Archive of SID

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 7, No. 3, 2011, p. 191-199

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۰، ص. ۱۹۹-۱۹۱

بررسی اثر ضد باکتریایی نایسین به دو فرم آزاد و نانوانکپسوله در لیپوزوم بر ماندگاری و کاهش جمعیت لیستریایی پنیر سفید ایرانی فراپالایش

الهام زایرزاده [۱*]- سیدعلی مرتضوی [۲]- محمود رضا جعفری [۳]- سیما افشارنژاد [۴]- فریده طباطبایی یزدی [۵]- مهدی نصیری محلاتی [۶]

تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۳۰
تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۱۲

چکیده

هدف از انجام این پژوهش بررسی تاثیر کارایی کاربرد نایسین در فرم آزاد و محصور در نانوکپسول های لیپوزومی در کنترل جمعیت لیستریا منوسیتوژنز در پنیر فتای فراپالایش بود. لیستریا منوسیتوژنز گونه ATCC 19117 به میزان 10^6 cfu/g به پنیر اضافه گردید. در ساخت فرمول های لیپوزومی از کلسترول، لستین و روغن کره استفاده شد. پس از تعیین حداقل غلظت بازدارندگی، نایسین در سطح ۵۰۰IU/g در تمام تیمارها به کار برده شد. کلیه آزمایش ها(میکروبی و pH) در قالب طرح کاملا تصادفی بر پایه فاکتوریل در ۳ تکرار انجام گرفت. تیمارهای مورد بررسی عبارت بودند از دو فرمول مختلف فسفولیپیدی، یک نمونه نایسین آزاد و یک نمونه کنترل. میزان محصورسازی نانوکپسول های لیپوزومی حاوی نایسین، برای فرمول ۱ لیپوزومی ۱۲/۴۹٪ و برای فرمول ۲ لیپوزومی ۱۱/۷۲٪ محاسبه گردید و نتایج حاصل از بررسی اندازه لیپوزوم ها نشان داد که ۱۰۰ درصد نمونه ها در هر دو فرمول، قطرمتوسطی در حدود ۱۴۹/۷-۱۰۱/۵۱ نانومتر داشتند. مقایسه نتایج روند تغییرات جمعیت لیستریایی نشان دهنده وجود تاثیر معنی دار بین عملکرد نایسین آزاد و محصور در نانوکپسول های لیپوزومی بر روند کاهش جمعیت لیستریایی بود($p<0.01$). در ارتباط با تغییرات pH در دو تیمار نایسین محصور در نانوکپسول های لیپوزومی، روند تغییرات pH اختلاف معنی داری با هم و با شاهد نداشتند، ولی در تیمار نایسین آزاد، تفاوت معنی داری در تمام هفته های نگهداری پس از تولید مشاهده گردید($p<0.01$).

واژه‌های کلیدی: پنیر فراپالایش، لیستریا منوسیتوژنز، نانوانکپسولاسیون، نایسین

مقدمه

طی چند دهه اخیر گرایش روز افزونی برای استفاده از باکتریوسین‌ها به عنوان مواد نگهدارنده طبیعی، گزارش گردیده است. در این میان نایسین حاصل از گونه‌های *Lactococcus lactis* به دلیل خاصیت ممانعت کنندگی از رشد بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت شامل پاتوژن‌ها و آلوده کننده‌های مواد غذایی، میکروارگانیزم‌های مولد فساد و برخی از باکتری‌های گرم منفی (که دچارآسیب دیدگی غشاء بیرونی گردیده اند.) شدیداً مورد توجه می‌باشد (Kordel et al, 1986، Laridi et al, 2003، Rodriguez, 1996، Stevens et al, 1991). این ترکیب همچنین قابلیت بازداری از جوانه زنی اسپورها را دارا می‌باشد (Davidson et al, 2003). مطالعات نشان می‌دهد نایسین قادر است رشد و تشکیل (اندو)اسپور در گونه‌های مختلف جنس کلستریدیوم و باسیلوس را تحت کنترل در آورد (نصر و همکاران، ۱۳۸۶، Davidson et al, 2003، Mattick et al, 1956).

استفاده از نایسین به منظور افزایش مدت زمان ماندگاری و کنترل باکتری‌های نامطلوب در بسیاری از مواد غذایی از جمله پنیر رایج می‌باشد (Laridi et al, 2003، Mazzotta et al, 1997). نایسین در پنیر از رشد میکروب‌های مولد فساد و بیماری زا، نظیر

۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
(*- نویسنده مسئول: Email: e_zaerzadeh@yahoo.com)
۲و ۵- به ترتیب استاد و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
۳- استاد، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد.
۴- استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد.
۶- استاد، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

www.SID.ir

Archive of SID

گونه‌های اسپورزای هوازی و بی هوازی و گونه‌های *لیستریا منوسیتوژنز*[1] جلوگیری می‌نماید (Laridi et al, 2003، Davidson et al, 2003). لیستریا منوسیتوژنز عامل بروز بیماری‌هایی نظیر انسفالیت، مننژیت و یا سقط جنین در زنان حامله می‌باشد، که وجود آن در شیر خام و پاستوریزه گزارش گردیده است (Tamime et al, 1991).

استفاده از نایسین به فرم آزاد در پنیر، اقتصادی نبوده و بر تولید اسید و آرومای باکتری‌های آغازگر، اثر بازدارندگی دارد، در نتیجه کاهش رشد و تولید اسید را در پی خواهد داشت (Roberts, 1991). علاوه بر این اضافه نمودن نایسین به فرم آزاد، می‌تواند محدودیت‌های دیگری را در پنیر به دنبال داشته باشد. از جمله اینکه بخش اعظم نایسین به طور یکنواخت در بافت پنیر پخش و توزیع نمی‌گردد (Roberts, 1991،Laridi et al, 2003) و مقادیر بیشتری از نایسین مورد نیاز خواهد بود(Laridi et al, 2003، Jung et al, 1992).

روش جایگزین برای فرم آزاد، استفاده از گونه‌های استارتر تولیدکننده نایسین می‌باشد (Benech et al, 2002a، Laridi et al, 2003). از طرفی این راهکار نیز دارای محدودیت‌هایی است. اضافه نمودن گونه‌های مولد باکتریوسین(نایسین) در فرایند تولید پنیر، رشد، تولید اسید و آرومای باکتری‌های آغازگر را تحت تأثیر قرار داده (Laridi et al, 2003)، اسیدی کردن را به تأخیر انداخته و میزان لاکتوز باقیمانده در فراورده نهایی را افزایش می‌دهد (Benech et al, 2002a). از این رو نهایتاً منجر به کاهش کیفیت محصول نهایی خواهد شد (Benech et al, 2003).

