شناسایی *انتروکوکوس* تولید کننده باکتریوسین در محصولات لبنی به وسیله PCR

محبوبه میرحسینی

یزد، دانشگاه پیام نور، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۱٤ تاریخ پذیرش: ۸۹/۸/۱۸

چکیده

در این مطالعه ۲٦ نمونه از محصولات لبنی برای حضور ژن باکتریوسین‌ها توسط روشهای مستقل از کشت و جداسازی باکتریهای اسید لاکتیک مورد بررسی قرار گرفتند. این روش شامل استخراج مستقیم DNA از محصولات لبنی است و انجام PCR با ۳ جفت پرایمر اختصاصی برای ژن انتروسین‌های مختلف (انتروسین A، P، As47) از *انتروکوکوس* می‌باشد. آنالیز نتایج PCR نشان داده است که انتروسین A تنها انتروسین غالب در همه نمونه‌ها بوده است و ژن مربوط به انتروسین‌های دیگر در نمونه‌های مورد مطالعه وجود نداشته است. با توجه به این موضوع به نظر می رسد که احتمالاً انتروکوکوس ها سویه‌های غالب تولید کننده باکتریوسین از باکتریهای اسید لاکتیک در محصولات لبنی جمع شده از مناطق مختلف ایران هستند. نتایج همچنین نشان داده است که PCR یک متد حساس، سریع و تکرار پذیر برای آشکارسازی سویه‌های تولید کننده باکتریوسین در محصولات لبنی است.

واژه های کلیدی: انتروسین، انتروکوکوس، PCR

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۳۷۳۰۸۹۵، پست الکترونیکی m.mirhossaini@gmail.com

مقدمه

انتروکوکسی به طور وسیع در محیط پخش است. *انتروکوکسی* معمولاً در دستگاه گوارش انسان یا حیوانات ساکن است. *انتروکوکوس فکالیس* سویه غالب از *انتروکوکسی* در دستگاه گوارش انسان است. هر چند در تعدادی از افراد و تعدادی از کشورها *انتروکوکوس فاسیوم* فراوان‌تر از *انتروکوکوس فکالیس* است (۲). به هر حال موندت در سال ۱۹۸٦ تعیین کرده است که حضور *انتروکوکوس فکالیس* در تعداد زیادی از مواد غذایی همیشه با آلودگی مدفوعی ارتباط ندارد. همچنین نشان داده شده است که *انتروکوکسی* ارزش کمی از نظر شاخص آلودگی در مراحل صنعتی مواد غذایی دارد. هرچند *انتروکوکوس فاسیوم*، *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس دورانس* به فراوانی از مدفوع انسان جدا شده است اما این گونه‌ها در احشام اهلی مثل: خوک، گاو و گوسفند کمتر دیده می‌شوند. *انتروکوکسی* تنها در ارتباط با حیوانهای خونگرم نیست، آنها در خاک، سطح آبها، روی گیاهان، سبزیجات و حشرات وجود دارند. مقاومت *انتروکوکسی* به درجه حرارت پاستوریزه شدن، سازش پذیری آنها به سوبستراهای مختلف و شرایط متفاوت رشد (درجه حرارت بالا و پایین، pH حداکثر و نمک) دلیل این است که این باکتریها می‌توانند در محصولات غذایی تهیه شده از مواد خام (گوشت و شیر) و محصولات غذایی که تیمار حرارتی دیده‌اند، یافت شوند. این بدین معنی است که این باکتریها می‌توانند در شرایط معمول تولید غذا پایدار بمانند. به علاوه آنها می‌توانند محصولات غذایی را در زمان بسته بندی آلوده کنند. بنابراین *انتروکوکسی* می‌تواند قسمت مهمی از میکروبهای غذاهای تخمیری، به ویژه گوشت و پنیرهای تخمیر شده را تشکیل دهد. مطالعه روی

