Food Hygiene, Vol. 13, No. 50, Summer 2023

**"Research article"** **DOI: 10.30495/JFH.2023.1986171.1401**

# Identification of enterocins and *in vitro* characterization of their antimicrobial and anticancer activity in *Enterococcus* strains isolated from traditional fermented products

**Salek, F.[1], Mirzaei, H.[1,2], Khandaghi, J.[2,3], Javadi A.[1,2], Nami, Y.[4]**

1. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2. Department of Food Biotechnology, Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3. Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.
4. Department of Food Biotechnology, Branch for Northwest & West region, Agricultural Biotechnology Research, Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran.

Corresponding author: yousefnami2010@gmail.com*
(Received: 2023/5/16 Accepted: 2023/8/13)

## Abstract

Replacing naturally occurring bioactive substances, such as microbial metabolites, with synthetic preservative compounds, and getting access to their beneficial properties, is expanding every day. Meanwhile, the focus of many researchers' attention has been on bacteriocins, which have multiple physiological functions, including antibacterial and anticancer properties. In this study, the enterocin production genes of *Enterococcus* isolates from two fermented dairy products (Motal cheese and Tarkhineh) were tracked using a molecular method. The kinetics of bacteriocin-like substance production, as well as its stability (at high temperatures, different pH levels, and under different enzyme influences), were investigated. The antagonistic (well diffusion method) and anticancer (with MTT colorimetric technique) characteristics of enterocins generated by these isolates were also investigated in two human cancer cell lines. The results of the PCR test showed that isolates of *Enterococcus faecium* AUT-7KB and *Enterococcus faecalis* KUMS-T48 contained all three studied enterocin production genes, and the bacteriocin-like metabolites of these strains had strong antagonistic effects on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*. These metabolites had high stability at different pH and became ineffective under the influence of protease enzymes (trypsin and pepsin), which indicated their protein nature. Additionally, metabolites of the KUMS-T48 isolate showed strong cytotoxic effects on two cancer cell lines, AGS and HT-29. According to the findings of the current research, enterocins of the *E. faecalis* KUMS-T48 strain are suggested as a suitable candidate for further anti-tumor studies, such as *in vivo* studies, after complete investigations of safety aspects.

**Conflict of interest**: None declared.

**Keywords:** Bacteriocin, Antimicrobial, Antitumor, *Enterococcus*

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2023.1986171.1401

# شناسایی انتروسین‌ها و بررسی برون-تنی فعالیت ضدمیکروبی و ضدسرطانی آن‌ها در سویه‌های انتروکوک جداشده از محصولات تخمیری سنتی

## شناسایی انتروسین‌ها در جدایه‌های انتروکوکوس محصولات تخمیری

فائزه سالک[۱]، حمید میرزائی[۱و۲]، جلیل خندقی[۲و۳]، افشین جوادی[۱و۲]، یوسف نامی[۴*]

۱- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران.

۴- گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، واحد شمال غرب و غرب پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، تبریز، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات: yousefnami2010@gmail.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۲/۲۶ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۵/۲۲)

## چکیده

**جایگزینی ترکیبات زیست‌فعال به‌دست آمده از منابع طبیعی مانند متابولیت‌های میکروبی با ترکیبات نگهدارنده سنتزی و بهره‌مندی از خواص فراسودمند این متابولیت‌ها ازجمله اثرات درمانی آن‌ها روز به‌روز در حال گسترش است. در این میان، باکتریوسین‌ها که دارای فعالیت فیزیولوژیک متعدد از جمله خواص ضدمیکروبی و ضدسرطانی هستند، کانون توجه بسیاری از محققین بوده‌اند. در این مطالعه ژن‌های تولید انتروسین جدایه‌های انتروکوکوس دو محصول لبنی تخمیری (پنیر موتال و ترخینه) به‌روش ملکولی ردیابی شده و کینتیک تولید ترکیبات شبه باکتریوسینی و پایداری آن‌ها در دمای بالا، pHهای مختلف و تحت تاثیر آنزیم‌های گوناگون بررسی شد. همچنین خواص آنتاگونیستی (به‌روش انتشار در چاهک) و ضدسرطانی (با تکنیک رنگ‌سنجی MTT) انتروسین‌های تولید شده توسط این جدایه‌ها بر روی دو رده سلولی سرطانی انسان مورد امطالعه قرار گرفت. نتایج آزمون PCR نشان داد که دو جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* AUT-7KB و *انتروکوکوس فکالیس* KUMS-T48 حاوی هر سه ژن تولید انتروسین مورد مطالعه بوده و متابولیت‌های شبه باکتریوسینی این سویه‌ها اثرات آنتاگونیستی قوی بر روی باکتری‌های *لیستریا مونوسایتوجنز* و *باسیلوس سرئوس* داشتند. این متابولیت‌ها از پایداری بالایی در pHهای مختلف برخوردار بودند و تحت تاثیر آنزیم‌های پروتئاز (تریپسین و پپسین) بی‌اثر شدند که نشانگر ماهیت پروتئینی آن‌ها بود. به‌علاوه، متابولیت‌های جدایه KUMS-T48 اثرات سایتوتوکسیک قوی روی دو رده سلولی سرطانی AGS و HT-29 نشان داد. با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر، انتروسین‌های سویه *انتروکوکوس فکالیس* KUMS-T48 به‌عنوان گزینه مناسبی برای مطالعات ضدتوموری بیشتر مانند بررسی‌های درون-تنی پس از بررسی‌های کامل جنبه‌های ایمنی پیشنهاد می‌شوند.**

**واژه‌های کلیدی: باکتریوسین، ضدمیکروبی، ضدتوموری، انتروکوکوس**

**مقدمه**

تمایل روز افزون افراد جامعه به استفاده از غذاهای طبیعی سبب شده است که جستجو و مطالعه ترکیبات مختلف زیست‌فعال (bioactive) به‌دست آمده از منابع طبیعی مانند متابولیت‌های تولید شده توسط گیاهان و میکروارگانیسم‌ها و جایگزینی آن با ترکیبات نگهدارنده سنتزی به منظور حفظ سلامت مواد غذایی، افزایش چشم‌گیری داشته باشد (Chopra *et al.*, 2015). همچنین بهره‌مندی از سایر خواص فراسودمند این متابولیت‌ها ازجمله اثرات درمانی مختلف مانند خواص ضد التهابی و ضدسرطانی روز به‌روز در حال گسترش است (Cesa-Luna *et al.*, 2021). به همین دلیل توجه محققین در سراسر دنیا به تولید و شناسایی ترکیبات زیست فعال جدید به‌دست آمده از باکتری‌های مختلف، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گزینه‌های تولید این گونه ترکیبات، معطوف شده است (Divyashri *et al.*, 2015; Hassan *et al.*, 2012; Mojsova *et al.*, 2015).

پپتیدهای فعال زیستی که گروه متنوعی از مواد با فعالیت فیزیولوژیک متعدد از جمله خواص ضداکسیدانی، ضدفشارخون، کاهش کلسترول، بهبود سیستم ایمنی و ضدمیکروبی هستند، کانون توجه بسیاری از محققین بوده‌اند (Moslehishad *et al.*, 2013). در این بین، باکتریوسین‌ها که متابولیت‌های پروتئینی با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلودالتون هستند و فعالیت ضدمیکروبی بر ضد سویه‌های نزدیک به باکتری مولد خود نشان می‌دهند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده‌اند (Mirzaei *et al.*, 2015). این پپتیدهای ضدمیکروبی در غلظت‌های نانومولار فعالیت می‌کنند و فاقد اثر سمیت در سلول‌های یوکاریوتی هستند (Martin-Visscher *et al.*, 2011). کاربرد باکتریوسین‌ها در صنعت نگهداری مواد غذایی وابسته به داشتن شرایطی مانند دارا بودن خواص آنتاگونیستی علیه باکتری‌های بیماریزا و یا عامل فساد مواد غذایی است (Hammami *et al.*, 2007).

نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که درصد قابل توجه‌ای از باکتری‌ها قابلیت تولید باکتریوسین را دارند (Sobrino-López and Martín-Belloso, 2008). باکتری‌های انترکوک یکی از این دسته میکروارگانیسم‌ها هستند که به دلیل داشتن ویژگی‌های سودمند متعدد از جمله توانائی تولید باکتریوسین از گروه باکتری‌های پروبیوتیک نیز محسوب می‌شوند (Araújo and Ferreira, 2013). این باکتری‌ها کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، غیراسپورزا و هموفرمانتاتیو با احتیاجات غذایی پیچیده هستند که از جمله باکتری‌های گروه لاکتیک اسید بوده و پراکندگی گسترده در طبیعت از جمله در مواد غذایی مختلف، آب، خاک دارند. آن‌ها همچنین قسمتی از فلور میکروبی طبیعی روده پستانداران و انسان را تشکیل می‌دهند (Hanchi *et al.*, 2018). در این میان فرآورده‌های تخمیری حاوی انواع متنوعی از این باکتری‌ها هستند و بر اساس تحقیقات انجام شده، وجود گونه‌های مختلف انتروکوکوس در محصولات لبنی و غیر لبنی تخمیری به اثبات رسیده است (Giraffa, 2003). جنس انتروکوکوس بیش از ۲۰ گونه دارد ولی *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس دیورنس* بیشترین فراوانی را در بین گونه‌ها به خود اختصاص داده اند (Ben Braiek and Smaoui, 2019).

سرطان یکی از جدی‌ترین مسائلی است که زندگی بشر را تهدید می‌کند. امروزه روش‌های متنوعی برای درمان سرطان وجود دارد ولی به دلیل اینکه در این روش‌های درمانی از داروهایی استفاده می‌شود که غیر انتخابی عمل می‌کنند، درصد بالایی از سلول‌های سالم بدن نیز به همراه سلول‌های سرطانی از بین رفته و در ضمن اثربخشی دارو نیز کاهش می‌یابد (Wong *et al.*, 2003). بنابراین در دسترس بودن داروها و مواد طبیعی مؤثر در درمان که کمترین اثرات جانبی و بیشترین اثر بخشی را داشته باشد، از اهمیت فراوانی برخوردار است. اساس عملکرد داروهای ضدسرطان، مهار رشد بی‌رویه سلول‌ها است (Kemnitzer *et al.*, 2008) و اثرات سایتوتوکسیک باکتری‌های لاکتیک پروبیوتیک در هنگام مواجهه با سلول‌های سرطانی به اثبات رسیده است (Lee *et al.*, 2004; Molham *et al.*, 2021; Tsai *et al.*, 2008). یکی از متداول‌ترین روش‌های برون-تنی سنجش خاصیت ضدسرطانی استفاده از تکنیک MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) است. به‌عبارتی نمک‌های تترازولیوم مانند MTT برای ارزیابی سلول‌های زنده از سلول‌هایی که توسط عامل ضدسرطانی از بین رفته‌اند بکار می‌رود (Haghshenas *et al.*, 2014; Jafari-Nasab *et al.*, 2021).

در مطالعه حاضر پتانسیل تولید باکتریوسین توسط جدایه‌های باکتری‌های لاکتیک در محصولات لبنی تخمیری مورد مطالعه قرار گرفته و همچنین کینتیک تولید انتروسین‌ها و پایداری آن‌ها در دمای بالا، pHهای مختلف و تحت تاثیر آنزیم‌های گوناگون بررسی شد. همچنین خواص آنتاگونیستی و ضدسرطانی انتروسین‌های تولید شده توسط این جدایه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

**- نمونه برداری**

این تحقیق بر روی جدایه‌های باکتری‌های انتروکوک جداسازی شده از پنیر موتال ایرانی و ترخینه که شناسائی آن‌ها در مطالعات قبلی و با استفاده از روش‌های فنوتیپیک، آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی صورت گرفته بود، انجام شد. برای فعال سازی و رشد این سویه از محیط کشت MRS broth (de Man Rogosa Sharpe , HiMedia, India) استفاده شد. لیست این سویه‌های انتروکوک در جدول۱ آورده شده است.

**- بررسی حضور ژن‌های تولید انتروسین**

برای این منظور پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی ۲۴ ساعته از جدایه‌های انتروکوک تلقیح شده در محیط کشت MRSبراث ، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج سیناژن و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. ژن‌های ساختاری کد کننده انتروسین‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جدول۲ و به کمک تکنیک PCR شناسایی گردید. آزمایش PCR در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتری که شامل ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master Mix (سیناژن)، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرها، یک میکرولیتر DNA استخراج شده و آب دو بار تقطیر شده تا رسیدن به حجم بود، انجام شد. آزمون طی ۳۵ چرخه حرارتی شامل واسرشت (۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه)، اتصال پرایمر (به ترتیب ۴۱، ۵۲ و ۴۹ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه برای

پرایمرهای Ent-Enterocin، Ent-Bacteriocin و Ent-Cylf) و توسعه محصول (۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه) در ترموسایکلر (PTC 200, Waltham, USA) انجام و محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد (Invitrogen, G501802) الکتروفورز شد.

جدول (۱)- باکتری‌های انتروکوک مورد استفاده در مطالعه حاضر

| کد جدایه | جدایه | باکتری انتروکوک | کد دسترسی | محل جداسازی | منبع |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | AUT-1TD | *E. faecalis* | MW433773 | پنیر موتال | Kouhi *et al.*, 2021 |
| ۲ | AUT-3B | *E. faecalis* | MW433823 | | |
| ۳ | AUT-5A | *E. faecalis* | MW433824 | | |
| ۴ | AUT-5C | *E. faecalis* | MW433828 | | |
| ۵ | AUT-4D | *E. faecium* | MW433825 | | |
| ۶ | AUT-3TB | *E. durans* | MW440541 | | |
| ۷ | AUT-5TA | *E. faecium* | MW433827 | | |
| ۸ | AUT-1D | *E. hirae* | MW433882 | | |
| ۹ | AUT-9KE | *E. avium* | MW433881 | | |
| ۱۰ | AUT-7KB | *E. faecium* | MW440511 | | |
| ۱۱ | KUMS-T48 | *E. faecalis* | MW433678 | ترخینه | Kiani *et al.*, 2021a |
| ۱۲ | KUMS-T20 | *E. durans* | MW433680 | | |
| ۱۳ | KUMS-T29 | *E. hirae* | MW433682 | | Kiani *et al.*, 2021b |
| ۱۴ | KUMS-T39 | *E. mundtii* | MW433679 | | |

جدول (۲)- مشخصات پرایمرهای بکاررفته برای تشخیص ژن‌های تولید انتروسین در جدایه‌های انتروکوک

| پرایمر | توالی | اندازه قطعه (جفت‌باز) | منبع |
|---|---|---|---|
| Ent-Enterocin | 5'-GAG ATT TAT CTC CAT AAT CT-3'<br>5'-GTA CCA CTC ATA GTG GAA-3' | ۴۵۰ | مطالعه حاضر |
| Ent-Bacteriocin | 5'-ATG CTG TAG GTC CAG CTG C-3'<br>5'-TTT CCA GGT CCT CCA CCA GT-3' | ۲۱۰ | مطالعه حاضر |
| Ent-Cylf | 5'-ACT CGG GGA TTG ATA GGC-3'<br>5'-GCT GCT AAA GCT GCG CTT-3' | ۶۸۸ | مطالعه حاضر |