به منظور حل مشکلات مذکور، انکپسولاسیون نایسین درگویچه‌های فسفولیپیدی می‌تواند راهکاری مناسب باشد (Laridi et al, 2003). این تکنیک می‌تواند توزیع مناسب و پایداری باکتریوسین را در شبکه ماده غذایی تضمین نماید (Benech et al, 2002a).

از مزایای این تکنیک می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

۱) کاهش و جلوگیری از تمایل نایسین به اجزای ماده غذایی

۲) جلوگیری از مداخله در رشد استارتر لاکتیکی

۳) محافظت نایسین در برابر شرایط نامساعد و بازدارنده‌ها که به طور طبیعی در ساختار ماده غذایی وجود دارند.

۴) ایفای نقش به عنوان نگهدارنده ای با ماندگاری طولانی مدت (Laridi et al, 2003)

در عین حال اصلی ترین محدودیت برای به دام اندازی نایسین ودیگر پپتیدهای آنتی باکتریال در لیپوزوم‌ها, توانایی این پپتیدها در برهم کنش با غشاء لیپوزومی و تخریب آن‌ها است (El Jastimi et al, 1999، Laridi et al, 2003). اتصال نایسین به غشاء لیپیدی سبب ایجاد تغییراتی در ساختار ثانویه پپتید می شود (El Jastimi et al, 1997)، بر هم کنش بین نایسین و غشاء فسفولیپیدی، از طریق انتخاب ترکیب فسفولیپیدی مناسب کاهش یافته یا مهار می‌گردد (Degnan et al, 1992).

در انجام این پژوهش، بررسی کارایی دو فرمولاسیون لیپوزومال نایسین در بازدارندگی از رشد لیستریا منوسیتوژنز در پنیر فتا مورد نظر بود. با این توضیح که تا کنون در پژوهش های صورت پذیرفته، چربی شیر به عنوان یکی از اجزا تشکیل دهنده لیپوزوم، مورد استفاده قرار نگرفته است و این امر می تواند گامی در پیشبرد صنعتی شدن و کاربرد این فناوری باشد.

مواد و روش‌ها

تولید و فرمولاسیون لیپوزوم ها

مواد

به منظور تهیه لیپوزوم ها کلسترول، روغن کره، آب مقطر استریل و لستین سویا مورد اسفاده قرارگرفت. روغن کره از شرکت فراورده های لبنی رضوی تامین گردید. کلسترول و لستین از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

روش آماده سازی لیپوزوم

برای تهیه هر فرمولاسیون ابتدا کلسترول، لسیتن و نایسین به مقدار ذکر شده در هر فرمولاسیون(فرمولاسیون ۱ حاوی ۷/۵٪ لستین، ۱۵٪ روغن کره، ۲٪ کلسترول و فاز آبی تا صد در صد، فرمولاسیون ۲ حاوی۳/۷۵٪ لستین، ۷/۵٪ روغن کره، ۱٪ کلسترول و فاز آبی تا صد در صد) به کمک ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ در فالکون وزن شد و سپس مقدار دقیق روغن حیوانی توزین گردید و در بن ماری ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا به طور کامل ذوب شد. پس از آن ترکیبات توزین شده مذکور به روغن کره ذوب شده اضافه شدند و میزان آب مورد نیاز نیز به صورت هم دما اضافه شد و تا به دست آمدن مخلوطی همگن ورتکس گردید. لازم به توضیح است که میزان حداقل غلظت بازدارندگی نایسین محاسبه و در فاز آبی افزوده گشت. سپس از هموژنایزر اولتراتوراکس مدل IKA-T10 برای مدت ۶-۵ دقیقه در سرعت ۱۶۰۰۰rpm استفاده شد. به منظور جلوگیری از اکسیده شدن، هوای موجود در فضای خالی بالای فالکون ها توسط گاز آرگون جایگزین گردید.

تولید پنیر سفید ایرانی فراپالایش

شیر فراپالایش، پاستوریزه و باکتوفیوژ شده با ماده خشک ۳۴ ٪ از صنایع شیر پگاه خراسان تامین شد. رنت و باکتری آغازگر پنیر فتا

1- Listeria monocytogenes

www.SID.ir

Archive of SID

از نمایندگی شرکت Delvotech دانمارک تهیه گردید، جهت فعال نمودن طبق دستورالعمل شرکت سازنده عمل شد.

سوش لیستریا منوسیتوژنز ATCC ۱۹۱۱۷ نیز به صورت لیوفلیزه از مرکز پژوهش های علمی- صنعتی ایران تهیه گردید.

تولید پنیر فراپالایش حاوی لیپوزومال نایسین و نایسین آزاد

در مرحله افزودن رنت، در دمای ۳۷-۳۴ درجه سانتی گراد و ۶/۴ =pH نایسین به صورت آزاد و به فرم کپسوله در حداقل غلظت بازدارندگی و لیستریا منوسیتوژنز به میزان 10^6 cfu/ml به نمونه ها اضافه شدند.

بررسی راندمان محصورسازی

جهت جداسازی نایسین از لیپوزوم های حاوی نایسین از میکروسانتریفیوژ UNIVERSAL 320R استفاده شد و برای تعیین میزان نایسین، کیت BCA شرکت Pierce تهیه گردید.

آنالیز میکروبی لیستریا منوسیتوژنز در هفته‌های پس از تولید

نمونه ها به مدت ۲۸ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند وآزمایش های مربوطه میکروبی در ۲۰تا۲۴ ساعت پس از تولید و هر ۷ روز یکبار انجام پذیرفت. برای این منظور ۱۰ گرم از نمونه پنیر با ۹۰ میلی لیتر محلول ۲٪ سیترات سدیم استریل برای ۳ دقیقه هموژن گردید و نمونه های پنیر به طور متوالی ۱۰ بار در سیترات سدیم ۲٪ رقیق شدند. رقت های مناسب در ۳ تکرار به پلیت حاوی محیط کشت پایه انتخابی لیستریا، همراه با مکمل انتخابی SR140E اضافه گردیدند. پلیت ها پس از ۴۸-۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد شمارش شد (Benech et al, 2003، Benech et al, 2002a).

