Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:27 IRST on Tuesday February 19th 2019

شناسایی و جداسازی ژن کدکننده یک انتروسین از سویه های انتروکوکوس فاسیوم (Enterococcus faecium) جداسازی شده از شیره بلوط

صدیقه فلامرزی منفرد[۱]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[۱*]، احمد اسماعیلی[۱]

۱) گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۷ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۳**

چکیده

مقدمه: باکتری های اسیدلاکتیک(LAB)، گروهی از باکتری های گرم مثبت، بدون اسپور، کروی یا میله ای شکل و کاتالاز منفی هستند که عموماً به عنوان ارگانیسم های ایمن در نظر گرفته می شوند. این باکتری ها دارای توانایی تولید تغییرات مطلوب در طعم و بافت غذا می باشند. انتروکوک ها باکتری های اسیدلاکتیکی با توانایی تولید پپتیدهای ضدمیکروبی(باکتریوسین ها) می باشند.

مواد و روش ها: به منظور، شناسایی و جداسازی ژن کدکننده و پپتید مربوطه از سویه های انتروکوکوس فاسیوم شیره بلوط، یک مطالعه ای تجربی صورت گرفت. برای این منظور، استخراج DNA از باکتری انتروکوکوس فاسیوم سویه LUB950217 صورت گرفت. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای هرز انجام گرفت و پس از خالص سازی محصول PCR، توالی سنجی صورت گرفت. آنالیزهای بیوانفورمانیکی صورت گرفت و توالی پروتئین مدل سازی شد.

یافته های پژوهش: پس از انجام توالی یابی و مقایسه هم ردیفی، پپتیدی با ۳۶ اسیدآمینه و وزن مولکولی ۴۶۵۸/۲۸ دالتون شناسایی شد. میزان شباهت این پپتید با باکتریوسین های شناخته شده از ۱۰۰-۸۶ متغیر بود. پپتید شناسایی شده به شدت کاتیونی(۲/۲ در pH=۷) بود.

بحث و نتیجه گیری: انتروسین مربوط به انتروکوکوس فاسیوم سویه LUB950217 دارای طیف مهارکنندگی رشد بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی می باشد. بنا بر این این سویه از باکتری پتانسیل بالایی جهت بررسی و استفاده به عنوان، نگه دارنده های زیستی در صنایع غذایی و خوراک دام دارد. به علاوه، جداسازی، همسانه سازی و بیان ژن کدکننده این پپتید در گیاهان زراعی ممکن است بتواند گیاهان را به بیماری های قارچی و میکروبی مقاوم کند.

واژه های کلیدی: انتروکوکوس فاسیوم، PCR، باکتریوسین، انتروسین A

* نویسنده مسئول: گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

Email: Nazarian.f@lu.ac.ir

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:27 IRST on Tuesday February 19th 2019

مقدمه

انتروکوک ها(Enterococcus) همانند سایر باکتری های اسیدلاکتیک دیگر، باکتری هایی گرم مثبت و کاتالاز منفی هستند. این باکتری ها کوکسی هایی بی هوازی، بدون اسپور و فاقد کپسول می باشند(۱،۲) که در رنگ آمیزی گرم به شکل گرد یا بیضی با آرایش های دوتایی یا زنجیره ای کوتاه دیده می شوند(۳،۴). انتروکوکسی ها به طور وسیع در همه شرایط و معمولاً در دستگاه گوارش انسان یا سایر حیوانات و گیاهان ساکن هستند(۵). در جنس انتروکوکوس بیش از ۲۰ گونه شناسایی شده است که دو گونه انتروکوکوس فکالیس(E. faecalis) و انتروکوکوس فاسیوم(E. faecium) از جمله مهم ترین آن ها هستند. اگر چه انتروکوکوس فکالیس سویه غالب دستگاه گوارش انسان است(۶،۷)، با این حال، در برخی افراد و هم چنین برخی کشورها، انتروکوکوس فاسیوم فراوانی بیشتری دارد(۸). شایع ترین انتروکوک های دخیل در عفونت های انسانی انتروکوکوس فکالیس(۹۰-۸۹ درصد) و فاسیوم(۱۰-۵ درصد) هستند که باعث عفونت های سیستم ادراری، زخم ها و آندوکاردیت می شوند. این باکتری ها در گذشته از لحاظ بالینی کم اهمیت تلقی می شدند، اما امروزه به دلیل کسب مقاومت اکتسابی به چندین آنتی بیوتیک مهم بالینی مانند ونکومایسین، به عنوان دومین عامل شایع عفونت های بیمارستانی مطرح شده اند(۹).

