Archive of SID

Journal of Food Hygiene, Vol. 10, No. 40, Winter 2021

"Research article" DOI: 10.30495/JFH.2021.1916560.1297

Inhibitory effect of nisin-producing *Lactococcus lactis* on survival of *Listeria monocytogenes* strains in ultra-filtered white cheese

Hamidi, S.R.[1], Hanifian, S.[2*]

1. MSc Graduate of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: hanifian@iaut.ac.ir
(Received: 2020/12/1 Accepted: 2021/1/4)

Abstract

Listeria monocytogenes (*Lm*) is an important foodborne pathogen that is of great importance in milk and its products. Despite the measures taken to eliminate and control *Lm* contamination in pasteurized milk products, but due to its high spread in the environment, there is a possibility of secondary contamination in products such as Ultra-filtered (UF) white cheese. This study aimed to investigate the inhibitory effect of nisin-producing *Lactococcus lactis* on *Lm* in Ultra-filtered white cheese. Ultra-filtrated and pasteurized cow's milk was inoculated with 3 Log CFU/g of standard or native strains of *Lm* and control and treatment (containing nisin-producing *L. lactis*) cheese samples were manufactured. Changes in the population of *Lm* and nisin concentration were estimated throughout the storage period. According to the results, in all groups, the population of *Lm* began to decrease from day five onwards. Nonetheless, the decreasing trend in the treatment samples and in parallel with the production of nisin was significant ($P< 0.01$). The native strain of *Lm* was significantly ($P< 0.01$) more resistant than the standard one. Since the nisin-producing *L. lactis*, despite inhibiting *Lm*, did not negatively affect the growth of starter bacteria and the resulting pH decline of the cheese samples. Consequently, nisin-producing *L. lactis* can be used to control some bacterial contamination of the UF white cheese. It is also necessary to study the behavior of native strains isolated from food samples along with laboratory strains in inoculation studies.

Conflict of Interest: None declared.

Keywords: Inoculation study, Lactic acid bacteria, Nisin, *hlyA*

www.SID.ir

Archive of SID

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2021.1916560.1297

اثر مهاری *لاکتوکوکوس لاکتیس* مولد نایسین بر سویه‌های *لیستریا مونوسایتوجنز* در پنیر سفید فراپالایشی

سیده رعنا حمیدی[۱]، شهرام حنیفیان[۲*]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
۲. گروه علوم و صنایع غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: hanifian@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۹/۹/۱۱ پذیرش نهایی: ۹۹/۱۰/۱۵)

چکیده

لیستریا مونوسایتوجنز یک باکتری بیماری‌زای غذایی است که از اهمیت بالایی در بهداشت شیر و فرآورده‌های آن برخوردار است. به‌رغم اقداماتی که با هدف از بین بردن یا کنترل آلودگی با *لیستریا مونوسایتوجنز* در محصولات پاستوریزه شیر انجام گرفته است، اما به‌دلیل پراکندگی زیاد آن در محیط، امکان بروز آلودگی ثانویه در محصولاتی نظیر پنیر سفید فراپالایشی وجود دارد. هدف این مطالعه، بررسی اثر مهاری *لاکتوکوس لاکتیس* مولد نایسین بر *لیستریا مونوسایتوجنز* در پنیر سفید فراپالایشی است. شیر فراپالایش شده و پاستوریزه گاوی با Log ۳ CFU/g از سویه‌های استاندارد یا بومی *لیستریا مونوسایتوجنز* تلقیح گردید و نمونه‌های پنیر شاهد و تیمار (حاوی *لاکتوکوس لاکتیس* مولد نایسین) تهیه شدند. تغییرات جمعیت *لیستریا مونوسایتوجنز* و غلظت نایسین طی دوره نگه‌داری پنیر فراپالایشی اندازه‌گیری شد. طبق نتایج مطالعه، در تمامی گروه‌ها کاهش جمعیت *لیستریا مونوسایتوجنز* از روز ۵ به بعد آغاز گردید اما این کاهش صرفاً در نمونه‌های حاوی *لاکتوکوکوس لاکتیس* و به موازات تولید نایسین معنادار (P< ۰/۰۱) بود. سویه بومی *لیستریا مونوسایتوجنز* به‌صورت معناداری (P< ۰/۰۱) مقاومت بیشتری نسبت به سویه استاندارد نشان داد. *لاکتوکوس لاکتیس* مولد نایسین به‌رغم مهار *لیستریا مونوسایتوجنز*، تأثیر منفی بر رشد باکتری‌های آغازگر لاکتیکی و pH نمونه‌های پنیر نداشت، لذا می‌توان از سویه‌های مولد نایسین برای کنترل برخی از آلودگی‌های باکتریایی در پنیر سفید فراپالایشی بهره برد. هم‌چنین لازم است در مطالعات تلقیحی رفتار سویه‌های بومی جدا شده از نمونه‌های غذایی در کنار سویه‌های آزمایشگاهی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: مطالعه تلقیحی، باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک، نایسین، ژن *hlyA*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

