Archive of SID

Journal of Food Hygiene, Vol. 10, No. 39, Autumn 2020

"Research article" DOI: 10.30495/JFH.2020.1896185.1266

Tracing of IIa and IIb bacteriocins in native strains of *Lactobacillus* isolated from traditional dairy products

Pourabdi Sarabi, P.[1], Tarinejad, A.[2*], Hejazi, M.A.[3], Majidi, M.[4]

1. MSc student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
2. Associate Professor, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
3. Associate Professor, Food Biotechnology Institute, Agricultural Biotechnology Institutes of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization of Iran (AREEO), Tabriz, Iran
4. Assistance Professor, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

*Corresponding Author: atarinejad@yahoo.com

(Received: 2020/3/25 Accepted: 2020/11/28)

Abstract

Lactic acid bacteria produce bacteriocin as antibacterial protein molecules with diverse genetic origins. Therefore, identifying the bacteriocin class of native lactic acid bacteria could lead to an understanding of the antibacterial function of these peptides. In this study, the presence of two subgroups of bacteriocins (IIa and IIb) in the native strain of Lactic acid bacteria was investigated. After the screening of these strains against two Index microorganisms including *Listeria innocua* (ATCC 33090), and *Escherichia coli (ATCC 1399)* by disk diffusion assay, the five strains with the highest diameter of growth inhibitory against these index pathogens were selected. The molecular weight of peptides secreted by lactic acid bacteria was estimated by ammonium sulfate precipitation. Upstream and downstream sequences of the bacteriocin structural gene were used to identify bacteriocin-producing lactic isolates in the polymerase chain reaction. The results of SDS - PAGE showed bands with a molecular weight of less than 10 kDa for these strains. Sequencing of the polymerase chain reaction product led to the identification of plnN, plnJK, and plnEF gene regions in N isolate and plnJK and plnEF gene regions in M isolate. Therefore, isolates M and N have good potential for use in increasing the quality level of dairy products and animal feed. The multalign results of sequences showed that the native strains in Iran are very similar (99%) with *Lactobacillus plantarum* FQ and ATCC BAA-793 strains. In case of additional experiments related to the isolation of bacteriocins present in native strains M and N, their inhibitory effect against foodborne pathogens can be used.

Conflict of interest: None declared.

Key words: Bacteriocin, Multalign, Probiotic, Tracing

www.SID.ir

Archive of SID

بهداشت مواد غذایی

دوره ۱۰، شماره ۳، پیاپی ۳۹، پاییز ۱۳۹۹، صفحات ۸۱-۶۷

DOI: 10.30495/JFH.2020.1896185.1266

«مقاله پژوهشی»

ردیابی باکتریوسین گروه IIa و IIb در سویه‌های بومی *لاکتوباسیلوس* جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی

پریسا پورعبدی سرابی[۱]، علیرضا تاری نژاد[۲*]، محمدامین حجازی[۳]، محمد مجیدی[٤]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، تبریز، ایران

۲. دانشیار دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، تبریز، ایران

۳. دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی صنایع غذایی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران

٤. استادیار دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، تبریز، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: atarinejad@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۹/۱/٦ پذیرش نهایی: ۹۹/۹/٦)

چکیده

باکتری‌های اسیدلاکتیک، مولکول‌های پروتئینی ضد باکتریایی باکتریوسین با منشأ ژنتیکی متنوع تولید می‌کنند. بنابراین، شناسایی رده باکتریوسینی این باکتری‌ها، می‌تواند منجر به درک درستی از عملکرد ضد باکتریایی این پپتیدها شود. هدف از این پژوهش غربالگری باکتری‌های اسیدلاکتیک بومی مولد باکتریوسین‌های زیرگروه IIa و IIb بود. ابتدا جدایه‌های با ویژگی ضد باکتریایی علیه دو باکتری شاخص *لیستریا اینوکوا* (*Listeria innocua*) و *اشریشیا کولای* (*Escherichia coli*) با استفاده از آزمون انتشار از دیسک غربالگری شدند. وزن مولکولی پپتیدهای ترشح‌شده از باکتری‌های اسیدلاکتیک در محیط کشت با روش ترسیب سولفات آمونیوم تخمین زده شد. برای شناسایی جدایه‌های لاکتیکی مولد باکتریوسین از توالی‌های بالادستی و پایین‌دستی ژن ساختاری باکتریوسین در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده گردید. پنج جدایه اسیدلاکتیک با بیشترین قطر هاله عدم رشدی علیه دو باکتری شاخص گزینش و وزن مولکولی پپتیدهای ترشح‌شده توسط این سویه‌ها کمتر از ۱۰ کیلودالتون برآورد گردید. توالی‌یابی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز منجر به شناسایی مناطق ژنی *plnN*، *plnJK* و *plnEF* در جدایه N و مناطق ژنی *plnJK* و *plnEF* در جدایه M گردید. بنابراین، جدایه M و N دارای باکتریوسین گروه IIb بوده و از قابلیت خوبی برای استفاده در افزایش سطح کیفی فراورده‌های لبنی و غذای دام برخوردار می‌باشند. نتایج زیر هم‌چینی توالی‌های به‌دست‌آمده نشان داد که سویه‌های بومی موجود در ایران تشابه بسیار بالایی (۹۹ درصد) با *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*Lactobacillus plantarum*) سویه‌های FQ و ATCC BAA-793 دارد. در صورت انجام آزمایش‌های تکمیلی در ارتباط با جداسازی باکتریوسین‌های موجود در سویه‌های بومی M و N، می‌توان از اثر مهاری آن‌ها علیه باکتری‌های بیماری‌زای غذایی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: ردیابی، زیرهم‌چینی، پروبیوتیک، باکتریوسین

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

باکتریوسین‌ها به پپتیدها، پروتئین‌ها یا کمپلکس پروتئینی ضد باکتریایی سنتز شده توسط باکتری‌ها اطلاق می‌گردد که علیه باکتری‌های نزدیک ازنظر خویشاوندی، باهدف باکتری‌کشی و یا توقف رشد تولید می‌شوند (Banerjee *et al*., 2013). استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک و باکتریوسین‌های تولیدشده توسط آن‌ها به‌عنوان نگه‌دارنده فراورده‌های غذایی باهدف حذف و یا کنترل میکروارگانیسم‌های عامل بیماری‌زا و فساد مواد غذایی امن معرفی‌شده است (Vuyst and Vandamme, 1994). عمده طبقه‌بندی باکتریوسین‌های تولیدشده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک شامل: (I): لانتی‌بیوتیک‌ها با وزن مولکولی کمتر از پنج کیلودالتون است، این پپتیدهای کوچک حاوی اسیدآمینه‌های لانتیونین و یا ال متیل لانتیونین هستند. (II): پپتیدهای کوچک بدون تغییرات پس از ترجمه و مقاوم به حرارت، با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلودالتون، (III): پروتئین‌های بزرگ حساس به حرارت با وزن مولکولی بیشتر از ۱۰ کیلو دالتون (Eijsink *et al*., 2002). (IV): کمپلکس پروتئینی لیپیدی و یا پروتئینی کربوهیدراتی (Joerger and Klaenhammer, 1990). تا به امروز باکتریوسین‌های گروه II به شش زیرگروه تقسیم‌بندی شده‌اند. زیرگروه IIa، IIb، IIc، IId، IIe، IIf (Van Belkum and Stiles, 2000). باکتریوسین‌های زیرگروه IIa بزرگ‌ترین و گسترده‌ترین زیرگروه مطالعه شده در گروه II باکتریوسینی می‌باشد و فعالیت ضد باکتریایی قوی علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes*) داشته است. این زیرگروه شامل باکتریوسین‌های شبه پدیوسینی است و در بخش N ترمینال خود دارای توالی حفاظت‌شده YGNGVXC (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys) می‌باشد (Papagianni and Anastasiadou, 2009).