Archive of SID

www.SID.ir

میکروبیولوژی پنیرهای سنتی در کشورهای مدیترانه‌ای که عموماً از شیر گوسفند و بز تولید می‌شود مشخص کرده است، *انتروکوکسی‌ها* نقش مهمی در رسیدن پنیر ایفاء می‌کنند. این باکتریها شاید این نقش را از طریق لیپولیز، پروتئولیز و شکستن سیترات ایفاء می‌کنند. بنابراین این باکتریها باعث ایجاد مزه و طعم تیپیک در این پنیرها می‌شوند (۲). این باکتریها همچنین در محصولات غذایی تخمیری مثل سوسیسها (۳، ۵) و زیتونها وجود دارند. *انتروکوکسی* توانایی تولید باکتریوسین‌ها را دارد که انتروسین‌ها نیز نامیده می‌شوند. باکتریوسین‌ها، پپتیدهای کوچک با فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتریهای گرم مثبت شامل: باکتریهای عامل فساد یا باکتریهای بیماریزا مثل: *لیستریا* هستند (٤). بیش از این *انتروکوکسی‌ها* در تعدادی از کشورها به عنوان پروبیوتیک استفاده شده است (۳).

در سال ۱۹۵۵ تولید مواد باکتریوسین توسط گروه D *استرپتوکوکسی* گزارش گردیده است، تاکنون تعداد زیادی از انتروسین‌ها مطالعه شده است. امروزه توانایی *انتروکوکسی* در مهار گونه‌های مختلف *لیستریا* به خوبی شناخته شده است. این موضوع ممکن است به دلیل ارتباط فیلوژنتیک نزدیک *انتروکوکسی* و *لیستریا* شرح داده شود (٤). اولین انتروسین خالص شده انتروسین AS-48 تولید شده توسط *انتروکوکوس فکالیس* بود. این انتروسین به عنوان آنتی‌بیوتیک پپتیدی حلقوی توصیف شده است. از آن زمان به بعد تعداد انتروسین‌های جدید رو به افزایش است. به هر حال تعداد زیادی از این انتروسین‌ها خالص نشده‌اند. انتروسین‌ها در کلاس I، کلاس IIa، کلاس IIc و کلاس III باکتریوسین‌ها قرار دارند. انتروسین‌ها مانند بیشتر باکتریوسین‌ها غشاء سیتوپلاسمی را به عنوان هدف اولیه قرار می‌دهند. آنها در غشاء سیتوپلاسمی منفذ تشکیل می‌دهند، بنابراین باعث از بین رفتن پتانسیل غشاء سیتوپلاسمی و/ یا گرادیانت pH در غشاء سیتوپلاسمی می‌شوند. این امر منتج به نشت مولکولهای درون سلولی می‌شود. کمک *انتروکوکسی* به هضم بهتر و تولید خصوصیات مفید مثل طعم و مزه بهتر در محصولات غذایی تخمیری و همچنین توانایی آنها در تولید باکتریوسین‌ها (انتروسین‌ها) خصوصیات مهمی برای کاربرد آنها در صنایع غذایی دارد. در سالهای اخیر گزارشهایی مبنی بر استفاده از *انتروکوکسی* به عنوان کشت آغازگر (Starter cultures) یا کشت همراه (Co-cultures) افزایش قابل توجه‌ای داشته است. قسمت مهم این نوع از تحقیقها روی کاربرد سویه‌های *انتروکوکوس* که باعث ایجاد خصوصیات مفید در محصولات پنیر و محصولات گوشت می‌شود تمرکز کرده است. به هر حال کاربرد *انتروکوکسی* در فرآیند تولید مواد غذایی به علت داشتن پتانسیل خطر برای سلامت انسان، نیاز به تحقیق و پژوهش وسیع دارد (۲). در این تحقیق با استفاده از روش مستقل از کشت و PCR به بررسی حضور ژن تولید انتروسین در محصولات لبنی پرداخته شد تا فراوانی ژن انتروسین در محصولات لبنی مشخص گردد.

