Archive of SID

ردیابی ژن‌های ساختاری کدکننده‌ی انتروسین در *انتروکوکوس*‌های ایزوله شده از پنیر سنتی کردی

حسین زنگانه[1]، **فخری شهیدی**[1*]، سید علی مرتضوی[1]، محمد رضا عدالتیان دوم[1]، الناز میلانی[2]

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲.گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، جهاد دانشگاهی مشهد، مشهد، ایران*

چکیده

انتروسین‌ها، باکتریوسین‌هایی هستند که توسط سویه‌های *انتروکوکوس* تولید می‌شوند. انتروسین‌ها تنوع زیادی داشته و هرگونه‌ی *انتروکوکوس* با توجه به محتوای ژنتیکی و محیط رشد، نوع یا انواع مختلفی از انتروسین را می‌تواند تولید کند. در این پژوهش ۱۵ سویه باکتریایی (جنس *انتروکوکوس*) که توسط روش های مبتنی برکشت و مولکولی از پنیر سنتی کردی جدا شده بودند، انتخاب گردیدند. جهت استخراج DNA جدایه‌ها از کیت استخراج Genomic DNA isolation VI که مخصوص باکتری‌های گرم مثبت با دیواره سخت بود، استفاده شد. به منظور ردیابی ژن‌های ساختاری کد کننده انتروسین واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR[59]) انجام گردید. نتایج نشان داد که ژن انتروسین A، با حضور در ۱۰ مورد از ۱۵ مورد ایزوله بیشترین فراوانی را داشت و بعداز آن بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به ژن‌های انتروسین P با ۹ مورد و B با ۸ مورد بود. اکثر جدایه‌های *انتروکوکوس* مورد بررسی در این مطالعه دارای ژن‌های تولید کننده انتروسین بودند. *انتروکوکوس فکالیس* NRIC0112 و *انتروکوکوس فکالیس* SK13 دارای ۵ ژن مختلف، انتروسین A، انتروسین B، انتروسین P، انتروسین۳۱ و انتروسین X بودند. ژن انتروسین‌های AS48, L50, 1071 و KS در هیچ یک از جدایه‌ها یافت نشد. با این وجود به کارگیری این جدایه‌ها در فراورده‌های لبنی و صنعتی مطالعات بیشتری را طلب می کند.

واژگان کلیدی: *انتروکوکوس*، پنیر سنتی کردی، ژن‌های کد کننده انتروسین.

* fshahidi@um.ac.ir

[59] Polymerase chain reaction

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پنیر کردی معمولا از شیر گوسفند، بز، گاو و گاومیش تهیه می‌شود. در فرآیند تولید این نوع پنیر مرحله ویژه‌ای وجود دارد که در آن محصول برای رسیدگی، درون پوست نگهداری می‌شود، این امر باعث کاهش فشار اکسیژن و ایجاد شرایط مناسب برای رشد میکروارگانیسم-های میکروآئروفیل می‌گردد. پنیرهای تولیدی از شیر خام، مشخصات طعمی گسترده‌تر و محسوس‌تری داشته و خصوصیات کیفی و ارگانولپتیکی آن‌ها نظیر بافت، بو، عطر و طعم، ظاهراً نتیجه‌ای از نوع شیر خام مصرفی، کیفیت میکروبی، تکنولوژی به کار رفته در تهیه و شرایط رسیدگی است. علی‌رغم برتری حسی پنیرهای سنتی به پنیرهای صنعتی مسئله مهم، استفاده از شیر خام بوده و به دلیل آلوده شدن شیر در مراحل تولید و پس از دوشش احتمال آلودگی پنیرهای تولیدی به انواع میکروب‌های بیماری‌زا وجود دارد (۱).

در حالی‌که همیشه یکی از دغدغه‌های مهم در تولید فراورده‌های لبنی حضور میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بوده است، بنابراین تأمین بهداشت فراورده‌های لبنی خصوصاً فراورده‌هایی که از شیر خام تهیه می‌شوند برای سلامت جامعه ضروری می‌باشد. اگر چه یافتن شاخص‌های ایجاد بیماری و مقاومت به آنتی‌بیوتیک در *انتروکوکوس*‌های جدایه شده از مواد غذایی، نشان دهنده‌ی پتانسیل بیماری‌زایی آن‌ها است اما تاکنون عفونت‌های ناشی از *انتروکوکوس*‌های غذایی گزارش نشده‌است. از طرفی داشتن ژن‌های بیماری‌زا به معنای عملگر بودن آن‌ها نیست به عبارت دیگر جدایه‌های غذایی بیشتر می‌توانند انتقال دهنده و پخش کننده‌ی شاخص‌های بیماری زا باشند تا عامل اصلی ایجاد عفونت (۲).