باکتریوسین‌های زیرگروه IIb کمپلکسی از دو رشته پپتیدی هستند. هر یک از دو رشته می‌توانند به‌طور مستقل به سلول‌های هدف متصل شوند اما فعالیت ضد باکتریایی این پپتیدها مستلزم تعامل آن‌ها با یکدیگر است (Banerjee *et al*., 2013; Bastos *et al*., 2010). در حال حاضر برخی روش‌ها برای غربالگری باکتری‌های اسیدلاکتیک مولد باکتریوسین توسعه‌یافته است، ازجمله روش انتشار از چاهک (Jacobsen *et al*., 1999)، آزمون لکه‌گذاری آگار (Todoriki *et al*., 2001)، آزمون میکروپلیت (Eijsink *et al*., 2002) آزمون فولوسایتومتری (Nuding *et al*., 2009)، روش انتقال انرژی رزونانس بر مبنای pH (Kim and Cha, 2006)، روش بیولومینومتریک (Liu *et al*., 2014). *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* حداقل ٦ باکتریوسین مجزا تولید می‌کنند. ازجمله شایع‌ترین پلانتاراسین‌هایی که توسط *لاکتوباسیلوس پلانتارم* تولیدشده‌اند می‌توان به پلانتاراسین EF، پلانتاراسین W ، پلانتاراسین JK و پلانتاراسین S اشاره کرد که همگی جزو باکتریوسین‌های دو پپتیدی می‌باشند (Zacharof and Lovitt, 2012).

با این‌حال این روش‌ها وقت‌گیر و پرزحمت بوده و به‌طور مستقیم وجود باکتریوسین را تائید نمی‌کند. به‌منظور بهبود روش غربالگری و به دست آوردن جدایه مولد زیرگروه IIa باکتریوسینی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در مطالعات قبلی روش انتشار از دیسک (Pingitore *et al*., 2007)، روش انتشار از چاهک و PCR را به‌کاربرده‌اند (Więckowicz *et al*.,

www.SID.ir

Archive of SID

2011). باکتری‌ها برای تولید باکتریوسین حداقل به ٤ ژن در ۱ یا ۲ اپرون نیاز دارند. خوشه ژنی باکتریوسین‌های مختلف ممکن است بر روی کروموزوم، ترنسپوزون‌ها و یا پلاسمیدها واقع شوند. شباهت بسیاری در سازمان‌دهی ژنتیکی ژن‌های کد کننده و سازنده باکتریوسین‌های کلاس II وجود دارد (Deshmukh and Thorat, 2014). با توجه به توانایی باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده باکتریوسین در مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا و باکتری‌های عامل فساد مواد غذایی، هدف از این پژوهش غربالگری باکتری‌های اسیدلاکتیک بومی باقابلیت مهارکنندگی بر دو باکتری شاخص *لیستریا اینوکوا* و *اشریشیا کولای* و به‌صورت اختصاصی غربالگری باکتری‌های اسیدلاکتیک مولد دو زیرگروه باکتریوسینی IIa و IIb بوده است.

مواد و روش‌ها

- سویه‌ها و محیط‌های کشت

در این پژوهش از ۵۰ باکتری اسیدلاکتیک و یک‌سویه استاندارد بومی لاکتوباسیلوس پلانتاروم سویه L28 موجود در مجموعه میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی صنایع غذایی استفاده گردید. سویه استاندارد لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC14917) نیز از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به‌صورت لیوفیلیزه (lyophilization) تهیه شد. باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌کاررفته در این پژوهش قبلاً از فراورده‌های شیر و ماست محلی مناطق مختلف آذربایجان شرقی جداسازی شده و در محیط کشت MRS مایع (Sigma - Aldrich, Germany) و حاوی ۳۰ درصد حجمی گلیسرول در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شده بودند. در این پژوهش دو سویه باکتری شاخص موجود در مجموعه میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی صنایع غذایی شامل *لیستریا اینوکوا* (ATCC 33090)، *اشریشیا کولای* (ATCC 1399)، مورداستفاده قرار گرفت.

- تولید باکتریوسین

جهت تولید مایع رویی حاوی باکتریوسین، از سویه‌های تولیدکننده باکتریوسین، از ۵۰ باکتری اسیدلاکتیک تحت شرایط استریل به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع تلقیح داده شدند و در شرایط کم هوازی (شرایط اتمسفری با فشار اکسیژن پایین) و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٤٨ ساعت انکوبه شدند. بعد از گرمخانه گذاری، سوسپانسیون‌های باکتریایی حاضر به مدت ۲۰ دقیقه در rpm ٦۰۰۰ در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و با عبور از فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر استریل شدند. مایع‌های رویی عاری از سلول استریل هرکدام از سویه‌ها، به علت تولید اسید، pHاسیدی داشت که با استفاده از NaOH ٤ نرمال بر روی ۷ تنظیم‌شده و عصاره نهایی به‌عنوان باکتریوسین خام جهت بررسی‌های بعدی مورداستفاده قرار گرفت (Ogunbanwo *et al*., 2003).

- بررسی فعالیت ضد باکتریایی

فعالیت ضد باکتریایی مایع رویی کشت حاصل از ۵۰ سویه اسیدلاکتیک با استفاده از آزمون انتشار از دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت (Liu *et al*., 2014). قبل از انجام دیسک گذاری، ابتدا محیط کشت مولر هینتون به شکل آگار نرم با افزودن ۰/۷ درصد آگار تهیه، استریل و خنک گردید. سپس ۲۰ میلی‌لیتر از این محیط کشت، به میزان ۱ درصد با پاتوژن‌های موردنظر

www.SID.ir

Archive of SID

با کدورت ۰/۳ (OD600nm=۰/۳) تلقیح شده و درون پلیت‌ها ریخته و به مدت یک ساعت پلیت‌ها درون یخچال باقی ماندند تا آگار کاملاً بسته شود. علت استفاده از آگار نرم این است که باکتریوسین بتواند به‌راحتی در آن انتشاریافته و به اطراف دیسک نفوذ نماید. پس از گذشت مدت‌زمان مقرر، دیسک‌های استریل به قطر ٦ میلی‌لیتر بر روی محیط کشت قرار داده شدند و ۲۰ میکرولیتر از باکتریوسین‌های خام تهیه‌شده تحت شرایط استریل بر روی دیسک‌های واقع بر روی پلیت، قرار داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ٤ درجه سلسیوس قرار گرفتند تا مواد آنتی باکتریایی به‌تدریج از دیسک به سمت آگار منتشر شوند و سپس به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. فعالیت آنتی‌باکتریایی مایع رویی با اندازه‌گیری قطر هاله مهار رشدی با استفاده از کولیس با دقت ۰/۱ میلی‌لیتر تعیین شد (Campos *et al.*, 2006). به‌این ترتیب فعالیت آنتی باکتریایی ۵۰ سویه اسیدلاکتیک علیه دو باکتری شاخص بررسی و درنهایت پنج سویه برای مطالعات پیشرفته انتخاب گردید.

