شناسایی ژن کد کننده باکتریوسین در شش سویه بومی لاکتوباسیلوس پلنتاروم

ملیحه السادات غلام زاده[1]، محمدامین حجازی [2*]، ناهیدحسین زاده قراجه[2]

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، موسسه غیرانتفاعی ربع رشیدی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

۲- دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

۳- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

(تاریخ دریافت: ۹٤/۰۳/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹٤/۰٦/١٤)

چکیده

باکتریوسین‌ها، پپتیدها یا پروتـئین‌های سنتز شده ریبوزومی هستند که بر علیه گونه‌های ژنتیکی نزدیک به باکتری تولید کننده خاصیت کشندگی یا مهارکنندگی رشد دارند و سبب افزایش ماندگاری و ایمنی محصولات غذایی می‌گردند. در این تحقیق، مطالعه بر روی سویه‌های بومی *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* (*DL2*، *BL1*، *L28*، *L27*، *L25* و *EL3*)، که قابلیت بازدارندگی رشد آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته بود، صورت گرفت. بعد از تأیید مطالعات قبلی مبنی بر قابلیت بازدارندگی سویه‌ها توسط تست انتشار از دیسک (Disk diffusion assay) و مشاهده نتایج مورد انتظار، جهت بررسی ژن کد کننده باکتریوسین، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت. مناطق ژنی مورد نظر در سویه‌های *BL1*، *L28*، *L25* و *EL3* تکثیر پیدا کردند. استفاده از پرایمرهای طراحی شده و توالی‌یابی نشان می‌دهد سویه *EL3* شامل ژن‌های ساختاری برای باکتریوسین‌های plnEF، plnJK و plnN می‌باشد، اگرچه سویه‌های *L28* و *BL1* *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* تنها دارای ژن‌های ساختاری برای تولید پلنتاریسین EF هستند. توالی‌ها دارای تشابه ۹۹٪ با ژن‌های ایزوله‌های *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* ثبت شده در پایگاه داده NCBI بوده و توالی این ایزوله‌ها با شماره دسترسی *EL3* (KT028600)، *L28* (KT028601) و *BL1* (KT028602) در Gene Bank ثبت شده اند.

کلید واژگان: باکتریوسین، *لاکتوباسیلوس پلنتاروم*، ژن کد کننده باکتریوسین، واکنش زنجیره ای پلیمراز، آغازگرهای اختصاصی

*مسئول مکاتبات: aminhejazi@abrii.ac.ir

۱- مقدمه

باکتریوسین ها پپتید ها یا پروتـئین های باکتری کش یا مهارکننده رشدی هستند که معمولا بر گونه های نزدیک به موجود تولید کننده مؤثر هستند. سویه‌های لاکتوباسیلوس پلنتاروم گروه متنوعی از باکتریوسین‌ها را تولید می‌کنند و اغلب ژن‌های باکتریوسین کد شده توسط یک سویه در یک مکان ژنتیکی کروموزومی قرار گرفته‌اند[۱و ۲]. مطالعه بر روی سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* نظیر *C11*، *BFE5092* و *PCS20* نشان می‌دهد حداقل سه سیستم باکتریوسین در این سویه‌ها وجود دارد، پلنتاریسین N و باکتریوسین-های دوپپتیدی پلنتاریسین‌های EF و JK. سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* عموماً شش ساختار شبه باکتریوسین (plnA، plnE، plnF، plnJ، plnK وplnN) تولید می‌کنند. ژن‌های کد کننده این ساختارهای شبه باکتریوسین درپنج اپرون plnABCD، plnEFI، plnJKLR، plnMNOP و plnGHSTUV مرتب شده‌اند. اخیرا، تعدادی مطالعات نشان داده‌اند مکان ژنتیکی باکتریوسین سویه‌های مختلف *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* با یکدیگر در سازمان‌دهی تعدادی ژن‌ها نظیر ژن‌های انتقال دهنده و تنظیم کننده باکتریوسین شباهت دارند، در حالیکه در دیگر سویه‌ها اساساً با توجه به طیف ژن‌های باکتریوسین می‌توانند متفاوت باشند. به طور کلی مکان ژنتیکی پلنتاریسین شامل ژن‌های ایمنی و ساختاری باکتریوسین است. هم چنین شامل تعدادی ژن که کد کننده پروتـئین‌های درگیر در تنظیم تولید باکتریوسین (plnABCD) و انتقال باکتریوسین (plnGHSTUV) می‌باشد. تولید باکتریوسین توسط سویه‌های انتخاب شده در این مطالعه، به اثبات نرسیده است اما در مطالعات قبلی خاصیت ضد میکروبی آن‌ها مشخص شده است. هدف در این مطالعه، بعد از تأیید مطالعات قبلی مبنی بر قابلیت بازدارندگی سویه‌ها توسط تست انتشار از دیسک[1]، شناسایی ژن باکتریوسین و بررسی یکسان بودن توالی ژن‌ها با سویه‌های مطالعه شده *NC8*، *ST-III*، *BFE5092* ، *C11*، *WCFS1*، *PCS20* *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* است. با استفاده از روش های مولکولی و بررسی ژن کد کننده باکتریوسین در سویه‌ها می توان اطلاعات قابل اطمینانی را به دست آورد. بنا به اهمیت لاکتوباسیل‌ها در سلامت انسان، شناسایی مولکولی این باکتری‌ها می تواند گامی مؤثر در معرفی لاکتوباسیل‌های بومی با خصوصیات عملکردی ویژه محسوب شود و در محصولات لبنی صنعتی و تولید محصولات فراویژه به کار گرفته شوند [۳ و ٤].