انتروکوکوس‌ها یکی از جنس‌های متعلق به خانواده باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که گرم مثبت، کاتالاز منفی، تخم مرغی شکل، غیراسپورزا، بی‌هوازی اختیاری و جورتخمیر با نیازهای غذایی پیچیده هستند (۲). فعالیت‌های پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی، توانایی استفاده از سیترات و پیرووات به عنوان منابع کربن و تولید انتروسین‌ها جزء فواید تکنولوژیکی *انتروکوکوس*‌ها محسوب می‌گردند. انتروسین-ها، باکتریوسین‌هایی هستند که توسط سویه‌های انتروکوکسی تولید می‌شوند و اغلب متعلق به کلاس II باکتریوسین‌ها می‌باشند. این باکتریوسین‌ها کوچک (KDa ۶-۴)، مقاوم به حرارت، کاتیونی، آبگریز، فاقد لانتی‌بیوتیک و پپتیدهای ضدباکتریایی هستند (۳) و از ۳۰ الی ۶۰ اسید آمینه آزاد تشکیل شده‌اند که به طور ویژه اثر بازدارندگی بر باکتری‌های گرم مثبت با وابستگی نزدیک به سویه‌های تولید کننده دارند. انتروسین‌ها تنوع زیادی داشته و هرگونه *انتروکوکوس* با توجه به محتوای ژنتیکی و محیط رشد، نوع یا انواع مختلفی از آن را می‌تواند تولید کند (۴ و ۵).

فلورمیکروبی موجود در پنیر ایتالیایی مورد بررسی قرار گرفته است و با استفاده از روش‌های مولکولی و همچنین روش مبتنی بر کشت، شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک انجام شد (۶). نتایج نشان داد که *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیر گونه لاکتیس در تمام مراحل فرایند (از شیر تا پنیر) حضور داشت و پس ا زآن گونه‌هایی از جنس *لاکتوباسیلوس* غالب بودند. اکثر گونه‌های *انتروکوکوس* با استفاده از تکنیک RFLP[1] و مطالعه روی ناحیه ژنی 16S، شناسایی شده است (۷).(هدف از این پاراگراف اشاره به مطالعاتی است که مشابه آنچه در این پژوهش انجام شده است، با استفاده از تکنیک های مولکولی به شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک پرداخته اند. به هر روی در صورت مناسب نبودن این مطلب از نظر داور محترم این قسمت حذف گردد).

از آن‌جا که یک سری از *انتروکوکوس*‌ها موجب ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌های شایع در انسان همچون آندوکاردیت[2]، باکترمیا[3]، منتژیت[4] و سپتی‌سمی [5] می‌گردند (۸)، لذا GRAS [6] شناخته نمی‌شوند و استفاده از *انتروکوکوس*‌های جدا شده در فراورده‌های غذایی زمانی

[1] Restriction Fragment Length Polymorphism
[2] Endocarditis
[3] Bacteremia
[4] Meningitis
[5] Septicemia
[6] Generally Recognized as Safe

www.SID.ir

Archive of SID

امکان‌پذیر خواهد بود که فاقد ژن‌های بیماری‌زا در آن‌ها و همچنین عدم مقاومت آن‌ها به آنتی بیوتیک‌های رایج اثبات شود لذا باید فاکتورهای بیماری‌زایی از قبیل تولید همولایزین، ژلاتیناز و همچنین قابلیت تولید انتروسین برای استفاده از آن‌ها جهت ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن از جمله *لیستریا* مورد بررسی قرار گیرد.

در این پژوهش آزمایشگاهی ژن‌های ساختاری کد کننده‌ی انتروسین ۱۵ *انتروکوکوس* جدا شده از پنیر کردی مورد بررسی قرار گرفت تا در نهایت از این سویه‌ها جهت نگهداری و افزایش ماندگاری محصولات غذایی بویژه لبنیات در صنعت بهره برد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش آزمایشگاهی در فاصله زمانی اسفند ماه ۱۳۹۱ تا شهریور ماه ۱۳۹۳ در آزمایشگاه‌های فناوری‌های نوین و بیولوژی سلولی و مولکولی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت.

فعال‌سازی جدایه‌های *انتروکوکوس*

به این منظور ذخیره باکتریایی مورد نظر را که در دمای ۸۰°C- نگهداری می‌شدند در دمای محیط آزمایشگاه (در فضایی استریل، زیر هود) قرار داده و پس از آنکه از انجماد خارج شدند مقداری از مایع داخل میکروتیوب توسط سمپلر برداشته و به صورت خطی در محیط کشت MRS (مرک آلمان) کشت داده شدند. پس از کشت، تمامی پلیت‌ها در دمای ۴۷ °C به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند (۹).