حداقل غلظت بازدارندگی موثر نایسین

بر اساس روش آزمون میکروبیولوژی نگهدارنده ها ـ تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC)، مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران شماره ۵۸۷۵ عمل گردید.

رسم منحنی رشد استاندارد لیستریا منوسیتوژنز و بررسی اثر حضور نایسین آزاد و لیپوزومال

منحنی رشد لیستریا منوسیتوژنز در حضور نایسین آزاد، لیپوزومال نایسین و عدم حضور آنها رسم شد. به این صورت که از کشت مایع میکروبی ۲۴-۱۸ ساعته (10^6 cfu/ml)، ۵۰ میلی لیتر به ارلن حاوی۴۵۰ میلی لیتر تریپتوز فسفات برات (TPB) تلقیح شد. پس از هم زدن ارلن ها اولین نمونه گیری به عنوان زمان صفر در نظر گرفته شده و پلیت های حاوی محیط کشت و باکتری در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

نمونه در فواصل زمانی صفر، ۲، ۵، ۹، ۱۴، ۱۹و ۲۴ ساعت ورتکس شد و در پلیت حاوی محیط اختصاصی لیستریا کشت گردید و منحنی رشد باکتری رسم شد.

اندازه گیری pH

pHنمونه ها توسط pHمتر مدل Metrohm 827 در زمان های ۲۰ ساعت پس از تولید، و پس از آن هر ۷ روز یکبار اندازه گیری گردید، و نتایج به صورت نمودار ثبت شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

کلیه آزمایش ها میکروبی و pH) در قالب طرح کاملا تصادفی بر پایه فاکتوریل در ۳ تکرار انجام گرفت. تیمارهای مورد بررسی عبارت بودند از دو فرمول مختلف فسفولیپیدی، یک نمونه نایسین آزاد و یک نمونه کنترل و زمان در ۵ سطح برای آزمایش های میکروبی و ۴ سطح برای اندازه گیری pH . برای انجام محاسبات آماری و رسم نمودارها از نرم افزارهای Minitab، Slide Write و Excel استفاده گردید.

نتایج و بحث

راندمان میزان محصورسازی لیپوزوم ها

جهت اندازه گیری میزان نایسین محصور شده در لیپوزوم از روش BCA[1] استفاده شد و برای آماده سازی نمونه ها در این روش، سه مرحله پیاپی میکروسانتریفیوژ با rpm۱۴۰۰۰ و زمان ۱۵ دقیقه صورت پذیرفت. میزان محصورسازی نانوکپسول های لیپوزومی حاوی نایسین، برای فرمول ۱ لیپوزومی ۱۲/۴۹٪ و برای فرمول ۲ لیپوزومی ۱۱/۷۲٪ محاسبه گردید. در پژوهشی که توسط بنچ و همکاران (۲۰۰۲، ۲۰۰۳) بر روی میکروکپسولاسیون نایسین صورت پذیرفت و در آن برای تهیه لیپوزوم ها از فسفاتیدیل کولین خالص استفاده شد، درصد انکپسولاسیون در فرمول های مختلف لیپوزومی در حدود ۳۰٪ گزارش شد. این احتمال وجود دارد که تفاوت در درصد انکپسولاسیون ناشی از نوع فسفاتیدیل کولین مورد استفاده در فرمولاسیون باشد. همچنین اندازه نانوکپسول های لیپوزومی نیز می تواند از طریق تاثیر شدیدتر نایسین بر دیواره تک لایه لیپوزومی عاملی در جهت کاهش درصد محصور سازی باشد.

1- Bicinchoninic acid

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه لیپوزوم ها

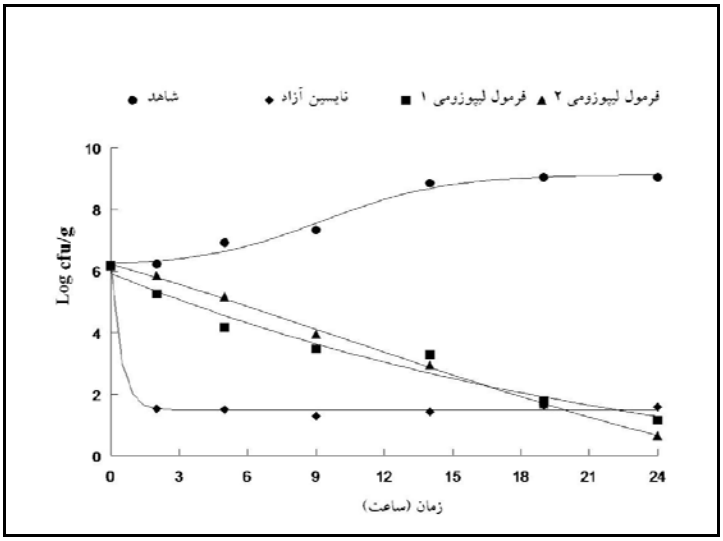
برای اندازه گیری ذرات از دستگاه PSA[1] مدل Mal1015189 استفاده گردید. نتایج حاصل از بررسی اندازه لیپوزوم ها نشان داد که ۱۰۰ درصد نمونه ها در هر دو فرمول، قطری در حدود ۱۵۰-۱۰۱ نانومتر داشته است و پس از محصورسازی تغییرات بسیار جزئی بود. نتایج حاصل از پژوهشی که توسط تیکسرا و همکاران (۲۰۰۸) بر روی نانوویزیکول های فسفولیپیدی حاوی ترکیبات شبه باکتریوسین، در ممانعت از رشد لیستریا منوسیتوژنز ATCC ۷۵۴۴ انجام پذیرفت، نشان داده شد که قطر متوسط نانوویزیکول ها پس از محصورسازی، از ۴۸۵ نانومتربه ۵۷۰ نانومتر افزایش یافت. این اختلاف در حدود ۱۰۰-۹۰ نانومتر گزارش گردید.

همانطور که در جدول۱ مشاهده می گردد، توزیع اندازه ذرات لیپوزومی فرمولاسیون یک و همچنین نانوویزیکول های حاوی نایسین در فرمول یک، به صورت کاملا یکنواخت بوده و قطر میانگین ذرات به ترتیب معادل ۱۴۹/۷ و ۱۴۲/۲ نانومتر بودند.