انتروکوکسی ها توانایی تولید باکتریوسین هایی(Bacteriocin) به نام اختصاصی انتروسین را دارند. باکتریوسین ها، پپتیدهای کوچکی با فعالیت ضد میکروبی در برابر پاتوژن های مختلف هستند. این پپتیدهای کوچک با ایجاد منافذی در غشا پلاسمایی میکروارگانیسم های هدف، قادرند آن ها را نابود کنند(۱۰،۱۱). در طی یک دهه گذشته، تحقیقات متعدد نشان داده است که باکتریوسین ها قادرند باکتری های گرم منفی مانند اشرشیاکلی و سالمونلا را از بین ببرند(۱۲،۱۳). این باکتری ها در برابر کمپیلوباکتر ژژونی(Campylobacter jejuni) به‌عنوان عامل عمده اسهال و استفراغ در سراسر جهان نیز فعالیت دارند(۱۴). به علاوه؛ باکتریوسین ها از تکثیر دوباره برخی از ویروس ها جلوگیری می کنند(۱۲،۱۵،۱۶).

استفاده از کشت های آغاز کننده ایی(Starter cultures) با قابلیت تولید باکتریوسین ها، یک مسئله حائز اهمیت در صنایع لبنی و غذایی است. به عنوان مثال، باکتریوسین ها می توانند ابزاری برای بهبود امنیت و کیفیت غذاهای تخمیری باشند و به صورت یک ماده افزودنی در مواد غذایی، از رشد باکتری های بیماری زا و اسپورهای آن ها جلوگیری کنند(۸). به دلیل فعالیت این ترکیبات علیه پاتوژن های قابل انتقال از طریق مواد غذایی و نیز تقاضای مصرف کنندگان برای حفاظت طبیعی بیشتر، مطالعات فراوانی روی باکتریوسین ها به عنوان نگه دارنده های زیستی در مواد غذایی صورت گرفته است(۱۷).

انتروسین ها عمدتاً توسط انتروکوکوس فاسیوم، انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس موندتی تولید و به بیرون از محیط غشاء ترشح می شوند. از جمله مهم ترین این انتروسین ها می توان به: انتروسین های A، P، CRL35، B و 1071A، موندتیسین و انترولیزین A اشاره کرد(۱۸). علی رغم موثر بودن انتروسین ها علیه باکتری های پاتوژن و نیز باکتری های آلوده کننده مواد غذایی هم چون گونه های لیستریا، استافیلوکوکوس، باسیلوس، کلستریدیوم و اشرشیاکلی در مواد غذایی متعدد(۱۹)، اطلاعات بسیار کمی درباره نقش این باکتریوسین ها در اکوسیستم حیوانات در دسترس می باشد(۲۰).

سالانه بخش عمده ای از محصولات کشاورزی براثر فعالیت آفات و بیماری های گیاهی از بین می روند(۳۱). طبق مطالعات علمی انجام شده، حفاظت گیاهان علیه این پاتوژن ها توسط ترکیبات مسی و آنتی بیوتیکی مقدور می باشد. اکثر ترکیبات شیمیایی ضمن آلودگی محیط زیست، به سلامت انسان و مواد غذایی آسیب می رسانند. یکی از راه های مبارزه با میکروارکانیسم های بیماری زا، استفاده از باکتری های مفید ولی با توانایی تولید پپتیدهای ضد میکروبی از جمله باکتریوسین ها است. باکتریوسین ها با ناپایدار نمودن کامل پوشش غشای درونی میکروب و یا از طریق مکانیسم های تهاجمی دیگر همانند؛ اختلال در

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:27 IRST on Tuesday February 19th 2019

سنتز پروتئین های ضروری سلول های هدف، باعث نابودی و در نهایت مرگ سلولی می شوند. به طور مثال، باکتریوسین LasharDGH2 یک مهارکننده سویه های بیمارگر زانتوموناس(Xanthomonas citri subsp)(عامل بیماری شانکر مرکبات در ایران و سایر نقاط جهان) می باشد. این باکتریوسین بدون داشتن مشکلات زیست محیطی و آلودگی های مربوط به مواد شیمیایی قادر است این بیماری را کنترل کند(۳۳).

