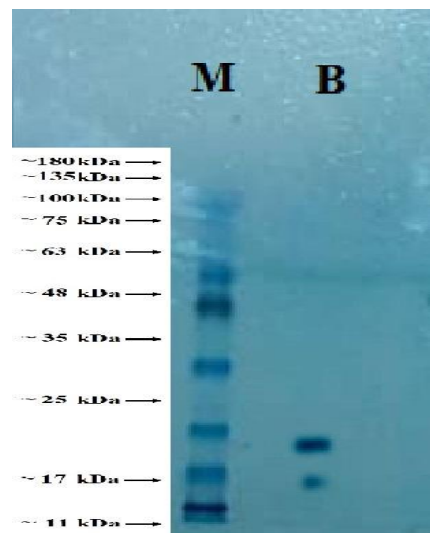


Fig 1 The result of SDS-Page test and staining with Coomassie Blue on the gel

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 کیلو دالتون 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 پاتوژن‌های منتقله از غذا، آماده سازی محیط کشت برای انجام آزمایش دیسک، انجام عمل تلقیح پاتوژن‌های 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

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	+	+	+

تولیدی حساس تر بودند، نتایج مشابهی با نیاسین، باکتریوسین RC20975، باکتریوسین R1333 و غیره [۷]. مهم تر از همه این باکتریوسین‌های تولید شده، برای 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].

### ۳-۳- تعیین فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین در

#### برابر باکتری های بیماری زا

فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین تولیدی در جدول ۴ 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 باکتریوسین

**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 ( $\mu\text{g/mL}$ )	16	16	8
MBC ( $\mu\text{g/mL}$ )	32	32	16

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

### ۳-۴- اثر تیمار اشعه ماورای بنفش (UV) بر

#### فعالیت باکتریوسین تولیدی

**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	+	+	+

های ترپسین و پپسین بررسی شد که این آنزیم ها باعث از بین رفتن فعالیت ضد میکروبی آن شدند. این یافته تاکید 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.

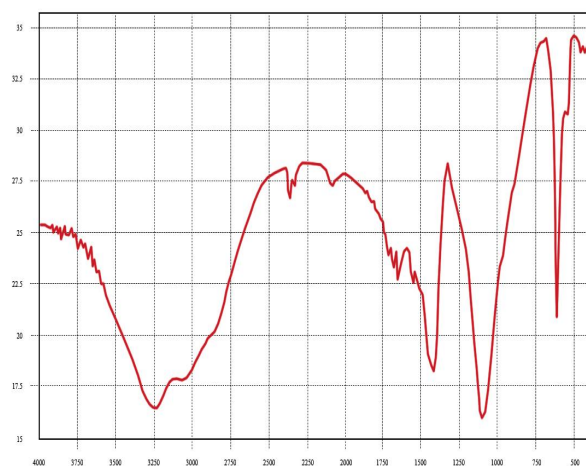
نتایج جدول ۵ نشان داد که باکتریوسین تولید شده توسط سویه باسیلوس لکینی فورمیس، در زمان های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه در برابر اشعه UV به طور کامل مقاوم است.

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

بدین منظور حساسیت باکتریوسین تولید شده نسبت به آنزیم

**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	-	-	-

**Fig 5** FTIR spectrogram of produced bacteriocin

### ۳-۷- ارزیابی ویژگی های دمایی باکتریوسین

تجزیه و تحلیل DSC برای بررسی تغییرات اندوترمال و اگزوترمالی با افزایش دما مورد استفاده قرار گرفت [۱۵ و ۲۳]. در این مطالعه، ترموگرافی DSC برای باکتریوسین تولیدی دو پیک اگزوترم نشان داد که نشان دهنده دمای ذوب می باشد. پیک های اگزوترمال به ترتیب ۱۹۰ و ۳۲۵ درجه سانتی گراد بود (شکل ۶).

### ۳-۶- ارزیابی گروه های 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  $\text{cm}^{-1}$  ۳۲۵۰ نشان دهنده گروه عاملی آمین (NH) بود [29]. Amiri و همکاران در سال (2021)، اظهار داشتند که پیک شدید در  $\text{cm}^{-1}$  ۳۶۰۰-۳۰۰۰ نشان می دهد پیوند کشش گروه عاملی آمین (NH) است. علاوه بر این آنها اظهار داشتند که پیک های بین  $\text{cm}^{-1}$  ۳۲۰۰ تا ۳۵۰۰ نشان دهنده حضور گروه آمید است. باکتریوسین تولیدی دارای یک پیک در  $\text{cm}^{-1}$  ۱۷۰۰ بود، که به دلیل ارتعاش پیوند C=O (کربنیل) در آمید نوع I است. باکتریوسین در منطقه  $\text{cm}^{-1}$  ۱۴۰۰ پیک داشت که به آمید نوع دوم نسبت داده می شود. پیک قوی در  $\text{cm}^{-1}$  ۱۱۰۰، مربوط به پیوند فسفودی استر (P=O) می باشد [۲۹].



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.,

بنابراین، این باکتریوسین دارای پایداری حرارتی بالایی است.

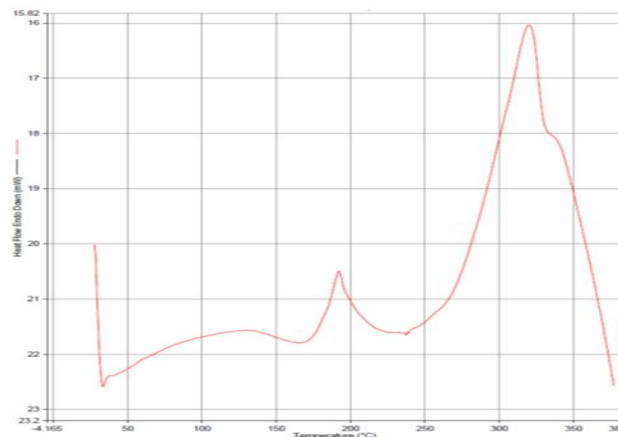


Fig 6 Thermogram obtained from DSC test

#### ۴- نتیجه گیری کلی

تعداد کمی از گونه‌های جنس باسیلوس تولید باکتریوسین می‌کنند. با توجه به اهمیت این پپتیدهای ضد میکروبی 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 راه‌گشای تحقیقات وسیع در استفاده از این مواد زیست فعال بیولوژیک باشند. در این پژوهش توانایی باکتری باسیلوس لکینی فورمیس در تولید باکتریوسین به عنوان پپتیدهای زیست فعال با اثر ضد میکروبی بررسی شد. پس از خالص‌سازی 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 ممانعت‌کنندگی رشد در برابر پاتوژن‌های منتقله از غذا نشان داد، به عنوان افزودنی و نگهدارنده می‌تواند در صنایع غذایی به کار می‌روند.

#### ۵- منابع

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

- 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 peptides 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., & Pirsā, 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

- 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



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

Khalili, A. <sup>1</sup>, Rezazadeh Bari, M. <sup>2\*</sup>, Tackallou, S. H. <sup>3</sup>, Amiri, S. <sup>4</sup>

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](mailto: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.