۲- مواد و روش ها

۲-۱- سویه ها و محیط کشت باکتریایی

سویه های *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* (*DL2*، *BL1*، *L28*، *L27*، *L25*و *EL3*) جدا شده از محصولات لبنی موجود در بانک میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال و شمال غرب کشور، در این تحقیق انتخاب شدند. باکتری ها بر روی محیط کشت انتخابی MRS [2] کشت شدند و در دمای ۳۷درجه سانتی-گراد گرم خانه گذاری شدند.

۲-۲- تست انتشار از دیسک

از باکتری شاخص و پاتوژن *لیستریامنوسیتوژنز* و پاتوژن شاهد *اشرشیا کلی* استفاده شد. جهت بررسی اثر ضد میکروبی سویه ها، دیسک های آغشته به عصاره باکتریایی هم در حالت pH اسیدی و هم در حالت pH خنثی بر روی محیط کشت شده با باکتری شاخص قرار گرفتند و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٤- ۱۲ ساعت انکوبه شدند و هاله عدم رشد بررسی گردید [۵].

1. Disk diffusion assay

2. Man Rogosa Sharpe Broth

۳-۲- استخراج DNA

جهت استخراج DNA از کشت ٢٤ ساعته باکتری ها در محیط کشت MRS broth و بافر لیزکننده CTAB[3] استفاده گردید. تخریب دیواره سلولی با شوک حرارتی انجام گرفت. ویال‌های حاوی پلیت، به طور متناوب در ازت مایع و بن ماری (٦٥ درجه سانتی گراد) قرار گرفتند. سپس ١mL لیزبافر CTAB و ١μL پروتـئیناز K اضافه و کاملا مخلوط گردید تا به صورت شیری رنگ درآمد و به مدت ١ ساعت در دمای ٦٠ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از سانتریفیوژ، مایع رویی جدا شد و برای خالص سازی DNA از پروتـئین از مخلوط کلروفرم- ایزوآمیل الکل با نسبت ٢٤:١ استفاده شد. رسوب دهی DNA با استفاده از ایزوپروپانل سرد صورت گرفت. در مرحله آخر برای شست و شو اتانول به کار برده شد. رسوب های DNA در دمای آزمایشگاه خشک و در ٥٠μL آب دیونیزه حل شدند. جهت بررسی کیفیت DNA از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ٠/٧ درصد استفاده شد.