باکتریوسین ها دارای گروه ها و خواص کنترل کنندگی متفاوتی هستند. به همین دلیل، در سال های اخیر مطالعات گسترده ای برای یافتن باکتریوسین های جدید از سویه های مختلف باکتری های اسیدلاکتیک صورت گرفته است. مطالعات در این راستا می تواند به شناسایی باکتریوسین های جدیدی منجر شود که با شناسایی و جداسازی ژن های کدکننده آن ها می توان آن ها را به گیاهان منتقل نمود و ارقام تراریخت مقاوم به بیماری ها را تولید کرد. به علاوه، باکتریوسین های جدید و با توانایی های بیشتر می توانند در کنترل عوامل بیماری زای انسان و دام نیز مفید باشند. هدف از این پژوهش شناسایی و جداسازی ژن های کدکننده باکتریوسین ها از سویه های انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از شیره بلوط بود(۲۲).

مواد و روش ها

کشت و نوع باکتری: از محیط اختصاصی MRS (pH=۷) برای کشت و جداسازی باکتری های اسیدلاکتیک به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد(۲۱). از باکتری انتروکوکوس فاسیوم سویه جداسازی شده از شیره بلوط با شماره ثبت LUB950217 در این مطالعه استفاده شد(۲۲).

استخراج DNA: برای استخراج DNA از باکتری انتروکوکوس فاسیوم، از لیزوزیم(۴ میلی گرم در میلی لیتر) و روش آرجو با اندکی تغییر استفاده شد(۲۳). به طور خلاصه، مقدار ۲ میلی لیتر از کشت باکتری به میکروتیوپ های ۲ میلی لیتری انتقال یافت و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری ها، ۳ بار با بافر TEN (۱۰۰ میلی مولار Tris-HCl، ۱۵ میلی مولار NaCl، ۱۰۰ میلی مولار EDTA) و هر بار در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شد. به رسوب حاصل، بافری متشکل از ۲۰۰ میکرولیتر بافر TEN و ۴ میلی گرم در میلی لیتر لیزوزیم اضافه شد و به دنبال آن انکوباسیون به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد صورت گرفت. سپس ۵۰ میکرولیتر محلول ۸/۵ درصد سدیم دو دسیل سولفات(SDS) اضافه گردید و انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۷۵ درجه سانتی گراد صورت گرفت. مقدار ۱۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم(۵ مولار) با pH=۵/۲ روی یخ به نمونه ها اضافه شد و نمونه ها ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. روشناور جدا شد و برای جداسازی DNA از پروتئین ها از مخلوط فنل: کلروفرم: ایزو آمیل الکل(۲۴:۲۵:۱) استفاده شد. در مرحله رسوب دهی DNA، ایزوپروپانل سرد مورد استفاده قرار گرفت و در مرحله آخر، برای شستشوی DNA، از اتانول ۷۰ درصد استفاده شد. رسوب های DNA در دمای اتاق خشک شدند و سپس در ۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل حل شدند. جهت بررسی کیفیت DNA از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و بررسی OD280/260 استفاده شد.

