نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، ص. ۲۱۷-۲۱۱

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 11, No. 2, Summer 2015, p. 211-217

تاثیر دما، غلظت نمک و pH بر خواص ضدلیستریایی نایسین

میرحسن موسوی[1*] - نسیم شاویسی[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۱۳

چکیده

نایسین متعلق به گروه A لانتی‌بیوتیک‌ها بوده و مشهورترین باکتریوسینی است که به عنوان نگهدارنده طبیعی در محصولات غذایی مانند شیر و پنیر مورد استفاده قرار می‌گیرد. این پپتید بر روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت تاثیر می‌گذارد. استفاده از نایسین به تنهایی و در ترکیب با سایر روش‌های نگهداری مواد غذاییمی‌تواند روشی موثر در حذف باکتری لیستریا مونوسیتوژنز و دیگر عوامل بیماریزا در صنایع غذایی باشد. بدین منظور هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر نایسین علیه باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در سه دما (۴، ۹ و ۱۴ درجه سانتی‌گراد)، سه pH (۵، ۶ و ۷) و چهار غلظت نمک (۰، ۱، ۲ و ۴ درصد) می‌باشد. حداقل غلظت مهاری نایسین با استفاده از روش براث میکرودایلوشن مورد ارزیابی قرار گرفت و به منظور بررسی اثر درجه حرارت، pH و غلظت نمک از شاخص DP استفاده شد. حداقل غلظت مهاری نایسین ۳۲۰IU/ml تعیین گردید. اثر نایسین در دمای ۱۴ درجه در مقایسه با دماهای۴ و ۹ درجه بیشتر بود (P<۰/۰۱۶). همچنین خواص ضدلیستریایی نایسین با افزایش غلظت نمک (۲ و ۴ درصد) افزایش یافت (P<۰/۰۰۱). با توجه به تاثیر pH، در شرایط اسیدی (pH=۵) میزان فعالیت نایسین نسبت به سایر pHهای مورد مطالعه (۶ و ۷) بیشتر بود (P<۰/۰۰۱). در بین متغیرهای مورد مطالعه بیشترین تاثیر در کاهش تعداد باکتری مربوط به نمک و در مرحله بعد دما، سپس pH و نایسین بود (P<۰/۰۰۱).نتایج این مطالعه ضرورت استفاده از پارامترهای مختلف را در کنترل موثر لیستریا مونوسیتوژنز در کارخانجات صنایع غذایی روشن می‌سازد.

کلمات کلیدی: لیستریا مونوسیتوژنز، نایسین، دما، نمک، pH.

مقدمه

مطالعات بوم‌شناسی و تحقیقات مختلف نشان داده است که الگوی مصرف مواد غذایی در سراسر جهان تغییر پیدا کرده و مصرف‌کنندگان تمایل بسیار زیادی به استفاده از محصولات تازه، با کیفیت بالا، بدون مواد نگهدارنده طبیعی و مدت زمان ماندگاری بالا دارند (Devlieghere *et al,* 2004؛ Sobrino-Lopez *et al,* 2008؛ Solomakos *et al,* 2008). به همین دلیل میزان بروز بیماری‌های با منشا غذایی حاصل از مواد غذایی آماده مصرف نیز افزایش پیدا کرده است، از مهمترین این عوامل بیماریزا می‌توان به باکتری لیستریا مونوسیتوژنز اشاره کرد (Chollet *et al,* 2008). توانایی بقاء لیستریا مونوسیتوژنز در درجه حرارت‌های پایین، غلظت‌های بالای نمک و شرایط اسیدی حذف این باکتری را از مواد غذایی مشکل نموده است (Gallo *et al,* 2007؛ Al-Holy *et al,* 2012). در این راستاپژوهشگران تحقیقات زیادی را در استفاده از مواد نگهدارنده طبیعی در حذف عوامل بیماریزا و به ویژه لیستریا مونوسیتوژنز در مواد غذایی بررسی کرده‌اند که عبارتنداز: سیستم لاکتوپراکسیداز (شیر)، لیزوزیم (سفیده تخم مرغ، انجیر)، ساپونین‌ها و فلاونوئیدها (ادویه‌جات و اسانس‌های روغنی گیاهان)، چیتوزان (پوست میگو) و باکتریوسین‌ها (Devlieghere *et al,* 2004).