- خالص‌سازی نسبی پروتئین‌های خارج سلولی

برای تخمین وزن مولکولی مایع رویی‌های خنثی‌شده عاری از سلول استریل مربوط به هرکدام از پنج سویه، به میزان ۸۰ درصد با پودر سولفات آمونیوم اشباع و جهت رسوب باکتریوسین به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٤ درجه سلسیوس شیک شدند. بعد از گذشت مدت‌زمان مقرر فالکون‌های مذکور به مدت ۳۰ دقیقه در g ۵۵۰۰ در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و رسوب‌هایی در ته فالکون‌ها تشکیل شدند. سپس مایع رویی دور ریخته شده و رسوب‌ها در حداقل میزان بافر فسفات سالین (pH= ۷/٤) به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٤ درجه سلسیوس حل شدند (Zacharof and Lovitt, 2012). وزن مولکولی باکتریوسین‌هایی که به‌صورت نسبی خالص‌سازی شدند، با استفاده از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید سدیم دو دسیل سولفات (PAGE- SDS) طبق روش لاملی، تعیین شدند (Lammeli, 1997). بعد از الکتروفورز، ژل بارنگ کوماسی بلو (Coomassie Blue R-250) رنگ‌آمیزی و از طریق شستشو با مخلوط استیک اسید- متیل الکل – آب (۵:۵:۱) به مدت ٢٤ ساعت، رنگ‌بری شد. از مارکر پروتئینی ۲۵۰-۵ کیلو دالتون (شرکت سینا ژن، ایران) به‌عنوان مارکر استاندارد استفاده شد.

- استخراج DNA ژنوم و پلاسمید باکتری اسیدلاکتیک

جهت استخراج DNA از کشت ٢٤ ساعته باکتری‌ها در محیط MRS مایع و بافر لیز کننده CTAB (Sigma - Aldrich, Germany) استفاده گردید. تخریب دیواره سلولی با شوک حرارتی انجام گرفت. تیوب‌های حاوی پلت، به‌طور متناوب در ازت مایع و بن ماری ٦۵در دمای درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس ۱ میلی‌لیتر بافر CTAB و یک میکرولیتر پروتئاز K اضافه و کاملاً مخلوط تا به‌صورت شیری‌رنگ درآید، سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ٦۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. بعد از سانتریفیوژ، مایع رویی جدا و برای خالص‌سازی DNA از پروتئین، کلروفرم ایزوآمیل الکل با نسبت ٢٤:۱ استفاده شد. رسوب‌دهی DNA با استفاده از ایزوپروپانل سرد انجام و در مرحله آخر برای شست و شوی DNA از اتانول استفاده شد. DNA ته‌نشین شده بعد از خشک

www.SID.ir

Archive of SID

شـــدن در دمای اتاق، در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه حل شـــدند. جهت بررسی کیفیت DNA از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۷ /۰ درصد استفاده شد. هـمـچـنـین اســـتخراج پلاســـمید باکتری‌های اســیدلاکتیک با روش کاالانهامر صورت گرفت (Klaenhammer, 1984).

- تکثیر ژن باکتریوسین

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز متشـــکـل از ۱ میکرولیتر DNA الـگـو، ۱۲/۵ مـیکرولیتر Master Mix، ۱۰/۵ میکرولیتر آب دیونیزه و ۰/۵ میکرولیتر از هرکـدام از آغـازگرهـای رفت‌وبرگشـــت و حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. واسرشته سازی DNA الگو در ۹٤ درجه سـلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت و به دنبال آن واکنش تکثیری DNA در ۳۵ سیکل به شرح زیر انجام شـد: واسـرشته سازی در ۹٤ درجه سلسیوس بـه مـدت ۱دقیقـه، درجـه حرارت آنیلینـگ مختص هر جفت آغازگر به مدت ٤۵ ثانیه، گسـترش آغازگر در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و انکوباسیون نهایی در ۷۲ درجه سـلسـیوس به مدت ۱۰دقیقه برای حصـول اطمینان از تکمیل و گسـترش آغازگرها صورت گرفت. جهت آشـکارسـازی محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱درصـــد با اســـتفاده از بافر TAE ۱X استفاده شد. محصول PCR پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر نور UV موردبررسی قرار گرفتند و از مارکر DNA 1000 (Gene ruler Fermentas, Germany) bp/1kb به‌عنوان سـایز مارکر مولکولی اسـتفاده شـد (Haas *et al*., 1994).

بـه‌منظور ردیـابی ٦ ژن بـاکتریوســـینی زیرگروه IIb باکتریوسـینی (*plnA ،plnN،plnJ ، plnK،plnE،plnF*) و جهت افزایش قدرت خوانش و رسیدن به‌توالی کامل ژن باکتریوسـین، سـه جفت آغازگر از نواحی حفاظت‌شـده بـالـادســـت و پایین‌دســـت این ژن‌ها طراحی شـــدند (جدول۱). این نواحی حفاظت‌شده شامل ژن‌های ایمنی و ژن‌های مســـئول انتقال باکتریوســـین به محیط خارج ســـلولی می‌بـاشـــند (Gholamzadeh *et al*., 2017). بـه‌منظور ردیـابی ۵ ژن بـاکتریوســـینی زیرگروه IIa (Bacteriocin423، PediocinAcH، Sakacin، leucocin A، mesentericin Y105) از دو جفت پرایمر با فوروارد مشـترک طراحی‌شـده توسـط ویکوویکز و همکاران (Wie¸ ckowicz) استفاده گردید. آغازگر رفت استفاده‌شده قابلیت اتصال به نوکلئوتیدهای حفاظت‌شده کد کننده توالی N ترمینال پپتید بالغ این ۵ باکتریوســـین را دارد (جدول۲).

جدول (۱)- لیست آغازگرهای استفاده‌شده در تکثیر ژن باکتریوسینی زیرگروه IIb (Gholamzadeh *et al*., 2017).

آغازگر	توالی رفت	توالی برگشت	دمای Tm	اندازه قطعه (bp)	ژن هدف
EF	TCCAAGCTTAGAGGATAGG	CTAATGCCGTAGTCCCTTC	٥٤/٥	۱٥۰۰	*pln EF*
JK	TTAAAACGGCGTCTGAGAT	CCAAAAGATAATCCTGACCA	٥٥	۲۰۰۰	*pln JK*
M	GCATATTCTTTTTGGCTAGG	CTGTAACACCATGACTGAG	٥٥/٥	۱۷۰۰	*pln N*

www.SID.ir

Archive of SID

جدول (۲)- لیست آغازگرهای استفاده‌شده در تکثیر ژن باکتریوسینی زیرگروه IIa (Liu *et al*., 2014).