لیستریا مونوسایتوجنز باسیل کوتاه گرم مثبت، کاتالاز مثبت، متحرک و فاقد اسپور است. این باکتری گسترش وسیعی در طبیعت دارد و معمولاً از بسیاری از مواد غذایی خام و فرآوری شده نظیر شیر و محصولات آن، فرآورده‌های گوشتی، محصولات دریایی و سبزیجات جداسازی شده است. توانایی رشد لیستریا در دماهای پایین موجب تکثیر آن در مواد غذایی نگه‌داری شده در یخچال می‌گردد (Pietrysiak *et al*., 2019). به‌علاوه، ویژگی‌هایی مانند پراکندگی گسترده و تحمل به تنش‌های محیطی، این باکتری را به‌عنوان یک بیماری‌زای مهم در صنایع غذایی مطرح نموده است. *لیستریا مونوسایتوجنز* عامل لیستریوزیس (Listeriosis) در انسان است و عوارض متعددی از جمله سپتی‌سمی، منتژیت و مننگوآنسفالیت را در افراد با سیستم ایمنی ضعیف ایجاد می‌کند (Matereke and Okoh, 2020). *لیستریا مونوسایتوجنز* نسبت به حرارت حساس است و در اثر پاستوریزاسیون سریعاً از بین می‌رود. با این وجود، آلودگی ثانویه در محصولات غذایی متعاقب پاستوریزاسیون، بسیار محتمل است (Koch *et al*., 2010).

در مطالعات مختلف آلودگی شیر خام و محصولات پاستوریزه با *لیستریا مونوسایتوجنز* مورد بررسی قرار گرفته است. این باکتری از شیر خام (Castro *et al*., 2017; Zafar *et al*., 2020)، شیر پاستوریزه (Chen, *et al*., 2020)، شیر شکلاتی پاستوریزه (Hanson, *et al*., 2019) و پنیر (Churchill *et al*., 2019; Tirloni *et al*. 2020) جداسازی شده است. جداسازی *لیستریا مونوسایتوجنز* از فرآورده‌های تخمیری شیر و به‌ویژه انواع پنیر نشان‌دهنده تحمل بالای این باکتری به تغییرات pH (٤ تا ٩/٥) و غلظت‌های بالای نمک (تا ١٠ درصد) است. گستره دمایی وسیع این باکتری (١ تا ٤٥ درجه سلسیوس) امکان رشد آن را طی نگه‌داری پنیر در یخچال یا سردخانه فراهم می‌آورد (Liu *et al*., 2005). با در نظر گرفتن ویژگی‌های فوق، *لیستریا مونوسایتوجنز* یک مخاطره بهداشتی مهم در پنیر تلقی می‌گردد.

پنیر سفید فراپالایشی ایرانی (Iranian ultra-filtered white cheese) از شیر پاستوریزه (٧٢ درجه سلسیوس و ١٥ ثانیه) و فراپالایش شده گاوی با حداقل میزان ٣٤ درصد (وزنی-وزنی) ماده خشک و افزودن رنت و باکتری‌های آغازگر لاکتیکی مزوفیل تهیه می‌شود. حداقل نمک این پنیر ٢ درصد است که به‌صورت خشک به لخته اضافه می‌گردد (Hanifian and Jodeiri, 2013). پنیر سفید فراپالایشی پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ٢٧ درجه سلسیوس به‌مدت ١ روز و نگه‌داری در دمای ٨ درجه سلسیوس به‌مدت ١ هفته، به بازار عرضه می‌شود (Karami *et al*., 2008). نبود دوره رسیدن در این نوع پنیر، به آن شکلی که در بسیاری از پنیرهای سنتی وجود دارد، فرصت محدودی برای فعالیت باکتری‌های آغازگر فراهم می‌آورد. در نتیجه، فعالیت باکتری‌های لاکتیکی نمی‌تواند اثر آنتاگونیستی مؤثری علیه میکروب‌های بیماری‌زای غذایی ایجاد کند (Ahmadzadeh Nia and Hanifian, 2016). برای رفع این مشکل، در تحقیقات مختلف از روش‌های مکمل نظیر افزایش زمان گرمخانه‌گذاری و افزودن آغازگرهای الحاقی (Adjunct starter) و باکتریوسین‌ها (Bacteriocins) استفاده شده است (Malheiros *et al*., 2012). در بین باکتریوسین‌ها، نایسین (Nisin) بیش‌تر

