مجله علمی - پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
بهار 1391، دوره چهارم، شماره دوازدهم، صفحه 28-21

شناسایی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداشده از زیتون به روش PCR-RFLP

طاهره اسماعیلی[1]، زرین دخت امامی[1]، علی محمد احدی[2]، کهین شاهانی پور[3]، مهسا شفیقی[4]

1. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.
2. گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
3. گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.
4. باشگاه پژوهشگران جوان، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

نویسنده مسؤول: طاهره اسماعیلی. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.
tahereesmaeili@gmail.com

دریافت: 91/1/10 پذیرش: 91/3/15

چکیده

زمینه و هدف: زیتون از با ارزش ترین گیاهان ایران است. تخمیر طبیعی زیتون و عمل تلخی زدایی توسط باکتری های اسید لاکتیک بخصوص لاکتوباسیلوس ها و در راس آن ***Lactobacillus plantarum*** انجام می گیرد که نوعی پروبیوتیک محسوب می شود. هدف از این تحقیق شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در بین انواع باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از زیتون بومی ایران بود.

روش بررسی: 28 سویه باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از ارقام مختلف زیتون ایران و نیز باکتری استاندارد **Lactobacillus plantarum** بر روی محیط **MRS** کشت داده شدند، تست های بیوشیمیایی از جمله تست تخمیر قندها بر روی آن ها انجام گرفت. **DNA** باکتری ها با روش فنل-کلروفرم استخراج گردید. واکنش زنجیره ای پلی مراز، با پرایمرهای طراحی شده برای سکانس **16SrDNA+ITS**، به روش **Touch-Up PCR** انجام گرفت. برای بررسی دقیق تر سویه ها، از تکنیک **RFLP** استفاده شد و تاثیر آنزیم های **TaqI** و **HaeIII** بر روی محصولات **PCR** مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: از 28 سویه، 5 سویه با پرایمر های اختصاصی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، باند اختصاصی تشکیل دادند. یکی از محصولات **PCR** پس از ترادف یابی، **Lactobacillus plantarum** تشخیص داده شد. در نتایج **RFLP** به دست آمده در سطح دو آنزیم **TaqI** و **HaeIII** تفاوتی بین سویه ها مشاهده نشد اما الگوی تخمیر قندها در یکی از سویه ها کمی متفاوت بود.

نتیجه‌گیری: *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* که از سویه های پروبیوتیک است، قابل جداسازی از زیتون ایران می باشد. با توجه به حضور طبیعی این باکتری، با تقویت و افزایش تعداد آن در طی مراحل تلخی زدایی و تخمیر می توان ارزش پروبیوتیکی زیتون را افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: ***Lactobacillus plantarum*** ، *زیتون*، ***PCR-RFLP***

www.SID.ir

مقدمه

در کتاب های مقدس به خصوص قرآن مجید از زیتون نامبرده شده است، مصرف زیتون از قرن ها پیش معمول بوده و یکی از خوراکی های اصلی انسان را تشکیل می داده است. زیتون با نام علمی *Olea europaea* ، درختچه ای بسیار مقاوم ، پر ثمر و همیشه سبز است(1). تقریباً 20 گونه درختان کوچک از خانواده اولئاسه وجود دارد، که در حوزه دریای مدیترانه، شمال آفریقا، جنوب شرقی آسیا، شمال تا جنوب چین، اسکاتلند و شرق استرالیا پراکندگی گسترده‌ای دارد. در کشور ایران نیز زیتون در باغستان های رودبار ، منجیل، طارم و اخیرا در استان های مختلف کشت می شود. زیتون و محصولات آن سرشار از باکتری های مولد اسید لاکتیک (LAB) می باشد که در طی فرآوری زیتون اثرات مفیدی در محصول ایجاد می کنند (3). فرآیند تخمیر طبیعی زیتون ، تجزیه ی اولئوروپین و عمل تلخی زدایی توسط باکتری های مولد اسید لاکتیک به خصوص لاکتوباسیلوس ها انجام می گیرد(5). باکتری های اسید لاکتیک میکروارگانیسم های اصلی مورد استفاده برای تولید محصولات غذایی تخمیری سنتی و جدید می باشند، آن ها هم مسئول حفاظت و هم مسئول ویژگی های حسی محصول نظیر رنگ، طعم و بافت آن هستند. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نقش مهمی در تخمیر و فرآوری زیتون ایفا می کند (11). *این باکتری* تاریخچه ای طولانی از مصرف ایمن و طبیعی در انواع محصولات غذایی دارد (17). انواع سویه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* توانایی ایجاد التهاب ندارند و نسبت به اسید معده و نمک های صفراوی مقاومند، بنابراین پتانسیل بالقوه ای در معرفی به عنوان پروبیوتیک دارند (۹،۱۰). روش های جدید و دقیق مولکولی برای شناسایی دقیق باکتری های اسید لاکتیک و آنالیز فعالیت آن ها استفاده می شوند که در سال های اخیر گسترش زیادی یافته اند (2). این روش ها می توانند به همراه روش های بیوشیمیایی برای تشخیص باکتری های مولد اسید لاکتیک به کاروند (4). هدف از این تحقیق شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در بین انواع باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از زیتون بومی ایران بود.