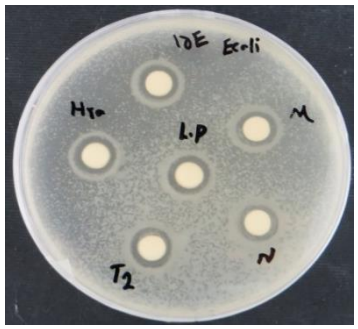
آغازگر	توالی رفت	توالی برگشت	دمای Tm	اندازه قطعه تکثیری
A	TGGGGTAAGGCTACCACTTG	CCCTTTATTGATGCCAGCTC	۵۸	۱۶۵۰**
B	ATGGGGTTACTTGTGGCAAA	CCCTTTATTGATGCCAGCTC	۵۷	۱۸۵۰**

**باندی بر روی ژل از طریق PCR برای آغازگرهای A و B مشاهده نشد.

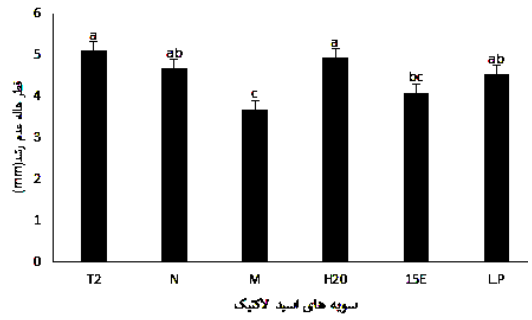
یافته‌ها

- آزمون انتشار از دیسک

از ۵۰ باکتری اسیدلاکتیک موجود در پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال غرب و غرب کشور ۵ باکتری با بازدارندگی خوب علیه دو باکتری شاخص *لیستریا اینوکوا* (ATCC 33090) و *اشرشیا کولای* (ATCC 1399) با روش انتشار از دیسک غربالگری شدند. این ۵ سویه با توجه به بازدارندگی بسیار خوب در مقایسه با شاهد، برای بررسی ردیابی باکتریوسین گروه IIa و IIb در این مطالعه انتخاب شدند (شکل۱).



الف



ب

شکل (۱)- بازدارندگی پنج سویه گزینش‌شده (سویه L.P به‌عنوان شاهد) علیه باکتری شاخص *اشریشیا کولای* (الف) و مقایسه میانگین بین سویه‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد برای قطر هاله رشد برعلیه باکتری *لیستریا اینوکوا* و *اشرشیا کولای* انجام‌گرفته است (ب).

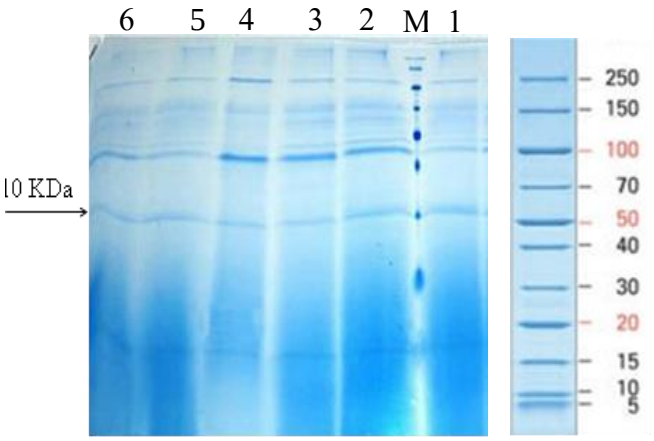
اکثر سویه‌های مورد بررسی به‌استثنای سویه M از نظر قطر هاله عدم رشد میانگین بیشتر یا برابر با سویه *لاکتوباسیلوس پلانتارم* به‌عنوان شاهد دارند که این امر پتانسیل پروبیوتیکی این سویه‌ها را نسبت به سویه استاندارد جهانی تائید می‌کند.

- آنالیز SDS-PAGE

آنالیز SDS- PAGE نمونه‌ها روی ژل پلی آکریل آمید ۲۰ درصد، در مقایسه با مارکر پروتئینی، یک باند پروتئینی با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ KDa را نشان داد که در بازه وزن مولکولی گروه II باکتریوسینی قرار دارد (شکل۲).

www.SID.ir

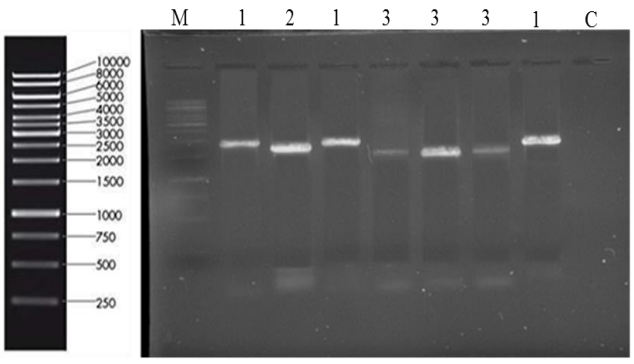
Archive of SID



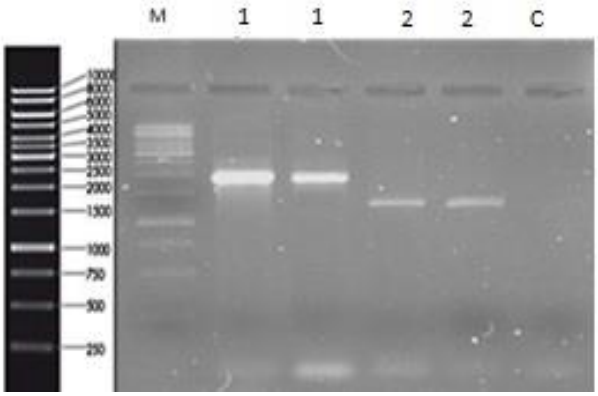
شکل (۲)- تصویر SDS-PAGE پروتئین‌های نیمه خالص‌شده باکتری‌های اسیدلاکتیک گزینش‌شده.
(۱) L_{28}، (۲) 15E، (۳) T_2، (٤) N، (٥) M، (٦) H_{20} و M) مارکر پروتئینی

- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای EF، JK و M نشان داد دوسویه N و M دارای ژن‌های ساختاری برای باکتریوسین‌های Plan EF، Plan JK و Plan N هستند (شکل ۳ و ٤).



شکل (۳)- تصویر الکتروفورز (ژل آگارز ۱ درصد) محصول PCR حاصل از تکثیر ۳ ژن باکتریوسینی زیرگروه IIb در سویه N . (۱،۱و۱) تکرارهای مستقل از تصویر الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر plan JK به طول ۲۰۰۰ جفت باز (۲) تصویر الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر plan N به طول ۱۷۰۰جفت باز. (۳،۳و۳) تکرارهای مستقل از تصویر الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر plan EF به طول ۱۵۰۰جفت باز.C:کنترل منفی.M: مارکر.