توزیع اندازه ذرات لیپوزومی در فرمولاسیون دو و نانوویزیکول های حاوی نایسین در فرمول دو، به صورت کاملا یکنواخت بود و ۱۰۰٪ ذرات قطر میانگینی به ترتیب معادل ۱۰۱/۵۱ و ۱۰۴/۲ نانومتر داشتند (جدول ۱).

جدول۱- میانگین قطر ذرات و درصد یکنواختی توزیع نانوویزیکول ها در فرمول یک و دو

نمونه	قطر میانگین (nm)	درصد یکنواختی توزیع (٪)
فرمولاسیون ۱	۱۴۹/۷±۰/۹	٪۱۰۰
فرمولاسیون ۲	۱۰۱/۵۱±۱/۵۹	٪۱۰۰
فرمولاسیون ۱حاوی نایسین	۱۴۲/۲±۰/۸	٪۱۰۰
فرمولاسیون ۲ حاوی نایسین	۱۰۴/۲±۲/۶	٪۱۰۰



شکل۱- نمودار رشد لیستریا منوسیتوژنز در محیط TPB تحت تیمارهای نایسین آزاد، فرمول لیپوزومی ۱و ۲.

حداقل غلظت بازدارندگی نایسین

حداقل غلظت بازدارندگی نایسین در برابر جمعیت لیستریایی IU/g ۵۰۰ محاسبه گردید. بنچ و همکاران (۲۰۰۲ و ۲۰۰۳) در پژوهشی بر روی تاثیر نایسین به صورت میکروکپسوله بر جمعیت لیستریایی و اثر باکتری آغازگر، این مقدار را در پنیر چدار و در برابر جمعیت 10^{6}-10^{5} cfu/g باکتری *Listeria innocua*، IU/g ۳۰۰ محاسبه نمودند.

تاثیر نایسین آزاد و لیپوزومال بر جمعیت لیستریایی در محیط TPB

شکل۱، نمودار رشد لیستریا منوسیتوژنز را در محیط TPB تحت تیمارهای نایسین آزاد، فرمول لیپوزومی ۱و ۲ نشان می دهد.

همانطور که در شکل مشاهده می شود در نمونه شاهد، رشد لیستریا منوسیتوژنز در طی ۲۴ ساعت log ۲/۹ افزایش نشان داده است ومنحنی رشد مراحل معمول خود را طی کرده است. در تیمار نایسین آزاد، جمعیت لیستریایی طی ۲ ساعت اولیه پس از تلقیح به

1- Particle size analyzer

www.SID.ir

Archive of SID

شدت کاهش یافته و پس از آن نسبتا ثابت مانده است و این کاهش در حدودlog ۴/۶ است. در تیمار فرمول یک لیپوزومی نایسین، روند خطی کاهش مشاهده گردید، که میزان این کاهش log ۵/۰ بود، اما تفاوت آن با تیمار نایسین آزاد در نحوه روند کاهش بود، زیرا که در فرمول لیپوزومی یک روند کاهش به صورت خطی ومداوم بود. در تیمار فرمول دو لیپوزومی نایسین، نیز روند کاهشی خطی مشاهده گردید، که میزان این کاهش log ۵/۵ بود. تفاوت مشاهده گردیده در روند کاهش جمعیت لیستریایی در تیمار نایسین آزاد و دو فرمول لیپوزومی حاوی نایسین، مربوط به رهایش کنترل شده لیپوزوم ها در طی زمان می باشد. مطابق نمودار سرعت رهایش نایسین از فرمول لیپوزومی یک تا حدود ساعت شانزدهم سریع تر از فرمول لیپوزومی دو بوده و پس از آن تا ۲۴ ساعت نرخ کاهش در دو فرمول عکس این حالت می گردد.

از لحاظ آماری تیمارها دو به دو توسط آزمون t-student آزمون گردیدند، نتایج نشان داد که میان تک تک تیمارها با نمونه شاهد تفاوت معنی داری وجود داشت. همچنین تفاوت بین تیمار نایسین آزاد با دو فرمول لیپوزومی نیز معنی دار بود. با این وجود نتایج آزمون بین دو نمونه فرمول لیپوزومی معنی دار نبود.

با توجه به شیب نمودار نیز مشهود است که فرمول دو تا حدی روند نزولی شدیدتری را طی می نماید. احتمال می رود که این امر به علت سرعت رهایش کنترل شده تر نایسین از فرمول دوم، میزان نایسین بیشتری امکان فعالیت تا انتهای ۲۴ ساعت را داشته باشد.

در نتایج حاصل از پژوهشی که توسط تیکسرا و همکاران ۲۰۰۸ بر روی نانوویزیکول های فسفولیپیدی حاوی ترکیبات شبه باکتریوسین، در ممانعت از رشد لیستریا منوسیتوژنز ATCC ۷۵۴۴ در جمعیتی معادل 10^{7} cfu/mlانجام گردید، نیز نتایج مشابهی در ارتباط با به کارگیری شبه باکتریوسین به صورت آزاد در ۱۰-۵ دقیقه اول گزارش گردید. همچنین نانوویزیکول حاوی شبه باکتریوسین نیز با اندکی فاصله زمانی نسبت به نمونه آزاد، عملکرد مشابهی نشان داده و سبب کاهش جمعیت لیستریایی تا log ۷ گردیدند.

شکل۲- نمودار رشد جمعیت لیستریا منوسیتوژنز طی دوره نگهداری پنیر.

تاثیر تیمارها بر تغییرات جمعیت لیستریا منوسیتوژنز طی زمان طی دوره نگهداری پنیر

در شکل ۲ رشد لیستریا منوسیتوژنز در طی دوره نگهداری پنیر مشاهده می گردد. مطابق نمودار، جمعیت لیستریایی در نمونه فاقد ترکیب نایسین، پس از ۲۰ ساعت و تکمیل عمل آغازگرها و کاهش pH از ۶/۴ به ۴/۹۶، کاهشی در حدود log ۰/۹ داشته است. در هفته اول نگهداری، روند نزولی با log ۰/۳ کاهش، ادامه یافت و پس از آن ثابت ماند. در انتهای هفته چهارم، جمعیت لیستریایی به cfu/ml 10^{4}*۵/۵ می رسد. مطابق پژوهش های صورت پذیرفته، اهمیت نقش pH و میزان اسید لاکتیک تولیدی توسط آغازگرها در ممانعت کنندگی از رشد لیستریا منوسیتوژنز در پنیر های فتا و کاتیج به اثبات رسیده است وگزارش گردیده است که کاهشpH تا زیر ۴/۶ رشد را متوقف می نماید (Le Marc et al, 2002).