www.SID.ir

Archive of SID

مورد توجه محققین واقع شده است. نایسین ترکیبی با ساختار پپتیدی مقاوم به حرارت و اسید است که توسط بعضی از گونه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* تولید می‌شود و قابلیت مهار برخی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی را دارد. مکانیسم اثر آن از طریق ایجاد منافذی در غشای سیتوپلاسمی و توقف گرادیان یون‌های حیاتی و در نتیجه اختلال در فرآیندهای بیوسنتزی در سلول‌های میکروبی می‌شود (Zhao *et al*., 2020). در حال حاضر در بیش از ۸۰ کشور از جمله آمریکا، کشورهای عضو اتحادیه اروپا، چین و استرالیا از نایسین به‌عنوان نگه‌دارنده غذایی استفاده می‌شود (Adams *et al*., 2003). با این وجود، طبق استاندارد ملی ایران به‌کارگیری هر گونه نگه‌دارنده به‌غیر از مقادیر محدود تنظیم کننده‌های اسیدی (از جمله اسید لاکتیک و اسید سیتریک) و کلرورسدیم در پنیر مجاز نیست (ISIRI, 2344-1/1993). هدف مطالعه حاضر، بررسی اثر افزودن *لاکتوکوکوس لاکتیس* مولد نایسین بر بقای سویه‌های استاندارد و بومی *لیستریا مونوسایتوجنز* در پنیر سفید فراپالایشی ایرانی است.

مواد و روش‌ها

- فعال‌سازی *لیستریا مونوسایتوجنز* و *لاکتوکوکوس لاکتیس*

سویه استاندارد *لیستریا مونوسایتوجنز* (ATCC 19115) از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. سویه بومی باکتری قبلاً از پنیرهای سنتی منطقه تبریز جداسازی (Kalantaripour and Hanifian, 2017) و توسط PCR با ردیابی ژن لیستریولیزین O (*hlyA*) تأیید شده بود. سویه‌های استاندارد و بومی *لیستریا مونوسایتوجنز* در محیط BHI براث (Merck, Germany) به‌مدت ۱۶ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس تجدید کشت شدند. برای محاسبه میزان تلقیح، کشت ۱۶ ساعته سویه‌ها سانتریفیوژ (g × ۴۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه) گردید و پس از دور ریختن مایع رویی، رسوب در ۱۰ میلی‌لیتر فسفات‌بافر نمکی استریل (pH = ۷/۴) به‌حالت سوسپانسیون درآمد (Abdollahi and Hanifian, 2015).

لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه *لاکتیس* (PTCC 1336) به‌صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های ایران «سازمان پژوهش‌های ملی و صنعتی ایران» (IROST, Iran) تهیه شد. باکتری لیوفیلیزه طبق دستورالعمل شرکت مربوطه در محیط تریپتیک سوی براث حاوی ۰/۳ درصد عصاره مخمر (Merck, Germany) کشت و به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. کشت ۲۴ ساعته *لاکتوکوکوس لاکتیس* با سانتریفیوژ (با شدت g × ۴۰۰۰ و مدت ۱۵ دقیقه) رسوب داده شد. سپس باکتری‌های رسوب یافته با ۳ میلی‌لیتر فسفات‌بافر نمکی استریل به‌حالت سوسپانسیون درآمد. سوسپانسیون تهیه شده برای تلقیح در رتنتیت (Retentate) مورد استفاده قرار گرفت.

- تهیه نمونه‌های پنیر و تلقیح باکتری

رتنتیت (ناتراوا) از کارخانه شیر پاستوریزه پگاه استان آذربایجان‌شرقی تأمین گردید. شیر خام با کیفیت مناسب، پس از عبور از دستگاه‌های پیش‌سردکن، کلاریفایر، باکتریوفوژ و خلاء، در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ ثانیه پاستوریزه شد. در قسمت

www.SID.ir

Archive of SID

اولترافیلتراسیون با عبور شیر پاستوریزه از صافی‌های غشایی لوله‌ای، آب، املاح و لاکتوز شیر جداسازی و ریتنتیت با فاکتور ۵/۱ کیلوگرم شیر به ۱ کیلوگرم ریتنتیت تهیه شد. پس از استانداردسازی چربی، ریتنتیت در دمای ۵۵ درجه سلسیوس هموژنیزه و در ۷۸ درجه سلسیوس به‌مدت یک دقیقه پاستوریزه گردید. در نهایت دمای ریتنتیت به ۳۷ درجه سلسیوس کاهش داده شد.