جدایه‌های *انتروکوکوس* ایزوله شده از پنیر سنتی کردی در جدول ۱، نمایش داده شده است.

استخراج DNA با استفاده از کیت

جهت استخراج DNA جدایه‌ها از کیت استخراج Genomic DNA isolation VI (دنا زیست آسیا، ایران) مخصوص باکتری‌های گرم مثبت، با دیواره سخت (S-1030) استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون اولیه هر جدایه برای شروع کار، هر یک از جدایه ها در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت MRS Broth (مرک آلمان) تلقیح شدند و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ °C ، از ۱۰۰ µL این سوسپانسیون برای ادامه‌ی کار استفاده شد. همه‌ی مراحل مطابق دستورالعمل کیت طی ۱۴ مرحله انجام پذیرفت. در پایان برای هر جدایه محلولی ۵۰ µL حاوی DNA جدایه بدست آمد، که برای انجام مراحل بعد درفریزر ۲۰- °C نگهداری شد(۱۰).

جدول ۱- جدایه‌های *انتروکوکوس* ایزوله شده از پنیر سنتی کردی

ردیف	جنس	گونه	شناسه
۱	*Enterococcus*	*lactis*	CK1026
۲	*Enterococcus*	*faecalis*	NRIC0112
۳	*Enterococcus*	*faecalis*	H13
۴	*Enterococcus*	*faecalis*	N
۵	*Enterococcus*	*faecalis*	SK12
۶	*Enterococcus*	*faecalis*	SK13
۷	*Enterococcus*	*faecalis*	VITEF
۸	*Enterococcus*	*faecium*	HN-N26
۹	*Enterococcus*	*faecium*	HN-N29
۱۰	*Enterococcus*	*faecium*	CK1114
۱۱	*Enterococcus*	*faecium*	IDCC2104
۱۲	*Enterococcus*	*faecium*	Aus0005
۱۳	*Enterococcus*	*faecium*	VITEH
۱۴	*Enterococcus*	*faecium*	-
۱۵	*Enterococcus*	*durans*	032

www.SID.ir

Archive of SID

انجام واکنش PCR

کلیه روش‌های مبتنی بر کشت همانند روش‌های Lawn on the Spot و Well Diffusion فقط توانایی شناسایی باکتری مولد ترکیبات ضد میکروبی از جمله باکتریوسین‌ها را دارا هستند اما در تشخیص نوع ترکیبات تولید شده و نوع باکتریوسین تولید شده یا ژن کدکننده‌ی باکتریوسین ناتوان هستند. لذا در این پژوهش از واکنش PCR برای به دست آوردن محصول PCR ژن‌های کد کننده‌ی انتروسین‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. واکنش PCR به کمک پرایمرهای اختصاصی ژن‌های ساختمانی باکتریوسین‌ها (جدول ۲)، با استفاده از مستر میکس (ماکروژن، کره جنوبی) در حجم ۲۵ µL انجام شد. این حجم شامل ۱۲/۵ µL مستر میکس، ۱ µL DNA، ۵ µL پرایمر رفت، ۵ µL پرایمر برگشت و ۱۰/۵ µL آب بود (۱۰).

پس از اضافه کردن هر یک از اجزای مخلوط واکنش، میکروتیوب‌ها در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند و برنامه دمایی به صورت ذیل تنظیم گردید (۱۰):

۱. واسرشته‌سازی اولیه: دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه، یک سیکل؛

۲. واسرشته‌سازی: دمای ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه (دناتوراسیون)، اتصال (Annealing): دمای مورد نیاز هر پرایمر (مطابق آنچه در جدول ۲ آمده است) به مدت ۴۵ ثانیه، توسعه (Extension): دمای ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل؛ (این زمان مطابق با رفرنس انتخاب شد اما همان‌طور که داور محترم فرموده‌اند در مورد این پژوهش زمان یک دقیقه نیز کفایت می‌کرد)

۳. توسعه نهایی: دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه، یک سیکل؛

۴. دمای ۴ °C به مدت نامحدود (۱۰).

الکتروفورز محصول PCR

پس از انجام واکنش PCR، برای هر واکنش ۱/۵ µL از محصول واکنش در هر چاهک الکتروفورز بارگذاری شد. در یکی از چاهک‌ها ۱ µL مارکر DNA[66] ۵۰ جفت باز (فرمنتاز) بارگذاری گردید. الکتروفورز مخلوط‌های بارگذاری شده در ژل آگارز ۱ درصد حاوی Green viewer (پارس توس) و در بافر TBE 1X (تریس، اسید بوریک، EDTA) با جریان ۹۰ ولت، به مدت ۳۰ دقیقه انجام پذیرفت. پس از اتمام الکتروفورز از ژل موردنظر توسط دستگاه Geldo تحت اشعه‌ی ماوراء بنفش عکس‌برداری صورت گرفت (۱۲).