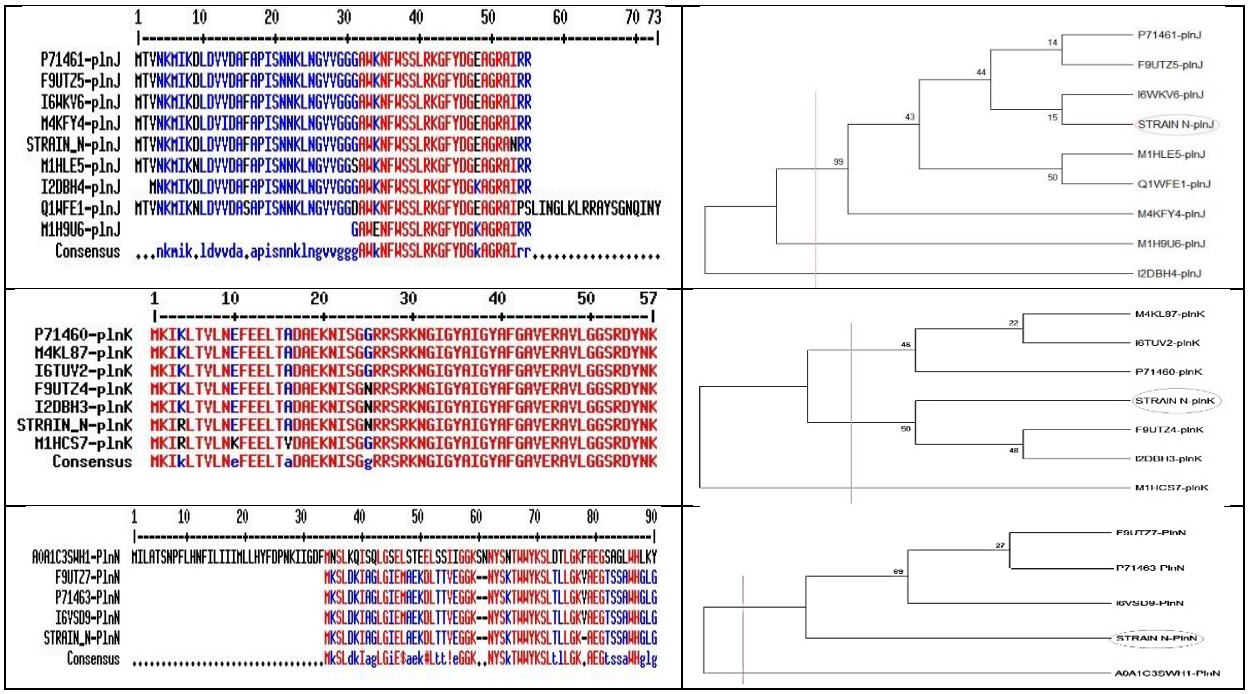
شکل (٤)- تصویر الکتروفورز (ژل آگارز ۱ درصد) محصول PCR حاصل از تکثیر ۲ ژن باکتریوسینی زیرگروه IIb در سویه M (۱و۱) تکرارهای مستقل از تصویر الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر plan JK به طول ۲۰۰۰ جفت باز. (۲و۲) تکرارهای مستقل از تصویر الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر plan EF به طول ۱۵۰۰جفت باز.C: کنترل منفی.M: مارکر.

www.SID.ir

Archive of SID

- زیرهم‌چینی توالی دی ان ای Plantaricicin J and K با توالی به‌دست‌آمده از باکتری سویه بومی

بعد از تکثیر توالی ژن *plan J, K, N* از سویه N، قطعه ژن مربوطه از روی ژل خالص‌سازی شد و برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. نتایج زیر هم‌چینی توالی ژن‌های کد کننده برای باکتریوسین‌های J, K, N با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده برای این ژن‌ها نشان داد که سویه بومی موجود در ایران ازنظر توالی باکتریوسین شباهت بسیار زیادی (۹۹/۹ درصد) با سویه *L. plantarum* strain FQ (KX853041.1) دارد.

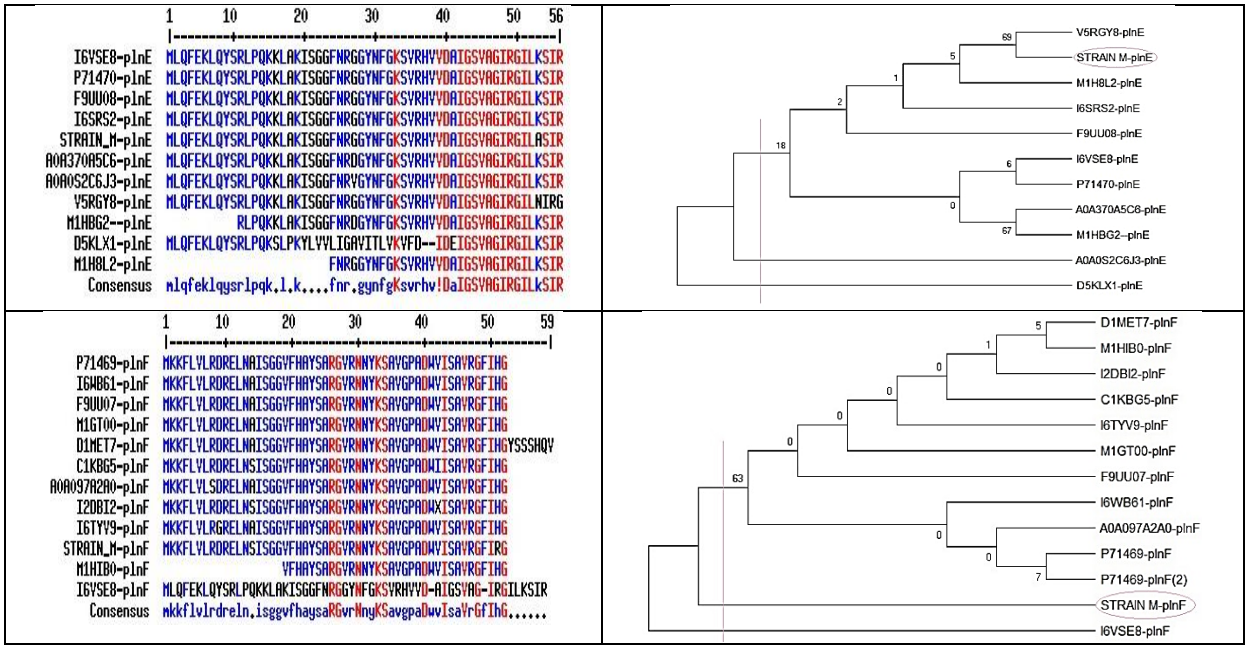


شکل (۵)- زیرهم‌چینی توالی اسیدآمینه ژن‌های کد کننده برای Plantaricicin J, K, N موجود در NCBI با توالی‌های به‌دست‌آمده از سویه بومی N به همراه خوشه‌بندی آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار مگا ویرایش X (۲٤) و روش ادغام نزدیک‌ترین همسایه