روش بررسی

ارقام مختلف زیتون بومی ایران شامل زیتون ماری ، روغنی و زرد از یک باغ تحقیقاتی واقع در استان زنجان شهرستان طارم خریداری و به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان انتقال داده شد. عملیات تلخی زدایی و تخمیر زیتون ها با استفاده از آب نمک 5% و سرکه 5% انجام گرفت. در طی فرآیند تخمیر از زیتون ها نمونه گیری انجام شد. این نمونه ها بر روی محیط کشت MRS که مخصوص رشد باکتری های مولد اسید لاکتیک به خصوص لاکتوباسیلوس ها می باشد کشت داده شدند (7). بعد از کشت های متوالی، سویه های خالص شده جداسازی شدند. در نهایت 28 سویه باکتری های مولد اسید لاکتیک از زیتون جدا و از لحاظ واکنش گرم و تست کاتالاز بررسی شدند. تست تخمیر قند ها با 9 قند ذکر شده در جدول 3 بر روی سویه ها انجام شد. در تست تخمیر قندها از محیط کشت MRS بدون عصاره گوشت و گلوکز و واجد 1% از قند مورد نظر ، معرف فنل رد و لوله دورهام استفاده شد. پس از تلقیح باکتری ها و انکوباسیون در 30 درجه سانتی گراد به مدت 24 تا 48 ساعت، تغییر رنگ محیط از قرمز به زرد و تولید گاز در لوله دورهام نشان دهنده مثبت بودن تست تخمیر قند مربوطه است. استخراج DNA از 28 ایزوله مذکور و باکتری استاندارد *Lactobacillus plantarum* MI74S با استفاده از روش فنل- کلروفرم انجام گردید (16). به این ترتیب که 3 ml از کشت MRS broth 24 ساعته باکتری ها به میکروتیوپ های 3 میلی لیتری انتقال یافت ودر دور rpm 4000 به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد. رسوب ها با سرم فیزیولوژی مخلوط شده و درrpm 3000به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شدند تا عاری از محیط کشت شوند. 500 میکرولیتر رسوب حاصل در 400 میکرولیتر بافر لیز متشکل از: Tris-Hcl 0.5 M 10 µl, EDTA 0.5 M 25 µl, NaCl 5M 10µl, H_2O 305 µl, SDS 2% 50 µl, Proteinase k(20mg/ml) 3µl حل کرده و به مدت 16 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس به

Archive of SID

www.SID.ir

مواد، 250میکرولیتر فنل و250میکرولیتر کلروفرم اضافه گردید و در دمای 4 درجه سانتی گراد با دور12000 rpm به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ انجام گرفت. فاز آبی که حاوی DNAاست به لوله جدیدی منتقل شد. هم حجم فاز آبی ایزوپروپانل اضافه و به آرامی تکان داده شد. 30 دقیقه در دمای 20°C- قرارگرفت و سپس سانتریفوژ با دور 12000rpm به مدت 5 دقیقه انجام گرفت. سوپرناتانت دور ریخته شد. 500 میکرولیتر اتانول 70% اضافه شد و سانتریفوژ با دور 12000 rpm به مدت 10 دقیقه انجام گرفت. الکل خالی شد، رسوب باقی مانده در دمای اتاق خشک گردید. در نهایت، 30-40 میکرولیتر آب تزریقی اضافه کرده و در 20 °C- نگهداری گردید. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز 0/8درصد و بررسی جذب نوری مورد تایید قرار گرفت.