مواد و روشها

۲٦ نمونه از شیر و مواد لبنی (۲۱ نمونه شیر، ۳ نمونه پنیر، ۲ نمونه ماست) مختلف با روش مستقل از کشت که شامل استخراج مستقیم DNA و انجام عمل PCR است برای حضور ژن انتروسین‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج DNA باکتریایی از شیر و مواد لبنی: روش استفاده شده جهت استخراج کل DNA باکتریایی از مواد لبنی بر اساس روش شرح داده شده توسط Masco *et al* (2005) با کمی تغییر است(۸). mL ۱ از مواد لبنی با سرعت rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل در بافر TE حل شد و با سرعت ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب به دست آمده دوباره در µL ۲۰۰ از بافر TE حل گردید. این محلولها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش نگهداری

Archive of SID

www.SID.ir

شد. بعد بلافاصله در روی یخ به مدت ۵ دقیقه نگهداری گردید و سلولها به روش بالا سانتریفیوژ شد (۸). سپس DNA از مایع رویی توسط روش استخراج با فنل استخراج شد و در بافر TE حل گردید.

PCR با پرایمرهای 16SrDNA : برای تأیید استخراج، DNA استخراج شده از ۲۶ نمونه مواد لبنی به وسیله پرایمرهای RW01 و DG74 که مربوط به ژن 16S rDNA باکتریها است، PCR شدند (جدول۱) (۱۲ و ۱۳). همچنین کمیت استخراج DNA با اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.

PCR با پرایمرهای اختصاصی برای انتروسین‌ها: PCR با استفاده از پرایمرها اختصاصی برای انتروسین‌های لیست شده در جدول۲ انجام گرفت (۱).

به عنوان کنترل مثبت شیر استریل با *انتروکوکوس فاسیوم* (تولید کننده انتروسینA) و کنترل منفی برای ژن انتروسین A با *انتروکوکوس فکالیس* تلقیح گردید و DNA به روش بالا از آنها استخراج گردید.

نتایج

DNA به روش ماسکو و همکاران با کمی تغییر از ۲۶ نمونه از مواد غذایی a_1 تا a_{26} به طور مستقیم جدا شده است(۸). DNA ژنومی استخراج شده با این روش برای تأیید، در تکثیر بخشی از ژن 16SrDNA (RW01 و DG74) به عنوان ژن عمومی بکار برده شد. نتیجه PCR فوق در شکل ۱ نشان داده شده است؛ محصول ۳۷۰ bp در مقابل مارکر DNA برای ژنوم جداسازی شده تمام نمونه‌های غذایی مورد آزمایش قابل مشاهده است. همچنین استخراج DNA به وسیله اسپکتروفتومتر تأیید شده است . بنابراین صحت جداسازی DNA ژنومی تأیید گردید.

جدول ۱- خصوصیات پرایمرهای تشخیص توالی 16SrDNA.