تکثیر ناحیه کدکننده پپتید و توالی یابی: جهت تکثیر ناحیه کدکننده پپتید، از آغازگرهای اختصاصی ژن های انتروسین و واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) استفاده شد. با اعمال تغییراتی در اجزای واکنش PCR، تغییر زمان ها، دمای اتصال آغازگرها، تغییر تعداد سیکل ها و غیره شرایط واکنش PCR برای تکثیر انتروسین بهینه سازی شد. واکنش PCR متشکل از ۲ میکرولیتر DNA الگو(۵۰ نانو گرم در میکرولیتر)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (1×)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۵ پیکومول) و ۲ میکرولیتر آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ پیکومول) و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (۵ واحد در میکرولیتر) در حجم ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت. دناتوره سازی اولیه DNA الگو در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت و در ادامه واکنش تکثیر DNA در ۳۰ سیکل به صورت: دناتوره شدن(۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه)، اتصال آغازگر(۵۸ درجه

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:27 IRST on Tuesday February 19th 2019

سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه)، گسترش آغازگر(۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه) و دناتوره شدن نهایی(۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه) صورت گرفت. محصول PCR با استفاده از کیت جداسازی DNA از ژل(USA، Fermentas) خالص سازی شد. سپس محصول PCR در ناقل همسانه سازی TA همسان سازی و با استفاده از توالی یابی سانگر، توالی یابی گردید. توالی حاصل، با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و میزان قرابت آن با پپتیدهای همولوگ مورد ارزیابی قرار گرفت.

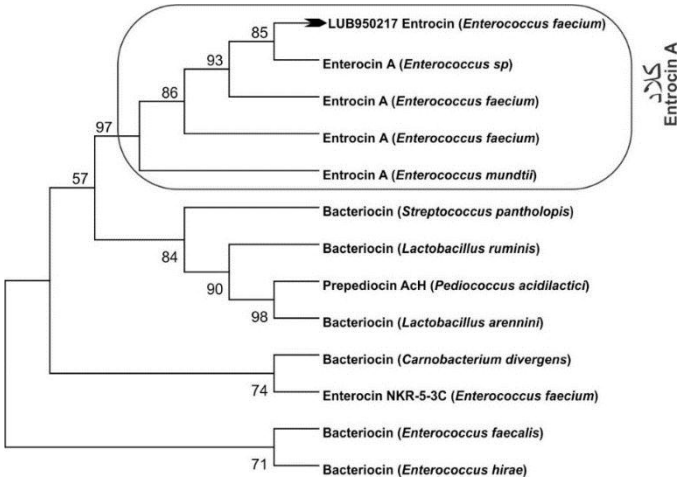
آنالیزهای بیوانفورماتیکی: پپتید مربوط به این مطالعه با پپتیدهای پایگاه تخصصی پپتیدهای میکروبی مقایسه شد. اطلاعاتی از پپتید از جمله وزن مولکولی، فرمول مولکولی و تعداد اسیدآمینه های تشکیل دهنده ساختار آن مشخص شد. هم چنین، ساختار تشکیل دهنده پپتید با مهم ترین انتروسین های ثبت شده در پایگاه داده مقایسه شد. با استفاده از نرم افزار Phyre، ساختار سه بعدی پپتید پیش بینی شد. مناطق حفاظت شده و موتیف های مهم با استفاده از پایگاه تخصصی MeMe شناسایی و با موتیف پپتیدهای هم خانواده مقایسه شدند. درخت فیلوژنی به روش حداکثر درست نمایی(Maximum Parsimony) با استفاده از نرم افزار MEGA 7 و با استفاده از ۱۲ توالی همولوگ و با بوت استرپ ۱۰۰۰ ترسیم گردید(۲۴).

یافته های پژوهش

مطالعه تجربی حاضر با هدف جداسازی و بررسی انتروسین های احتمالی در ایزوله های انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از شیره بلوط صورت گرفت. در تحقیق قبلی دو سویه انتروکوکوس فاسیوم از شیره بلوط جداسازی و شناسایی شده بودند که دارای توانایی تولید گاز CO_2 از گلوکز(KX185054) و دیگری ناتوان در تولید گاز(KX185055) CO_2 بودند(۲۲). نتایج مربوطه نشان داد که دو سویه انتروکوکوس فاسیوم جداسازی شده از بلوط می توانند کاندید مناسبی برای بررسی های بیشتر به عنوان پروبیوتیک و کنترل بیولوژیکی پاتوژن های بیماری زا باشند.