پرایمرهـای اختصاصـی زیـر بـر مبنـای سـویه هـای *L. Plantarum* برای تـوالی 16SrDNA+ITS بـا اسـتفاده از نرم افزار Blast وclustal w طراحی گردید (6):

Flplan: 5-ACGAACTCTGGTATTGATTGG-3
R2lplan: 5- GGTGTTCTCGGTTTCATTATG-3

سپس واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از پرایمرها و مواد زیر انجام شد:

H_2o (InJection water) 19.05µl, PCR Buffer 10X 2.5µl, $MgCl_2$ 50 mM 0.75µl, d NTP 10 mM 0.5µl , Forward primer 20 pM 0.5 µl, Reverse primer 20 pM 0.5 µl, DNA 50 ng/µl 1µl , Taq polymerase 5 u/µl 0.2 µl.

تکثیرDNA با روش Touch-Up PCR با دستگاه ترموسایکلر گرادیانت اپندورف انجام شد. در برنامه مورد استفاده، دناتوره شدن در 94 درجه سانتی گراد به مدت 6 دقیقه و به دنبال آن واکنش تکثیری مرحله اول در 15 سیکل: دناتوره شدن در 94 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه، اتصال پرایمر در 50 درجه سانتی گراد به مدت 40 ثانیه و گسترش پرایمر (مرحله طویل شدن) در 72 درجه سانتی گراد به مدت 2 دقیقه و واکنش تکثیری مرحله دوم در 20 سیکل: دناتوره شدن در 94 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه، اتصال پرایمردر 57 درجه سانتی گراد به مدت 35 ثانیه و گسترش پرایمر در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه و 35 ثانیه انجام شد. انکوباسیون نهایی به مدت 5 دقیقه در 72 درجه سانتی گراد برای حصول اطمینان از تکمیل و گسترش پرایمر ها صورت گرفت. جهت آشکار سازی محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز 1% با استفاده از بافرTBE 1X استفاده گردید. ژل با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شد و با نور UV، مورد بررسی قرار گرفت. Orange Ruler 50bp DNA ladder (sinagene) به عنوان مارکر مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. باند حدود 1650bp باند مورد نظر است.

تکرارهای متوالی و تغییر شرایط PCR با هدف باند گرفتن از سویه های بیشتر انجام شد. برای اطمینان، یک بار دیگر استخراج DNA، این بار از نمونه های رشد کرده بر روی MRS-Broth ، انجام گرفت و PCR با این DNA تکرار شد. یکی از محصولات PCR برای ترادف یابی به شرکت ژن فناوران ارسال شد. به منظور شناسایی تفاوت های بین گونه ای در بین باکتری های جدا شده از زیتون ایران ، محصولات PCR که دارای باند مورد نظر بودند در معرض هضم آنزیمی با آنزیم های محدودالاثر *Taq I* و *Hae III* قرار گرفتند (4). برای انجام عمل RFLP ، 5 میکرولیتر از DNA (هر یک از محصولاتPCR با غلظت 0/3 µg/µl) با 12/5 میکرولیتر آب مقطر تزریقی و 2 میکرولیتر بافر واکنش آنزیم و 0/5 میکرولیتر (5 unit) از آنزیم مورد نظر مخلوط شد و در دمای مخصوص واکنش (65 °C برای *TaqI* و 37 °C برای *Hae III*) به مدت 16 ساعت انکوبه گردید. در ویال های حاوی آنزیم *TaqI* که در دمای بالا قرار می گیرند مقداری روغن معدنی (پارافین جامد) ریخته تا از تبخیر مخلوط آنزیمی جلوگیری گردد. مدت 16 ساعت کافیست تا آنزیم محدودالاثر بر روی قطعه DNA اثر گذاشته و آن را قطعه قطعه کند.