تعیین توالی و مقایسه توالی‌ها

پس از انجام PCR و مشاهده‌ی الگوی باندی مناسب و اطمینان از این موضوع که محصولات PCR آماده توالی یابی هستند سه آمپلیکون یا محصول PCR برای هر نوع ژن انتروسین انتخاب و برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. توالی‌یابی با استفاده از پرایمر پیشرو انجام شد. سپس توالی های بدست آمده با توالی‌های اطلاعاتی موجود در بانک اطلاعاتیGen Bank(NCBI) با کمک برنامه BLAST مقایسه گردیدند (۱۲).

[66] Ladder

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش (اقتباس از عدالتیان و همکاران، ۲۰۱۲) (۱۱)

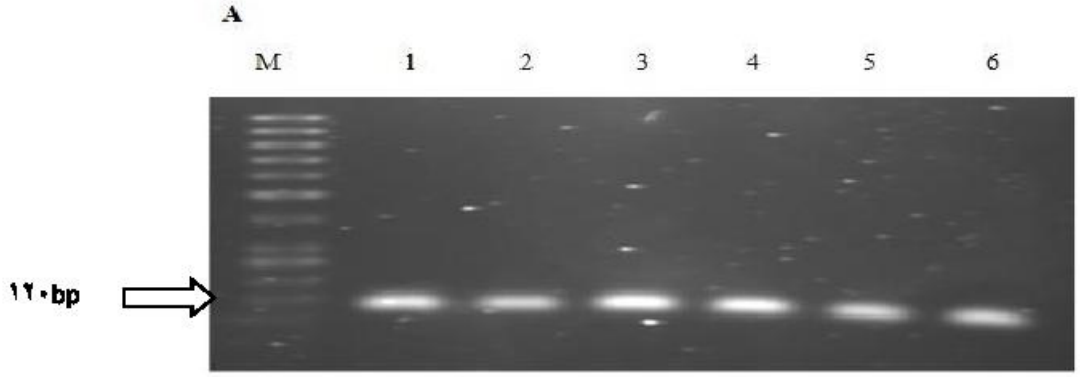
Name	Sequence (5'-3')	Target gene	Annealing temperature	Size of the PCR product (bp)
EntAF EntAR	AAATATTATGGAAATGGAGTGTAT GCACTTCCCTGGAATTGCTC	Enterocin A	50	120
EntBF EntBR	GAAAATGATCACAGAATGCCTA GTTGCATTTAGAGTATACATTT	Enterocin B	50	159
EntPF EntPR	GGTAATGGTGTTTATTGTAAT ATGTCCCATACCTGCCAAAC	Enterocin P	48	117
EntL50F EntL50R	GGAGCAATCGCAAAATTAG ATTGCCCATCCTTCTCCAAT	Enterocins L50A,	55	150
Ent31F Ent31R	TATTACGGAAATGGTTTATATTG TCTAGGAGCCCAAGGGCC	Enterocin 31	50	122
EntAS48F EntAS48R	GAGGAGTTTCATGATTTAAAG CATATTGTTAAATTACCAAGC	Enterocin AS48	50	185
Ent1071F Ent1071R	GGGGAGAGTCGGTTTTTAG ATCATATGCGGGTTGTAGCC	Enterocin 1071A,	50	273
EntKSF alEntKSR	CTACGGTAATGGAGTCTCATG CATCTGCATACAGGCTATACC	Mundticin KS	50	275
EntQF EntQR	CAAGAAATTTTTTCCCATGGC CTTCTTAAAAATGGTATCGCA	Enterocin Q	55	95
EntXF EntXF	GTTTCTGTAAAAGAGATGAAAC CCTCTTAATCATTAACCATAC	Enterocin X	50	500
PedPAF PedPAR	ACTGCGTTGATAGCGAGGTT TGATGCCAGCTCAGCATAAT	Pediocin PA1	50	360

نتایج

نتایج حاصل از محصولات PCR به دست آمده حاکی از حضور ژن‌های انتروسین X, P, B, A و Q و انتروسین ۳ در جدایه‌ها می‌باشد (شکل ۲). شکل ۲، تصویری از ژل محصولات PCR تعداد محدودی از جدایه‌های مورد بررسی می‌باشد.

