

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

صدیقه فلامرزی منفرد^۱، فرهاد نظریان فیروزآبادی^{۱*}، احمد اسماعیلی^۱

(۱) گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، فرم آباد، ایلام

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 ضد میکروبی (باکتریوسین ها) می باشند.

مواد و روش ها: به منظور، شناسایی و جداسازی ژن کدکننده و پپتید مربوطه از سویه های انتروکوکوس فاسیوم شیر 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 بیوانفورماتیکی صورت گرفت و توالی پروتئین مدل سازی شد.

یافته های پژوهش: پس از انجام توالی یابی و مقایسه هم ردیفی، پپتیدی با ۳۶ اسیدآمین 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 (pH=۷ در ۲/۲) 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.

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 انتروسیین 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 میکروارگانسیم 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) به عنوان 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 (۱۴،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).

انتروسیین ها عمدتاً توسط انتروکوکوس فاسیوم، انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس موندنی تولید و به بیرون از محیط غشاء ترشح می شوند. از جمله مهم ترین این انتروسیین ها می توان به: انتروسیین های A، P، CRL35، B و 1071A، موندتیسین و انترولیزین A اشاره کرد (۱۸). علی رغم موثر بودن انتروسیین ها علیه باکتری های پاتوژن و نیز باکتری های آلوده کننده مواد غذایی هم چون گونه های لیستریا، استافیلوکوکوس، باسیلوس، کلسترییدیوم 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 بر اثر فعالیت آفات و بیماری های گیاهی از بین می روند (۳۱). طبق مطالعات علمی انجام شده، حفاظت گیاهان علیه این پاتوژن ها توسط ترکیبات مسمی 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 میکروارگانسیم 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

سنتز پروتئین‌های ضروری سلول‌های هدف، باعث نابودی و در نهایت مرگ سلولی می‌شوند. به طور مثال، باکتریوسین LasharDGH2 یک مهارکننده سویه‌های بیمارگر زانتوموناس (*Xanthomonas citri* subsp) عامل بیماری شانکر مرکبات در ایران و سایر نقاط جهان) می‌باشد. این باکتریوسین بدون داشتن مشکلات زیست‌محیطی و آلودگی‌های مربوط به مواد شیمیایی قادر است این بیماری را کنترل کند (۳۳).

باکتریوسین‌ها دارای گروه‌ها و خواص کنترل‌کنندگی متفاوتی هستند. به همین دلیل، در سال‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای برای یافتن باکتریوسین‌های جدید از سویه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک صورت گرفته است. مطالعات در این راستا می‌تواند به شناسایی باکتریوسین‌های جدیدی منجر شود که با شناسایی و جداسازی ژن‌های کدکننده آن‌ها می‌توان آن‌ها را به گیاهان منتقل نمود و ارقام تراریخت مقاوم به بیماری‌ها را تولید کرد. به علاوه، باکتریوسین‌های جدید و با توانایی‌های بیشتر می‌توانند در کنترل عوامل بیماری‌زای انسان و دام نیز مفید باشند. هدف از این پژوهش شناسایی و جداسازی ژن‌های کدکننده باکتریوسین‌ها از سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از شیر بلوط بود (۲۲).

مواد و روش‌ها

کشت و نوع باکتری: از محیط اختصاصی MRS (pH=7) برای کشت و جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد (۲۱). از باکتری انتروکوکوس فاسیوم سویه جداسازی شده از شیر 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 آرگو با اندکی تغییر استفاده شد (۲۳). به طور خلاصه، مقدار ۲ میلی لیتر از کشت باکتری به میکروتیوپ‌های ۲ میلی لیتری انتقال یافت و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری‌ها، 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 سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس ۵۰ میکرولیتر محلول ۸/۵ درصد سدیم دو سدیل سولفات (SDS) اضافه گردید و انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۷۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. مقدار ۱۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم (۵ مولار) با pH=۵/۲ روی یخ به نمونه‌ها اضافه شد و نمونه‌ها ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. روش‌ناور جدا شد و برای جداسازی DNA از پروتئین‌ها از مخلوط فنل: کلروفرم: ایزو آمیل الکل (۱:۲۵:۲۴) 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. رسوب‌های 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 ژن‌های انتروسین و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استفاده شد. با اعمال تغییراتی در اجزای واکنش PCR، تغییر زمان‌ها، دمای اتصال آغازگرها، تغییر تعداد سیکل‌ها و غیره شرایط واکنش PCR برای تکثیر انتروسین بهینه‌سازی 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. دناتوره‌سازی اولیه DNA الگو در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت و در ادامه واکنش تکثیر DNA در ۳۰ سیکل به صورت: دناتوره شدن (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه)، اتصال آغازگر (۵۸ درجه