**- اثر آنتاگونیستی**

روش انتشار در چاهک برای تعیین فعالیت ضدباکتریایی متابولیت‌های شبه باکتریوسینی انتروکوک‌های منتخب بر روی پنج پاتوژن شاخص *لیستریا مونوسیتوژنز* (PTCC 1163)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1015)، *اشرشیاکلی* (PTCC 1276)، *کلبسیلا پنومونیه* (ATCC 43816) و *یرسینیا انتروکولیتیکا* (ATCC 2715) استفاده شد. برای این کار، ابتدا پاتوژن‌های شاخص در سطح محیط MRS agar کشت و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس چاهک‌های با قطر ۷ میلی‌متر در این پلیت‌ها ایجاد شده و ۵۰ میکرولیتر از فیلتر شده (از طریق فیلتر ۰/۲ میکرومتر) کشت تازه جدایه‌های انتروکوک به هر چاهک اضافه شد. پس از انکوباسیون یک شبه پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، مناطق عدم رشد در اطراف هر چاهک اندازه‌گیری و به‌عنوان فعالیت ضد باکتریایی در نظر گرفته شد. با توجه به قطر هاله مذکور (میانگین دو قطر عمود بر هم)، فعالیت آنتاگونیستی به سه دسته قوی (قطر بزرگتر از ۲۰ میلی‌متر)، متوسط (قطر بین ۲۰ تا ۱۰ میلی‌متر) و ضعیف (قطر کوچکتر از ۱۰ میلی‌متر) تقسیم شد. به منظور تعیین ترکیب اصلی دخیل در اثرات ضدمیکروبی متابولیت، فرم خنثی شده متابولیت‌ها (pH = ۷/۲) که با آنزیم کاتالاز تیمار شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفته بود، تحت آزمایشات ضد باکتریایی قرار گرفتند (Kouhi *et al.*, 2021).

**- کینتیک رشد انتروکوک‌ها و تولید انتروسین**

ابتدا برای تعیین دمای اپتیمم رشد جدایه‌های انتروکوک، تعداد سلول‌های انتروکوک‌های منتخب که در دو دمای ۳۷ و ۴۳ درجه سلسیوس در محیط MRS broth تلقیح شده‌اند، در مدت زمان ۲۴ ساعت و در فواصل زمانی دو ساعت، شمارش و منحنی رشد آن‌ها رسم شد. در مرحله بعد، جدایه‌ها به مدت ۳۰ ساعت در دمای اپتیمم رشد قرار گرفته و هر ۶ ساعت میزان رشد (بر اساس جذب نوری سوسپانسیون میکروبی)، تغییرات pH و فعالیت باکتریوسینی به‌روش انتشار در چاهک محاسبه شد (Todorov & Dicks, 2006). به‌طور خلاصه، ابتدا یک کشت چمنی از باکتری‌ای که بیشترین اثر ضدمیکروبی ایزوله‌ها بر علیه آن ثبت شده است، در سطح محیط کشت Brain Heart Infusion BHI agar انجام گرفت. سپس مقدار ۵۰ میکرولیتر از هریک از محلول‌های باکتریوسینی بدست آمده در بازه‌های زمانی گفته شده، در چاهک‌های ایجاد شده روی پلیت کشت ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس قرار گرفته و سپس به مدت ۲۴ساعت در دمای مناسب رشد گرم‌خانه‌گذاری شدند. فعالیت باکتریوسینی بر اساس درصدی از بالاترین قطر هاله عدم رشد شکل گرفته در اطراف چاهک‌ها، بیان گردید. محلول باکتریوسینی با دو بار سانتریفیوژ کردن (۳۵۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه) سوسپانسیون کشت تازه انتروکوک‌ها در محیط MRS broth و استحصال روماند به‌دست آمد (Kouhi *et al.*, 2021).

**- ارزیابی پایداری انتروسین‌ها**

برای این منظور تأثیر حرارت، pH و آنزیم‌های مختلف بر عملکرد باکتریوسین مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین اثر درجه حرارت روی میزان فعالیت باکتریوسین، محلول روماند در ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ و ۳۰ دقیقه قرار گرفت (دمای رشد ۳۷ درجه به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد). برای مشخص شدن مقاومت باکتریوسین در برابر تغییرات pH نیز روماند سویه‌های تولید کننده باکتریوسین در ۲، ۴ و ۸ تنظیم شد (pH طبیعی تولید باکتریوسین یعنی ۴/۵ به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد). همچنین اثر آنزیم‌های پروتئاز پپسین و تریپسین بر فعالیت باکتریوسین‌ها نیز با افزودن غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هریک از آنزیم‌ها بر روی محلول روماند انتروکوک‌ها در مدت زمان ۲ ساعت بررسی شد (روماند بدون آنزیم به‌عنوان کنترل

در نظر گرفته شد). در هر مرحله قطر هاله عدم رشد تعیین و میزان فعالیت باکتریوسینی بیان شد.

**- فعالیت ضدسرطانی**

این آزمون نیز بصورت برون-تنی و با استفاده از تکنیک رنگ‌سنجی MTT (3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) بر روی دو رده سلولی سرطان معده انسان (AGS) و سرطان روده بزرگ انسان (HT-29) که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بود، انجام شد. ابتدا سلول‌ها در پلیت کشت سلولی ۹۶ چاهکی در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium -Sigma-Aldrich, USA) و با افزودن ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی‌لیتر پنی سیلین، ۱۰ میکروگرم در لیتر استرپتومایسین و ۱۰ درصد حجمی/حجمی از سرم جنین گاو در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و محیط دارای ۹۵ درصد رطوبت و ۵ درصد CO2 کشت داده شدند. در مرحله بعد تستMTT با سه تکرار و در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای جداگانه انجام شد (Haghshenas *et al.*, 2014). به‌طور خلاصه، ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با غلظت $۲/۱\times۱۰^{۴}$ cell/ml به هر چاهک اضافه و پس از گذشت ۲۴ ساعت روی آن ۵۰ میکرولیتر روماند جدایه‌های انتروکوک منتخب اضافه و در سه بازه زمانی ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت گرم‌خانه گذاری شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر MTT در فسفات بافر، به هر چاهک اضافه و پلیت‌های کشت مجدداً به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و حضور ۵ درصد CO2 در محل تاریک قرار گرفتند. بلورهای فورمازان ایجاد شده در اثر مجاورت سلول‌های زنده و نمک تترازولیوم، با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) و ۲۵ میکرولیتر بافر گلیسین سورنسون (گلیسین ۰/۱ مولار و NaCl یک مولار pH =۱۰/۵) تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا به هر چاهک و ۲۰ دقیقه انکوباسیون آن‌ها در ۳۷ درجه سلسیوس حل شدند. در نهایت جذب نوری کریستال‌های فورمازان محلول توسط یک دستگاه خوانش‌گر الایزا ( Biotek, ELx 800, USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی با مقایسه جذب نوری به‌دست آمده با جذب نوری گروه کنترل (سلول‌های مجاور نشده با متابولیت جدایه‌های انتروکوک) محاسبه شد.