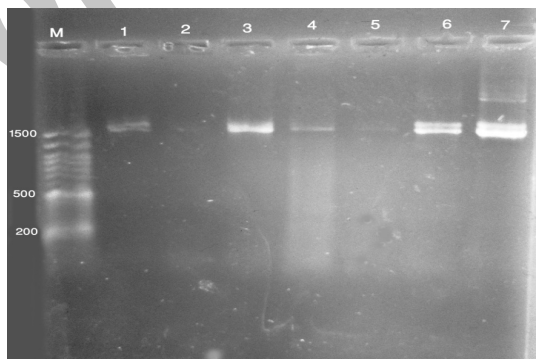
برای مشاهده نتیجه هضم آنزیمی ، تمام محصول هضم آنزیمی شده با 4 میکرولیتر لودینگ بافر مخلوط شد و در ژل آگارز 1/2% بارگذاری شد. الکتروفورز در ولتاژ 70 ولت و به مدت 45 دقیقه انجام گرفت. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید، نتایج مورد بررسی قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

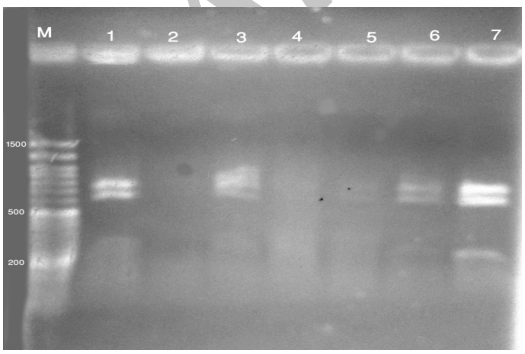
یافته ها

تمام سویه ها بر روی محیط کشتMRS که مخصوص لاکتوباسیلوس ها طراحی شده است رشد کردند. واکنش گرم آن ها مثبت و تست کاتالازشان منفی بود. نتیجه تست تخمیر قند ها در جدول 1 آمده است. در واکنش PCR ، از 28 سویه مورد آزمایش ،هفت سویه ی 1، 6، 9، 10، 12، 16، 21 با پرایمر *اختصاصی لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تشکیل باند دادند که پنج سویه 1، 6، 10، 12 و 21 باند قوی و دو سویه ی 9 و 16 باند ضعیف تشکیل دادند. در تصویر 1 نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR دیده می شود. نتایج ترادف یابی سویه شماره 21، بیان می دارد که این سویه، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* می باشد. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات RFLP در تصویر2 و 3 دیده می شود. در الگوی باندی حاصل از RFLP در سطح دو آنزیم *TaqI* و *Hae III* تفاوتی بین سویه ها مشاهده نمی شود.



تصویر1. الکتروفورز محصولات Touch up PCR با پرایمر های Flplan و R2lplan در ژل آگارز 1%. ستون M: مارکر مولکولی 50 bp ستون 1:سویه 1 ، ستون 2:سویه 16 ، ستون 3: سویه21 ، ستون 4 :سویه 6 ، ستون 5 : سویه 9. ستون 6: سویه 10، ستون 7 : سویه 12.

قند / سویه	گالاکتوز	سالیسین	د- سوربیتول	مانوز	تره هالوز	رافینوز	سلوبیوز	ریبوز	لاکتوز
1	-	-	-	-	+	+	+	-	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	-	+	+	+
4	+	-	-	-	-	+	-	+	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	-	-	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	-	-	-	-	-	+	+	-
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	-	-	+	-	-	+	+
15	+	-	-	-	+	-	+	+	+
16	-	-	-	-	+	-	-	-	+
17	-	-	-	+	+	-	+	-	+
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	+	-	-	-	+	-	-	-
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	-	+	+	+
23	+	+	+	+	+	-	+	+	+
24	+	+	-	-	-	-	-	+	-
25	+	+	+	+	-	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	-	-	-	-	+	-	-	-	-
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+