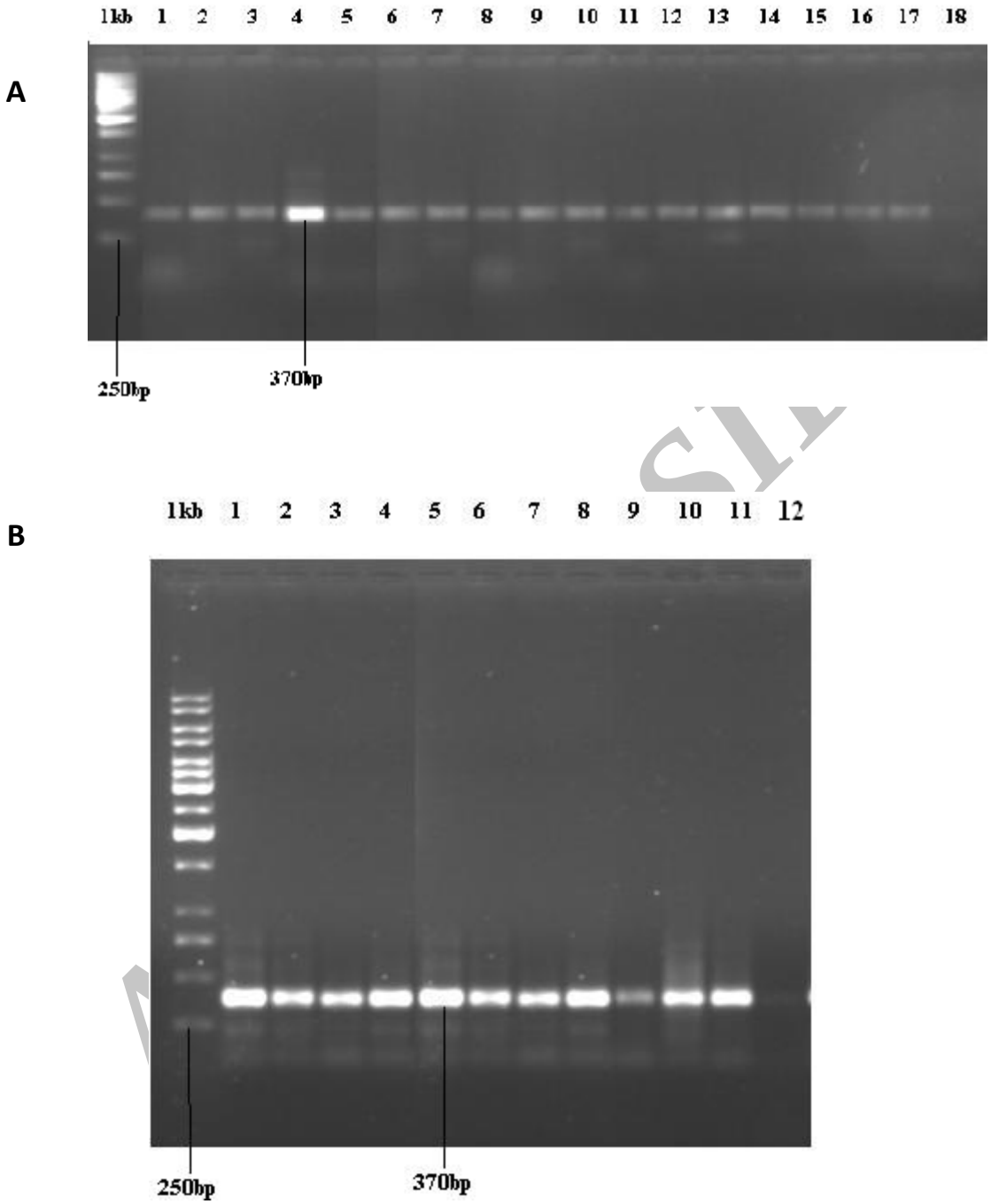
محصول PCR	نام پرایمر	توالی پرایمر	دمای ذوب پرایمر (°C)Tm
۳۷۰ bp	RW01	5′- AACTGGAGGAAGGTGGGGAT- 3′	۶۰
	DG74	5′- AGGAGGTGATCCAACCGCA- 3′	۵۹

جدول ۲- پرایمرهای اختصاصی استفاده شده برای انتروسین‌ها.

Bacteriocin	Forward primer	Reverse primer	Tm (C°)	PCR product (bp)
Enterocin A	EntAF- 5′- GGTACCACTCATAGTGGAAA-3′	EntAR- 5′- CCCTGGAATTGCTCCACCTAA-3′	EntAF (58) EntAR (64)	۱۳۷
Enterocin P	EntPF - 5′′-GCTACG CGTTCATAT GGT AAT-3′′	EntPR- 5′- TCCTGCAATATTCTC TTT AGC-3′′	EntPF (60) EntPR (57.90)	
Enterocin AS48	EntAs48F- 5′-GAGGAGTATCATGGTTAA AGA-3′	EntAs48R - 5′- ATATTG TTAAATTAC CAA-3′	EntAs48F (56.61) EntAs48R (43.79)	۸۷ ۲۳۸