## یافته‌ها

**- بررسی حضور ژن‌های تولید انتروسین**

جستجوی ژن‌های ساختاری حامل عوامل انتروسینی در ۱۴ جدایه‌ی انتروکوکوس نشان داد که به ترتیب ۴، ۷ و ۲ جدایه حاوی ژن‌های A، E و M بودند (جدول۳). از بین این باکتری‌ها، سویه‌ی AUT-7KB و KUMS-T48 به ترتیب متعلق به گونه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* دارای هر سه ژن مورد مطالعه بوده و ادامه آزمون‌ها بر روی آن‌ها انجام شد.

جدول (۳)- مشخصات پرایمرهای بکاررفته برای تشخیص ژن‌های تولید انتروسین در جدایه‌های انتروکوک

| پرایمر | ۱ | ۲ | ۳ | ۴ | ۵ | ۶ | ۷ | ۸ | ۹ | ۱۰ | کنترل | ۱۱ | ۱۲ | ۱۳ | ۱۴ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ent-Enterocin | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | + | - | - | - |
| Ent-Bacteriocin | + | - | + | + | - | - | + | - | - | + | - | + | - | - | + |
| Ent-Cylf | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - |

**- اثر آنتاگونیستی**

مطالعه فعالیت ضدباکتریایی متابولیت‌های شبه باکتریوسینی انتروکوک‌های منتخب بر روی پاتوژن‌های شاخص به‌روش انتشار در چاهک در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج حاصله نشانگر کمتر شدن فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌ها پس از تیمار شدن (خنثی‌سازی pH و افزودن آنزیم کاتالاز) می‌باشد. با این وجود روماند تیمار شده هر دو جدایه اثرات بازدارندگی قوی برضد باکتری‌های گرم مثبت *لیستریا مونوسایتوجنز* و *باسیلوس آنتراسیس* نشان دادند. ترکیبات شبه باکتریوسینی سویه KUMS-T48 بر روی باکتری *کلبسیلا پنومونیه* و متابولیت شبه باکتریوسینی سویه AUT-7KB بر روی باکتری *یرسینیا انتروکولیتیکا* بی تاثیر بودند.

جدول (۴)- خواص آنتاگونیستی متابولیت‌های شبه باکتریوسینی جدایه‌های انتروکوکوس KUMS-T48 و AUT-7KB روی پاتوژن‌های شاخص

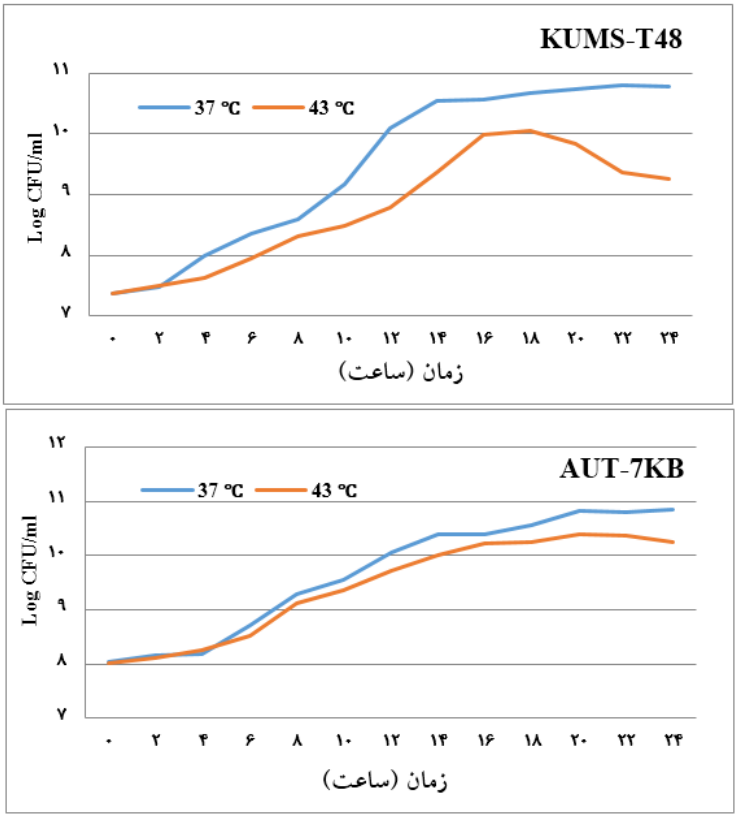
| نمونه | قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) اطراف باکتری شاخص | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | *لیستریا مونوسیتوژنز* (PTCC 1163) | *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1015) | *اشرشیاکلی* (PTCC 1276) | *کلبسیلا پنومونیه* (ATCC 43816) | *یرسینیا انتروکولیتیکا* (ATCC 2715) |
| روماند خام KUMS-T48 | ۲۶±۱/۲۷ | ۲۲±۲/۰۸ | ۱۱±۰/۸۹ | ۶±۰/۱۱ | ۱۴±۱/۵۳ |
| روماند تیمارشده KUMS-T48 | ۲۴±۱/۰۹ | ۱۸±۲/۱۲ | ۵±۰/۰۷ | ۰ | ۳±۰/۰۴ |
| روماند خام AUT-7KB | ۲۸±۲/۳۶ | ۲۰±۱/۶۷ | ۹±۰/۶۳ | ۱۲±۱/۲۰ | ۱۵±۱/۰۸ |
| روماند تیمارشده AUT-7KB | ۲۲±۱/۹۲ | ۱۸±۱/۶۵ | ۴±۰/۱۷ | ۶±۰۶/۴۶ | ۰ |

**- کینتیک رشد انتروکوک‌ها و تولید انتروسین**

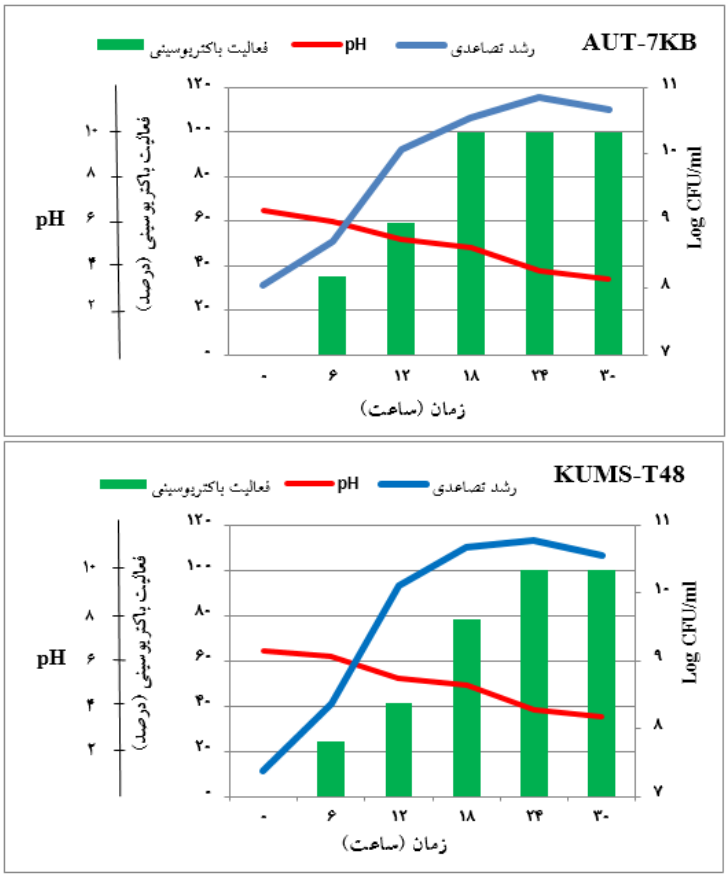
بررسی نمودار رشد دو جدایه انتخاب شده در مدت ۲۴ ساعت و در دو دمای رشد ۳۷ و ۴۳ درجه سلسیوس نشان داد که پس از یک دوره تاخیری ۴ ساعته تعداد باکتری‌ها شروع به ازدیاد نمود و برای سویه KUMS-T48 پس از ساعت ۱۶ و برای سویه AUT-7KB پس از ساعت ۲۰ به فاز سکون رشد رسید (شکل۱). در مورد هر دو جدایه رشد باکتری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بهتر و بالاتر از دمای ۴۳ درجه سلسیوس بود و آزمون‌های بعدی رشد جدایه‌ها در این دما انجام شد.