در حال حاضر تنها باکتریوسین تجاری که در مواد غذایی و به خصوص فرآورده‌های لبنی مانند شیر و پنیر مورد استفاده قرار می‌گیرد نایسین می‌باشد (Hsieh *et al,* 2011). این باکتریوسین توسط برخی سویه‌های خاص لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه لاکتیس تولید می‌شود (Gallo *et al,* 2007). نایسین بر روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت تاثیرگذار است. این ترکیب مقاوم به حرارت، دارای بار مثبت و ۳۴ اسید آمینه بوده (Chollet *et al,* 2008) و با تاثیر بر روی غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم مثبت باعث نابودیاین میکروارگانیسم‌ها می‌گردد (Gallo *et al,* 2007).

در بررسی اثر نایسین بر روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز نشان داده شده است که برخی از سویه‌های خاص این باکتری نسبت به

۱و۲- استادیار و دانشجوی کارشناسی ارشد ، گروه بهداشت مواد غذایی و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، ایران
(* - نویسنده مسئول: Email: moosavymh@gmail.com)

نایسین مقاومت نشان داده‌اند (Chi-Zhang *et al,* 2004). به همین دلیل استفاده از سایر عوامل محیطی نظیر درجه حرارت، دما و وجودشرایط اسیدی در افزایش اثر نایسین ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی خواص ضدباکتریایی نایسین بر روی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز در سه دما (۴، ۹ و ۱۴ درجه سانتی‌گراد)، سه pH (۵، ۶ و ۷) و چهار غلظت نمک (۰، ۱، ۲ و ۴ درصد) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی نایسین

نایسین خالص از شرکت سیگما کشور انگلستان خریداری گردید. برای آماده سازی 10^4 واحد بین‌المللی نایسین، ابتدا ۰/۰۲ گرم نایسین خالص را در ۱۰۰۰ µl اسید کلریدریک ۲٪ (۰/۰۲ M) در میکروتیوپ‌های استریل حل نموده (Moosavy *et al,* 2008)، در مرحله بعد آن را در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه در بن‌ماری حرارت داده و پس از سانتریفوژ و فیلتراسیون مایه رویی با فیلتر ۰/۲۲ میکرون، آن را تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری نمودیم (Al-Holy *et al,* 2012). غلظت‌های مورد مطالعه نایسین نیز بر اساس واحد بین‌المللی و از ۲/۵ تا ۲۵۶۰ به صورت رقت‌های سریالی دوتایی تعیین گردید.

باکتری مورد مطالعه و تعیین دوز تلقیح

باکتری مورد مطالعه لیستریا مونوسیتوژنز (ATCC 19115) بود که بصورت لیوفیلیزه ازسازمانپژوهش‌هایعلمی صنعتیایرانتهیهگردید. آماده سازیب اکتری برای تلقیح با انتقال باکتری از میکروتیوپ استریل به محیط آبگوشت قلب و مغز (مرک، آلمان) و نگهداری آن به مدت۲۴ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. مجدداًکشت دومی ازکشت ۲۴ ساعته اول در محیط آبگوشت قلب و مغز دیگر در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تهیه شد. سپس مقادیر مختلفی از کشت آبگوشت قلب و مغز ۲۴ ساعته دوم به درون سلکووت مختلف برده و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نوری خوانده شد. از محتویاتسلکووت، با استفاده از تهیه سری رقت و کشت سطحی مقدار باکتری در هر میلی‌لیتر مشخص و در نهایت به هر میلی‌لیتر محیط کشت تعداد 10^6 باکتری تلقیح گردید.