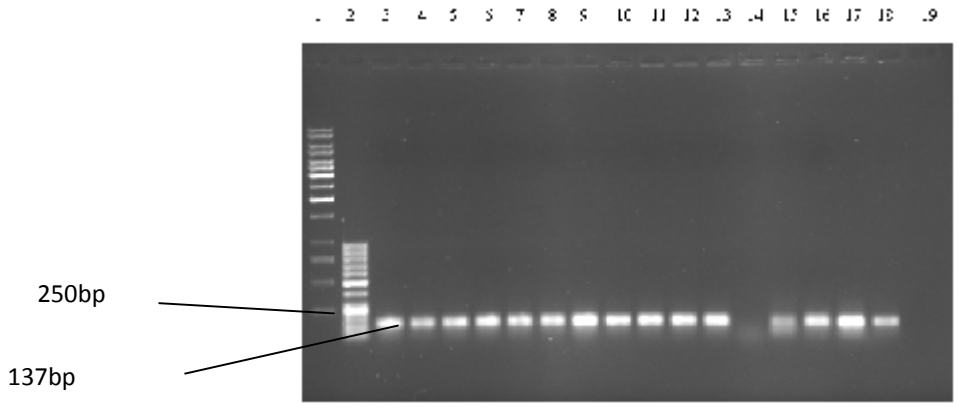
Archive of SID

www.SID.ir

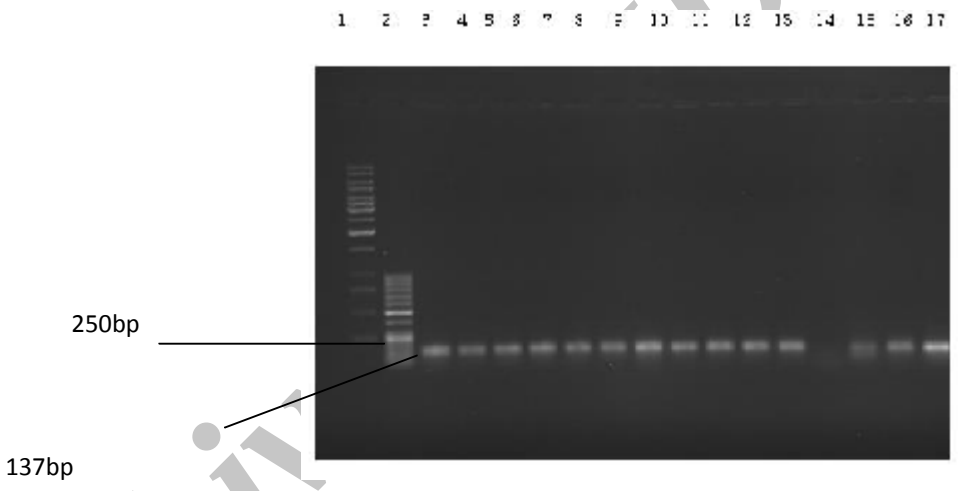


شکل۱- تکثیر PCR ژن 16SrDNA از نمونه‌های مواد غذایی (a_1 تا a_{26}) *با پرایمرهای RW01 و DG74*, (محصول PCR، ۳۷۰ bp). A : مارکر kb ۱ (فرمنتاز) ؛ ۱-۱۷- به ترتیب DNA جدا شده از a_1 تا a_{17}. ۱۸- آب. B: مارکر kb ۱؛۱-۹- به ترتیب DNA جدا شده از a_{18} تا a_{26}۱۰- شیر تلقیح شده با *انتروکوکوس فاسیوم*، ۱۱- شیر تلقیح شده با *انتروکوکوس فکالیس*، ۱۲- *آب*.

www.SID.ir



A



B

شکل ۲- محصول PCR از DNA که مستقیماً از مواد لبنی استخراج شده و با پرایمر اختصاصی برای انتروسین A تکثیر شده است. A: ۱- مارکر kb ۱، ۲- مارکر bp ۵۰ (فرمنتاز). ۳- شیر تلقیح شده با *انتروکوکوس فاسیوم* ، ٤-۱۳ – به ترتیب a_1 –a_{10}، ١٤- شیر تلقیح شده با *انتروکوکوس فکالیس*، ۱۵- ۱۸- به ترتیب a_{11} – a_{13}. ۱۹-آب . B: ۱- مارکر kb ۱، ۲- مارکر bp ۵۰ ،۳-۱۳ – به ترتیب a_{14} –a_{24}، ١٤- شیر تلقیح شده با *انتروکوکوس فکالیس* ، ۱۵- ١٦- به ترتیب a_{25}- a_{26}. ۱۷- شیر تلقیح شده با *انتروکوکوس فاسیوم*.