در تیمار نایسین آزاد، پس از گذشت ۲۰ ساعت از زمان تلقیح، جمعیت لیستریایی log ۱/۵ کاهش داشته است. اما نتایج در هفته اول، نسبت به ۲۰ ساعت اولیه پس از تلقیح و افزودن نایسین مجددا رشدی در حدودlog ۰/۴۳ را نشان می دهد. که نسبت به زمان تولید log ۱/۰۴ کاهش یافته است. پس از این مرحله و در هفته های دوم، سوم و چهارم نگهداری پنیر روند ثابتی مشاهده می شود، که در این مدت pH نمونه نیز تا حد ۰/۵ کاهش می یابد (شکل۲).

این نتیجه مرتبط با تاثیر منفی نایسین آزاد بر آغازگرها، عدم تولید اسید لاکتیک به اندازه کافی و نهایتا عدم کاهش pH در

www.SID.ir

Archive of SID

محدوده بهینه و مهیا بودن pH مطلوب برای رشد لیستریا مـی باشـد. همچنین مطالعات پژوهشگران نشان می دهد، عدم کاهش pH سبب کاهش فعالیت نایسین می گردد (Bouttefroy et al, 2000)که مـی تواند در نتیجه کاهش حلالیت و پایداری نایسـین (Liu et al, 1990) و کاهش بار خالص مثبت نایسین باشد (Bouksaim et al, 2000).

همچنین این احتمال نیـز وجـود دارد کـه در اثـر تـاثیر ناگهـانی نایسین بر جمعیت لیستریایی، رشد مجدد تـا حـدی در نتیجـه حضـور سلول های مقاوم بـه نایسـین باشـد. مطـابق نتـایج تعـداد زیـادی از پژوهشگران رشد مجدد لیستریا پـس از اعمـال تیمـار بـا نایسـین، در نتیجه حضور سلول هـای مقـاوم بـه نایسـین اسـت (Harris et al, 1991، Muriana, 1996، De Martinis et al, 1997).

علاوه بر نکاتی که عنوان گردید، در اضـافه نمـودن نایسـین بـه صورت آزاد، فعالیت ضد لیستریائی نایسـین، پـس از مـدتی بـه دلیـل واکنش های تجزیه ای آنزیمی با ترکیبات ماده غذایی و در اثر ایجـاد اتصال با ترکیبات دیگر موجود در محیط کاهش نشـان مـی دهـد. در پژوهشی که بر روی فعالیت ضد لیستریائی نایسین آزاد و محصـور در نانوویزیکول ها در غلظت IU/ml ۴۰۰ و جمعیت لیستریا منوسـیتوژنز در غلظتی برابر با 10^{7} cfu/ml صورت پذیرفت، فعالیـت نایسـین آزاد اضافه شده به محیط مایع پس از گذشت ۲۱ روز نگهداری در دمای ۴ درجه، به شدت کاهش یافت و به ۱۰٪ میزان اولیه رسید (Demel et al, 1996).

در پژوهشی مشابه در پنیر چدار، با تلقیح *Listeria innocua* بـا جمعیتی در حدود cfu/g 10^{6}–10^{5} و غلظت نایسـین IU/g ۳۰۰، بـه صورت آزاد و میکروکپسوله، پس از شش ماه نگهداری پنیـر، فعالیـت نایسین در فرم آزاد تا ۱۲٪ کاهش یافت، و جمعیـت لیسـتریایی در ۲ ماه اول log ۱/۵ ، و پس از شش ماه تنهـا log ۲ کـاهش نشـان داد (Benech et al, 2003، Benech et al, 2002، Benech et al, 2002a).

براساس نتایج مطالعات صورت پذیرفته بر توزیع نایسین در بافـت پنیر, بخش اعظم نایسین در فرم آزاد به طور یکنواخت در بافـت پنیـر پخش و توزیع نمی‌گردد (Laridi et al, 2003 ،Roberts, 1991).

در فرمول ۱ لیپوزومی، در ۲۰ ساعت اول پس از تولید,log ۲/۵۷ کاهش در تعداد لیستریا منوسیتوژنز مشاهده گردید (شکل۲). روند این کاهش در هفته اول تا چهارم بـه ترتیـب ۰/۲۱، ۰/۲۵، ۰/۶۱ و ۰/۳۱ در مقیاس لگاریتمی بود. در مورد فرمول ۲ لیپوزومی نیـز رونـد نسـبتا مشابهی دیده شد. به این صورت که در ۲۰ ساعت اولیه پس از تولید، log۲/۷۸ کاهش در تعداد لیستریا منوسیتوژنز مشـاهده گردیـد. رونـد این کاهش در هفته اول تـا چهـارم بـه ترتیـب ۰/۴۳، ۰/۱۲، ۰/۲۰ و ۰/۲۴ در مقیاس لگاریتمی بود. در مقایسه این دو فرمول نانوکپسـوله نایسین، می توان گفت که فرمول ۲ در ابتـدا بـا شـدتی کمـی بیشـتر رهایش را آغاز کرده و در ادامه با مقدار نسبتا ثـابتی رونـد رهـایش را ادامه داده است. به طور کلی، در انتهای دوره نگهداری، تیمارهـای ۱و ۲ به ترتیب باعث کاهش لگاریتمی برابر بـا ۴/۰۰ و ۳/۷۳ در جمعیـت لیستریایی گردیده اند. این نتیجه در اثر نقش حفاظتی نانوکپسـول هـا بر روی نایسین و جلوگیری از واکـنش بـا سـایر ترکیبـات موجـود در محیط در طی زمان، و در نتیجه ممانعت از کاهش فعالیـت، همچنـین تاثیر بر آغازگرها و ایجاد تداخل در کاهش pH بـه صـورت طبیعـی، حاصل گردید.

به لحـاظ آمـاری، اثـر تیمـار نایسـین آزاد و نایسـین محصـور در نانوکپسول های لیپوزومی کاملا معنی دار می باشد ($p<0.01$).