در شکل۲ نیز میزان فعالیت باکتریوسین‌های تولید شده توسط دو جدایه منتخب انتروکوکوس در بازه زمانی ۳۰ ساعت (هر ۶ ساعت) که در دماس ۳۷ درجه

سلسیوس رشد کرده‌اند به همراه میزان رشد باکتری‌های مولد انتروسین و pH محیط رشد آن‌ها آورده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود همزمان با افزایش رشد جدایه‌ها، pH محیط کاهش یافته و از ساعت ششم میزان تولید انتروسین و فعالیت آن روبه افزایش بوده است. از آنجائیکه مقدار باکتریوسین‌های تولید شده در اواخر دوره رشد تصاعدی به حداکثر مقدار خود رسیده و در فاز سکون رشد باکتری‌ها هم همچنان تا ساعت ۳۰ بالا بوده است، میتوان گفت که انتروسین تولیدی یک متابولیت ثانویه بوده است.



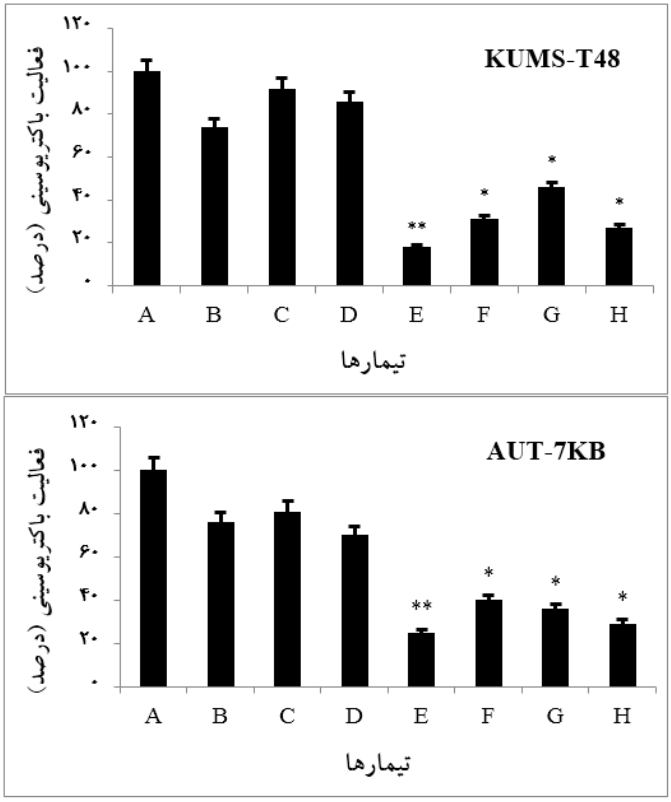

شکل (۱)- نمودار رشد جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* KUMS-T48 و *انتروکوکوس فاسیوم* AUT-7KB در دو دمای ۳۷ و ۴۳ درجه سلسیوس




شکل (۲)- نمودار رشد جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* KUMS-T48 و *انتروکوکوس فاسیوم* AUT-7KB در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، تغییرات pH و فعالیت باکتریوسینی آن‌ها

**- پایداری انتروسین‌ها**

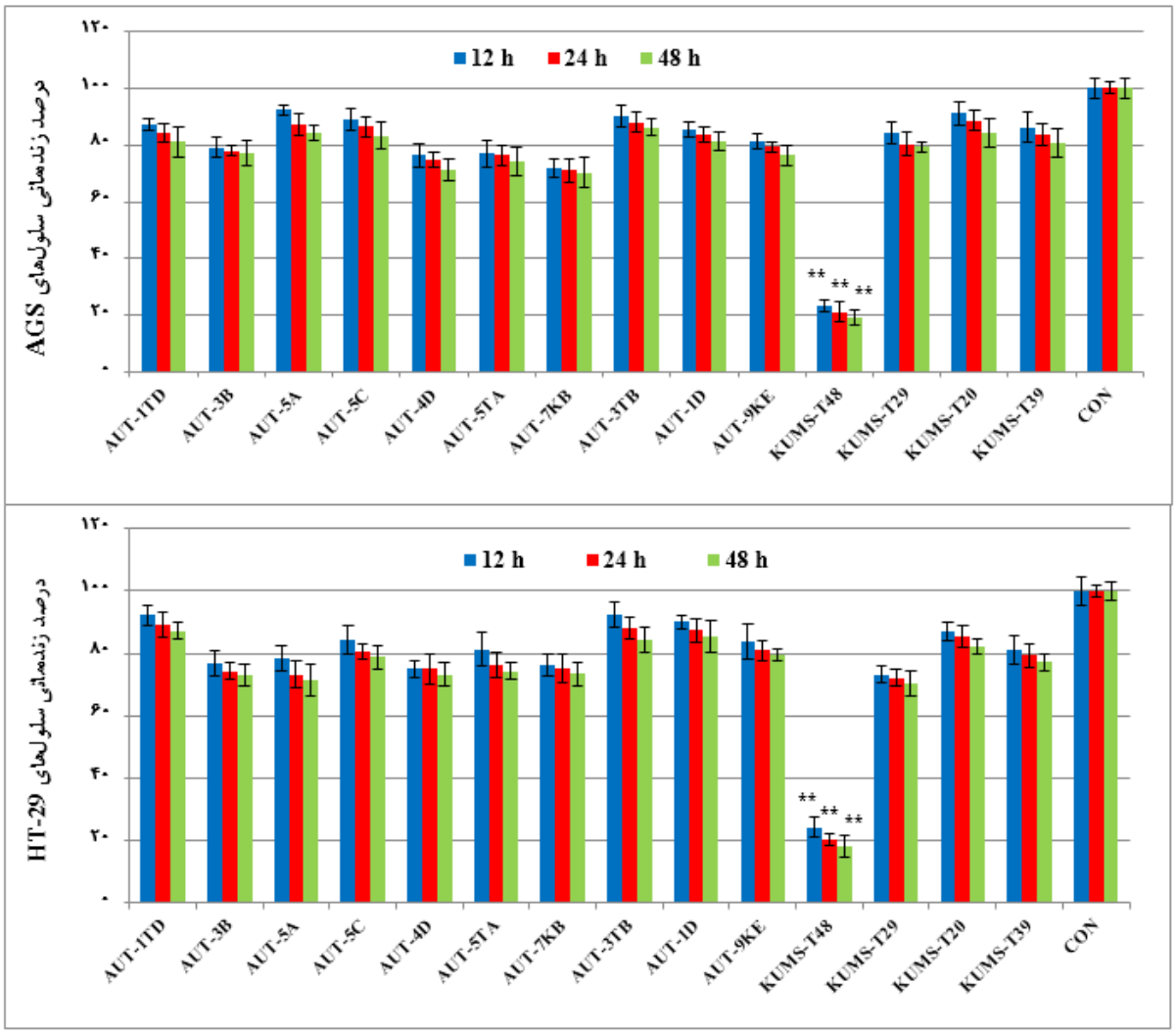
بررسی فعالیت انتروسین‌های دو جدایه انتروکوکوس نشان داد که قرار گرفتن متابولیت‌های انتروسینی (روماند باکتری‌ها) در معرض pH های اسیدی و قلیایی سبب کاهش فعالیت آن می‌شود و این کاهش در pH برابر با ۲ مشهودتر است، گرچه باز هم اختلاف معنی دار آماری با نمونه شاهد ندارد (شکل۳). در همین حال تیمار کردن روماند دو جدایه‌ی مورد مطالعه با آنزیم‌های پروتئاز تریپسین و پپسین و همچنین قرار گرفتن متابولیت‌های شبه باکتریوسینی به مدت ۱۰ و ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس موجب کاهش معنی دار فعالیت باکتریوسینی نسبت به نمونه شاهد شد (شکل۳).