هر یک از سویه‌های استاندارد یا بومی *لیستریا مونوسایتوجنز* با تعداد تقریبی Log CFU/g ۳ و *لاکتوکوس لاکتیس* با تعداد تقریبی Log CFU/g ۸ در رتنتیت تلقیح شد. پس از انتقال مخلوط تهیه شده به ظروف استریل ۱۰۰ گرمی، کشت آغازگر مزوفیل و ترموفیل (FD-DVS FRC-65) طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark) به‌مقدار ۱۰۰ گرم به ازای ۵۰۰۰ کیلوگرم شیر فراپالایش شده، اضافه گردید. به‌همراه کشت آغازگر، رنت (Meito Sangyo, Tokyo, Japan) به‌مقدار ۰/۰۰۲ درصد (وزنی–وزنی) به مخلوط افزوده شد. برای انعقاد رتنتیت، ظروف حاوی پنیر به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. پس از قرار دادن کاغذ پارچمنت (Parchment paper) بر روی لخته، مقدار ۲ درصد (وزنی–وزنی) نمک گرانولی (استریل شده با حرارت خشک ۱۸۰ درجه سلسیوس و ۲ ساعت) روی کاغذ ریخته شد و ظروف درب‌بندی گردید. مطابق با روش تولید صنعتی پنیر سفید فراپالایشی، در مرحله گرمخانه‌گذاری، نمونه‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت در ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس به‌مدت ۲ ماه در دمای ۸ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند (Mohammadi and Jodeiri, 2013).

- طراحی مطالعه

مطابق با جدول (۱) شش نوع نمونه پنیر با در نظر گرفتن استفاده یا عدم استفاده از *لاکتوکوکوس لاکتیس* و هم‌چنین نوع سویه *لیستریا مونوسایتوجنز* تهیه شد. مطالعه سه بار و در طی روزهای مجزا تکرار گردید و از هر نوع پنیر به تعداد ۷ نمونه ساخته شد و طی مراحل زیر تحت آزمایش قرار گرفت:

۱. زمان تهیه نمونه‌های پنیر (روز صفر)؛

۲. بعد از گرمخانه‌گذاری در ۲۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲٤ ساعت (روز ۱)؛

۳. طی دوره نگه‌داری در ۸ درجه سلسیوس به‌مدت دو ماه (روزهای ۵، ۱۵، ۳۰، ٤۵ و ٦۰).

جدول (۱)- انواع پنیر فراپالایشی تولید شده با توجه به استفاده یا عدم استفاده از *لاکتوکوکوس لاکتیس* و سویه *لیستریا مونوسایتوجنز*

نوع پنیر†	*لاکتوکوکوس لاکتیس*	*سویه لیستریا مونوسایتوجنز*
C	-	-
L.C	+	-
C.S	-	S
C.N	-	N
L.S	+	S
L.N	+	N

† C، L، S و N: به‌ترتیب مخفف کنترل، *لاکتوکوکوس لاکتیس*، سویه استاندارد و بومی *لیستریا مونوسایتوجنز* هستند.

www.SID.ir

Archive of SID

- آماده‌سازی نمونه‌های پنیر برای آزمون‌های میکروبی

پس از همگن‌سازی محتویات بسته پنیر، مقدار ۱۰ گرم به ارلن مایر حاوی ۹۰ میلی‌لیتر محلول هضم‌کننده استریل (۱ درصد کازیتون و ۲ درصد سیترات‌سدیم) حاوی پرل شیشه‌ای منتقل شد. مخلوط به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب‌گرم (Memmert, Germany) با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت و به‌طور متناوب با شیکر (IKA, Germany) هم‌زده شد (Hanifian, 2014).

- شمارش و تأیید *لیستریا مونوسایتوجنز*

برای برآورد جمعیت *لیستریا مونوسایتوجنز* از روش استاندارد پلیت کانت استفاده شد. مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت (10^{-1}-10^{-4}) به‌صورت سطحی در دو محیط کشت آکسفورد آگار (Merck, Germany) حاوی مکمل آنتی‌بیوتیکی (Oxford-Listeria-Selective-Supplement) کشت داده شد. پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید و کلونی‌های با قطر ۲-۱ میلی‌متر، با رنگ سیاه و هاله سبز متمایل به خاکستری شمارش شدند (Ahmadzadeh Nia and Hanifian, 2016). در پلیت استاندارد، ۵ درصد کلونی‌ها انتخاب و با PCR مورد بررسی و تأیید قرار گرفت.