٤-۲- طراحی آغازگر

همانطور که گفته شد در *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* ژن‌های مرتبط با باکتریوسین بر روی یک مکان ژنی pln قرار گرفته‌اند که دارای ژن‌های کد کننده شش ساختار شبه باکتریوسینی(plnE، plnF، plnA، plnN، plnJ وplnK) است. جهت افزایش قدرت خوانش و رسیدن به توالی کامل ژن باکتریوسین، ٤ آغازگر از نواحی حفاظت شده بالا دست و پایین دست این ژن‌ها طراحی شدند. این نواحی حفاظت شده شامل ژن‌های ایمنی و ژن‌های انتقالی هستند. پس از هم‌ردیف کردن توالی ژن‌ها، آغازگرها با نرم افزار Oligo5 و بر اساس خصوصیات مطلوب یک آغازگر که شامل میزان GC، تشکیل دایمرهای انتهایی و میانی، تشکیل ساختار سنجاق سری[4] و نیز داپلکس و Tm[5] می‌باشد، طراحی شدند[٦ و ٧].

٥-۲- تکثیر ژن باکتریوسین و توالی یابی

جهت تکثیر ژن باکتریوسین از آغازگرهای طراحی شده که توالی آنها در ذیل آمده است، استفاده شد.

در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز متشکل از ١ میکرولیتر DNA الگو، ١٢,٥ میکرولیتر Master Mix، ١٠,٥ میکرولیتر آب دیونیزه و ٠,٥ میکرولیتر آغازگرهای رفت و برگشت، حجم کلی واکنش ٢٥ میکرولیتر در نظر گرفته شد. دناتوره شدن DNA الگو در ٩٤ درجه سانتی گراد به مدت ٦ دقیقه انجام گرفت و به دنبال آن واکنش تکثیری DNA در ٣٠ سیکل به شرح زیر انجام شد:

دناتوره شدن در ٩٤ درجه سانتی گراد به مدت ١ دقیقه، درجه حرارت مختص هر جفت آغازگر به مدت ٣٠ ثانیه، گسترش آغازگر در ٧٢ درجه سانتی گراد به مدت ١ دقیقه و انکوباسیون نهایی در ٧٢ درجه سانتی گراد به مدت ١٠ دقیقه برای حصول اطمینان از تکمیل و گسترش آغازگرها صورت گرفت. جهت آشکارسازی محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ٠,٧ درصد با استفاده از بافر TBE ٠/٥ X[6] استفاده شد.

ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و محصولات PCR زیر نور uv، مورد بررسی قرار گرفتند. از مارکر Gene ١٠٠bp) (Ruler,fermentas به عنوان مارکر مولکولی استفاده شد. پس از خالص سازی محصول PCR، توالی یابی هر دو رشته توسط آغازگرهای رفت و برگشت به کار رفته در واکنش PCR، به روش تمام اتوماتیک فلورسانس و توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام گردید [٨ و ٩].

3. Cetyl trimethyl ammonium bromide

4. *Haripin*
5. Melting temperature
6. *Tris base- Boric acid- EDTA*

Table 1 List of designed primers used in DNA replication

primers	Forward primers	Reverse primers
EF	TCC AAT GCT TAG AGG ATA GG	CTA ATG CCG TAG TCC CTT C
JK	TTA AAA CGG CGT CTG AGA T	CCA AAA GAT AAT CCT GAC CA
M	GCA TAT TCT TTT TGG CTA GG	CTG TAA CAC CAT GAC TGA G
A	TAA ACA GGT AAA GCA GGT TG	GGA TTA TCA GGT TCT AAA GC

۳- نتایج

۳-۱- نتایج تست انتشار از دیسک

شش ایزوله جدا شده از محصولات لبنی بومی *DL2* ، *BL1*، *L28*، *L27*، *L25* و *EL3* از کلکسیون میکروبی ، جهت بررسی مولکولی با روش توالی یابی در این مطالعه انتخاب شدند. سویه ها بر اساس نتایج تست دیسک دارای خاصیت بازدارندگی بودند.

Fig 1 Inhibition zone of BL1 strain in Disk diffusion assay

۳-۲- نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مطالعه ژن‌های باکتریوسین با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و تکثیر مناطق ژنی ۳ سیستم باکتریوسین نشان داد این سویه‌ها دارای ژن‌های ساختاری برای باکتریوسین‌های plnN، plnJK و plnEF هستند که با توالی‌یابی محصولات PCR به اثبات رسیده است. با توجه به تصاویر محصولات PCR در ژل آگارز، سویه‌های *BL1*، *L28*، *L25* و*EL3* تکثیر پیدا کردند و سه سویه *BL1*، *EL3* و *L28* برای توالی‌یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی فرستاده شدند.