فاسیوم جدا شده از شیر به بلوط صورت گرفت. در تحقیق قبلی دو سویه انتروکوکوس فاسیوم از شیر به بلوط جداسازی و شناسایی شده بودند که دارای توانایی تولید گاز CO₂ از گلوکز (KX185054) و دیگری ناتوان در تولید گاز (KX185055) 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.

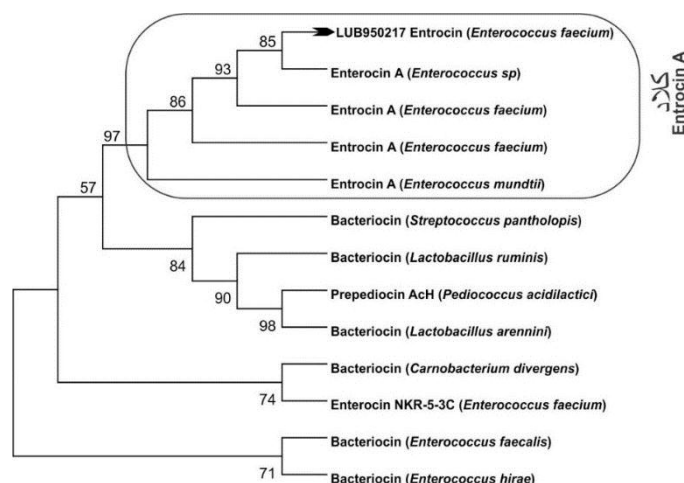
بررسی فیلوژنتیکی توالی ژن کدکننده و پیتید مربوطه: توالی ژن کدکننده انتروسین مربوط به باکتری LUB950217 با توالی های پیتیدی ثبت شده موجود در پایگاه های داده با استفاده از نرم افزار بلاست (BLAST) بانک ژن مقایسه گردید. سپس تعداد ۱۲ توالی همولوگ انتخاب و همراه با توالی کدکننده پیتید مربوط به سویه LUB950217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

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 پیتیدهای همولوگ مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیزهای بیوانفورماتیکی: پیتید مربوط به این مطالعه با پیتیدهای پایگاه تخصصی پیتیدهای میکروبی مقایسه شد. اطلاعاتی از پیتید از جمله وزن مولکولی، فرمول مولکولی و تعداد اسید آمینه های تشکیل دهنده ساختار آن مشخص شد. هم چنین، ساختار تشکیل دهنده پیتید با مهم ترین انتروسین های ثبت شده در پایگاه داده مقایسه شد. با استفاده از نرم افزار Phyre ساختار سه بعدی پیتید پیش بینی شد. مناطق حفاظت شده و موتیف های مهم با استفاده از پایگاه تخصصی MeMe شناسایی و با موتیف پیتیدهای 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

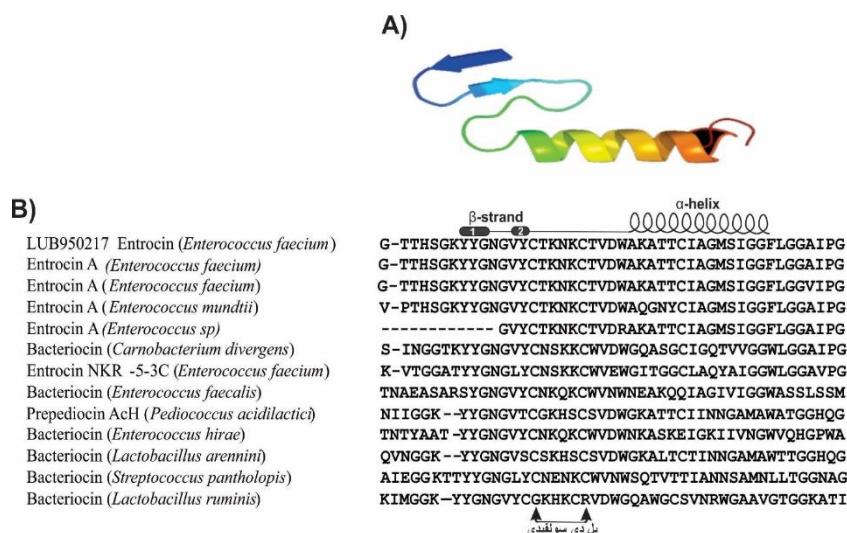
مطالعه تجربی حاضر با هدف جداسازی و بررسی انتروسین های احتمالی در ایزوله های انتروکوکوس