برای تأیید مولکولی *لیستریا مونوسایتوجنز* از ژن *hlyA* و پرایمرهای F: 5′-GCA GTT GCA AGC GCT TGG AGT GAA-3′ و R: 5′- GCA ACG TAT CCT CCA GAG TGA TCG-3′ استفاده شد. هر یک از کلونی‌های انتخاب شده *لیستریا مونوسایتوجنز* در میکروتیوب حاوی ۲ میلی‌لیتر BHI براث کشت (در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۲۴ ساعت) داده شد. پس از سانتریفیوژ کردن و جداسازی سلول‌های باکتری (با شدت g × ۴۰۰۰ و ۱۵ دقیقه)، DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج باکتری‌های گرم مثبت (Sinaclon, Iran) و طبق دستورالعمل کیت، استخراج و در ۳۰ میکرولیتر آب یون‌زدایی شده (Deionized water) عاری از (Sinaclon, Iran) DNA/RNA مخلوط گردید. با نانودراپ (Thermo Scientific, USA) و با استفاده از طول موج ۲۶۰ نانومتر و نسبت ۲۶۰/۲۸۰ به‌ترتیب غلظت و خلوص DNA استخراج شده ارزیابی شد. مخلوط واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس ۲× (Fermentas, Germany)، ۶۰ پیکومول از هر پرایمر (Eurofins, Germany) و ۲۵ نانوگرم DNA الگو بود. حجم نهایی مخلوط با افزودن آب یون‌زدایی شده به ۲۵ میکرولیتر رسید. واکنش PCR با یک مرحله دمایی ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه برای دناتوراسیون اولیه آغاز گردید. سپس ۳۵ سیکل متوالی و شامل شرایط دمایی زیر اعمال گردید: ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ ثانیه جهت دناتوراسیون، ۶۰ درجه سلسیوس و ۳۰ ثانیه برای اتصال پرایمرها، ۷۲ درجه سلسیوس و ۹۰ ثانیه جهت توسعه توالی هدف و در نهایت یک مرحله دمایی ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه برای توسعه نهایی (Swetha *et al*., 2012). محصول PCR یک قطعه bp ۴۵۶ بود که با الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد (Invitrogen, USA) حاوی ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر رنگ سایبرگرین (Sigma–Aldrich, USA)، مشاهده گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

- شمارش باکتری‌های آغازگر

جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها و لاکتوکوکوس‌ها به‌ترتیب در محیط MRS آگار و M17 آگار شمارش گردید. رشد لاکتوکوکوس‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و به‌مدت سه روز تحت شرایط هوازی انجام پذیرفت و لاکتوباسیلوس‌ها در دمای ۳۵ درجه سلسیوس و به‌مدت سه روز در جار بی‌هوازی حاوی گازپک نوع A (Merck, Germany) رشد داده شدند (Mohammadi and Jodeiri, 2013).

- استخراج نایسین از پنیر و ارزیابی خاصیت ضدمیکروبی آن

جهت ارزیابی تولید نایسین در نمونه‌های تلقیح شده با *لاکتوکوکوس لاکتیس*، مقدار ٤ گرم پنیر با ۸ میلی‌لیتر از مخلوط توین ۸۰ (۰/۲ درصد وزنی-حجمی) و اسید کلریدریک (اسیدکلریدریک ۰/۰۲ نرمال) مخلوط گردید. سپس pH آن با استفاده از اسیدکلریدریک ۵ نرمال روی ۵ تنظیم شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام‌آب (Memmert, Germany) با دمای ٦۰ درجه سلسیوس همگن گردید. مخلوط همگن شده به‌مدت ۳ دقیقه در ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و در ادامه به‌مدت ۲ دقیقه با ورتکس (IKA, Germany) هم‌زده شد و این مرحله مجدداً تکرار گردید. پس از خنک‌سازی مخلوط تا دمای ٤ درجه سلسیوس، با سانتریفیوژ (شدت g × ٤۰۰۰ و ۳۰ دقیقه) رسوب داده شد. مایع رویی مجدداً با همان شدت برای ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی پس از صاف شدن با فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتری، با سانتریفیوژ تحت خلاء (Vacufuge Concentrator, Eppendorf, Germany) تغلیظ گردید. نمونه تغلیظ شده در ۲۰۰ میکرولیتر توین ۸۰-اسیدکلریدریک حل شد (Benech *et al*., 2002). برای رسم منحنی استاندارد از نایسین خالص (Sigma-Aldrich, USA) با غلظت‌های ۰/٦۲۵ تا ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نایسین در توین ۸۰-اسیدکلریدریک استفاده گردید.