PCR با پرایمرهای اختصاصی برای انتروسین‌های A (محصول ۱۳۷ bp)، AS48 (محصول ۲۳۸ bp)، P (محصول ۹۰ bp) که توسط گونه‌های مختلف *انتروکوکوس* تولید می‌شود، بر روی DNA استخراج شده از مواد غذایی انجام گرفت. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز تنها حضور محصول حاصل از پرایمر اختصاصی از انتروسین A را در مواد غذایی نشان داد و سایر انتروسین‌های بررسی شده در مواد غذایی مورد بررسی غایب بودند (شکل ۲).

بحث

۲٦ نمونه ازمواد غذایی با روش مستقل از کشت که شامل استخراج مستقیم DNA و PCR است برای حضور ژنهای انتروسین مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج شامل استخراج

Archive of SID
www.SID.ir

مستقیم DNA و انجام عمل PCR برای حضور ژن انتروسین‌ها نشان داد که در همه نمونه‌ها تنها انتروسین A یافت می شود و ژنهای مربوط به انتروسین‌های دیگر غایب بودند. این نتایج نشان داد که روش PCR روش حساسی برای شناسایی سویه‌های تولید کننده باکتریوسین در مواد لبنی می‌باشد. مزیت این روش نسبت به روشهای وابسته به کشت، سرعت، دقت و تکرار پذیری آن است (۱۱). این موضوع به خاطر این است که روش PCR بر اساس شناسایی ژنها استوار است. همیشه آشکارسازی ژنهای بیان کننده نشان دهنده تولید این ماده نیست. فقدان بیان ژن به علت فقدان فاکتور القای نسخه برداری و یا رخداد ژنهای مقاومت چندگانه به باکتریوسین ممکن است به طور وسیع روی طیف ضد میکروبی باکتریوسین تولید شده توسط یک گونه خاص اثر کند (۱). فقدان فعالیت ضدمیکروبی ضرورتاً نقص ژن تولید باکتریوسین را معنی نمی‌دهد. تولید باکتریوسین یک فرآیند تنظیم شده است. به طوری که یک سلول باکتریایی مواد ضدمیکروبی را که دریک محیط غنی یا بدون رقابت رشد می‌کند، کمتر تولید می‌کند. به عبارت دیگر شرایط محیطی در تولید باکتریوسین تأثیر دارد. تعدادی از باکتریوسین‌ها در محیط جامد تولید می‌شوند ولی در محیط مایع تولید نمی‌شوند. بنابراین فراوانی وجود ژنهای ساختمانی می‌تواند بعد از به کارگیری متد ایده‌آل برای بررسی تولید باکتریوسین و شرایط اپتیمم تولید باکتریوسین و به کارگیری سویه حساس به باکتریوسین تخمین زده شود (۱۰). نتایج حاصل از این پروژه تأیید می‌کند که تولید انتروسین به طور وسیع در شیر و محصولات حاصل از شیر اتفاق می‌افتد (شکل ۲). استرومپفوا و همکاران (۲۰۰۸) حضور ژن انتروسین A ، B، P و L50B را در ٤٢٧ سویه *انتروکوکسی* از منشا مختلف (حیوان، غذا) با استفاده از تکنیکPCR بررسی کردند (٣٦٨ *انتروکوکوس فاسیوم*، ٥٩ *انتروکوکوس فکالیس*)(۱۰). بر اساس نتایج PCR ، ٢٣٤ سویه حاوی یک یا چند ژن ساختمانی انتروسین بودند. انتروسینP و A بیشترین ژنهای ساختمانی یافت شده در میان سویه‌های *انتروکوکوس* بودند. انتروسین A بیشتر در *انتروکوکوس فاسیوم* یافت شد ولی ژن انتروسینP، B و L50B بیشتر در هر دو سویه *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* یافت شدند (۱۰).