بررسی فیلوژنتیکی توالی ژن کدکننده و پپتید مربوطه: توالی ژن کدکننده انتروسین مربوط به باکتری LUB950217 با توالی های پپتیدی ثبت شده موجود در پایگاه های داده با استفاده از نرم افزار بلاست(BLAST) بانک ژن مقایسه گردید. سپس تعداد ۱۲ توالی همولوگ انتخاب و همراه با توالی کدکننده پپتید مربوط به سویه LUB950217 با استفاده از نرم افزار CLUSTAL-OMEGA هم ردیفی شدند و با استفاده از نرم افزار MEGA 7 و به کمک روش Maximum Parsimony درخت فیلوژنی آن ها ترسیم شد(۲۵). همان طوری که مشاهده می شود، پپتید مربوط به سویه LUB950217 با میزان تشابه بالایی(بوت استرپ بالاتر از ۷۰ درصد) نسبت به سایر انتروسین ها در کلادی انتروسین های A قرار گرفت(شکل شماره ۱). این پپتید با انتروسین A سایر انتروکوکوس ها به ویژه انتروسین مربوط به گونه فاسیوم در یک کلاد اصلی قرار گرفت. با این حال، میزان شباهت پپتید حاصل با این انتروسین ها از ۸۶ تا ۱۰۰ درصد متفاوت بود.

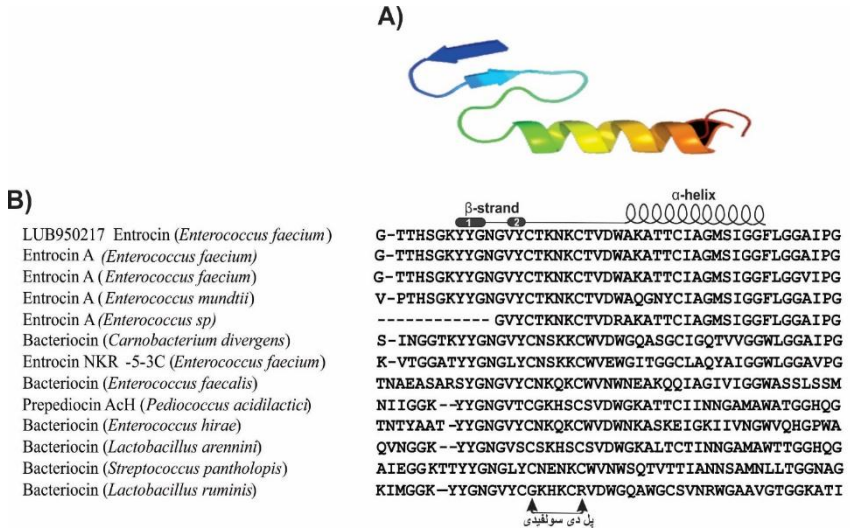
Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:27 IRST on Tuesday February 19th 2019



شکل شماره ۱. درخت فیلوژنی مبتنی بر تعدادی از انتروسین ها و سایر باکتریوسین ها با مشابهت ۱۰۰-۸۶ با انتروسین LUB950217. توالی پپتیدهای مورد نظر از پایگاه های داده پپتید استخراج شده اند. اعداد واقع در گره کلادها، نمایانگر ارزش bootstarp (٪) می باشند.

بررسی ساختار پپتید: بررسی های بیشتر در مورد ساختار پپتید مربوط به سویه LUB950217 و مقایسه آن با ساختار پپتیدهای همولوگ آن نشان داد که همسو با نتایج درخت فیلوژنی(شکل شماره ۱)، این پپتید یک انتروسین است. توالی پپتید مربوط به سویه LUB950217 با توالی باکتریوسین های موجود در پایگاه اختصاصی پپتیدها(BACTIBASE) هم ردیف و مقایسه شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که پپتید این تحقیق همانند سایر پپتیدهای شناخته شده، از تعدادی اسید آمینه بسیار حفظ شده تشکیل شده است.

در ساختار این پپتید، تعداد یک عدد مارپیچ الفا(α-helix) و دو رشته بتا(β-strand) دیده می شود(شکل شماره ۲). هر دو رشته بتا پشت سرهم و در سر آمینی(N-terminal) قرار دارند، اما تنها مارپیچ الفا در نزدیکی سر کربوکسیکی(C-terminal) پپتید قرار دارد. همان طوری که مشاهده می شود، این پپتید می تواند در ساختار فعال خود یک پل دی سولفیدی بین سیستئین های شماره ۱۵ و ۲۰ تشکیل دهد و از این رو، دو رشته بتا شماره ۱ و ۲ را به هم متصل نماید(شکل شماره ۲).