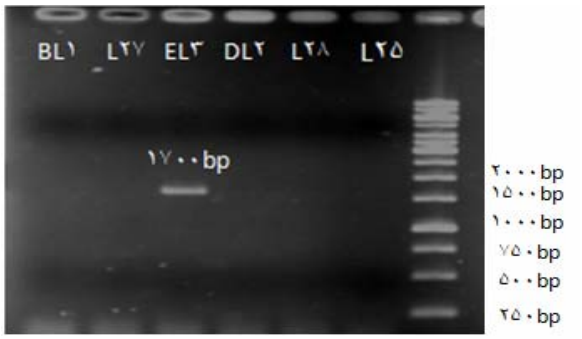

Fig 2 PCR Product (fragment 1700 bp) of *L.plantarum* isolates amplified with plnN primer pair

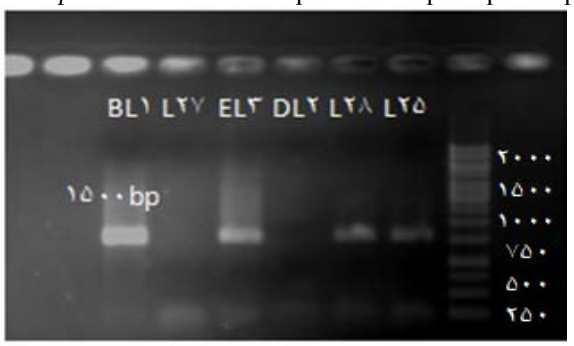

Fig 3 PCR Product (fragment 1500 bp) of *L.plantarum* isolates amplified with plnEF primer pair

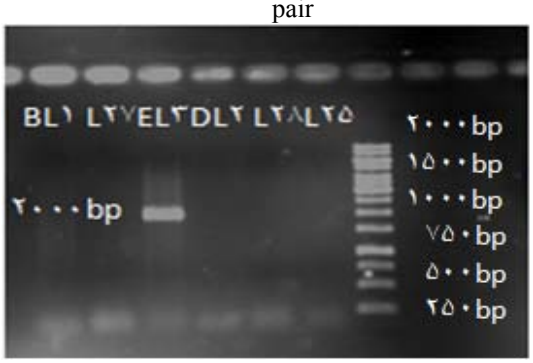

Fig 4 PCR Product (fragment 2000 bp) of *L.plantarum* isolates amplified with plnJK primer pair

۳-۳- نتیجه خوانش توالی ها

توالی‌ها جهت بررسی بیشتر توسط نرم افزار Chromas مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و در نهایت، توالی کامل ناحیه ژن های مورد نظر برای هر ایزوله حاصل شد. برای شناسایی توالی های باکتریوسین ایزوله های مورد مطالعه، از برنامه Blastn در داده پایگاه NCBI BLAST Search tool استفاده گردید. باکتری‌های مرجع بر مبنای حداکثر هم ردیفی با توالی های مورد مطالعه (۹۹٪) در تحقیق حاضر انتخاب و در جدول ۱ ارائه شده است.

Table 2 Assessment of the similarity of isolates with recorded bacteria in the database

strins	Identification based on sequence analysis		
	Identification	Accession Number	similarity
EL3	*L. L.plantarum pln locus,strain C11*	X94434.2	99%
	L.plantarum,strain BFE5092	GU584090.1	99%
	L. plantarum, strain PCS20	GU584091.1	99%
	L. plantarum,strain ST-III	CP002222.1	99%
BL1	*L. plantarum pln locus,strain C11*	X94434.2	99%
	L. plantarum, strain PCS20	GU584091.1	99%
	L. plantarumWCFs1	AL935263.2	99%
	L.plantarum NC8 bacteriocin locus	AF522077.2	99%
L28	*L.plantarumBFE5092plantaricin gene*	GU58409.1	99%
	L.plantarumST-III pln locus	CP002222.1	99%
	L.plantarum strain NC8	AF522077.2	99%
	L.plantarumYM-2-5pln gene	JQ900767.1	99%