گسترش وسیع ژنهای انتروسین در بین *انتروکوکسی‌ها* ممکن است به علت توانایی *انتروکوکسی* برای انتشار و دریافت مواد ژنتیکی بین سویه‌ها و همچنین بین جنسها باشد. مثل تبادل مواد ژنتیکی بین جنس *انتروکوکسی* و *استافیلوکوکسی* (۱۰). انتروسین A به طور وسیع در میان *انتروکوکسی‌ها* گسترده است (٦) و فعالیت *ضدلیستریایی* قوی نشان می‌دهد (٦ و ۹). نتایج این تحقیق و سایر تحقیقات حضور تعداد زیاد باکتریهای اسید لاکتیک تولید کننده باکتریوسین با فعالیت مهاری در مقابل میکروارگانیسم‌های پاتوژن و عوامل مسمومیت غذایی موجود در شیر خام و محصولات لبنی را تأیید می‌کند (۷). همچنین نتایج نشان داد که سویه های تولید کننده انتروسین در شیر و محصولات لبنی فراوان است. این نتایج با نتایج به دست آمده حاصل از میکروبیولوژی پنیرهای سنتی در کشورهای مدیترانه‌ای که عموماً از شیر گوسفند و بز تولید می‌شود، تطابق دارد (۲).

منابع

1- De Vuyst, L., Foulquie Moreno, M. R. and Revets, H. 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. International Journal of Food Microbiology. 84, 299-318.

2- Foulquié Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. International Journal of Food Microbiology. 106, 1-24.

Archive of SID

www.SID.ir

3- Franz, C., Stiles, M. E., Schleifer, K. H. and Holzapfel, W. H. 2003. *Enterococci* in foods—a conundrum for food safety. International Journal of Food Microbiology. 88, 105-122.

4- Franz, C., Van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H. and Galvez, A. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. FEMS Microbiology Reviews. 31, 293-310.

5- Giraffa, G. 2002. *Enterococci* from foods. FEMS Microbiology Reviews. 26, 163-171.

6- Joosten, H., Rodriguez, E. and Nunez, M. 1997. PCR detection of sequences similar to the AS-48 structural gene in bacteriocin-producing enterococci. Letters in Applied Microbiology. 24, 40-42.

7- Martnez, B., Surez, J. E. and Rodriguez, A., 1995. Antimicrobials produced by wild lactococcal strains isolated from homemade cheeses. Journal of food protection (USA). 58, 1118-1123.

8- Masco, L., Huys, G., De Brandt, E., Temmerman, R. and Swings, J. 2005. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. International Journal of Food Microbiology. 102, 221-230.

9- Nunez, M., Rodriguez, J. L., Garcia, E., Gaya, P. and Medina, M. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. Journal of Applied Microbiology. 83, 671-677.

10- Strompfova, V., Laukova, A., Simonova, M. and Marcinakova, M. 2008. Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. Veterinary Microbiology. 132, 293–301.

11- Suwanjinda, D., Earnes, C. and Panbangred, W. 2007. Screening of lactic acid bacteria for Bacteriocins by microbiological and PCR methods. Biochemistry and Molecular Biology Education. 35, 364-369.

12- Trotha, R., Hanck, T., Knig, W. and Knig, B. 2001. Rapid ribosequencing-an effective diagnostic tool for detecting microbial infection. Infection. 29, 12-16.

13- Yoon, M. Y., Kim, Y. J. and Hwang, H. J. 2008. Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product. Food Science and Technology. 41, 925-933.

Identification of bacteriocin producing Enterococcus in dairy products by PCR

Mirhosseini M.

Biology Dept., University of Payam Noor, Yazd, I.R. of IRAN

Abstract

In this study, a collection of 26 dairy products were subjected to bacteriocin analysis by using a culture-independent approach. The culture-independent approach involved extraction of total bacterial DNA directly from the products, this is followed by a polymerase chain reaction (PCR) using three pairs of specific primers (enterocin A, enterocin P and enterocin As48). The PCR analysis showed that only enterocin A was predominant in all study samples, however the other genes were absent. The absent of other bacteriocins in 26 samples , give the idea *that Enterococcus spp* are predominant bacteriocin producing LAB in different dairy products obtained from different area in Iran. Also the PCR approach was found to have a much higher sensitivity for detection of bacteriocin producing strains in dairy products in a fast, reliable, and reproducible manner.

Keywords: Enterocin*, Enterococcus*, PCR.

Archive of SID

www.SID.ir