برای بررسی خاصیت ضدمیکروبی، محیط مولر-هینتون آگار (Scharlau, Spain) با غلظت‌های نیم مک‌فارلند *لیستریا مونوسایتوجنز* استاندارد (ATCC 19115) و *لیستریا مونوسایتوجنز* جدا شده از پنیر سنتی بومی، کشت داده شد. دیسک‌های کاغذی به‌طور مجزا با ٦ غلظت تهیه شده نایسین و هم‌چنین عصاره استخراج شده از نمونه پنیر آغشته و در سطح محیط قرار داده شد. پس از گرمخانه‌گذاری در ۳۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۸ ساعت، هاله مهاری پیرامون دیسک‌ها با کولیس اندازه‌گیری گردید (Benech *et al*., 2002).

- اندازه‌گیری pH

میزان pH نمونه‌های پنیر به‌وسیله pH متر دیجیتال اندازه‌گیری شد. مقدار ۱۰ گرم نمونه پنیر در بشر ۱۰۰ میلی‌لیتری توزین و سپس ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر روی نمونه اضافه شد. پس از یکنواخت‌سازی محتویات، pH نمونه اندازه‌گیری گردید (Mohammadi *et al*., 2009).

- تجزیه و تحلیل آماری

جمعیت *لیستریا مونوسایتوجنز* و لاکتوکوکوس‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها به مقیاس لگاریتمی (Log_{10} CFU/g) تبدیل شد. پس از محاسبه آمار توصیفی (میانگین و انحراف معیار) و برآورد نرمال بودن توزیع داده‌ها (با آزمون‌های Skewness و Kurtosis)، تغییرات جمعیت‌های میکروبی طی مراحل مختلف تهیه و نگه‌داری پنیر و هم‌چنین بین گروه‌های شاهد و تیمار با

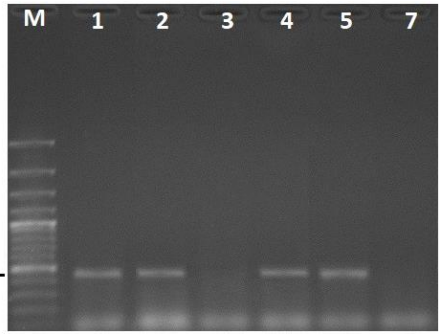
www.SID.ir

Archive of SID

آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون دانکن (Duncan's test) مقایسه گردید (SPSS, Version 17).

یافته‌ها

شکل (۱) ژل الکتروفورز کلونی‌های ارزیابی شده با PCR را نشان می‌دهد. طبق نتایج، برخی از کلونی‌های شمارش شده به‌رغم داشتن مورفولوژی مشابه با کلونی‌های *لیستریا مونوسایتوجنز*، در ارزیابی PCR مورد تأیید قرار نگرفتند. با توجه به این که محیط‌های کشت اختصاصی قابلیت بازدارندگی نسبی دارند، لذا درصدی از کلونی‌های رشد کرده در این قبیل محیط‌ها مربوط به باکتری‌های همراه است که در نتیجه مقاومت حرارتی بالا یا آلودگی ثانویه به محیط راه پیدا کرده‌اند. بنابراین در این مطالعه، ضریب «*درصد کلونی‌های تأیید شده با PCR*» در «*تعداد کل کلونی‌های شمارش شده*» اعمال گردید و تعداد به‌دست آمده به‌عنوان جمعیت *لیستریا مونوسایتوجنز* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

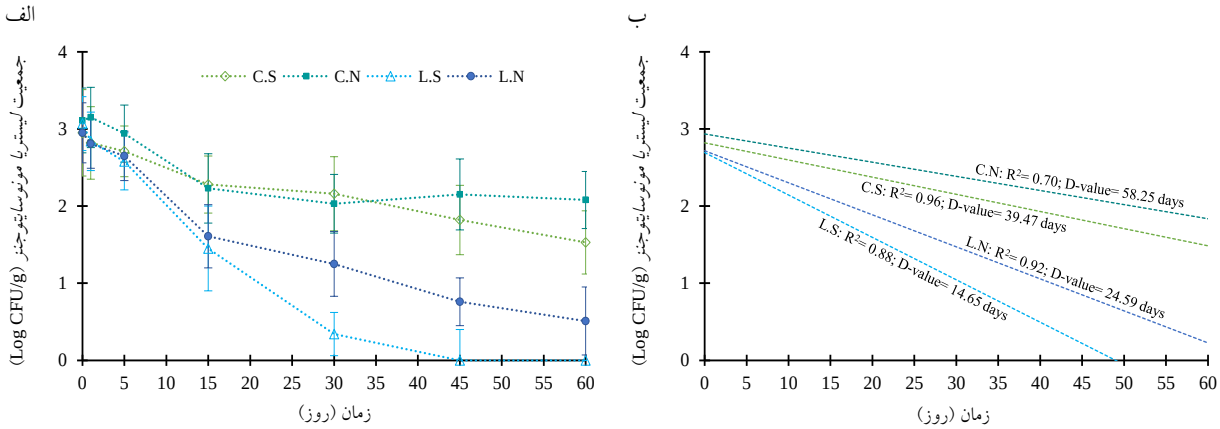


شکل (۱)- ژل‌الکتروفورز محصول PCR و باند ٤٥٦ bp ژن *hlyA* *لیستریا مونوسایتوجنز*؛ ۱، ۲، ٤ و ٥: نتایج مثبت؛ ۳ و ۷: نتایج منفی.