تعیین حداقل غلظت مهاری نایسین

برای تعیین حداقل غلظت مهاری نایسین از روش براث میکرودایلوشن در پلیت‌های میکروتیتر ۹۶ چاهکی استریل (اکستراژن، آمریکا) استفاده شد. بطور خلاصه در هر چاهک ۱۶۰ میکرولیتر محیط آبگوشت قلب و مغز استریل، ۲۰ میکرولیتر از هرکدام از رقت‌های متوالی نایسین و ۲۰ میکرولیتر کشت باکتریایی اضافه گردید. کنترل مثبت (چاهک حاوی باکتری+ محیط آبگوشت قلب و مغز بدون ترکیب ضدمیکروبی) و کنترل منفی (ترکیب ضدمیکروبی+ محیط آبگوشت قلب و مغز بدون باکتری) نیز در این مرحله از آزمایش در نظر گرفته شد. پس از افزودن غلظت‌های مورد نظر از ترکیب ضدمیکروبی و باکتری مورد مطالعه، پلیت‌های میکروتیتر به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۲۵۰ rpm برای مخلوط‌شدن در شیکر قرار داده شدند. بعد از طی شدن زمان ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به منظور تعیین حداقل غلظت مهاری، چاهک‌ها برای وجود کدورت به طریق چشمی بررسی و حداقل غلظتی که ایجاد حالت عدم رشد یا عدم کدورت مشهود با گروه کنترل کرد، به عنوان حداقل غلظت مهاری تعیین گردید. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر از نمونه در محیط آگار قلب و مغز (مرک، آلمان) کشت داده شد و پس از طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد عدم رشد تایید گردید (Rivas *et al,* 2010؛ Weerakkody *et al,* 2010).

بررسی اثر نایسین بر روی رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز

پس از تعیین حداقل غلظت مهاری نایسین دو غلظت پایین‌تر از آن (۸۰IU/ml و ۱۶۰IU/ml) برای بررسی اثر نایسین برروی رشد باکتری در pH، دما و غلظت‌های مختلف نمک مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور در هر چاهک پلیت‌های میکروتیتر ۱۶۰ میکرولیتر محیط آبگوشت قلب و مغز استریل دارایpH ۵، ۶ و ۷ و دارای نمک ۰، ۱، ۲ و ۴ درصد، ۲۰ میکرولیتر از دو غلظت مورد مطالعه نایسین و ۲۰ میکرولیتر کشت باکتریایی اضافه گردید. کنترل مثبت (چاهک حاوی باکتری+ محیط آبگوشت قلب و مغز بدون ترکیب ضدمیکروبی) و کنترل منفی (ترکیب ضدمیکروبی+ محیط آبگوشت قلب و مغز بدون باکتری) نیز در این مرحله از آزمایش در نظر گرفته شد. پس از افزودن غلظت‌های مورد نظر از نایسین و باکتری مورد مطالعه، پلیت‌های میکروتیتر به مدت ۳۰ ثانیه با دور ۲۵۰ rpm در شیکر برای مخلوط شدن قرار داده شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۳ دمای ۴، ۹ و ۱۴ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند.به منظور ارزیابی رشد باکتری پس از طی دمای گرمخانه‌گذاری شمارش کلنی به روش کشت سطحی در محیط آگار قلب و مغز صورت گرفت (Razavi Rohani *et al,* 2011).

برای شمارش تعداد باکتری در هرکدام از مراحل انجام آزمایش، پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلیتی انتخاب شد که تعداد کلنی باکتری آن بین ۳۰۰-۳۰ باکتری بود.

در این مطالعه از شاخصی به نام DP (Differences in

(Population) استفاده گردید که به صورت زیر محاسبه می‌شود (Zhou et al, 2011).

$$\text{Log DP}= \log\left(\frac{N}{N0}\right)= \log(N)- \log(N0) \quad (۱)$$

N_0: تعداد باکتری اولیه

N: تعداد باکتری پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری

این مطالعه با سه بار تکرار انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل

برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده گردید و مقدار P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار لحاظ گردید. از آزمون آنالیز واریانس و با استفاده از ANOVA و Turkey test جهت بررسی اثر متغیرهای مستقل(مقادیر نایسین، نمک و درجه حرارت) برروی متغیر وابسته (کاهش جمعیت باکتری باکتری) استفاده گردیدو از همبستگی اسپیرمن برای بررسی ارتباط متغیرهای مزبور با هم استفاده شد.