٤-۳- بررسی و مقایسه توالی‌ها

سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* عموماً شش ساختار شبه باکتریوسین (plnA، plnE، plnF، plnJ، plnK وplnN) تولید می‌کنند. ژن‌های کد کننده این ساختارهای شبه باکتریوسین درپنج اپرون plnABCD، plnEFI، plnJKLR، plnMNOP و plnGHSTUV مرتب می‌شوند. plnEF و plnJK دو باکتریوسین دو پپتیدی، plnI، plnL، plnM وplnP احتمالاً پروتـئین‌های ایمنی، plnB، plnC وplnD پروتـئین‌های درگیر در انتقال سیگنال، plnG و plnH پروتـئین‌های پردازشی ترشحی را کد می‌کنند. [۹، ۱۰ و ۱۱]. پس از انجام تکثیر، توالی یابی و مشخص شدن توالی باکتریوسین، مقایسه هم ردیفی در پایگاه NCBI Blastn انجام شد و بالای ۹۷ درصد تشابه با سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* حاصل شد که نتایج آن به طور خلاصه در جدول ۱ نمایش داده شده است (برای مثال برای هر ایزوله چهار باکتری با درصد تشابه بالا در نظر گرفته شده است). توالی نوکلـئوتیدی محصولات PCR plnJK، plnEF و plnN که محصولات تکثیری بخشی از ژن کد کننده پپتیدهای باکتریوسین بالغ سویه-های *BL1*، *L28* و *EL3* هستند، توالی‌های یکسان با موارد گزارش شده مطالعات قبلی نشان دادند. سویه‌های *BL1* و *L28* تنها دارای ژن‌های ساختاری برای تولید پلنتاریسین EF هستند. توالی نوکلـئوتیدی ژن‌های plnE و plnF سویه‌های *BL1* و *L28* با یکدیگر و ۹۹٪ با ژن‌های سویه‌های (X94434.2) *L. plantarum C11*، *L.plantarumBFE5092* (GU58409.1)، *L.plantarumNC8*(AF522077.2)،

(AL935263.2) *L.plantarumWCFs1* و سایر پلنتاروم-های ذخیره شده در بانک اطلاعاتی (جدول شماره ۱)، شباهت دارند[۱۲]. سویه *EL3* دارای ژن‌های ساختاری برای پلنتاریسین-های EF، JK و N هستند و توالی نوکلـئوتیدی ژن‌های plnE، plnF، plnJ، plnK و plnN آن دارای تشابه ۹۹٪ با ژن‌های سویه‌های(GU584091.1) *L. plantarum PCS20*، (GU58409.1) *L.plantarumBFE5092*، (X94434.2) *L.plantarum C11* و *L.plantarumST-III* (CP002222.1) ذخیره شده در بانک اطلاعاتی هستند. مطالعه مولکولی و میزان تشابه حاصل شده حاکی از شناسایی ژن باکتریوسین در سویه های *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* جدا شده از محصولات لبنی و بومی است [۱۳و ۱٤]. مکان ژنی باکتریوسین سویه پروبیوتیک *EL3* که در این مطالعه توالی یابی شده است شامل ژن‌های plnRLKJMNOPIFEG درگیر در بیوسنتز، تنظیم، انتقال و ایمنی سه سیستم باکتریوسین هستند، باکتریوسین-های دو پپتیدی EF، JK، هم چنین پلنتاریسین N. سویه *EL3* دارای ۳ ORF (Open Reading Frame) در مکان‌های ژنتیکی تکثیر شده است. ۲ORF کد کننده پروتـئین‌های ایمنی هیدروفوبیک در اپرون‌های plnEFI و plnJKLR، در ناحیه ژن‌های plnI و plnL و یک ORF کد کننده پروتـئین‌های شبه باکتریوسین و ایمنی آن در اپرون plnMNOP قرار دارند[۱۵، ۱٦ و ۱۷]. مکان ژنی سویه‌های *BL1* و *L28* تنها شامل ژن‌های پلنتاریسین EF هستند و دارای ژن کد کننده پپتید ایمنی پلنتاریسین EF (plnI) و ژن انتقال باکتریوسین (plnG) هستند. یک ORF در محدوده plnI این سویه‌ها قرار دارد که کد کننده پروتـئین ایمنی است.