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 bootstrap (%) می باشند.

در ساختار این پپتید، تعداد یک عدد مارپیچ الفای (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 الفای 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 سیستمین 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).

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.



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 clog7A_ 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.

بحث و نتیجه گیری

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 ضد میکروبی جدید شده است. این ترکیبات پتانسیل بسیار بالایی برای کاربرد در صنایع غذایی و پزشکی دارند. شناسایی پپتیدهای ضد میکروبی جدید، در درک فرآیند سیستم های زیستی موثر در ایمنی نقش مهمی دارد (۲۶). موسوی و همکاران (۱۳۹۵) نشان دادند که باکتری های انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از شیر بلوط دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه باکتری های بیمارگر گیاهی خال زدگی باکتریایی گوجه فرنگی (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) و پژمردگی باکتریایی لوبیا (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) هستند. بر این اساس و با توجه به این که بخشی از توان ضد باکتریایی این قبیل باکتری ها به پپتیدهای ترشحی آن ها ارتباط دارد، مبادرت به شناسایی و جداسازی پپتیدی در باکتری انتروکوکوس فاسیوم سویه LUB950217 شد. پپتید شناسایی شده به شدت کاتیونی بود و به نظر می رسد که بتواند در غشاء پلاسمایی سایر میکروارگانیسم ها اختلال ایجاد کند (۲۷). مطالعات میکروسکوپ الکترونی 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 (۲۸، ۲۰). به عنوان مثال، باکتری انتروکوکوس فاسیوم سویه L50، سه نوع متفاوت انترووسین 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 خانواده انترووسین های A، به ویژه پپتید معروف AS-48 مربوط به انتروکوکوس فکالیس، دارای نقطه ایزوالکتریک (PI) نزدیک به ۹ بود. نزدیکی 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 های گیاهی و تولید گیاهان تراریخت، ممکن است بتواند سبب مقاومت گیاهان زراعی به برخی از باکتری های بیمارگر شود.

References

- 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 Microbiol* 2008;25:668-75. doi.org/10.1016/j.fm.2008.03.008.
- 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.
- Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. Enterococci in foods a

conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol* 2003;88:105-22.

doi.org/10.1016/S0168-605(03)00174-0.

- 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.

- Chen H, Hoover D. Bacteriocins and their food applications. *Comp Rev Food Sci Foo Saf* 2003;2:82-100. doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x.

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 Rev*2000;13:686-707.
10. Zacharof M, Lovitt R. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Proce*2012;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 Letters*1995;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.enzmitec.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. *Anaerobe*2012;18:584-9. doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.10.004.
15. Todorov S, Botes M, Guigas C, Schillinger U, Wiid I, Wachsmann 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. Wachsmann 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 Res*2003;58:17-24. doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00099-2.
17. Stropfova V, Laukova A, Simonova M, Marcinakova M. Occurrence of the structural entrocin A, P and B, L50B genes in enterococci of different origin. *Vet Microbiol*2008;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 Rev*1993;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 on *Listeria monocytogenes* in saint paulin cheese. *Folia Microbiol*2001;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 Rev*2007;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 Bacteriol*1960;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 Sci*2017;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 Microbiol*2002;68:4906-14.

- 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 Biolo*2011;7:539. doi.org/10.1038/msb.2011.75
26. Pometto A, Shetty K, Paliyath G, Levin RE. *Food biotechnology*. 2th 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. *Biochemistry*2014;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 Leeuwenhoek*2002;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 Bacteriol*2000;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.

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

Flamarzimonfared S¹, Nazarianfirouzabadi F^{1*}, Ismaili A¹

(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