نتایج و بحث

اهمیت بیماری زایی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز موجب شده‌است تا محققین اثر نگهدارنده‌های ضدمیکروبی مختلف را علیه این باکتری در شرایط آزمایشگاهی و مدل‌های غذایی مختلف مورد مطالعه قرار دهند (Yoon *et al,* 2011؛ Xi *et al,* 2011؛ Hayrapetyan et al, 2012). در این مطالعه خواص ضدباکتریایی نایسین بر روی لیستریا مونوسیتوژنز تحت شرایط محیطی مختلف در سه دما (۴، ۹ و ۱۴ درجه سانتی گراد)، سه pH (۵، ۶ و ۷) و چهار غلظت نمک (۰، ۱، ۲ و ۴ درصد) مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه نشان داده شد که افزایش درجه حرارت، شرایط اسیدی و غلظت نمک، اثر نایسین را بر روی رشد لیستریا مونوسیتوژنز افزایش می‌دهند.

تعیین حداقل غلظت مهاری نایسین

در این مطالعه حداقل غلظت مهاری نایسین ۳۲۰IU/ml تعیین شد. Solomakos و همکاران (۲۰۰۸) گزارش نمودند که غلظت‌های۶۰۰IU/ml–۱۵۰ رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز را در شرایط آزمایشگاهی مهار می‌کند. حداقل غلظت مهاری نایسین در این مطالعه ۳۲۰IU/ml تعیین گردد که با مطالعه این محققین همخوانی دارد. بالابودن میزان استفاده از نایسین به منظور مهار کامل لیستریا مونوسیتوژنز در مقایسه با برخی از تحقیقات (Razavi Rohani *et al,* 2011) می‌تواند به دلیل تفاوت در میزان اسیدهای چرب و فسفولیپیدهای سویه‌های مختلف این باکتری و به تبع آن کاهش میزان قدرت نایسین در تشکیل منفذ در غشاهای دارای میزان بالاتر لیپید باشد (Murdock *et al,* 2007؛ Singh *et al,* 2001).

اثر ضدباکتریایی نایسین در شرایط مختلف

آنالیز آماری واریانس بررسی اثر غلظت‌های نایسین بر متغیر وابسته (جمعیت باکتری برحسب CFU/ml) (جدول ۱) نشان داد که بین دو غلظت ۸۰IU/ml و ۱۶۰IU/ml نایسین تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۰۶)، هر چند غلظت ۱۶۰IU/ml نایسین باعث کاهش تعداد باکتری شد اما در آزمون t-test این کاهش بصورت معنی‌دار نبود (P<۰/۰۷). مقاومت سویه‌های مختلف لیستریا مونوسیتوژنز به باکتریوسین‌ها و همچنین تحمل شرایط محیطی مانند دمای پایین، شرایط اسیدی و غلظت‌های بالای نمک ضرورت استفاده از تکنولوژی هردل را در مواد غذایی روشن می‌سازد. به هنگام استفاده از این پارامترها به صورت همزمان با یکدیگر حساسیت باکتری افزایش می‌یابد. این مسئله به خصوص درباره سوسیس‌های تخمیری و پنیر صادق بوده که در آن‌ها به منظور کنترل این باکتری از ترکیب pH پایین و نمک بالا استفاده می‌گردد (Tiganitas *et al,* 2009). در واقع باکتری در شرایط اسیدی با حفظ pH داخلی تعادل خودرا حفظ می‌کند. اما به هنگام استفاده از یک عامل محیطی دیگر مانند غلظت بالای نمک باکتری باید میزان انرژی بیشتری مصرف نماید تا بتواند خود را در برابر شرایط نامساعد حفظ کند و بدین ترتیب حساسیت آن به نایسین افزایش می‌یابد (Shabala *et al,* 2008).

اثر درجه حرارت بر روی میزان رشد باکتری

مطالعه اثر درجه حرارت‌های مختلف گرمخانه‌گذاری (۴، ۹ و ۱۴ درجه سانتی‌گراد) بر متغیر وابسته (جمعیت باکتری برحسب CFU/ml) توسط آنالیز واریانس نشان داد که بین درجه حرارت‌های مختلف در کاهش رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۰۱). آزمون t-test نیز نشان داد که که دمای ۱۴ درجه در مقایسه با دمای ۴ و ۹ درجه باعث کاهش بیشتر لگاریتم باکتری می‌شود (P<۰/۰۱۶). بطورکلی با توجه به ماهیت سرمادوست بودن لیستریا مونوسیتوژنز مقاومت باکتری در دماهای پایین به نایسین بیشتر می‌باشد، به همین دلیل در این مطالعه دمای ۱۴ درجه در مقایسه با دمای ۴ و ۹ درجه باعث کاهش بیشتر جمعیت باکتری شد (P<۰/۰۱۶). که نتیجه این مطالعه با تحقیق Karina و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت دارد. این محققین اثر مواد نگهدارنده از جمله نایسین را در شرایط محیطی مختلف (دما، فعالیت آبی، چربی و pH) برروی لیستریا مونوسیتوژنز در فارش سوسیس بررسی کرده و نشان دادند که با افزایش دما میزان رشد باکتری کاهش می‌یابد، بطوری که در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در تمامی نمونه‌های آن‌ها باکتری بقای خود را حفظ نموده بود.