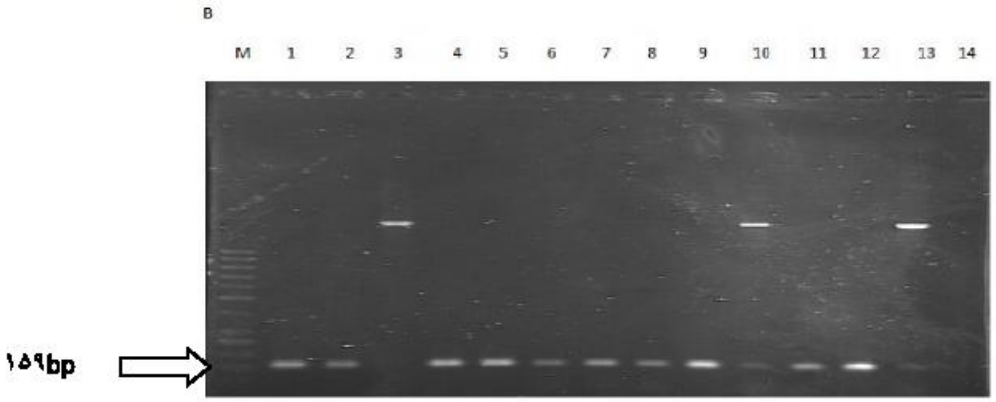
www.SID.ir

Archive of SID



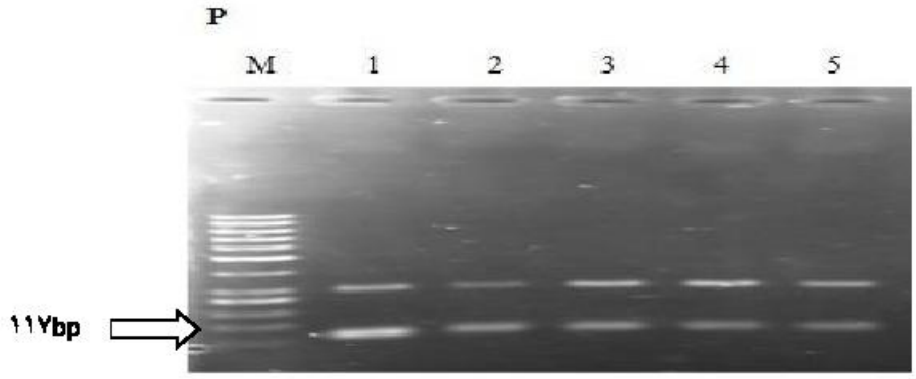
شکل ۱- تصویر باند محصولات PCR به دست آمده از ژن انتروسین A

(M مارکر ۵۰bp و ستون‌های شماره گذاری شده مربوط به گونه‌های *انتروکوکوس* ذکر شده در جدول شماره ۱ می‌باشد)



شکل ۲- تصویر باند محصولات PCR به دست آمده از ژن انتروسین B

(M مارکر ۵۰bp و ستون‌های شماره گذاری شده مربوط به گونه‌های *انتروکوکوس* ذکر شده در جدول شماره ۱ می‌باشد)

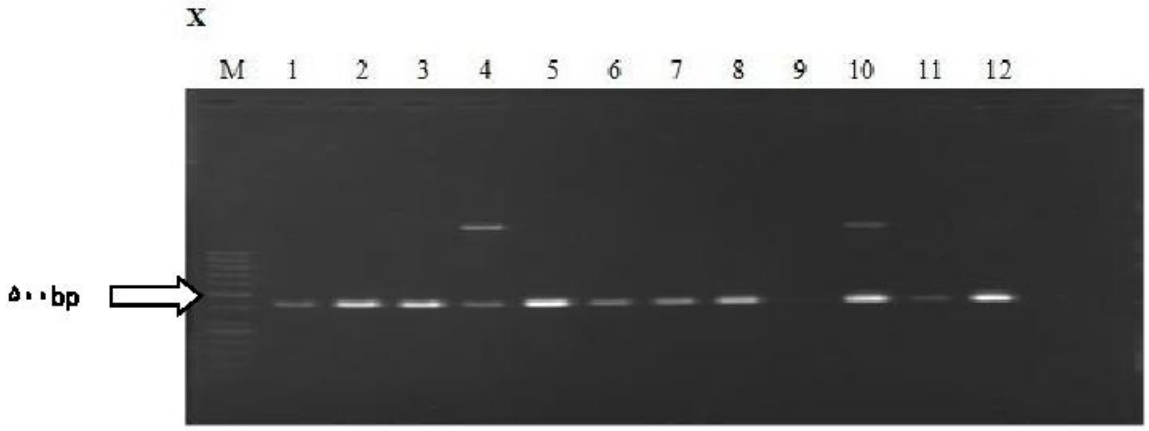


شکل ۳- تصویر باند محصولات PCR به دست آمده از ژن انتروسین P

(M مارکر ۵۰bp و ستون‌های شماره گذاری شده مربوط به گونه‌های *انتروکوکوس* ذکر شده در جدول شماره ۱ می‌باشد)