بعد از تکثیر توالی ژن *plan E,F* از سویه M، قطعه ژن مربوطه از روی ژل خالص‌سازی و پس از تعیین توالی نتایج زیر هم‌چینی توالی ژن‌های کد کننده برای باکتریوسین‌های E, F با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده برای این ژن‌ها نشان داد که سویه بومی موجود در ایران ازنظر توالی باکتریوسین شباهت بسیار زیادی (۹۹/۸ درصد) با سویه *L. plantarum* strain ATCC BAA-793 دارد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل (٦)- زیرهم‌چینی توالی اسیدآمینه ژن‌های کد کننده برای Plantaricicin E, F موجود در NCBI با توالی به‌دست‌آمده از سویه بومی M به همراه خوشه‌بندی آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار مگا ویرایش X (٢٤) و روش ادغام نزدیک‌ترین همسایه

توالی‌های اسیدآمینه‌های Bacteriocin J, K, F, E, N باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتارم* از پایگاه داده uniprot استخراج و با استفاده از نرم‌افزار مگا ویرایش X (٢٤) روش ادغام نزدیک‌ترین همسایه گروه‌بندی گردید. نتایج حاصل (شکل ۷) نشان داد که باکتریوسین J و K در یک زیرگروه واقع‌شده‌اند و ازنظر اسیدآمینه‌های تشکیل‌دهنده تا حدودی شبیه هم و در اکثر قسمت‌ها هر دو پروتئین ساختار حفاظت‌شده‌ای را دارا می‌باشند، طوری که به نظر می‌رسد احتمالاً این دو باکتریوسین از یک ژن اجدادی نشایت گرفته‌اند و هر دو زیر واحد، تقریباً وزن مولکولی یکسانی دارند. سایر باکتریوسین‌های موردبررسی در زیرگروه‌های مجزا از هم قرارگرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

شکل (۷)- گروه‌بندی باکتریوسین‌ها بر اساس توالی اسیدآمینه ژن‌های کد کننده آن‌ها بر اساس اطلاعات موجود در NCBI با توالی به‌دست‌آمده از سویه بومی M و N

بحث و نتیجه‌گیری

روند غربالگری متداول برای باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده باکتریوسین، استخراج پروتئین خام، جداسازی و خالص‌سازی باکتریوسین و تعیین توالی‌های اسیدآمینه‌های N ترمینال آن‌ها می‌باشد. این روش ازنظر زمان، نیروی کار و مصرف مواد پرهزینه است. همچنین به‌منظور غربالگری به‌طورمعمول از روش انتشار از چاهک استفاده می‌شود. ازجمله معایب چاهک نیز فقدان اختصاصیت و محدودیت حساسیت می‌باشد. روش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی باکتریوسین بارها گزارش‌شده است. در تحقیق حاضر از ۵۰ سویه اسیدلاکتیک موجود در بانک میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال غرب و غرب ۵ سویه M، T_2، H_{20} ، N و 15E علیه *لیستریا اینوکوا* (ATCC 33090) و *اشرشیا کولای* (ATCC 1399) با روش انتشار از دیسک گزینش شدند. شناسایی صرف حضور یک باکتریوسین به این معنا نیست که باکتریوسین دارای فعالیت ضد باکتریایی است. چراکه چنین ژن‌هایی ممکن است تحت شرایط تخمیر بیان نشوند و تحت تأثیر محیط کشت و اثر متقابل با سلول‌های هدف قرار می‌گیرند. بنابراین بیشتر روش‌هایی که برای شناسایی باکتریوسین‌ها موردنیاز است با سنجش فعالیت ضد باکتریایی میسر است. بعلاوه برخی محققان فعالیت ضد باکتریایی باکتریوسین‌ها را در برابر سایر گونه‌های میکروارگانیسم گرم منفی در نظر نمی‌گیرند (Liu *et al*., 2014).

در آزمایشی اثر مهاری ۲۴ جدایه بومی *انتروکوک* که از ۱۰۵ محصول لبنی جداسازی شده بود، بر روی برخی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی بررسی نمودند. تمامی جدایه‌ها اثر مهاری بر میکروب‌های شاخص داشتند؛ با این توضیح که اثر مهاری در بین گونه‌های مختلف و همچنین سویه‌های مختلف یک‌گونه متفاوت برآورد شد. بیشترین اثرات ضد باکتریایی مربوط به گونه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

انتروکوکوس فکالیس (*E. faecalis*) و *فاسیوم* (*E. faecium*) بود (Tafkiki and Hanifian, 2018).

در تحقیقی، فعالیت ضد باکتریایی مایع رویی کشت ۱۰ سویه از باکتری‌های لاکتیکی استاندارد بومی بر روی برخی باکتری‌های شاخص مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس ماهیت پروتئینی عامل ضد باکتریایی با استفاده از آنزیم تریپسین بررسی گردید. نتایج مطالعه نشان داد، سویه‌های اسیدلاکتیک توان ضد باکتریایی خوبی را در مقابل باکتری‌های شاخص نشان دادند. هم‌چنین نتایج تیمار آنزیمی ماهیت پروتئینی عوامل آنتاگونیستی تولیدشده توسط باکتری‌های لاکتیکی را تأیید کرد و سویه بومی T2 به‌عنوان سویه‌ای با پتانسیل بسیار بالا برای مهار رشد باکتری‌های گرم منفی نظیر *شیگلا فلکسنری*، *اشریشیا کولای*، *یرسینیا انتروکولیتیکا* و *کلبسیلا پنومونیه* در نظر گرفته شد (Tarinejad *et al*., 2017).

در پژوهشی، ۲۰ نمونه از محصولات لبنی محلی از مناطق مختلف اهواز جمع‌آوری شد. اثرات ضد میکروبی جدایه‌ها با استفاده از آزمون انتشار دیسک بر روی محیط MRS جامد با سه پاتوژن بررسی و نتایج نشان داد فقط سه سویه لاکتوباسیل جداشده از نمونه‌های لبنی محلی ازجمله *لاکتوباسیلوس آلیمنتاریوس* (*L. alimentarius*)، *لاکتوباسیلوس ساکی* (*L. sake*) و *لاکتوباسیلوس کولینویدس* (*L. collinoides*)، اثرات مهاری بر روی عوامل بیماری‌زا تحت مطالعه داشتند. هر سه جدایه به ترتیب فعالیت نسبتاً شدیدی (منطقه مهار بزرگ‌تر از ۱۵ میلی‌متر) در برابر *سودوموناس آئرونژینا* (*P.aeruginosa*) و *باسیلوس سوبتیلوس* (*B.subtilis*) از خود نشان دادند (Karami *et al*., 2017).

در مطالعه‌ای ۱۰۸ باکتری اسیدلاکتیک *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوکوکوس* (*Lactococcus*) و *لوکونوستوک* (*Leuconostoc*) جداسازی شده از پنیرتنریف (Tenerife) را بر اساس تولید ماده ضد باکتریایی گزینش و سویه لاکتوباسیلوس پلانتاروم TF711 را که طیف میزبانی وسیعی در برابر پاتوژن‌های مختلف نشان داد، انتخاب و وزن مولکولی آن توسط SDS-PAGE، ۲/۵KDa تعیین گردید (Anderssen *et al*., 1998).