شکل(۳)- فعالیت باکتریوسینی جدایه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* AUT-7KB و *انتروکوکوس فکالیس* KUMS-T48 در شرایط مختلف. A) کنترل، B) pH۲، C) pH۴، D) pH۹، E) تریپسین، F) پپسین، G) ۱۰۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه، H) ۱۰۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ دقیقه. * معنی‌داری اختلاف در سطح ۰/۰۵ و ** معنی‌داری اختلاف در سطح ۰/۰۱ را نشان می‌دهد.

**- فعالیت ضدسرطانی**

برای ارزیابی اثرات سیتوتوکسیک ترکیبات شبه باکتریوسینی ۱۴ جدایه‌ی انتروکوکوس مورد مطالعه، بر روی دو رده سلولی سرطانی انسان (AGS و HT-29) از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. یافته‌ها حاکی از اثرات کشندگی معنی‌دار روماند جدایه‌ی *انتروکوکوس فکالیس* KUMS-T48 روی هر دو رده سلولی در هر سه بازه زمانی انکوباسیون ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت بود.




شکل(۴)- درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی رده AGS و HT-29 تحت تاثیر متابولیت‌های شبه باکتریوسینی جدایه‌های انتروکوکوس

## بحث و نتیجه‌گیری

سویه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک با تولید متابولیت‌های مختلف ضد میکروبی مانند اسید و آنزیم‌ها و همچنین باکتریوسین‌ها توانایی بالایی در کنترل آلودگی‌های میکروبی در محصولات غذایی دارند (Rajaram *et al.*, 2010). وسیع‌تر شدن دامنه استفاده از باکتریوسین از یک طرف و گسترش مقاومت‌های آنتی بیوتیکی از طرف دیگر، سبب جلب توجه محققین به شناسایی باکتریوسین‌های جدید شده است به‌طوریکه تحقیقات زیادی در مورد این مواد طبیعی در حال انجام است (Azad *et al.*, 2021; Hassan *et al.*, 2012; Mirdamadi & Tangestani, 2011).

تولید باکتریوسین فرآیندی تنظیم شده است به طوری که شرایط محیطی در تولید آن تأثیر به‌سزائی دارد (Strompfová *et al.*, 2008). بنابراین ارزیابی فراوانی وجود ژن‌های ساختمانی و تولید باکتریوسین

بهتر است در شرایط اپتیمم تولید باکتریوسین انجام گیرد. بررسی کینتیک رشد جدایه‌های انتروکوک انتخاب شده در این کار پژوهشی نشان داد که این باکتری‌ها در دمای رشد ۳۷ درجه سلسیوس رشد بهتری نشان دادند و بنابراین آزمون‌های بعدی در این شرایط رشد جدایه‌ها صورت گرفت.

بر اساس نتایج سویه‌های مختلف انتروکوکوس از منشا مختلف (حیوان و غذا) حاوی یک یا چند ژن ساختمانی انتروسین بودند که فعالیت ضدلیستریایی قوی نشان دادند (Mirdamadi & Tangestani, 2011; Nunez *et al*., 1997). طبق گزارشات، بیشترین جدایه‌های انتروکوکوس مولد باکتریوسین متعلق به گونه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* می‌باشند به‌طوریکه سویه‌های انتروکوکوس فکالیس (Aran *et al*., 2015; Balla *et al*., 2000) و *انتروکوکوس فاسیوم* (Ahmadova *et al*., 2013; Sonsa-Ard *et al*., 2015) دارای توانایی تولید باکتریوسین و خاصیت ضدمیکروبی در تحقیقات متعددی گزارش شده‌اند. طبق یافته‌های تحقیق حاضر نیز دو جدایه‌ی AUT-7KB و KUMS-T48 که به ترتیب متعلق به گونه‌های انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس بودند، حامل هر سه نوع ژن باکتریوسین مورد مطالعه بودند. بیان شده است که گسترش ژن‌های انتروسین در بین انتروکوک‌ها می‌تواند ناشی از توانایی این باکتری‌ها در انتشار و دریافت مواد ژنتیکی باشد (Strompfová *et al*., 2008).

در یافته‌های اکثر مطالعات بر اثرات ضدمیکروبی بیشتر باکتریوسین‌ها از جمله نایسین بر ضد باکتری‌های گرم مثبت تاکید شده است (de Arauz *et al*., 2009; Motahari *et al*., 2017). به‌عنوان مثال، مطالعات زیادی تأثیر انتروکوک‌ها را بر *لیستریا مونوسیتوژنز* ثابت کرده‌اند (Nascimento *et al*., 2010; Yerlikaya & Akbulut, 2020). بالاترین اثرات آنتاگونیستی ترکیبات شبه باکتریوسینی جدایه‌های انتروکوکسی در این تحقیق نیز بر ضد *لیستریا مونوسایتوجنز* به ثبت رسید. متابولیت شبه باکتریوسینی سویه AUT-7KB و KUMS-T48 علاوه بر باکتری‌های گرم مثبت به ترتیب علیه باکتری‌های گرم منفی *کلبسیلا پنومونیه* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* نیز اثر داشتند. در همین راستا، اثرات ضدمیکروبی باکتری‌های انتروکوک جداشده از منابع مختلف برضد باکتری‌های گرم منفی در مطالعات دیگر محققین دیده می‌شود (Aguilar *et al*., 2011; Sami *et al*., 2022).

ارزیابی پایداری دو جدایه منتخب انتروکوک در این تحقیق حاکی از حساسیت ترکیبات شبه باکتریوسینی تولیدی تحت تأثیر آنزیم تریپسین و پپسین بود و این پروتئازها سبب کاهش معنی‌دار فعالیت ضدمیکروبی گردید. این یافته ماهیت پروتئینی ترکیب ضدمیکروبی و باکتریوسین بودن این متابولیت را تأیید می‌کند (Hammami *et al*., 2009). مطابق با این مطالعه، ناپایداری انتروسین‌های تولید شده توسط انتروکوک‌ها تحت تاثیر آنزیم‌های پروتئاز، در دیگر تحقیقات هم گزارش شده است (Ahmadova *et al*., 2013; Hassan *et al*., 2012). پایداری حرارتی یکی از ویژگی‌های کاربردی برای باکتریوسین‌ها است و استفاده از آن‌ها به‌عنوان جایگزین‌های عوامل ضدمیکروبی سنتزی در محصولات غذایی و دارویی که در فرایند تولید به حرارت بالا نیاز دارند را ممکن می‌سازد (Xi *et*

*al*., 2018). این ویژگی در دماهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است و در مواردی حتی مقاومت انتروسین‌ها به دمای اتوکلاو (۱۲۱ درجه سلسیوس) گزارش گردیده است (Aran *et al*., 2015; Khodaii & Soltani Nezhad, 2017) ولی انتروسین‌های مورد مطالعه تحقیق حاضر، پایداری خود در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس را به‌طور معنی‌داری از دست دادند. مقاوت بالای انتروسین‌ها به تغییرات pH محیط (در محدوده‌ی ۳ تا ۹) در مطالعه ما، مطابق با یافته‌های دیگر دانشمندان است که بیان کردند باکتروسین تولیدی توسط جدایه‌های انتروکوک در محدوده وسیعی (از pH ۲ تا ۱۲) فعال بوده‌اند (Ahmadova *et al*., 2013; Khodaii & Soltani Nezhad, 2017; Sonsa-Ard *et al*., 2015). این قابلیت امکان استفاده از ترکیبات باکتریوسینی در مواد غذایی متنوع با pH های مختلف را فراهم می‌سازد.