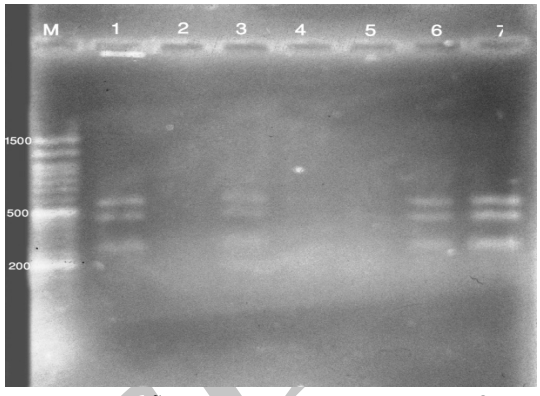


تصویر 2. الکتروفورز محصولات PCR هضم شده با آنزیم Taq I بر روی ژل آگارز 1/2%. ستون M: مارکر مولکولی 50 bp ، ستون 1:سویه 1 ، ستون 2:سویه 16 ، ستون 3: سویه21.

Archive of SID

www.SID.ir

ستون 4 :سویه 6 ، ستون 5 : سویه 9، ستون 6: سویه 10، ستون 7 : سویه 12



تصویر3. محصولات PCR هضم شده با آنزیم Hae III بر روی ژل آگارز 1/2%. ستون M: مارکر مولکولی 50 bp ، ستون 1:سویه 1، ستون 2:سویه 16 ، ستون 3: سویه21 ، ستون 4 :سویه 6، ستون 5 : سویه 9، ستون 6: سویه 10، ستون 7: سویه 12

بحث

شناسایی باکتری های مولد اسید لاکتیک درگیر در صنایع تخمیری زیتون در کشورهای متعدد به ویژه در مواردی که زیتون در اقتصاد آن کشورها نقش مهمی دارد، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در کشور ما ایران نیز این محصول می تواند با توجه بیشتر در رده اقلام استراتژیک و درآمد زا قرار گیرد. روش های سنتی شناسایی باکتری ها شامل روش های بیوشیمیایی و مورفولوژی نمی تواند به تنهایی برای شناسایی دقیق سویه ها به کار رود. امروزه روش های شناسایی مولکولی باکتری ها در کنار روش های بیوشیمیایی ، برای شناسایی دقیق در حد گونه و سویه استفاده می شوند. تحقیقات متعدد در دنیا، روش های مولکولی را برای شناسایی انواع مختلف باکتری ها از جمله باکتری های مولد اسید لاکتیک به کار گرفته اند. از آن جایی که این باکتری ها نقش مهمی در صنایع غذایی کشورها بر عهده دارند و نیز به عنوان پروبیوتیک شناخته می شوند، شناخت دقیق سویه ها و کنترل تغییرات ژنتیکی در آن ها از اهمیت بالایی برخوردار است. روش های مولکولی متعددی با اهداف متفاوت برای شناسایی باکتری های مولد اسید لاکتیک طراحی شده اند که می توان به روش های مولکولی پیشرفته مانند,PCR, RFLP, RAPD , PFGE , Probing , , DGGE, AFLP , FISH Ribotyping و روش های کمپلکس اشاره کرد. این تکنیک ها می توانند تفاوت های باکتری ها را در حد جنس، گونه و حتی سویه مشخص کنند (2). با استفاده از روش های فنوتیپی و ژنوتیپی باکتری های مولد اسید لاکتیک جدا شده از انواع مواد غذایی شامل لبنیات، سبزیجات، میوه ها ، غذاهای فرآوری شده و نوشیدنی های تخمیری شناسایی شده اند. درتحقیقی بیان شد که 98% باکتری های جدا شده از زیتون های سبز منطقه سیسیل ایتالیا ، از دسته باکتری های مولد اسید لاکتیک بوده اند و 57% آن ها ازگونه های *Lactobacillus plantarum* و*Enterococcus spp.* و *Leuconostoc mesenteroides* تشخیص داده شدند. روش تشخیصی مورد استفاده شامل روش های کشت، تست های بیوشیمیایی، مورفولوژی و روش های ملکولی مانند: DGGE وPCR-RFLP بوده است (8).