٤- بحث

تعداد زیادی از سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* جدا شده از محیط‌های مختلف به عنوان تولید کننده‌های باکتریوسین، اغلب بیش از یک باکتریوسین، شناخته شده اند. تولید باکتریوسین در این سویه‌ها ممکن است تا حدی با موفقیت در ساکن شدن آن‌ها در منابعی نظیر شراب و زیتون و پنیرهای تخمیر شده، سبزیجات، سوسیس‌ها و هم‌چنین در روده و بزاق انسان همکاری داشته باشد[۱۸]. تعیین کننده‌های ژنتیکی برای باکتریوسین‌ها در بیش‌تر سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* مطالعه شده نظیر *Lb.plantarumC11* (Diep,et al.1994)، *Lb.plantarumBFE5092* (Sung cho,et al.2010)، *Lb.plantarumPCS20* (Sung cho,et al.2010) و *Lb.plantarumWCFS1* (Kleerebezem,et al.2003) توسط کروموزوم‌ها کد می‌شوند و در خوشه‌های ژنی سازمان یافته‌اند. این مطلب برای سویه‌های *BL1*، *L28* و *EL3* نیز صحیح است. ژن‌های باکتریوسین در این سویه‌ها بر روی کروموزوم قرار گرفته اند. سویه *EL3* دارای ژن‌های ساختاری برای باکتریوسین‌های JK، EF و N است در صورتیکه سویه-های BL1 و *L28* تنها دارای ژن ساختاری برای باکتریوسین EF هستند. سانگچو[1] و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۰ به بررسی مکان ژنتیکی مربوط به باکتریوسین پرداختند. آن‌ها از آغازگرهای عمومی طراحی شده برای ژن های باکتریوسین و ژنوم کلی سویه های *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* *BFE5092* و *299V* استفاده کردند. آن‌ها نشان دادند هر دوی این سویه ها ژن های ساختاری برای باکتریوسین های plnEF، plnJK و plnN که با توالی یابی محصولات PCR تأیید شده، هستند. سویه مطالعه شده *EL3* در این تحقیق نیز بر اساس نتایج توالی‌های مشابه با *Lb.plantarum C11*، *Lb.plantarum WCFs1*، *Lb.plantarum 299V* و *Lb.plantarum BFE5092* دارای ژن های ساختاری برای باکتریوسین های EF، JK و N است. سانگچو نیز به بررسی ژنتیکی لوکوس مولد باکتریوسین plantaricinEFI *Lb.plantarum PCS20* پرداخت و مشخص کرد این باکتری تنها دارای ژن ساختاری باکتریوسین EF است[۱۹]. سویه های *BL1* و *L28* مشابه با سویه *Lb.plantarum PCS20* دارای ژن ساختاری باکتریوسین EF می‌باشند. همانطور که مشاهده می شود توالی های نوکلـئوتیدی حاصل از توالی یابی دارای تشابه با توالی‌های ثبت شده و مرجع سویه‌های*299V*، *C11*، *BFE5092*، *WCFs1*، *PCS20* *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* هستند. این تحقیق بیانگر پروبیوتیک بودن

1. Sung cho

و وجود ژن باکتریوسین در سویه های بومی *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* مطالعه شده می باشد[۲۰].