در پژوهشی که بنچ و همکاران بر روی پنیـر چـدار و بـا تلقـیح *Listeria innocua*بـا جمعیتـی در حـدود cfu/g10^{6}–10^{5} و غلظـت نایسین IU/g ۳۰۰، به صورت آزاد و میکروکپسوله انجام دادند، پس از شش ماه نگهداری پنیر، فعالیت نایسین به فرم میکروکپسوله تـا ۹۰٪ حفظ شده بود و جمعیت نهایی پس از شش ماه به cfu/ml ۱۰ رسید. همچنین پس از گذشت ۲ ماه، کاهش جمعیت لیسـتریایی در مقیـاس لگـاریتمی برابـر ۳ بـود (Benech et al, 2003، Benech et al, 2002، Benech et al, 2002a).

در پژوهشی دیگر که بر روی فعالیت آنتی لیستریائی نایسـین آزاد و محصور در نـانوویزیکول هـا در غلظـت IU/ml ۴۰۰ و جمعیـت لیستریا منوسیتوژنز با غلظتی برابرcfu/ml10^{7} صورت پذیرفت، نتـایج مشابهی به دست آمد، فعالیت نایسین محصور در نانو ویزیکـول هـای اضافه شده به محیط مایع پس از گذشت ۲۸ روز نگهداری در دمای ۴ درجه، ۹۰٪ میزان اولیه بود (Teixeira et al, 2008).

تـاثیر تیمارهـا بـر رونـدتغییرات pH در طـی زمـان نگهداری

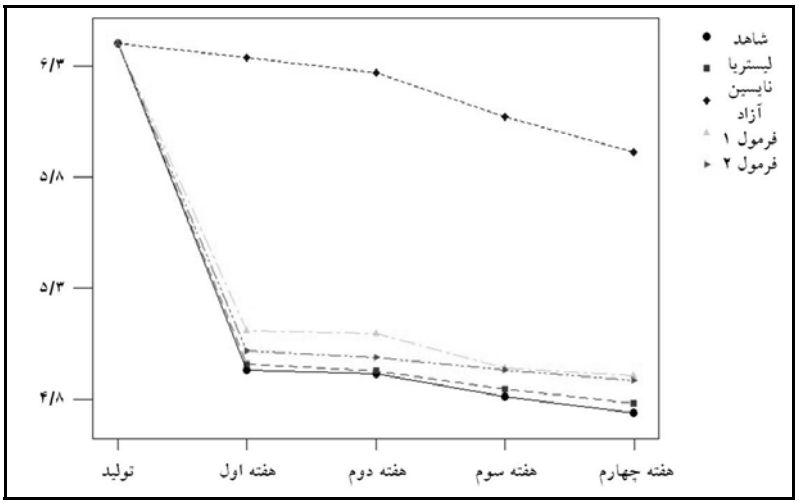
در شکل ۳ تغییرات pH در طـی زمـان نگهـداری مشـاهده مـی گردد. با توجه به نمودار، pH در ابتدای تولید ۶/۴ بـوده اسـت، کـه در نمونه شاهد در اثر فعالیت باکتری های آغـازگر در هفتـه اول پـس از تولید، به ۴/۹۳ و در هفته های بعد به ترتیب ۴/۹۲، ۴/۸۱، و در انتهـا به ۴/۷۴ رسید.روند تغییراتpH در نمونه پنیر حـاوی لیسـتریا نیـز در هفته های پس از تولید مشابه و به ترتیب ۴/۹۶، ۴/۹۳، ۴/۸۵ و ۴/۷۸ بود، که تفاوت معنی داری با نمونه شاهد مشاهده نشد.

در دو تیمار نایسین محصور در نانوکپسول های لیپـوزومی، رونـد تغییرات pH به ترتیب برای فرمول ۱ و ۲ طی هفته اول ۵/۱۱، ۵/۰۲، در هفته دوم ۵/۱۰، ۴/۹۹، هفته سوم ۴/۹۴، ۴/۹۳ و در هفتـه چهـارم پس از تولید ۴/۹۱، ۴/۸۹ بود. نتایج دو فرمول اختلاف معنی داری بـا هم و با شاهد ندارند. دو فرمول در دو هفتـه اول تفـاوتی در حـد ۰/۱ داشته و پس از آن تفاوت به کمتر از این مقدار مـی رسـد. در مقایسـه با شاهد دامنه pH در حدود ۰/۱–۰/۲ بالاتر است، که می تواند در اثر

www.SID.ir

Archive of SID

رهایش جزئی نایسین از نانوکپسول ها قبل از تکمیل مرحله تولید اسید لاکتیک توسط باکتری های آغازگر باشد. در ارتباط با تیمار نایسین آزاد، تفاوت معنی داری در تمام هفته های نگهداری پس از تولید مشاهده شد ($p<0.01$). مقادیر pH در این تیمار به ترتیب زمان برابر با ۶/۳۴، ۶/۲۷، ۶/۰۷ و ۵/۹۱ بود. با توجه به بالا بودن pH در تمام هفته های نگهداری نسبت به نمونه شاهد، به ترتیب در هفته اول ۱/۴۱، هفته دوم ۱/۳۵، هفته سوم ۱/۲۶ و هفته چهارم ۱/۱۷ می توان نتیجه گرفت که نایسین آزاد بر عملکرد باکتری های آغازگر تاثیر منفی گذاشته است و از آنجاکه مطابق استاندارد ویژگیهای پنیر فتای فراپالایش موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، pH نهایی پنیر در دامنه ۴/۶ تا۴/۹ قابل قبول می باشد، pH در انتهای نگهداری در این تیمار در محدوده استاندارد نمی باشد. جدول ۲، نتایج آنالیز واریانس را نشان می دهد.



شکل۳- تغییرات pH طی مدت زمان نگهداری پنیر.

جدول۲- جدول نتایج آنالیز واریانس

تیمار	pH		cfu/g	
	df	MS	df	MS
تیمار	٤	۲/۹۰۷**	۳	۲/۳۵۹ E+۱۱**
زمان	٤	٤/٦٧٦**	٥	۳/۹٥۷ E+۱۲**
تیمار*زمان	١٦	۰/۱۸۸**	١٥	۳/٦٥۲ E+۱۰**
خطا	٥۰	۰/۰۰۱	٤٨	۱/۳۸۹ E+٦**
کل	٧٤	-	٧١	-