شکل شماره ۲. ساختار سه بعدی و توالی هم ردیف شده پپتید LUB950217 همراه با توالی پپتیدی ۱۲ باکتریوسین دیگر. (A) ساختار 3D توسط نرم افزار Phyre2 با توجه به توالی هولوگ c1og7A_ به عنوان الگو پیشنهاد شده است. (B) هم ردیفی چندگانه توسط نرم افزار Clustal-Omega ترسیم شد و توالی ها به صورت دستی مرتب شده اند.

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:27 IRST on Tuesday February 19th 2019

بحث و نتیجه‌گیری

افزایش بیماری ها و مسمومیت های ناشی از مواد غذایی به همراه مشکلات اقتصادی و اجتماعی حاصل از آن ها، سبب گسترش مطالعات در زمینه تولید غذای سالم و به کارگیری ترکیبات ضدمیکروبی جدید شده است. این ترکیبات پتانسیل بسیار بالایی برای کاربرد در صنایع غذایی و پزشکی دارند. شناسایی پپتیدهای ضدمیکروبی جدید، در درک فرآیند سیستم های زیستی موثر در ایمنی نقش مهمی دارد(۲۶). موسوی و همکاران(۱۳۹۵) نشـــان دادند که باکتـــــری های انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از شیره بلوط دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه باکتری های بیمارگر گیاهی خال زدگی باکتـــــریایی گـــوجه فرنگی (Pseudomonas syringae pv. tomato) و پژمردگی باکـــتریـــــایی لوبیا(Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens) هستند. بر این اساس و با توجه به این که بخشی از توان ضد باکتریایی این قبـــیل باکتری ها به پپتیدهای ترشحی آن ها ارتباط دارد، مبادرت به شناسایی و جداسازی پپتیدی در باکـــتری انـــتروکوکوس فاسیوم سویه LUB950217 شد. پپتید شناسایی شده به شدت کاتیونی بود و به نظر می رسد که بتواند در غشاء پلاسمایی سایر میکـــروارگانیسم ها اختلال ایجاد کند(۲۷). مطالعات میکـــروسکوپ الـــکترونی تاثیر این پپتیدها روی برخی از باکتری ها، نشان داد که دیواره سلولی باکتری های بیماری زا به شدت آسیب دیده اند(۲۲). مطالعات نشان می دهند که بسیاری از باکتری ها، به ویژه باکتری های اسید لاکتیک، بیش از یک نوع باکتریوسین تولید می کنند(۲۰،۲۸). به عنوان مثال، باکتری انتروکوکوس فاسیوم سویه L50، سه نوع متـــفاوت انتروسین به نام های LP50، P و Q تولید می کند(۲۹). با این حال، تنها یک پپتید در این مطالعه شناسایی شد، و لازم است مطالعات دیگری برای شناسایی سایر پپتیدهای احتمالی در این سویه صورت بگیرد. پپتید LUB950217، همانند سایر پپتیدهای خانـــواده انتروسین های A، به ویژه پپتید معروف AS-48 مربوط به انتروکوکوس فکالیس، دارای نقطه ایزوالکتریک(PI) نزدیـــک به ۹ بود. نزدیـــکی نقطه ایزوالکتریک یک پپتید به ۱۰ و شباهت قابل توجه آن به پپتید AS-48 نشان می دهد که این پپتید احتمالاً یک پپتید حلقوی باشد(۳۰). بنا بر این، با توجه به حلقوی بودن پپتید LUB950217 و مکانسیم موثر حمله به سایر پاتوژن ها و هم چنین ثبات قابل توجه پپتید LUB950217 این پپتید نامزد خوبی به عنوان پپتیدهای محافظ مواد غذایی طبیعی است و احتمالاً در پیشگیری از مسمومیت های غذایی موثر باشد. به علاوه، بیان این پپتید در سلول هـــای گیاهی و تولید گیاهان تراریخت، ممکن اســت بتـــواند سبـــب مقاومت گیاهان زراعی به برخی از باکتری های بیمارگر شود.