www.SID.ir

Archive of SID

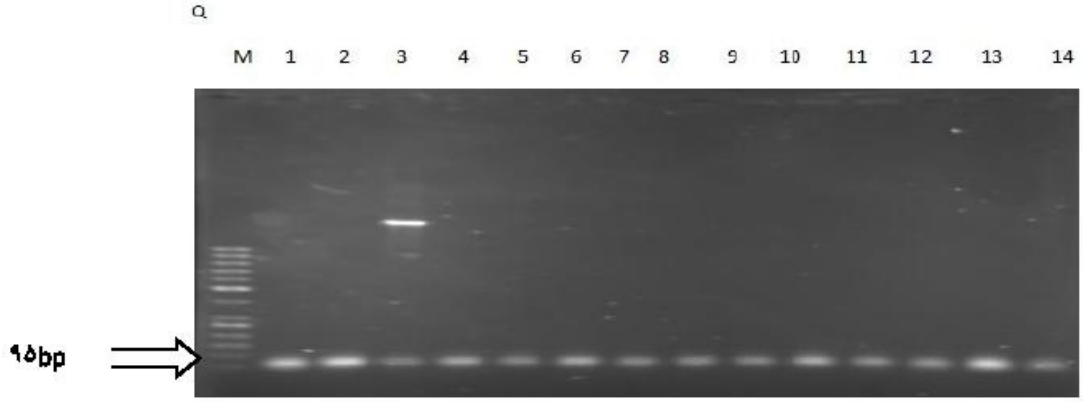


شکل ۴- تصویر باند محصولات PCR به دست آمده از ژن انتروسین X

(M مارکر ۵۰bp و ستون‌های شماره‌گذاری شده مربوط به گونه‌های *انتروکوکوس* ذکر شده در جدول شماره ۱ می‌باشد)

شکل ۵- تصویر باند محصولات PCR به دست آمده از ژن انتروسین 31

(M مارکر ۵۰bp و ستون‌های شماره‌گذاری شده مربوط به گونه‌های *انتروکوکوس* ذکر شده در جدول شماره ۱ می‌باشد)



شکل ۶- تصویر باند محصولات PCR به دست آمده از ژن انتروسین Q

(M مارکر ۵۰bp و ستون‌های شماره‌گذاری شده مربوط به گونه‌های *انتروکوکوس* ذکر شده در جدول شماره ۱ می‌باشد)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. نتایج حاصل از بررسی حضور ژن‌های انتروسین در گونه‌های *انتروکوکوس*

گونه	E.A	E.B	E.P	E.31	E.X	E.Q	E.KS	E. 1071A,B	E.AS48	E.L50A,B
E. lactis CK1026	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
E.faecalis NRIC0112	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
E.faecalis H13	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
E.faecalis N	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
E.faecalis SK12	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
E.faecalis SK13	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
E.faecalis VITEF	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
E. faecium HN-N26	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
E. faecium HN-N29	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
E. faecium CK1114	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
E. faecium IDCC2104	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E. faecium Aus0005	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
E. faecium VITEH	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E. faecium	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
E.durans 032	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

با توجه به شکل ۲، باندهای مربوط به ژن‌های انتروسین مختلف در سایزهای مورد انتظار مشاهده شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که ژن انتروسین A بیشترین حضور را در جدایه‌های *انتروکوکوس* داشت (جدول ۳).

نتایج نشان داد از بین ۱۵ گونه *انتروکوکوس*، ۱۰ گونه ژن انتروسین A، ۹ گونه ژن مولد انتروسین P، ۸ گونه ژن مولد انتروسین B، ۳ گونه ژن مولد انتروسین X و ۲ گونه ژن‌های انتروسین Q و ۳۱ داشتند. همچنین مشاهده شد که در هیچکدام از جدایه‌های *انتروکوکوس*، ژن انتروسین‌های AS48, L50, 1071 و KS یافت نشد. همچنین با توجه به جدول ۳، مشاهده شد که *انتروکوکوس فکالیس* (NRIC0112) و *انتروکوکوس فکالیس* (SK13) ۵ ژن مختلف، انتروسین A، انتروسین B، انتروسین P، انتروسین ۳۱ و انتروسین X داشتند.