** معنی دار در سطح احتمال ۱٪

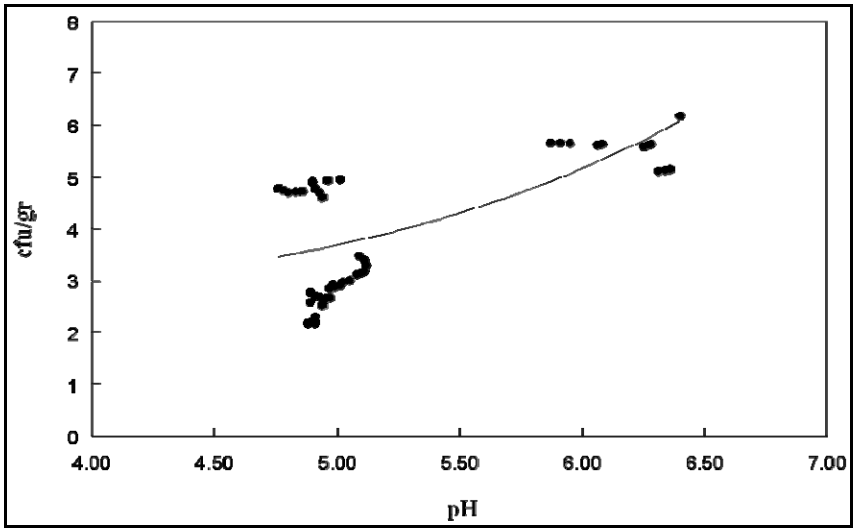
نتایج پژوهش بنچ و همکاران بر روی پنیر چدار نیز این نکته را تایید می کند که انکپسولاسیون نایسین مانع از تاثیر منفی آن بر باکتری های آغازگر و تولید اسید در پنیر چدار گردیده و pH در حد مطلوب و بهینه حفظ شده است (Benech et al, 2003، Benech et al, 2002a). تاثیر منفی نایسین به صورت آزاد طی فرایند های تخمیری بر باکتری های آغازگر، در مقایسه با نایسین انکپسوله توسط دیگر پژوهشگران نیز تایید شده است (Dean et al, 1996).

تاثیر pH بر جمعیت لیستریا منوسیتوژنز

در شکل۴ تاثیر pH بر رشد لیستریا منوسیتوژنز مشاهده می گردد. با توجه به شکل، مطابق انتظار با کاهش pH از ۶/۴ تا ۴/۷ و خروج از دامنه مطلوب رشد باکتری، رشد کاهش می یابد. همچنین با کاهش pH میزان حلالیت و پایداری نایسین (Liu et al, 1990)، و فعالیت آن افزایش نشان می دهد (Bouttefroy et al, 2000, Singh et al, 2001)، علاوه بر این با توجه به ساختار مولکولی نایسین، بار مثبت آن افزایش می یابد (Jack et al, 1995)، که در نتیجه با در نظر گرفتن بار الکتریکی خنثی تا منفی فرمول های لیپوزومی، برهم کنش ها برای رهایش بیشتر خواهد شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل٤-نمودار تاثیر pH برجمعیت لیستریا منوسیتوژنز.

نتیجه گیری

در پژوهشی که انجام شد معلوم گردید که اثر افزایش نایسین در پنیر فتای فراپالایش حاوی جمعیت میکروبی لیستریا منوسایتوژنز، در مقایسه با افزودن این ترکیب آنتی باکتریال به صورت نانوکپسوله در فرمول های لیپوزومی در طی مدت زمان نگهداری یک ماهه، تاثیر معناداری بر روند کاهش جمعیت لیستریایی داشته، به طوریکه اختلاف نهایی در جمعیت لیستریا منوسایتونز در نمونه نایسین آزاد نسبت به فرمول های لیپوزومی ۱ و۲ در پایان چهار هفته به ترتیب برابر با ۳/۵ و ۳/۲ log بود و این روند نشانگر تاثیر حفاظتی نانوکپسول های لیپوزومی بر نایسن و تضمین پایداری آن در طول نگهداری، جلوگیری از واکنش با سایر ترکیبات موجود در محیط در طی زمان، و در نتیجه ممانعت از کاهش فعالیت و همچنین تاثیر بر آغازگرها و ایجاد تداخل در کاهش pH به صورت طبیعی، بود.

همچنین تاثیر افزایش نایسین در پنیر فتای فراپالایش حاوی جمعیت میکروبی لیستریا منوسایتوژنز، در مقایسه با افزودن این ترکیب آنتی باکتریال به صورت نانوکپسوله در فرمول های لیپوزومی در طی مدت زمان نگهداری بر نحوه تغییرات pH در طی مدت زمان نگهداری نیز معنادار بود. این روند در نمونه کنترل و نمونه های لیپوزومی، روند نسبتا مشابهی را طی کرد، که در پایان نیز در محدوده pHاستاندارد فراورده نهایی قرار داشت. اما در نمونه نایسن آزاد pH نهایی خارج از دامنه استاندارد بود و نایسین آزاد بر روی عملکرد باکتری های آغازگر تاثیر منفی گذاشته بود. عدم کاهش pH تا حد مطلوب، سبب تاثیر منفی مضاعف و در نتیجه رشد بهتر جمعیت لیستریایی گردید. همچنین این pH بالا تا حدی، سبب جذب آب مجدد در پنیر گشت و بافت را نیز دستخوش تغییر نمود.

منابع

نصر، الف.، ر. کسری کرمانشاهی و الف. نحوی.۱۳۸۶. بررسی تاثیر اسیدهای آلی و نایسین در غلظت‌های کمتر از مهار کننده بر رشد سویه باسیلوس سرئوس جدا شده از پنیر. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. سال دوم. شماره ۱. صفحات ۳۰- ۲۱..

Benech, R.-O., E. E. Kheadr, C. Lacroix, and I. Fliss. 2002. Antibacterial Activities of Nisin Z Encapsulated in Liposomes or Produced In Situ by Mixed Culture during Cheddar Cheese Ripening. Applied and Environmental Microbiology, 68(11), 5607–5619.

Benech, R.-O., E. E. Kheadr, C. Lacroix, and I. Fliss. 2003. Impact of Nisin roducing Culture and Liposome-encapsulated Nisin on Ripening of Lactobacillus added-Cheddar Cheese. Journal of Dairy Sciences. 86, 1895–1909.

Benech, R.-O., E. E. Kheadr, R. Laridi, C. Lacroix, and I. Fliss. 2002. Inhibition of Listeria innocua in Cheddar Cheese by Addition of Nisin Z in Liposomes or by In Situ Production in Mixed Culture. Applied and Environmental Microbiology, 68(8), 3683–3690.