با توجه به عملکردهای مفید باکتری‌های پروبیوتیک، روز به روز استفاده از آن‌ها برای ارتقای سلامت مصرف کنندگان و پیشگیری از بیماری‌ها افزایش می‌یابد (Gorbach, 2000). یکی از جالب ترین و بحث انگیزترین خواص این باکتری‌ها فعالیت ضد سرطانی آن‌هاست چراکه این باکتری‌ها برخلاف داروهای شیمیایی اثرات سایتوتوکسیک بر سلول‌های طبیعی بدن نشان نمی‌دهند (Śliżewska *et al*., 2020). در این مطالعه اثرات سایتوتوکسیک متابولیت‌های شبه پروبیوتیکی دو سویه انتروکوک منتخب بر روی دو رده سلولی سرطانی با منشاء اپیتلیال یعنی HT-29 و AGS انجام گرفت. اکثر مطالعات در این زمینه بر پیشگیری از سرطان در سلول‌های روده بزرگ متمرکز شده‌اند (An *et al*., 2019; Hirayama & Rafter, 2000). این در حالی‌است که در مقایسه با سایر سلول‌های سرطانی، سلول‌های HT-29 و AGS حساسیت کمتری به عوامل سیتوتوکسیک و داروها دارند (Brown & Attardi, 2005) لذا می‌توانند گزینه‌های بهتری در ارزیابی و معرفی عوامل ضد سرطانی بیولوژیک مانند متابولیت‌های باکتری‌های پروبیوتیکی باشند.

در مجموع، دو جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* AUT-7KB و *انتروکوکوس فکالیس* KUMS-T48 که در بررسی مولکولی حاوی هر سه ژن تولید انتروسین بودند. متابولیت‌های شبه باکتریوسینی این سویه‌ها در شرایط برون-تنی نیز اثرات بازدارندگی بر رشد باکتری‌های پاتوژن خصوصا *لیستریا مونوسایتوجنز* و *باسیلوس سرئوس* از خود نشان دادند و از پایداری بالایی در pHهای مختلف برخوردار بودند گرچه تحت تاثیر آنزیم‌های پروتئاز بی‌اثر شدند که نشانگر ماهیت پروتئینی آن‌ها بود. همچنین، اثرات سایتوتوکسیک قوی توسط متابولیت‌های جدایه KUMS-T48 بر دو رده سلول‌های سرطانی معده (AGS) و روده (HT-29) انسان ثبت شد.

## تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام وجود ندارد.

## منابع


- Aguilar, C., Vanegas, C. and Klotz, B. (2011). Antagonistic effect of Lactobacillus strains against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in milk. Journal of Dairy Research, 78(2): 136-143 .
- Ahmadova, A., Todorov, S.D., Choiset, Y., Rabesona, H., Zadi, T.M., Kuliyev, A., et al. (2013). Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain Enterococcus faecium AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. Food Control, 30(2): 631-641 .
- An, B.C., Hong, S., Park, H.J., Kim, B.K., Ahn, J.Y., Ryu, Y., et al. (2019). Anti-colorectal cancer effects of probiotic-derived p8 protein. Genes, 10(8): 624 .
- Aran, H., Biscola, V., El-Ghaish, S., Jaffrès, E., Dousset, X., Pillot, G., et al. (2015). Bacteriocin-producing Enterococcus faecalis KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: purification, characterization and safety evaluation. Food Control, 54: 126-134 .
- Araújo, T.F. and Ferreira, C.L. (2013). The genus Enterococcus as probiotic: safety concerns. Brazilian Archives of Biology and Technology, 56: 457-466 .
- Azad, A., Naghavy, N. and Karbasizade, V. (2021). Antibacterial activity of Bacteriocin produced by Lactococcus lactis isolates from dairy products against Foodborne Pathogens. International Journal of Molecular and Clinical Microbiology, 11(1): 1416-1422 .
- Balla, E., Dicks, L., Du Toit, M., Van Der Merwe, M. and Holzapfel, W. (2000). Characterization and cloning of the genes encoding enterocin 1071A and enterocin 1071B, two antimicrobial peptides produced by Enterococcus faecalis BFE 1071. Applied and Environmental Microbiology, 66(4): 1298-1304 .
- Ben Braiek, O. and Smaoui, S. (2019). Enterococci: between emerging pathogens and potential probiotics. BioMed Research International, 2019: 1-13
- Brown, J.M. and Attardi, L.D. (2005). The role of apoptosis in cancer development and treatment response. Nature Reviews Cancer, 5(2): 231 .
- Cesa-Luna, C., Alatorre-Cruz, J. M., Carreno-Lopez, R., Quintero-Hernandez, V. and Baez, A. (2021). Emerging applications of bacteriocins as antimicrobials, anticancer drugs, and modulators of the gastrointestinal microbiota. Polish Journal of Microbiology, 70(2): 143-159 .
- Chopra, L., Singh, G., Kumar Jena, K. and Sahoo, D.K. (2015). Sonorensin: a new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. Scientific Reports, 5(1): 1-13 .
- De arauz, L.J., Jozala, A.F., Mazzola, P.G. and Penna, T.C.V. (2009). Nisin biotechnological production and application: a review. Trends in Food Science & Technology, 20(3-4): 146-154 .
- Divyashri, G., Krishna, G. and Prapulla, S. (2015). Probiotic attributes, antioxidant, anti-inflammatory and neuromodulatory effects of Enterococcus faecium CFR 3003: in vitro and in vivo evidence. Journal of Medical Microbiology, 64(12): 1527-1540 .
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. International Journal of Food Microbiology, 88(2-3): 215-222 .
- Gorbach, S.L. (2000). Probiotics and gastrointestinal health. The American Journal of Gastroenterology, 95(1): S2-S4 .
- Haghshenas, B., Nami, Y., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R. and Khosroushahi, A.Y. (2014). Anti-proliferative effects of Enterococcus strains isolated from fermented dairy products on different cancer cell lines. Journal of Functional Foods, 11: 363-374 .
- Hammami, I., Rhouma, A., Jaouadi, B., Rebai, A. and Nesme, X. (2009). Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated Bacillus subtilis strain 14B for biocontrol of Agrobacterium spp. strains. Letters in Applied Microbiology, 48(2): 253-260 .
- Hammami, R., Zouhir, A., Hamida, J.B. and Fliss, I. (2007). BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. BMC Microbiology, 7(1): 1-6 .
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K. and Hammami, R. (2018). The genus Enterococcus: between probiotic potential and safety concerns—an update. Frontiers in Microbiology, 9: 1791.