References

1. Gomes BC, Esteves CT, Palazzo IC, Darini ALC, Felis GE, Sechi LA, et al. Prevalence and characterization of Enterococcus spp. isolated from Brazilian foods. Food Microbiol2008;25:668-75. doi.org/10.1016/j.fm.2008.03.008.
2. Devriese LA, Pot B, Damme L, Kersters K, Haesebrouck F. Identification of Enterococcus species isolated from foods of animal origin. Int J Food Microbiol 1995;26:187-97. doi.org/10.1016/0168-1605(94)00119-Q.
3. Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. Enterococci in foods a conundrum for food safety. Int J Food Microbiol2003;88:105-22. doi.org/10.1016/S0168-605(03)00174-0.
4. Cousins D, Skuce R, Kazwala R, Van Embden J. Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of Mycobacterium bovis. Int J Tubercul Lung Dis 1998;2:471–8.
5. Chen H, Hoover D. Bacteriocins and their food applications. Comp Rev Food Sci Foo Saf2003;2:82-100. doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x.

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:27 IRST on Tuesday February 19th 2019

6. Gelsomino R, Vancanneyt M, Cogan TM, Swings J. Effect of raw milk cheese consumption on the enterococcal flora of human feces. Appl Environ Microbiol 2003;69:312-9. doi.org/10.1128/AEM.69.1.312-319.2003.

7. Manero A, Vilanova X, Cerdacuellar M, Blanch AR. Characterization of sewage waters by biochemical fingerprinting of Enterococci. Water Res 2002;36:2831-5. https://doi.org/10.1016/S0043-354(01)00486-9.

8. Guinane C, Cotter P, Hill C, Ross R. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. J Appl Microbiol 2005;98:1316-25. doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02552.x.

9. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin resistant enterococci. Clin Microbiol Rev2000;13:686-707.

10. Zacharof M, Lovitt R. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. APCBEE Proce2012;2:50-6. doi.org/10.1016/S0022-143(97)90054-8.

11. Abee T. Pore forming bacteriocins of gram positive bacteria and self protection mechanisms of producer organisms. FEMS Microbiol Letters1995;129:1-9. doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07548.x.

12. Todorov S, Dicks L. Lactobacillus plantarum isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. Enzyme Microbial Technol 2005;36:318-26. doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.09.009.

13. Gong H, Meng X, Wang H. Plantaricin MG active against gram negative bacteria produced by Lactobacillus plantarum KLDS1. 0391 isolated from Jiaoke a traditional fermented cream from China. Food Cont 2010;21:89-96. doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.04.005.

14. Messaoudi S, Madi A, Prevost H, Feuilloley M, Manai M, Dousset X, et al. In vitro evaluation of the probiotic potential of Lactobacillus salivarius SMXD51. Anaerobe2012;18:584-9 doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.10.004.

15. Todorov S, Botes M, Guigas C, Schillinger U, Wiid I, Wachsman M, et al. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. J Appl Microbiol 2008;104:465-77. doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03558.x.

16. Wachsman MB, Castilla V, Ruizholgado AP, Torres RA, Sesma F, Coto CE. Entrocin CRL35 inhibits late stages of HSV-1 and HSV-2 replication in vitro. Antiviral Res2003;58:17-24. doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00099-2.

17. Strompfova V, Laukova A, Simonova M, Marcinakova M. Occurrence of the structural entrocin A, P and B, L50B genes in enterococci of different origin. Vet Microbiol2008;132:293-301. doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.05.001.

18. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev1993;12:39-85. doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x

19. Laukova A, Vlaemynck G, Czikkova S. Effect of entrocin CCM 4231 onListeria monocytogenes in saint paulin cheese. Folia Microbiol2001;46:157-60.

20. Franz CM, Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H, Galvez A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. FEMS Microbiol Rev2007;31:293-310. doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x.

21. Deman J, Rogosa d, Sharpe ME. A medium for the cultivation of lactobacilli. J Appl Bacteriol1960;23:130-5. doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x.