در پژوهش انجام شده، 28سویه جدا شده از زیتون ایران و فرآورده های تخمیری زیتون، بر روی محیط کشت MRS که مخصوص باکتری های مولد اسید لاکتیک است کشت داده شدند. واکنش گرم تمام سویه ها مثبت ارزیابی شد و تمام سویه ها کاتالاز منفی بودند. کشت بر روی محیط MRS که ویژه باکتری های مولد اسید لاکتیک است، همچنین گرم مثبت و کاتالاز منفی بودن سویه ها بیانگر آن است که باکتری های جدا شده از زیتون ایران از دسته باکتری های مولد اسید لاکتیک هستند. در این تحقیق از روش PCR-RFLP برای شناسایی سویه های جدا شده از زیتون بومی ایران استفاده شد. ابتدا استخراج DNA از نمونه های رشد کرده روی محیط کشت MRS-Agar انجام شد. سپس Touch up PCR بر روی DNA استخراج شده، با پرایمر های طراحی شده برای گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، انجام گرفت. در واکنش PCR، از 28 سویه مورد آزمایش، هفت سویه ی 1، 6، 9، 10، 12، 16، 21 با پرایمر اختصاصی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تشکیل باند دادند که

Archive of SID
www.SID.ir

پنج سویه 1، 6، 10، 12 و 21 باند قوی و دو سویه ی 9 و 16 باند ضعیف تشکیل دادند. نتایج ترادف یابی سویه شماره 21، بیان می دارد که این سویه، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* می باشد. مورفولوژی سویه های 9 و 16کوکوباسیل تشخیص داده شد که با سویه استاندارد و سویه شماره 21 (باسیل) متفاوت است. همچنین باند ایجاد شده سویه های 9 و 16 در واکنش PCR ضعیف تر از باند سویه های 1، 6 ، 10 ، 12 و21 بود و نتایج تست تخمیر قندهای این دو سویه نیز با سویه 21 متفاوت است، بنابراین این دو سویه نمی توانند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* باشند. اظهار نظر قطعی در مورد سویه های 9 و 16 منوط به توالی یابی محصول PCR آن ها می باشد. بر اساس یافته های این پژوهش می توان نتیجه گرفت که سویه های 6 ،10، 12 و 21 قطعاً از گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* می باشند. این نتیجه با نتایج تحقیقات در سایر مناطق دنیا مطابقت دارد:

یک مطالعه در ترکیه بیان می دارد باکتری *Lactobacillus plantarum* در پایان تخمیر از زیتون جدا می شود (3). در کتاب باکتری شناسی تایید شده است که باکتری های مولد اسید لاکتیک شامل 11 جنس هستند، اما مهمترین باکتری های مولد اسید لاکتیک شناسایی شده از غذاهای تخمیری، سبزیجات و میوه ها مربوط به گونه های جنس *Lactobacillus* ,*Lactococcus* , *Leoconostoc, Pediococcus, Streptococcus,* می باشند. در این بین دو گونه *لاکتوباسیل* شامل *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus brevis* در تخمیر زیتون نقش اصلی دارند (17). برمبنای کتاب "پروکاریوت ها" گونه های باکتری های اسید لاکتیک که از زیتون تخمیری جدا شده اند شامل:

Lactobacillus brevis، Lactobacillus plantarum ، Leoconostoc mesenteroides ، Enterococcus faecalis ، Pediococcus cerevisiae می باشند که از بین آن ها *L. plantarum* به اولئوروپین (ماده ی تلخ زیتون) مقاوم است (7). در بین همه باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از زیتون در الجزیره ، پرتغال، اسپانیا، ترکیه و ایتالیا گونه *Lactobacillus plantarum* گونه غالب معرفی شده است (3، 8، 7، 15-11).

نتایج حاصل از RFLP با دو آنزیم *TaqI* و *Hae III* تفاوتی در سویه های 1، 6 ،10، 12 و 21 نشان نمی دهد. این سویه ها پس از عمل هضم آنزیمی باند های مشابهی ایجاد کردند (باندهای حدود 750 bp، 650 bp و 300 bp برای آنزیم *TaqI* و باندهای حدود 600 bp، 450 bp و 300 bp برای آنزیم *Hae III*). این نتایج بیانگر آن است که سویه های 6، 10، 12 و 21 کاملاً مشابه همدیگر هستند و تفاوت های ژنتیکی در آن ها در سطح این دو آنزیم به چشم نمی خورد. از طرفی می توان گفت برای آن که تفاوت بین سویه ها به خوبی در عمل RFLP آشکار شود نیاز به استفاده از تعداد بیشتری آنزیم محدودالاثر است و دو آنزیم استفاده شده کافی نیستند.