در نمودار (۱-الف) تغییرات جمعیت سویه‌های استاندارد و بومی *لیستریا مونوسایتوجنز* طی نگه‌داری پنیر سفید فراپالایشی نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، جمعیت لیستریا در زمان تلقیح تا بعد از گرمخانه‌گذاری (روز ۱) تقریباً ثابت برآورد شد. در فاصله روز ۱ تا ٥ دوره نگه‌داری، کاهش مختصری (به‌طور میانگین ۰/۱٦ Log CFU/g) در نمونه‌های پنیر مشاهده شد که از نظر آماری معنادار نبود. اما از روز ٥ به بعد کاهش محسوس‌تر لیستریا در نمونه‌های شاهد و تیمار مشاهد گردید. با این تفاوت که این کاهش در گروه شاهد غیرمعنادار (به‌طور متوسط Log CFU/g ۰/۵۷) و در گروه تیمار به لحاظ آماری معنادار (به‌طور میانگین Log CFU/g ۱/۰۸) بود (P< ۰/۰۱). در ادامه دوره نگه‌داری (روز ۱۵ تا روز ٦۰) تفاوت Log CFU/g ۱/۳-۳/٦ بین نمونه‌های گروه شاهد و تیمار مشاهده شد (P< ۰/۰۵). در نمودار (۱-ب) روند (Trend) کاهشی جمعیت *لیستریا مونوسایتوجنز* در نمونه‌های پنیر شاهد و تیمار نشان داده شده است. طبق این یافته‌ها، عدد D (D-value) میانگین در نمونه‌های شاهد ٤٨/٨٦ روز و در نمونه‌های تیمار ۱۹/٦۲ روز به‌دست آمد که این تفاوت به لحاظ آماری معنادار (P< ۰/۰۱) بود.

www.SID.ir

Archive of SID



جدول (۱)- (الف): تغییرات جمعیت (میانگین ± انحراف‌معیار) *لیستریا مونوسایتوجنز* در نمونه‌های پنیر سفید فراپالایشی طی دوره نگه‌داری؛ (ب): تجزیه و تحلیل روند (Trend analysis) تغییرات جمعیت *لیستریا مونوسایتوجنز* در نمونه‌های پنیر سفید فراپالایشی طی دوره نگه‌داری؛ C.S و C.N به‌ترتیب نشان‌دهنده سویه استاندارد (ATTC 19115) و بومی در نمونه شاهد هستند؛ L.S و L.N به‌ترتیب نشان‌دهنده سویه استاندارد و بومی در نمونه تیمار (حاوی *لاکتوکوکوس لاکتیس* مولد نایسین) هستند.

طبق نتایج مطالعه، تغییرات جمعیت سویه‌های استاندارد و بومی *لیستریا مونوسایتوجنز* در گروه تیمار تا روز ۱۵ و در گروه شاهد تا روز ۳۰، تقریباً روند مشابهی داشتند (نمودار ۱-الف). اما پس از زمان‌های یاد شده، روند کاهش جمعیت در سویه استاندارد لیستریا نسبت به سویه بومی با شدت بیش‌تری دیده شد. شایان ذکر است تفاوت رفتار سویه‌ها صرفاً در گروه تیمار معنادار (P< ۰/۰۱) بود. هم‌چنین میانگین عدد D گروه شاهد و تیمار برای سویه استاندارد معادل ۲۷/۰۶ روز و برای سویه بومی ۴۱/۴۲ روز برآورد شد که به لحاظ آماری معنادار (P< ۰/۰۱) بود (نمودار ۱-ب).