22. Mousavi E, Nazarianfirouzabadi F, Ismaili A. [Antibiogram analysis and detection of pathogenicity genes in two strains of Enterococcus faecium isolates from Oak Sap (Quercus brantii var. Persica)]. J Mazandaran Uni Med Sci2017;26(146):31-46. (Persian)

23. Araujo WL, Marcon J, Maccheroni W, van Elsas JD, van Vuurde JW, Azevedo JL. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with Xylella fastidiosa in citrus plants. Applied Environ Microbiol2002;68:4906-14.

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:27 IRST on Tuesday February 19th 2019

doi.org/10.1128/AEM.68.10.4906-4914.2002.

24. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies an approach using the bootstrap. Evolution 1985:783-91. doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.

25. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast scalable generation of high quality protein multiple sequence alignments using Clustal omega. Mole sys Biolo2011;7:539. doi.org/10.1038/msb.2011.75

26. Pometto A, Shetty K, Paliyath G, Levin RE. Food biotechnology. 2 th ed. CRC Publication. 2005;P.231.

27. Islam MZ, Ariyama H, Alam JM, Yamazaki M. Entry of cell penetrating peptide transportan 10 into a single vesicle by translocating across lipid membrane and its induced pores. Biochemistry2014;53:386-96. doi.org/10.1021/bi401406p.

28. Eijsink VG, Axelsson L, Diep DB, Havarstein LS, Holo H, Nes IF. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. Antonie Van Leeuwenhoek2002;81:639-54 .

29. Cintas LM, Casaus P, Herranz C, Havarstein LS, Holo H, Hernandez PE, et al. Biochemical and genetic evidence that Enterococcus faecium L50 produces entrocins L50A and L50B, thesec-dependent entrocin P and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed entrocin Q. J Bacteriol2000;182:6806-14. doi.org/10.1128/JB.182.23.6806-6814.2000.

30. Grandeburgos MJ, Pulido RP, Carmenlopez M, Galvez A, Lucas R. The cyclic antibacterial peptide entrocin AS-48: isolation, mode of action, and possible food applications. Int J Mole sci 2014;15:22706-27. doi.org/10.3390/ijms151222706.

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 3:27 IRST on Tuesday February 19th 2019

Identification and Isolation of an Enterocin Encoding Gene from an Enterococcus faecium Strain LUB950217 Isolated from Oak Tree Sap

Flamarzimonfared S[1], Nazarianfirouzabadi F[1], Ismaili A[1]*

(Received: December 27, 2016 Accepted: October 25, 2017)

Abstract

Introduction: Lactic acid bacteria (LAB) are a group of gram-positive, non-spore forming, cocci or rod shaped, catalase-negative organisms, which are generally recognized as safe (GRAS). The LAB can cause changes in the food flavor and texture. Enterococci are a group of LAB capable of producing antimicrobial peptides.

Materials & Methods: This experimental study was conducted to identify and isolate genes encoding antimicrobial peptides from an E. faecium LUB950217 strains isolated from oak tree. In doing so, genomic DNA was extracted from E. faecium strains and polymerase chain reaction (PCR) analysis was performed using specific primers. Amplified PCR products were sequenced by Sanger sequencing. Bioinformatic analysis was carried out and the peptide was modeled.

Findings: Both DNA and protein Blast search confirmed that the PCR product encoded an antimicrobial peptide, known as LUB950217 enterocin with 36 amino acids of 4658.28 Da molecular mass. The isolated enterocin peptide had 86-100% similarity to other known enterocins in the peptide data bases. The LUB950217 enterocin was almost water insoluble and it was found to be cationic (2.2, pH=7).

Discussion & Conclusions: The LUB950217 enterocin seems to inhibit both gram-positive and gram-negative bacteria growth in vitro, suggesting LUB950217 enterocin can be used in food stuff and animal feed. Furthermore, isolation, cloning, and expression of this peptide may render resistance to fungi and bacteria pathogens in crop plants.

Keywords: Enterococcus faecium, PCR, Bacteriocin, Entrocin A

1. Dept of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
**Corresponding author Email: Nazarian.f@lu.ac.ir*