۵- نتیجه گیری

به طور کلی در روش های فنوتیپی معایبی نظیر نیاز به صرف وقت بیش تر، عدم تکرارپذیری توسط شرایط وابسته به کشت در آزمایشگاه های مختلف و تنوع سویه ها به چشم می خورد. توالی بازهای نوکلـئوتیدی تحت تأثیر شرایط محیط کشت قرار نمی گیرند. آنالیز توالی اسید های نوکلـئیک، پایه و اساسی را برای روش های شناسایی فراهم می آورد که از یک آزمایشگاه به آزمایشگاه دیگر تکرارپذیرند و اطلاعات به دست آمده به دلیل سهولت بیشتر، قابل اعتماد بودن بیشتر و تفسیر دقیق نتایج، با ارزش هستند. شناسایی سویه های پروبیوتیک با قابلیت تولید باکتریوسین می تواند گامی مؤثر در صنایع غذایی و دارویی واقع شود. در نتیجه امروزه شناسایی پروبیوتیک ها با تکیه بر روش های مولکولی رو به افزایش است[۲۱]. نتایج حاصل از تحقیق حاضر، بیانگر وجود ژن باکتریوسین در سویه های متنوعی از *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* با خاصیت بازدارندگی و مهار رشد می باشد که با موارد گزارش شده قبلی شباهت دارند و توالی های باکتریوسین سویه های مذکور با شماره دستیابی‌های *EL3* (KT028600)، *L28* (KT028601) و *BL1* (KT028602)در پایگاه اطلاعاتی Gene Bank ثبت شدند. با توجه به افزایش روز افزون مصرف غذاهای آماده و عدم تمایل به استفاده از غذاهای محلی، ضرورت شناسایی و جداسازی باکتری های پروبیوتیک مشخص می شود. نتایج این تحقیقات می تواند در جهت بهبود و افزایش کیفیت محصولات غذایی و زمان ماندگاری (به عنوان نگهدارنده های طبیعی) در مصارف صنعتی به کار گرفته شود[۲۲].

٦- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مدیریت محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور تبریز به جهت تأمین امکانات آزمایشگاهی این تحقیق قدردانی می گردد.

۷- منابع

[1] O. Gillor,A. Etzion and M. A. Riley. (2008). The dual role of bacteriocins as antimicrobial and probiotics. Appl Microbiol Biotechnol, 81(4): 591-606.

[2] N. Toomula, S. Kumar, A. Kumar, H. Bindu and Ravitejay. (2011). Bacteriocin producing probiotic lactic acid bacteria. J Microbial Biochem Technol.3(5): 121-124.

[3] S.A. Mortazavi, A. Motamedzadegan, M. Alami, A. Gohari Ardabili. (2007). Modern Food Microbiology(EM J). Ferdowsi University of Mashhad publication, 3, 394, 234-258.

[4] W. Noonpakdee, P. Jumriangrit, K. Wittayakom, J. Zendo, J. Nakayama, K. Sonomoto, S. Panyim.(2009). Two-peptide bacteriocin from Lactobacillus plantarum PMU 33 strain isolatedfrom som-fak, a Thai low salt fermented fish product. Asia pacific journal of molecular biology and biotechnology.vol.17(1) : 19-25.

[5] E. Yang, L. Fan, Y. Jiang, C. Doucette and Sh. Fillmore. (2012). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. AMB Express.2(48):1-12.

[6] A. Savadogo, A. T. Ouattara chiek, H. N. Bossole imael and S. A. Traove. (2006). Bacteriocins and Lactic acid bacteria. African Journal of Biotechnology. 5(9): 678-683.

[7] L.D. vuyst and F. Leroy. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food applications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology,13:194-199.

[8] H. Lotfi, M.A. Hejazi, B. Zanjani, A. Barzegari. (2009). Isolation, Biochemical and Molecular Identification of Potentiallly Probiotic Bacteria from Traditional Dairy Products from Heris and Sarab Regions. Food Research of Tabriz university.3, 20, 25-38.

[9] O.B.Ahmed, A. H. Asghar and M. M. Elhassan. (2006).Comparison of three DNA extraction methods for polymerase chain reaction (PCR) analysis of bacterial genomic DNA.African Journal of Microbiology Research,8(6):598-602.

[10] V.G.H.Eijsink, L. AXelsson, D. B. Diep, L. S. Havarstein, H. Holo and II. F. Nes. (2002) production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication.Antonie van Leeuwenhook,81: 639-654.

[11] D. B. Diep, L. S. Havarstein, J. N. Meyer and I. F. Nes. (1994). The Gene encoding plantaricin A , a bacteriocin from Lactobacillus plantarum C11, is located on the some transcription unit as an agr-like regulatory system. Applied and Environmental Microbiology, vol.60,NO.1,160-166.

[12] M. Kleerebezem, J. Boekhorst, R. V. Kranenburg, D. Molenaor, O. P. Kuipers and R. Leer. (2003). complete genome sequence of Lactobacillus plantarum WCFs1. vol. 100,NO.4,1990- 1995.

[13] Yanhua Cui,et al.(2012). Class IIa bacteriocins : Diversity and New Developments. Int. J. Mol. Sci,13,16668-16707.