جدول ۱- اثر نایسین برروی شاخص DP لیستریا مونوسیتوژنز در دمای ٤، ۹ و ١٤ درجه سانتی‌گراد

تیمار		غلظت		
		نایسین IU/ml		
دما	pH	نمک (g/۱۰۰)	۸۰	۱٦۰
۴	۵	۰	۱/۵۷±۰/۷۴۲	۱/۶۱±۰/۱۲۷
		۱	۱/۵۶±۰/۰۰۰	۱/۲۲±۰/۱۴۱
		۲	۱/۳۰±۰/۰۲۸	۰/۳۶±۰/۲۵۴
		۴	۰/۸۰±۰/۰۱۴	-۰/۰۵±۰/۵۱۶
	۶	۰	۲/۱۲±۰/۰۳۵	۲/۰۳±۰/۰۹۱
		۱	۱/۸۶±۰/۰۴۹	۱/۹۰±۰/۰۰۰
		۲	۱/۵۳±۰/۱۵۵	۰/۸۶±۰/۰۳۵
		۴	۰/۸۷±۰/۰۰۰	۰/۲۹±۰/۱۶۲
	۷	۰	۲/۰۸±۰/۰۴۹	۲/۱۰±۰/۱۴۱
		۱	۲±۰/۰۰۷	۱/۹۰±۰/۰۰۰
		۲	۱/۹۲±۰/۰۸۴	۱/۴۴±۰/۰۵۶
		۴	۱/۴۶±۰/۰۷۷	۱/۲۵±۰/۰۹۸
۹	۵	۰	۱/۵۴±۰/۶۵۷	۱/۴۸±۰/۱۹۰
		۱	۱/۲۱±۰/۸۴۱	۱/۱۹±۰/۰۷۷
		۲	۰/۶۱±۰/۵۱۸	-۰/۲۱±۰/۰۵۶
		۴	۰/۱۶±۰/۳۷۴	-۰/۶۴±۰/۱۴۱
	۶	۰	۲/۰۲±۰/۱۵۵	۱/۹۹±۰/۰۰۷
		۱	۱/۶۶±۰/۴۶۶	۱/۸۹±۰/۰۲۸
		۲	۱±۰/۱۶۲	۱±۰/۰۰۷
		۴	۰/۵۴±۰/۶۵۰	۰/۳۱±۰/۱۵۵
	۷	۰	۲/۰۵±۰/۰۹۱	۲/۱۸±۰/۰۲۱
		۱	۱/۷۰±۰/۳۸۸	۱/۹۰±۰/۱۳۴
		۲	۱/۳۳±۰/۰۰۷	۱/۴۶±۰/۰۶۳
		۴	۰/۹۷±۰/۰۳۵	۱/۲۴±۰/۰۵۶
۱۴	۵	۰	۱/۹۷±۰/۰۴۲	۱/۳۷±۰/۱۷۶
		۱	۱/۵±۰/۰۸۴	۱/۰۲±۰/۰۲۸
		۲	۰/۸۷±۰/۰۵۶	-۰/۳۳±۰/۰۳۵
		۴	۰/۳۱±۰/۱۱۳	-۰/۹۷±۰/۰۴۲
	۶	۰	۲/۰۱±۰/۰۲۸	۱/۹۶±۰/۰۳۵
		۱	۱/۹۲±۰/۰۲۸	۱/۷۹±۰/۰۷۷
		۲	۱/۰۲±۰/۰۲۸	۰/۷۰±۰/۱۱۳
		۴	۰/۸۶±۰/۰۴۲	۰/۰۴±۰/۰۵۶
	۷	۰	۲/۳۴±۰/۰۲۱	۲/۲۲±۰/۰۳۵
		۱	۲/۰۷±۰/۱۰۶	۱/۹۴±۰/۰۶۳
		۲	۱/۴۱±۰/۰۲۱	۱/۲۴±۰/۰۵۶
		۴	۱/۱۶±۰/۰۰۷	۱/۱۲±۰/۰۲۸