بحث

از آنجایی که اخیراً انتروسین‌ها به علت قابلیت استفاده از آن‌ها به عنوان نگهدارنده‌های زیستی در مواد غذایی انسانی و حیوانی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند، تشخیص دقیق گونه‌های *انتروکوکوس* تولید کننده‌ی پپتیدهای ضدمیکروبی جهت ارائه سویه‌های مناسب به عنوان عوامل پروبیوتیک و نگهدارنده‌های زیستی مواد غذایی ضروری می‌باشد (۱۳). توزیع گسترده‌ی ژن ساختاری انتروسین A احتمالا به دلیل توانایی قابل توجه *انتروکوکوس*‌ها در انتشار و همچنین دریافت مواد ژنتیکی بین سویه‌ها و حتی ما بین جنس‌ها (از جمله بین *استافیلوکوکوس*‌ها و *انتروکوکوس*-ها) می‌باشد. مکانیسم‌های انتقال ژنی که در *انتروکوکوس*‌ها به خوبی شناسایی شده‌اند شامل به کارگیری پلاسمیدهای کانجوگیتیو، پلاسمیدهای غیر کانجوگیتیو و همچنین ترنسپوزون‌های کانجگیتیو می‌باشد (۱۴). بر اساس تحقیقات استرومپفووا و همکاران فراوانی ژن‌های انتروسین بر اساس خاستگاه آن‌ها متفاوت می‌باشد که برای رسیدن به نتایج معتبر نیاز به بررسی مجموعه‌های بزرگتر از سویه‌ها از مناطق جغرافیایی مختلف و مقایسه مطالعات مستقل از یکدیگر دارد (۱۵).

سایبا و همکاران، ژن کدکننده‌ی انتروسین را در چندین سویه‌ی مولد باکتریوسین شامل *انتروکوکوس فاسیوم*، *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس کاسلی فلاووس*، که ازمنابع مختلف (حیوانات، مواد غذایی و بالینی) جداسازی کرده بودند مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه ژن کدکننده‌ی انتروسین A در ۳ سویه از جدایه‌های بالینی و در ۲ سویه از جدایه‌های حیوانی شناسایی گردید و در ۲ سویه از جدایه‌های غذایی نیز فقط ژن انتروسین P ردیابی شد (۱۶).

www.SID.ir

Archive of SID

ترسیس و همکاران، دو نوع پنیر سنتی اسلونیایی (Tolminc و Kraski) که در ۹ ناحیه تهیه شده بودند ژن‌های ساختاری باکتریوسین‌های اسیدلاکتیک را به روش PCR ردیابی کردند، در این میان ژن پلانتارسین A در تمامی نمونه-ها شناسایی شد، ولی ژن انتروسین As-48 در هیچ یک از نمونه‌ها پیدا نشد و سایر ژن‌ها به طور متغیر در نمونه‌های مختلف ردیابی شدند (۱۷).

عدالتیان و همکاران در سال ۲۰۱۲، ژن‌های کدکننده‌ی انتروسین را در ۱۵ سویه مولد انتروسین که از دو پنیر سنتی ایرانی جداسازی شده‌بودند مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که در این میان ژن کد کننده انتروسین A در ۱۰ سویه و ژن های کدکننده انتروسین‌های B و P در ۸ سویه، ژن انتروسین X در ۵ سویه و ژن کدکننده انتروسین ۳۱ در ۲ سویه شناسایی شدند. در حالی‌که سایر ژن‌های کدکننده‌ی انتروسین در هیچ یک از سویه‌های دیگر ردیابی نشدند (۱۱). نتایج مطالعه مذکور از نظر ترتیب فراوانی ژن‌های کد کننده انتروسین A، B، P، X و ۳۱ با نتایج بررسی ما هم‌خوانی دارد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، وجود ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در سویه‌های *انتروکوکوس* موجود در پنیرسنتی کردی و همچنین امکان انتقال ژن‌ها وخواص بیماری‌زایی از سویه‌های مشکوک به سویه‌های ایمن، می‌توانند به عنوان اهداف بعدی در این راستا مورد آزمایش و بررسی قرار بگیرند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می دانند از مساعدت های جناب آقای دکتر بهروز علیزاده بهبهانی قدردانی نمایند. از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به جهت مساعدت‌های مادی و معنوی در طول اجرای این پژوهش علمی تشکر و قدردانی می گردد. مقاله علمی-پژوهشی حاضر مستخرج از پایان نامه دانشجویی مصوب در گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد.

منابع

1- Mortazavi A, Ghandi A, Barouei J, Moussavi M. Diversity of lactic acid bacteria isolated from Kurdish ewe's milk cheese. Aust J Dairy Technol. 2007; 62(3):185.

2- Ogier JC, Serror P. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. Int J Food Microbiol. 2008; 126(3):291-301.