[14] S.D.Todorov, et al.(2009). Bacteriocins from Lactobacillus plantarum- production, Genetic organization and mode of action.Brazilian Journal of Microbiology.40,209-221.

[15] J.N. Meyer, A.G.Larsen, K. Sletten, M. Daeschel and I. F. Nes. (1993). purification and characterization of plantaricin A, whose activity depends on the action of two peptides. Journal of General Microbiology. 139, 1973-1978.

[16] A. Maldonado, J. L. Ruiz-Barba and R. Jimenez-Diaz. (2003). purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture- inducible two peptide bacteriocin from from lactobacillus plantarum NC8.Applied and Environmental Microbiology,69(1) : 383-389.

[17] C. A.V. Reenen, W. H. V. Zyl and L. M. T. Dicks. (2006)..Expression of the Immunity Protein of Plantaricin 423, Produced byLactobacillus plantarum 423, and Analysis of the PlasmidEncoding the Bacteriocin. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol.72,No.12,p.7644-7651.

[18] S.A. Mortazavi and A.Sadeghi Mahunak. (2006). Food Microbiology(Edmen). Ferdowsi University of Mashhad publication, 3, 326, 129-148.

[19] G. Sung cho, M. Huch, A. Hanak, W. H. Holzapfel, C. M. A. P. Franz.(2010). Genetic analysis of the plantaricin EFI locus of Lactobacillus plantarum PCS20 reveals an unusual plantaricin E gene sequence as result of mutation. International Journal of food Microbiology,141,117-124.

[20] H. Holo, Z. Jeknic, M. Daeschel, S. Stevanovic and I. F. Nes. (2001). plantaricin W from Lactobacillus plantarum belongs to a new family of Two-peptide Lantibiotics. Microbiology, 147,643-651.

[21] F. Tafvizi, M. Tajabadi Ebrahi, L. Khejare. 2012. Genotypic and Phylogenic Analysis of Lactobacilli Producing Bacteriocin Isolated from Traditional Dairy Products and Food Journal of Fasa University of Medical Sciences.Vol.2, No.2, 84-90.

[22] N.Udhayashree, D. Senbagam, B. Senthilkumar, K. Nithya and R. Gurusamy. (2012). production of bacteriocin and their application in food products. Asian pacific Journal of tropical Biomedicine,406-410.

Determination of bacteriocin encoding gene in six native strains of *Lactobacillus plantarum*

Gholamzadeh, M. A. [1], Hejazi, M. A. [2*], Hosseinzadeh Gharaje, N. [3]

1. Master degree in Biotechnology, Higher Education Institute of Rab-Rashid, Department of Food Biotechnology, Branch for Northwest & West region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Biotechnology, Branch for Northwest & West region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran.
3. Master degree, Department of Food Biotechnology, Branch for Northwest & West region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran.

(Received: 2015/06/21 Accepted: 2015/09/05)

Bacteriocins are ribosomally synthesized proteins/peptides that have bacteriocidal or bacteriostatic trait against genitically closed species. Bacteriocins have role as biopreservative and increase of the safety of food products. Study on native strains of *lactobacillus plantarum* (*DL2* ،*BL1* ،*L28* ،*L27* ، *L25* and *EL3*) that their growth inhibition ability had been analyzed, was performed. after approving inhibition ability of strains by disk diffusion in previous study, to investigate bacteriocin encoding gene, polymerase chain reaction (PCR) was performed by specific primers. The correspondant region was amplified in *L25*, *BL1*, *EL3* and *L28* strains. Using designed primers and sequencing could be shown that *EL3* strain contained the structural genes for the bacteriocins plnEF, plnJK and plnN, howover, the *Lb. plantarum* strain *BL1* and *L28* contained only the structural genes for plantaricin EF production. sequences showed ٪99 similarity with bacteriocin genes of *Lactobacillus plantarum* strains recorded in Gene Bank database. The sequences were submitted at NCBI with accession numbers of *EL3* (KT028600), *L28* (KT028601) and *BL1* (KT028602).

Key word: Bacteriocin, *Lactobacillus plantarum*, Bacteriocin encoding gene, Polymerase chain reaction, Specific primers

* Corresponding Author E-mail address: aminhejazi@abrii.ac.ir