Bouksaim, M., C. Lacroix, P. Audet, and R. E. Simard. 2000. Effects of mixed starter composition on nisin Z production by Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis UL 719 during production and ripening of Gouda cheese. International Journal of Food Microbiology, 59, 141–156.

Bouttefroy , A., J. B. Milliere, 2000, Nisin–curvaticin 13 combinations for avoiding the regrowth of bacteriocin

www.SID.ir

Archive of SID

resistant cells of Listeria monocytogenes ATCC 15313. International Journal of Food Microbiology, 62, 65–75.
Davidson, P.M., J. N. Sofos, and , A. L. Branen. 2003. Antimicrobials in Food. 3rd edition.CRC Press.
Dean, J.P., E. A. Zottola. 1996. Use of nisin in ice cream and effect on the survival of Listeria monocytogenes. Journal of Food Protection, 59(5), 476-480.
Demel, R. A., T. Peelen, R. J. Siezen, B. De Kruijff, and O. P. Kuipers.1996. Nisin Z, mutant nisin Z and lacticin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity. European Journal of Biochemistry. 235, 267–274.
Degnan,A. J., J. B. Luchansky. 1992. Influence of beef tallow and muscle on the antilisterial activity of pediocin AcH and liposome encapsulated pediocin AcH. Journal of Food Protection, 55, 552–554 .
De Martinis, E.C.P., Crandall, A.D., Mazzotta, A.S., Montville, T.J., 1997. Influence of pH, salt, and temperature on nisin resistance in Listeria monocytogenes. Journal of Food Protection. 60, 420–423.
El Jastimi, R., M. Lafleur. 1997. Structural characterization of free and membrane-bound nisin by infrared spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta, 1324,151–158.
El Jastimi, R., M. Lafleur, and K. Edwards. 1999. Characterization of permeability and morphological perturbations induced by nisin on phosphatidylcholine membranes. Biophysical Journal, 77, 842–852.
Harris, L.J., Fleming, H.P., Klaenhammer, T.R., 1991. Sensitivity and resistance of Listeria monocytogenes ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to nisin. Journal of Food Protection. 54, 836–840.
Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B., 1995. Bacteriocins of gram- positive bacteria. Microbiology Reviews. 59, 171–200.
Jung, D.-S., F. W. Bodyfelt, and M. A. Daeschel. 1992. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting Listeria monocytogenes in fluid milk. Journal of Dairy Science, 75, 387–393.
Kordel, M., and H. G. Sahl. 1986. Susceptibility of bacterial eucaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep5 and nisin. FEMS Microbiology Letters, 34, 139–144.
Laridi, R., E.E. Kheadra, R.-O. Benech, J.C, Vuillemard, C. Lacroixa and I. Fliss. 2003. Liposome encapsulated nisin Z: optimization,stability and release during milk fermentation. International Dairy Journal, 13, 325–336.
Le Marc., Y, Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P., Thuault, D., 2002. Modelling the growth kinetics of Listeria as a function of temperature, pH and organic acid concentration. International Journal of Food Microbiology. 73, 219– 237.
Liu, W., Hansen, J.N., 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by Lacctococcus lactis. Applied Environmental Microbiology. 56, 2551–2558.
Mattick, A. T., and A. Hirsch. 1956. Manufacture and preservation of cheese. U.S. patent, 2, 744,827.
Mazzotta, A. S., A. D. Crandall, and T. J. Montville. 1997. Nisin resistance in Clostridium botulinum spores and vegetative cells. Applied Environmental Microbiology, 63, 2654–2659.
Muriana, P.M., 1996. Bacteriocins for control of Listeria spp. In food. Journal of Food Protection. Supplementary, 59, 54–63.
Roberts, R. F. 1991. Development of a nisin-producing starter culture for use in Cheddar cheese manufacture to inhibit spoilage in high-moisture pasteurized process cheese spreads. Ph.D. Thesis,University of Minnesota,Minneapolis,MN.
Rodriguez, J. M. 1996. Antimicrobial spectrum, structure, properties and mode of action of nisin, a bacteriocin produced by Lactococcus lactis. Int. Journal of Food Science and Technology, 2, 61–68.
Singh, M.B., B. Falahee and M.R. Adams. 2001. Synergistic inhibition of Listeria monocytogenes by nisin and garlic extract. Food Microbiology, 18, 133-139.
Stevens, K. A., B. W. Sheldon, N. A. Klapes, and T. R. Klaenhammer. 1991. Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other gram-negative bacteria. Applied Environmental Microbiology, 57, 3613–3615.
Tamime, A. Y., R. K. Robinson. 1991. Feta & Related Cheeses. WP.
Teixeira., M. L. J. dos Santos, N. P. Silveira, A. Brandelli.2008. Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of Listeria monocytogenes. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 9, 49–53.

www.SID.ir

Archive of SID

Antibacterial Effect of Nano-Encapsulated Nisin in Liposoms In Contrast to Free Nisin in Control of *Listeria monocytogenes* in Iranian Feta Cheese (UF)

E. Zaerzadeh [1*]- S.A. Mortazavi [2]- M.R. Jafari [3]- S. Afsharnejad[4]- F. Tabatabaii[5]- M. Nassiri Mahallati [6]

Received: 22-10-2009
Accepted: 02-05-2011

Abstract

The objective of this study was evaluating the effectiveness of encapsulated nisin in liposoms in contrast to free nisin in control of *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 in Feta cheese during its ripening. The size of the nano-encapsules with nisin was around 103-150 nm and of the nano-encapsules without nisin was of approximately 101-143 nm. Addition of 500IU/g nisin to cheese resulted into 0.57, 4 and 3.7 log reduction in viable cells, respectively in free nisin, nano-encapsulated nisin (formulation 1) and nano-encapsulated nisin (formulation 2) at the end of four weeks ripening. In addition, changes in pH during this period of time was also affected by the form of addition of nisin, it was significantly different from liposomal nisin formulations($p<0.01$). Since the free nisin had negative effect on starters, pH of this treatment could not achieve the standard range of pH determined for feta cheese and deficiencies in quality was observed.

Keywords: Feta, Listeria, Nisin, Nano-Encapsulation

1- Former MSc Student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad.
(*- Corresponding author Email: e_zaerzadeh@yahoo.com)
2&5- Prof. and Assistant Prof., Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad.
3- Prof, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences.
4- Assistant Prof, Medical Faculty, Islamic Azad University of Mashhad.
6- Professor, Department of Agronomy, Ferdowsi University of Mashhad.

www.SID.ir