3- Walter V, Syldatk C, Hausmann R. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. Adv Exp Med Biol. 2010; 672:1-13.

4- Rodríguez E, González B, Gaya P, Nuñez M, Medina M. Diversity of Bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. Int Dairy J. 2000; 10(1):7-15.

5- Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. *Enterococci* in foods—a conundrum for food safety. Int J Food Microbiol. 2003;88(2):105-22.

6- Andrighetto C, Knijff E, Lombardi A, Torrioni S, Vancanneyt M., Kersters K, Swings J, Dellaglio F. Phenotypic and genetic diversity of *Enterococci* isolated from Italian cheeses. J Dairy Res. 2001; 68(02):303-16.

7- Scheidegger E, Fracalanzza S, Teixeira L, Cardarelli-Leite P. RFLP analysis of a PCR-amplified fragment of the 16S rRNA gene as a tool to identify *Enterococcus* strains. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(7):1003-8.

8- Murray BE. Diversity among multidrug-resistant *Enterococci*. Emerg Infect Dis. 1998; 4(1):37.

9- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, 9th ed. Wayne,Clinical and Laboratory Standards Institute,2006; PP: 2-9.

10- Edalatian MR. Detection and identification the microbial flora of cheeses obtained from raw milk using culture-based methods and molecular techniques [dissertation]. [Mashhad]: Ferdowsi University; 2012. [In Persian]

11- Edalatian MR, Najafi MBH, Mortazavi SA, Alegría Á, Delgado S, Bassami MR, et al. Production of bacteriocins by *Enterococcus* spp. isolated from traditional, Iranian, raw milk cheeses, and detection of their encoding genes. Eur Food Res Technol. 2012; 234(5):789-96.

12- Alegría Á, Álvarez-Martín P, Sacristán N, Fernández E, Delgado S, Mayo B. Diversity and evolution of the microbial populations during

www.SID.ir

Archive of SID

manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. Int J Food Microbiol. 2009; 136(1):44-51.

13- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int J Food Microbiol. 2001; 71(1):1-20.

14- Patil M, Kumari YR, Ramana K. Bacteriocin production by *Enterococcus* sp isolated from rat intestine. Int J Environ Sci. 2011; 1(7):1395-402.

15- Strompfová V, Lauková A, Simonová M, Marciňáková M. Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in *Enterococci* of different origin. Vet Microbiol. 2008; 132(3):293-301.

16- Sabia C, De Niederhäusern S, Guerrieri E, Messi P, Anacarso I, Manicardi G. Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin resistant *Enterococci* of different sources. J Appl Microbiol. 2008; 104(4):970-9.

17- Trmčić A, Obermajer T, Rogelj I, Matijašić BB. Short communication: culture-independent detection of lactic acid bacteria bacteriocin genes in two traditional Slovenian raw milk cheeses and their microbial consortia. J Dairy Sci. 2008; 91(12):4535-41.

www.SID.ir

Archive of SID

Tracing the Enterocin Encoding Structural Genes in *Enterococcus* Isolated From Kurdish Traditional Cheese

Hossein Zanganeh[1], **Fakhri Shahidi**[1*], Seyed-Ali Mortazavi[1], Mohammad-Reze Edalatian Dovom[1], Elnaz Milani[2]

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Department of Food Quality and Safety, Food Science and Technology Research Institute, Mashhad branch, Mashhad ,Iran*

Abstract

Enterocins are those bacteriocins that produce by *Enterococcus* strains. Enterocins have a large variety and any strain of *Enterococcus*, according to their genetic content and growth environment can produce type or types of Enterocin. In the present study 15 bacterial strains (*Enterococcus* genus) chose that had isolatated of Kurdish traditional cheese bye cultured-based and molecular methods. Genomic DNA isolation VI kit that was specific for Gram-positive bacteria with hard well, was used to DNA extraction of isolates. Polymerase chain reaction was performed, in order to tracing the Enterocin encoding structural genes. The results showed that the Enterocin gene A was 10 of 15 isolates and had the highest frequency and after the highest frequency was related to Enterocin gene P with 9 cases and B with 8 cases, respectively. The majority of investigated *Enterococcus* isolates in this study had Enterocin producing genes. *Enterococcus faecalis* NRIC0112 and *Enterococcus faecalis* SK13 had 5 different genes, Enterocin A, Enterocin B, Enterocin P, Enterocin 31 and Enterocin X. 1071, L50, AS48 and KS Enterocin genes was not found in any of the isolates. However, the use of these isolates in industrial and dairy products demands more researches.

Keywords: *Enterococcus*, Kurdish Traditional Cheese, Enterocin Encoding Genes.

* fshahidi@um.ac.ir

www.SID.ir