اثر pH برروی میزان رشد باکتری

بررسی اثر pHهای مختلف (۵، ۶، ۷) بر متغیر وابسته (جمعیت باکتری بر حسب CFU/ml) با استفاده از آنالیز واریانس نشان داد که بین pH های مختلف در کاهش تعداد باکتری تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۰۱). به عبارت دیگر این نتیجه نشان می‌دهد که با کاهش میزان pH، کاهش (لگاریتمی) در جمعیت باکتری مشاهده می‌گردد. آزمون t-test نیز نشان داد که اثر pH=۵ بیشتر از سایر pHها می‌باشد (P<۰/۰۰۱). در مطالعه Gallo و همکاران (۲۰۰۷) که

اثر شرایط محیطی (pH و درجه حرارت) را در افزایش خواص نایسین بر روی باکتری لیستریا ایناکوا در آب پنیر مورد بررسی قرار دادند نیز نشان داده شد که در pH=۵/۵ میزان اثر نایسین بیشتر از ۶/۵= pHمی‌باشد که نتایج این مطالعه با مطالعه حاضر مطابقت دارد، چراکه در این مطالعه نیز میزان اثر نایسین در pH=۵ بیشتر از سایر pHهای مورد مطالعه بود (P<۰/۰۰۱). در واقع لیستریا ایناکوا یک سویه غیربیماریزا بوده که به دلیل شباهت خواص فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی آن با لیستریا مونوسیتوژنز در بسیاری از مطالعات از آن به عنوان شاخص باکتری لیستریا مونوسیتوژنز استفاده می‌گردد (Gallo *et al,* 2007). بطور کلی اثر نایسین در شرایط اسیدی و pHهای پایین بیشتر از pHهای خنثی می‌باشد (Devlieghere *et al,* 2004)، تحقیقات دیگر نیز که اثر نایسین را بر روی سایر باکتری‌هایی مانند سالمونلا تیفی‌موریوم و اشریشیا کلی O157:H7 (Saldaña *et al,* 2012)، باسیلوس سرئوس و باسیلوس سیرولانس (Rajkovic *et al,* 2005) بررسی نموده‌اند، گزارش کرده‌اند که اثر نایسین در pH های اسیدی بیشتر می‌باشد.

اثر مقادیر نمک برروی میزان رشد باکتری

مطالعه اثر درصدهای نمک (۰، ۱، ۲ و ۴ درصد) بر متغیر وابسته (جمعیت باکتری بر حسب CFU/ml) توسط آنالیز واریانش نشان داد که بین غلظت‌های مختلف نمک ۰، ۱، ۲ و ۴ درصد تفاوت معنی‌داری در کاهش تعداد باکتری وجود دارد (P<۰/۰۰۱). آزمون t-test نیز نشان داد که نمک باعث کاهش تعداد باکتری می‌گردد. بطوری که کاهش تعداد باکتری در دو غلظت نمک ۲ درصد (P<۰/۰۰۲)، و ۴ درصد (P<۰/۰۰۱) معنی دار بود، که این نتیجه با مطالعه Razavi Rohaniو همکاران، در سال ۲۰۱۱؛ Boziaris و همکاران در سال ۲۰۰۶ و Bouttefroy و همکاران در سال ۲۰۰۰ همخوانی دارد.