باکتریوسین تولیدشده از یک‌سویه باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* Lp6SH که از یک نوشیدنی تخمیری مبتنی بر ذرت جداسازی شده بود، علیه باکتری‌های گرم منفی و مثبت دارای خاصیت بازدارندگی بالایی بود. باوجوداین، تجزیه‌وتحلیل وزن پروتئین با استفاده از SDS PAGE باندی را نشان نداد. بااین‌حال فعالیت باکتریوسین با روش Overlay assay در ژل تشخیص داده شد و این روش نشان داد که غلظت پپتید فعال کم بوده است و وزن مولکولی پپتید باکتریوسینی ۲/۳٤KDa گزارش شد (Marie *et al*., 2012).

در تحقیق حاضر، نتایج حاصل از SDS PAGE رسوب پروتئین‌های خارج سلولی باکتری‌های اسیدلاکتیک گزینش‌شده توسط سولفات آمونیوم ۸۰ درصد، باندهایی در محدوده وزن مولکولی ۲۵۰ تا باندهای کمتر از ۱۰KDa را برای این سویه‌ها نشان داد که فقط یک باند کمتر از ۱۰KDa در محدوده جرم مولکولی گروه II باکتریوسینی قرار داشتند. الگوی باندی SDS PAGE همه باکتری‌ها مشابه سویه بومی استاندارد L_{28} بود. با توجه به بهینه نبودن شرایط کشت احتمال دارد که برخی پپتیدها به میزان کمتری در سویه‌های بومی تولیدشده و در طول مراحل استخراج به میزان

www.SID.ir

Archive of SID

زیادی از غلظت آن‌ها کاسته شده است. درنتیجه با استفاده از رنگ‌آمیزی کوماسی بلو بر روی ژل SDS-PAGE قابل‌رؤیت نخواهند بود. بنابراین، برای اطمینان از حضور ژن مولد باکتریوسین در سویه‌های بومی روش PCR ضروری می‌باشد.

به‌منظور توسعه روش غربالگری سریع، آسان و دقیق در این پژوهش روش غربالگری انتشار از دیسک علیه دو باکتری شاخص و یک روش مبتنی بر موتیف YGNGV برای تکثیر ۵ زیرگروه IIa استفاده شد (Liu *et al*., 2014). همچنین از روش طراحی پرایمر برای توالی‌های بالادستی و پایین‌دستی ژن‌های ساختاری باکتریوسین‌های زیرگروه IIb به‌منظور به دست آوردن سویه‌های اسیدلاکتیک مولد باکتریوسین استفاده گردید.

با توجه به عدم وجود باند تکثیری با استفاده از آغازگرهای زیرگروه IIa از روی DNA ژنومی و پلاسمیدی سویه‌های گزینشی فاقد ۵ ژن ساختاری زیرگروه IIa باکتریوسینی بودند. این در حالی است که مطالعات محققین بر روی سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* C11 وجود یک ژن باکتریوسینی گروه IIa (Plantaricin 423) (Van Reenen *et al*., 2003) و شش ژن باکتریوسینی گروه IIb (*plnA*، *plnE*، *plnF*، *plnJ*، *plnK* و *plnN*) را نشان داده است (Anderssen *et al*., 1998)، طوری که Plantaricin 423 از یک اپرون ژنی واقع در پلاسمید pPLA4 بیان می‌شود که بسیار شبیه به اپرون ژنی باکتریوسین pediocin PA-1 می‌باشد. چهار ژن *plnABCD* دریک اپرون بر روی کروموزوم اصلی باکتری مسئول ساخت زیرگروه IIa باکتریوسینی می‌باشند (Van Reenen *et al*., 2003). برخی از سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* دارای شش ژن باکتریوسینی زیرگروه IIb (*plnA*، *plnE*، *plnF*، *plnJ*، *plnK* و *plnN*) هستند. هریک از این ژن‌ها در اپرون‌های plnABCD، plnEFI، plnJKLR، plnMNOP و plnGHSTUV قراردادند. *plnEF* و *plnJK* ژن‌های دو باکتریوسین دو پپتیدی هستند. PlnI،PlnL و PlnM پروتئین‌های ایمنی، PlnB، PlnC و PlnD پروتئین‌های درگیر در انتقال سیگنال، PlnG، PlnH پروتئین‌های پردازشی ترشحی را کد می‌کنند (Diep *et al*., 1994).

با توجه به نتایج PCR سویه N دارای ژن ساختاری باکتریوسین JK با طول باند حدود ۲۰۰۰ جفت باز، ژن ساختاری باکتریوسین EF با طول باند حدود ۱۵۰۰ جفت باز و N با طول باند حدود ۱۷۰۰ جفت باز است؛ درصورتی‌که سویه M دارای ژن ساختاری باکتریوسین JK و EF می‌باشد. طول باندهای حاصل از بارگذاری محصولات PCR در تحقیق حاضر مشابه نتایج حاصل از بارگذاری محصول PCR غلام‌زاده و همکاران است (Gholamzadeh *et al*., 2017). با توجه به اینکه باند تکثیری مربوط به ژن *plan JK* با استفاده از آغازگر JK از روی DNA ژنومی سویه M به‌دست‌آمده است، درنتیجه این باکتریوسین بر روی کروموزوم باکتری بومی قرار دارد. توالی‌های ژنتیکی کد کننده باکتریوسین‌ها در بیشتر سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نظیر سویه BFE5092 و PCS20 بر روی کروموزوم باکتری قرار دارند و در یک خوشه ژنی سازمان یافته‌اند (Cho *et al*., 2010b).

بعد از تکثیر توالی ژن مربوطه توسط PCR، قطعه موردنظر مربوط به *plan J,K,N,E,F* از روی ژل در سویه N خالص‌سازی شد و برای تعیین توالی با استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

از پرایمرهای داخلی ژن موردنظر به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. توالی‌ها با نرم‌افزار Chromas موردبررسی قرار گرفتند. زیر هم‌چینی توالی به‌دست‌آمده همراه با توالی‌های حاصله از پایگاه داده NCBI در پایگاه Multalin صورت گرفت. نتایج زیر هم‌چینی توالی‌های به‌دست‌آمده نشان داد که سویه‌های بومی موجود در ایران بالای ۹۹ درصد تشابه با سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* FQ (KX853041.1) و ATCC BAA-793 دارد.

قابلیت بازدارندگی شش سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* DL2، BL1، L28،L27 ، EL3 و L25 با روش انتشار از دیسک در پژوهشی دیگر موردبررسی قرار گرفت. مناطق ژنی مربوط به باکتریوسین با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در سویه‌های BL1، L28، L25 و EL3 تکثیر پیدا کردند. نتایج توالی یابی نشان داد که سویه EL3 دارای ژن ساختاری برای باکتریوسین‌های PlnEF، PlnJK و PlnN و سویه‌های L28 و BL3 دارای ژن ساختاری برای PlnEF هستند (Gholamzadeh *et al*., 2017).

در بررسی مکان ژنی مربوط به باکتریوسین *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* سویه‌های BFE 5092 و PCS20 با استفاده از آغازگرهای عمومی طراحی‌شده برای ژن‌های باکتریوسین، نتایج نشان داد مکان باکتریوسین سویه BFE 5092 شباهت قابل‌توجهی به مکان پلانتارسین دارد که قبلاً برای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* سویه‌های C11 و WCFS1 گزارش‌شده است (Cho *et al*., 2010a).