نتیجه گیری

بر اساس یافته های این پژوهش می توان نتیجه گرفت که سویه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از زیتون بومی ایران جدا می شوند.. با توجه به حضور طبیعی این باکتری در زیتون، با تقویت و افزایش تعداد آن در طی مراحل تلخی زدایی و تخمیر می توان ارزش پروبیوتیکی زیتون را افزایش داد.

References

1. Ansari M. Development of a Simple Green Extraction Procedure and HPLC Method for Determination of Oleuropein in Olive Leaf Extract Applied to a Multi-Source Comparative Study. *J. Iran. Chem*. 2011; Soc: Vol. 8 No. 1. 38-47.
2. Ben Amor K., Vaughan E. E., and de Vos W. M. Advanced molecular tools for the identification of Lactic Acid Bacteria .*J. Nutrition*. 2007; 137: 741-747.
3. Borcakli M. Ozay G.,Alperden L. Fermentation of Turkish olives with traditional and aerated systems In Food flavours, ingredients, and composition . Elsevier Science Publisher. *B.V. Charalambous*. 1993; 265-277.
4. Bulut Cisem. Isolation and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria From Cheese. MSc thesis Izmir Institute of Technology. Izmir, Turky; 2003.
5. Cardinal MJ., Mghrons J. *Lactococcuslactis* strain producing inhibitory activity against *Listeria. Food Biotechnology*. 2000; 11: 129-146.
6. Clustal : Multiple Sequence Alignment. Available from:http://www.clustal.org/.2011.

www.SID.ir
Archive of SID

7. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K-H., Stackebrandt E.The Prokaryotes. Third Edition. Singapore: Springer; 2006.
8. Fava Giovani . Employment of starter cultures for green olives fermentation. 14th Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology - University of Sassari Oristano, September 16 – 18. 2009.
9. Fazeli M.R., Vaghari E., Jamalifar H., Ebrahim Z., Samadi N. Antimicrobial activity of *lactobacillus plantarum* strains isolated from fermented olive origin .*Journal of Medicinal Plants*. 2009; Vol. 8, No. 31. 20-24.
10. GuarnerF , Schaafsma GJ . Probiotics. *Int J Food Microbiol* .1998; 39:237-8.
11. Lavermicocca P., Valerio F. Lonigro S.L.,Gobbetti M., Baruzzi F., Morea M. Olive fermentation using lactic acid bacteria isolated from olive phyllopolane and olive brines. IV International Symposum on olive growing. *Actahortic*. 2002; 586:621-624.
12. Mourad K. and Nour-Eddine K. In vitro preselection criteria for probiotics *lactobacillus plantarum* strains of fermented olives origin. *International Journal of Prebiotics*. 2006; Vol.1, No. 1, 27-32.
13. MouradK. ,Zadi-karam Halima and KaramNour-Eddine. Isolation of lactic acid bacteria for its possible use in the fermentation of green Algeria olives.*Grassas y Aceites* .2004; 55: 4, 385-393.
14. RandazzoC.L. ,Restuccia C.A. , Romano A.D.Caggia C. Lactobacillus casei, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives. *International Journal of Food Microbiology*. 2004; 90: 9 – 14.
15. Ruiz-Barbara J.L.,Piard J.C. , Jimenez-Diaz R. Plasmid profiles and curing of plasmids in *lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentation. *J. Apple. Bacteriol*. 1991; 71,417-421.
16. Sambrook J and Russel DW. Molecular cloning: A laboratory manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor *NY USA*: Cold Spring Harbor Press. 2001.
17. Todar K. Todar s online textbook of bacteriology. MadisonWiscons. Availablefrom: http://textbookofbacteriology.net/lactics_1.html. (Accessed 15 February 2012).

Archive of SID

www.SID.ir