- Hassan, M., Diep, D.B., Javadzadeh, Y., Dastmalchi, S., Nes, I.F., Sharifi, Y., et al. (2012). Prevalence of bacteriocin activities and bacteriocin-encoding genes in enterococcal clinical isolates in Iran. Canadian Journal of Microbiology, 58(4): 359-368 .
- Hirayama, K. and Rafter, J. (2000). The role of probiotic bacteria in cancer prevention. Microbes and Infection, 2(6): 681-686 .
- Jafari-Nasab, T., Khaleghi, M., Farsinejad, A. and Khorrami, S. (2021). Probiotic potential and anticancer properties of Pediococcus sp. isolated from traditional dairy products. Biotechnology Reports, 29: e00593 .
- Kemnitzer, W., Drewe, J., Jiang, S., Zhang, H., Crogan-Grundy, C., Labreque, D., et al. (2008). Discovery of 4-aryl-4 H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell-and caspase-based high throughput screening assay. 4. Structure–activity relationships of N-alkyl substituted pyrrole fused at the 7, 8-positions. Journal of Medicinal Chemistry, 51(3): 417-423 .
- Khodaii, M. and Soltani Nezhad, S. (2017). Isolation and screening of bacteriocin-producing bacteria from native dairy products of Kerman province and study of antibacterial activity of produced bacteriocin. Journal of Food Microbiology, 4(3): 69-79. [In persian]
- Kiani, A., Nami, Y., Hedayati, S., Jaymand, M., Samadian, H. and Haghshenas, B. (2021 a). Tarkhineh as a new microencapsulation matrix improves the quality and sensory characteristics of probiotic Lactococcus lactis KUMS-T18 enriched potato chips. Scientific Reports, 11(1): 12599 .
- Kiani, A., Nami, Y., Hedayati, S., Komi, D.E.A., Goudarzi, F. and Haghshenas, B. (2021 b). Application of Tarkhineh fermented product to produce potato chips with strong probiotic properties, high shelf-life, and desirable sensory characteristics. Frontiers in Microbiology, 12: 1-13.
- Kouhi, F., Mirzaei, H., Nami, Y., Khandaghi, J. and Javadi, A. (2021). Potential probiotic and safety characterisation of Enterococcus bacteria isolated from indigenous fermented Motal cheese. International Dairy Journal, 105247 .
- Lee, J.W., Shin, J.G., Kim, E.H., Kang, H.E., Yim, I.B., Kim, J.Y., et al. (2004). Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic fraction of Lactobacillus casei and Bifidobacterium longum. Journal of Veterinary Science, 5(1): 41-48 .
- Martin-Visscher, L.A., Yoganathan, S., Sit, C.S., Lohans, C.T. and Vederas, J.C. (2011). The activity of bacteriocins from Carnobacterium maltaromaticum UAL307 against Gram-negative bacteria in combination with EDTA treatment. FEMS Microbiology Letters, 317(2): 152-159 .
- Mirdamadi, S. and Tangestani, M. (2011). Screening and characterization of bacteriocins produced by some Strains of Lactobacillus spp isolated from Iranian Dairy Products. Journal of Food Hygiene, 1(3): 55-69. [In persian]
- Mirzaei, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M.R., Aminlari, M. and Hosseini, E. (2015). Purification and identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptide from Saccharomyces cerevisiae protein hydrolysate. Journal of Functional Foods, 19: 259-268 .
- Mojsova, S., Krstevski, K., Dzadzovski, I., Popova, Z. and Sekulovski, P. (2015). Phenotypic and genotypic characteristics of enterocin producing enterococci against pathogenic bacteria. Macedonian Veterinary Review, 38(2): 209-216 .
- Molham, F., Khairalla, A.S., Azmy, A.F., El-Gebaly, E., El-Gendy, A.O. and AbdelGhani, S. (2021). Anti-Proliferative and Anti-Biofilm Potentials of Bacteriocins Produced by Non-Pathogenic Enterococcus sp. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 13(2): 571-585 .
- Moslehishad, M., Ehsani, M.R., Salami, M., Mirdamadi, S., Ezzatpanah, H., Naslaji, A.N. and Moosavi-Movahedi, A.A. (2013). The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by Lactobacillus rhamnosus PTCC 1637. International Dairy Journal, 29(2): 82-87 .
- Motahari, P., Amini-Bayat, Z. and Mirdamadi, S. (2017). Bacteriocins: New generation of antimicrobial peptides. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences, 21(2): 79-94. [In persian]

- Nascimento, M.D., Moreno, I. and Kuaye, A.Y. (2010). Antimicrobial activity of Enterococcus faecium FAIR-E 198 against gram-positive pathogens. Brazilian Journal of Microbiology, 41: 74-81 .
- Nunez, M., Rodriguez, J., Garcia, E., Gaya, P. and Medina, M. (1997). Inhibition of Listeria monocytogenes by enterocin 4 during the manufacture andripening of Manchego cheese. Journal of Applied Microbiology, 83(6): 671-677 .
- Rajaram, G., Manivasagan, P., Thilagavathi, B. and Saravanakumar, A. (2010). Purification and characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus lactis isolated from marine environment. Advance Journal of Food Science and Technology, 2(2): 138-144 .
- Sami, A., Abbasgholizadeh, N. and Khandaghi, J. (2022). Evaluation of Safety Aspects and Antagonistic Activity of Enterococcus Strains Isolated from Traditional Pot Cheese. Journal of Health, 13(1), 7-16. [In persian]
- Śliżewska, K., Markowiak-Kopeć, P. and Śliżewska, W. (2020). The role of probiotics in cancer prevention. Cancers, 13(1): 1-22.
- Sobrino-López, A. and Martín-Belloso, O. (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. International Dairy Journal, 18(4), 329-343 .
- Sonsa-Ard, N., Rodtong, S., Chikindas, M.L. and Yongsawatdigul, J. (2015). Characterization of bacteriocin produced by Enterococcus faecium CN-25 isolated from traditionally Thai fermented fish roe. Food Control, 54: 308-316 .
- Strompfová, V., Lauková, A., Simonová, M. and Marciňáková, M. (2008). Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. Veterinary Microbiology, 132(3-4): 293-301 .
- Todorov, S. and Dicks, L. (2006). Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: Comparison of the bacteriocins. Process Biochemistry, 41(1): 11-19 .
- Tsai, Y.T., Cheng, P.C., Fan, C.K. and Pan, T.M. (2008). Time-dependent persistence of enhanced immune response by a potential probiotic strain Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101. International Journal of Food Microbiology, 128(2): 219-225 .
- Wang, C.Z., Calway, T. and Yuan, C.S. (2012). Herbal medicines as adjuvants for cancer therapeutics. The American Journal of Chinese Medicine, 40(4): 657-669 .
- Wong, S., McLaughlin, J., Cheng, D. and Witte, O.N. (2003). Cell context–specific effects of the BCR-ABL oncogene monitored in hematopoietic progenitors. Blood, the Journal of the American Society of Hematology, 101(10): 4088-4097 .
- Xi, Q., Wang, J., Du, R., Zhao, F., Han, Y. and Zhou, Z. (2018). Purification and characterization of bacteriocin produced by a strain of Enterococcus faecalis TG2. Applied Biochemistry and Biotechnology, 184: 1106-1119 .
- Yerlikaya, O. and Akbulut, N. (2020). In vitro characterisation of probiotic properties of Enterococcus faecium and Enterococcus durans strains isolated from raw milk and traditional dairy products. International Journal of Dairy Technology, 73(1): 98-107.