از مهمترین محدودیت‌های استفاده از نایسین عدم پایداری آن در شرایط خنثی و قابلیت انحلال پایین آن در آب می‌باشد، این موارد استفاده کاربردی آن را در برخی از مواد غذایی محدود می‌نماید، بنابراین،به منظور افزایش تاثیر نایسین و کاهش محدودیت‌های استفاده از آن،بکارگیری تکنولوژی پارمترهای چندمانعی (نظیر pH، دما و غلظت نمک) منطقی به نظر می‌رسد.در این تحقیق، خواص ضدمیکروبی نایسین و تاثیر pH، دما و غلظت نمک بر روی میزان اثر این ترکیب در رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که عوامل محیطی (دما،pH وغلظت نمک) سبب افزایش اثر نایسین بر روی لیستری امونوسیتوژنز می‌گردد. همچنین به منظور بررسی تاثیر سایر نگهدارنده‌های میکروبی و گیاهی در افزایش خواص نایسین بر روی این باکتری، باید اثرات ترکیبی آن با این ترکیب در شرایط آزمایشگاهی و مدل‌های غذایی نظیر گوشت و فرآورده‌های گوشتی و همچنین فرآورده‌های لبنی که احتمال حضور لیستریا مونوسیتوژنر در آن‌ها بیشتر است مورد بررسی قرار گیرد. علاوه بر این، پیشنهاد می‌شود که قبل از استفاده از نایسین به عنوان افزودنی مواد غذایی مطالعات بیشتری در خصوص خواص ضدمیکروبی آن روی عوامل بیماریزای مختلف منتقله از مواد غذایی صورت گیرد.

منابع

Al-Holy, M.A., Al-Nabulsi, A., Osaili, T.M., Ayyash, M.M.,Shaker, R.R., 2012,Inactivation of *Listeria innocua* in brined white cheese by a combination of nisin and heat.Food Control, 23(1), 48-53.

Bouttefroy, A., Mansour, M., Linder, M. Milliere, J.B., 2000, Inhibitory combination of nisin, sodium chloride and pH on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth by an experimental design approach. International Journal ofFood Microbiology, 54(1-2), 109–115.

Boziaris, I.S., Nychas, G.J.E., 2006, Effect of nisin on growth boundaries of *Listeria monocytogenes* Scott A, at various temperatures, pH and water activities. Food Microbiology, 23(8), 779-784.

Chi-Zhang, Y., Yam, K.L.,Chikindas, M.L., 2004,Effective controlof *Listeria monocytogenes*by combination of nisin formulated andslowly released into broth system. International Journal ofFood Microbiology, 90(1),15–22.

Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A.,Degraeve, P., 2008, Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. Food Control, 19(10), 982–989.

Devlieghere, F., Vermeiren, L.,Debevere, J., 2004,New preservation technologies: possibilities and limitations. International Dairy Journal, 14(4), 273-285.

Gallo, L.I., Pilosof, A.M.R.,Jagus, R.J., 2007, Effective control of *Listeria innocua*by combination of nisin, pH and low temperature in liquid cheese whey.Food Control, 18(9), 1086-1092.

Gandhi, M.,Chikindas, M.L.,2007, *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. International Journal ofFood Microbiology, 113(1), 1–15.

Hayrapetyan, H., Hazeleger, W.C.,Beumer, R.R., 2012, Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. Food Control, 23(1), 66-72.

Hsieh, Y.H., Yan, M., Liu, J.G.,Hwang, J.C., 2011,The synergistic effect of nisin and garlic shoot juice against *Listeria* spp. in soymilk. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 42(4), 576-579.

Karina, P., Julio, C., Leda, G. Noemi, Z., 2011, Behavior of *Listeria monocytogenes* type1 355/98 (85) in meat emulsions as affected by temperature, pH, water activity, fat and microbial preservatives. Food Control, 22(10), 1573-1581.

Moosavy, M.H., Akhondzadeh Basti, A., Misaghi, A., Zahraei Salehi, T., Abbasifar, R., Ebrahimzadeh Mousavi, H.L.,2008, Effect of *Zataria multiflora Boiss*. essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. Food Research International, 41(10), 1050–1057.

Murdock, C.A., Cleveland, J., Matthews, K.R. Chikindas, M.L., 2007,Thesynergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes*and *Escherichia coli* O157:H7. Letters in Applied Microbiology, 44(3),255–261.

Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Courtens, T.,Debevere, J., 2005, Antimicrobial effect of nisin and carvacrol and competition between *Bacillus cereus* and *Bacillus circulans* in vacuum-packed potato puree. Food Microbiology, 22(2-3), 189–197.

Razavi Rohani, S.M., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S.S.Griffiths, M.W., 2011,The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. LWT-Food Science and Technology, 44(10), 2260-2265.