رویکرد مطالعه حاضر برای گزینش سویه‌های برتر سریع و دقیق است و تنها نیازمند دو مرحله گزینشی آزمون انتشار از دیسک و PCR می‌باشد. طی مراحل گزینشی دوسویه بومی M و N به‌عنوان سویه تولیدکننده زیرگروه باکتریوسینی IIb معرفی شد. سه سویه گزینش‌شده دیگر 15E، H20 و T2 نیز بازدارندگی بسیار خوبی علیه باکتری‌های شاخص نشان دادند، مطالعات آتی نیازمند ردیابی گروه‌های دیگر باکتریوسینی در این سویه‌ها است. از دوسویه M و N می‌توان به‌عنوان یک عامل ضد باکتریایی برای ارتقاء سطح کیفی محصولات لبنی و غذای دام استفاده کرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و نیز مدیریت محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور جناب آقای دکتر محمدامین حجازی به جهت در اختیار قرار دادن بخشی از امکانات مالی و پژوهشی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

- Anderssen, EL., Diep, DB., Nes, IF., Eijsink, VG. and Nissen-Meyer, J. (1998). Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricins EF and JK, and the induction factor plantaricin A. Applied and Environmental Microbiology, 64(6): 2269-2272.
- Banerjee, SP., Dora, KC. and Chowdhury, S. (2013). Detection, partial purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* FPTLB3 isolated from freshwater fish. Journal of Food Science and Technology, 50(1): 17-25.
- Bastos, MCF., Coutinho, BG. and Coelho, MLV. (2010). Lysostaphin: a staphylococcal bacteriolysin with potential clinical applications. Pharmaceuticals, 3(4): 1139-1161.
- Campos, CA., Rodríguez, Ó., Calo-Mata, P., Prado, M. and Barros-Velázquez, J. (2006). Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (Psetta maxima). Food Research International, 39(3): 356-364.
- Cho, G-S., Huch, M., Hanak, A., Holzapfel, WH. and Franz, CM. (2010a). Genetic analysis of the plantaricin EFI locus of *Lactobacillus plantarum* PCS20 reveals an unusual plantaricin E gene sequence as a result of mutation. International Journal of Food Microbiology, 141: S117-S124.
- Cho, G-S., Huch, M., Hanak, A., Holzapfel, WH. and Franz, Charles M.A.P. (2010b). Genetic analysis of the plantaricin EFI locus of *Lactobacillus plantarum* PCS20 reveals an unusual plantaricin E gene sequence as a result of mutation. International Journal of Food Microbiology, 141: S117-S124.
- Deshmukh, PV. and Thorat, PR. (2014). Detection antimicrobial efficasy of novel bacteriocin produced from *Lactobacillus* similis RL7. Advanced Research, 2(1): 987-995.
- Diep, DB., Håvarstein, L., Nissen-Meyer, J. and Nes, IJA. (1994). The gene encoding plantaricin A, a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* C11, is located on the same transcription unit as an agr-like regulatory system. Applied and Environmental Microbiology, 60(1): 160-166.
- Eijsink, VG., Axelsson, L., Diep, DB., Håvarstein, LS., Holo, H. and Nes IF. (2002). Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. Antonie Van Leeuwenhoek, 81(1-4): 639-654.
- Gholamzadeh, MA., Hejazi, MA. and Hosseinzadeh Gharaje, N. (2017). Determination of bacteriocin encoding gene in six native strains of *Lactobacillus plantarum*. Iranian Journal of Food Science and Technology, 14(66): 17-25. [In Persian]
- Haas, H., Budowle, B. and Weiler, G. (1994). Horizontal polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. Electrophoresis, 15(1):153-158.
- Jacobsen, CN., Nielsen, VR., Hayford, A., Møller, PL., Michaelsen, K., Paerregaard, A. *et al*., (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Applied and Environmental Microbiology, 65(11): 4949-4956.
- Joerger, M. and Klaenhammer, T. (1990). Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. Journal of Bacteriology, 172(11): 6339-6347.
- Karami, S., Roayaei, M., Hamzavi, H., Bahmani, M., Hassanzad-Azar, H., Leila, M. and Rafieian-Kopaei, M. (2017). Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens. International Journal of Pharmaceutical Investigation, *7*(3):137-141.
- Kim, YS. and Cha, HJ. (2006). High-throughput and facile assay of antimicrobial peptides using pH-controlled fluorescence resonance energy transfer. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(10): 3330-3335.
- Klaenhammer T R. (1984). A general method for plasmid isolation in lactobacilli. Current Microbiology, 10(1): 23-28.

www.SID.ir

Archive of SID

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227(5259): 680-685.
- Liu, W., Zhang, L., Yi, H., Shi, J., Xue, C., Li, H. *et al*., (2014). Qualitative detection of class IIa bacteriocinogenic lactic acid bacteria from traditional Chinese fermented food using a YGNGV-motif-based assay. Journal of Microbiological Methods, 100: 121-127.
- Marie, KP., François, ZN., Abbasi, A., Anwar, F., Ali, SA., Victor, SD. *et al*., (2012). Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* Lp6SH isolated from" Sha'a", a maize-based traditionally fermented beverage from cameroon. International Journal of Biology, 4(2):149-158.
- Nuding, S., Zabel, LT., Enders, C., Porter, E., Fellermann, K., Wehkamp, J. *et al*., (2009). Antibacterial activity of human defensins on anaerobic intestinal bacterial species: a major role of HBD-3. Microbes and Infection, 11(3): 384-393.
- Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. and Onilude, A.A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OGI. African Journal of Biotechnology, 2: 219-227.
- Papagianni, M. and Anastasiadou, S. (2009). Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. sources, production, properties and applications. Microbial Cell Factories, 8(1): 1-16.
- Pingitore, EV., Salvucci, E., Sesma, F. and Nader-Macias, ME. (2007). Different strategies for purification of antimicrobial peptides from lactic acid bacteria (LAB). Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, 1:557-568.
- Tafkiki, S. and Hanifian, S. (2018). Inhibitory effect of native *enterococci* isolates on some of the foodborne bacterial pathogens. Journal of Food Hygiene, 9(33): 35-47. [In Persian]
- Tarinejad, A., Pourabdi Sarabi, P. and Hejazi, M.A. (2017). Antagonistic effect of native lactic acid bacteria against foodborne bacterial pathogens. Journal of Food Hygiene, 8(29): 25-38. [In Persian]
- Todoriki, K., Mukai, T., Sato, S. and Toba, T. (2001). Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. Journal of Applied Microbiology, 91:154-159.
- Van Belkum, MJ. and Stiles, ME. (2000). Nonlantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. Natural Product Reports, 17(4): 323-335.
- Van Reenen, C., Chikindas, M., Van Zyl, W. and Dicks, L. (2003). Characterization and heterologous expression of a class IIa bacteriocin, plantaricin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology, 81(1): 29-40.
- Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (2012). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, genetics and applications. Springer press.
- Więckowicz, M., Schmidt, M., Sip, A. and Grajek, W. (2011). Development of a PCR-based assay for rapid detection of class IIa bacteriocin genes. Letters in Applied Microbiology, 52:281-289.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35:1547-1549.
- Zacharof, M.P. and Lovitt, R.W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. APCBEE Procedia, 2: 50-56.

www.SID.ir