Rivas, L., McDonnell, M.J., Burgess, C., O'Brien, M., Navarro-Villa, A., Fanning, S.,2010, Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. International Journal of Food Microbiology, 139(1-2),70–78.

Saldaña, G., Monfort, S., Condón, S., Raso, J., Álvarez, I. 2012, Effect of temperature, pH and presence of nisin on inactivation of *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed electric fields. Food Research International, 45(2), 1080–1086.

Shabala, L., Lee, S.H., Cannesson, P.,Ross, T., 2008, Acid and NaCl limits of growth of*Listeria monocytogenes* and influence of sequence of inimical acid and NaCl levelson inactivation kinetics. Journal of Food Protection, 71(6), 1169–1177.

Singh,B., Falahee, M.B.,Adams, M.R., 2001, Synergistic inhibition of*Listeriamonocytogenes* by nisin and garlic extract.Food Microbiology, 18(2),133–139.

Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., Botsoglou, N., 2008,The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. Meat Science, 80(2), 159–166.

Sobrino-Lopez, A., Martin-Belloso, O., 2008, Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products.International Dairy Journal, 18(4), 329-343.

Tiganitas, A., Zeaki, N., Gounadaki, A.S., Drosinos, E.H.,Skandamis, P.N., 2009, Study of the effect of lethal and sublethal pH and aw stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*. International Journal ofFood Microbiology, 134(1-2), 104–112.

Weerakkody, N.S., Caffin, N., Turner, M.S.,Dykes, G.A., 2010, In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. Food Control, 21(10), 1408-1414.

Xi, Y., Sullivan, G.A., Jackson, A.L., Zhou, G.H.,Sebranek, J.G., 2011, Use of natural antimicrobials to improve the control of *Listeria monocytogenes* in a cured cooked meat model system: Meat Science, 88(3), 503–511.

Yoon, J.I., Bajpai, V.K.,Kang, S.C., 2011, Synergistic effect of nisin and cone essential oil of Metasequoia glyptostroboides Miki ex Hu against *Listeria monocytogenes* in milk samples. Food and Chemical Toxicology,49(1), 109–114.

Zhou, F., Ji,B., Zhang, H., Jiang, H., Yang, Y.,Li, J., 2007,The antibacterial effects of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella typhimurium*. Journal of Food safety, 27(2), 124-133.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 11, No. 2, Summer 2015, p. 211-217

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، ص. ۲۱۷-۲۱۱

Effect of temperature, NaCl concentration and pH on anti-listerial activity of nisin

M. Moosavy[1]* - N.Shaveisi[2]

Received: 23-10-2013
Accepted: 03-05-2014

Abstract

Nisin, belonged to type-A lantibiotcs, is a well-known bacteriocin that applied as natural preservative in food productions such as milk and cheese. This peptide has an inhibitory effect on many of Gram-positive bacteria. Using of nisin alone and in combination with other hurdles may serves as an effective method to eliminate *Listeria monocytogenes* and other pathogens in food industries. This study was undertaken to evaluate the effect of nisin against *listeria monocytogenes* in different temperatures (4, 9 and 14°C), pH (5, 6 and 7) and NaCl concentrations (0, 1, 2 and 4).The minimum inhibitory concentration (MIC) of nisin was assessed using a broth micro-dilution method. Furthermore, differences in population (DP) assay was used in order to analyze the effects of (storage) temperature, pH and sodium chloride concentration on *Listeria monocytogenes* survival in presence of nisin. The MIC value of nisin was 320IU/ml**.** The effectiveness of nisin was increased at 14°C better than at 9 and 4°C ($P<0.016$).Nisin activity increased in the presence of 2 and 4 g/100 ml of NaCl concentration ($P<0.001$). Also higher inactivation was observed after to pH 5 compared to pH 6 and 7 ($P<0.001$). Our results demonstrated that among different NaCl, pH, temperature and nisin values, the effect of NaCl was confounded than the effect of other factors at all prepared combinations ($P<0.001$).Our findings suggest the application of hurdle technology for achieving effective control in most in food industries.

Keywords: *Listeria Monocytogenes*;Nisin; Temperatures; NaCl; pH

1,2- Assistant professor and M.Sc student, Health of food and aquatics group, faculty of keterinary medicine Tabriz University, Iran.
(* - Corresponding Author Email: Moosavymh@gmail.com)