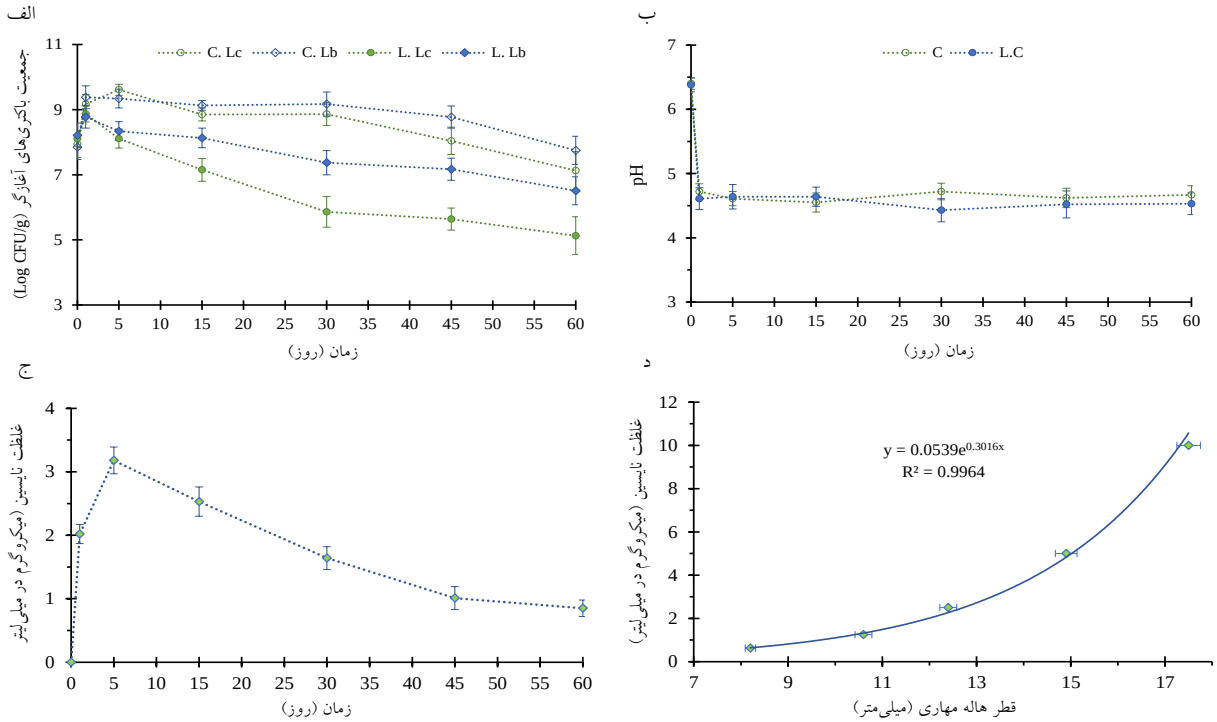
در نمودار (۲-الف) میانگین تغییرات تعداد باکتری‌های آغازگر لاکتیکی (لاکتوباسیلوس‌ها و لاکتوکوکوس‌ها) طی دوره نگه‌داری پنیر سفید فراپالایشی نشان داده شده است. طبق نتایج به‌دست آمده، جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها و لاکتوکوکوس‌ها در زمان تلقیح تقریباً Log CFU/g ۸ بود که پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری نمونه‌های پنیر در دمای ۲۷ درجه سلسیوس، در هر دو گروه شاهد و تیمار به حدود Log CFU/g ۹ رسید. در گروه شاهد جمعیت باکتری‌های آغازگر افزایش مختصر و غیرمعناداری از روز ۱ تا ۵ داشت و سپس روند نزول تدریجی آغاز شد و تا پایان دوره ۶۰ روزه این روند کاهشی ادامه یافت. اما در گروه تیمار (L. Lb و L. Lc) کاهش جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها و لاکتوکوکوس‌ها متعاقب گرمخانه‌گذاری آغاز و با شیب نزولی بیش‌تری نسبت به گروه شاهد (C. Lb و C. Lc) مشاهده شد. از روز ۵ تا روز ۶۰ دوره نگه‌داری، جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها در گروه تیمار به‌طور معناداری (P< ۰/۰۱) کم‌تر از گروه شاهد بود. طی همین مدت، جمعیت لاکتوکوکوس‌ها در نمونه‌های پنیر تلقیح شده با *لاکتوکوکوس لاکتیس* کم‌تر از گروه شاهد برآورد گردید (P< ۰/۰۱). به علاوه، مقایسه جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها و لاکتوکوکوس‌ها در

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌های تیمار نشان داد که لاکتوکوکوس‌ها بیش‌تر (P< ۰/۰۱) تحت تأثیر قرار گرفته‌اند.

میانگین تغییرات pH در نمونه‌های پنیر گروه شاهد و تیمار در نمودار (۲-ب) نشان داده شده است. میانگین pH طی گرمخانه‌گذاری (روز صفر تا روز ۱) در نمونه‌های شاهد (C) از ٦/٤٠ به ٤/٧٢ و در نمونه‌های تیمار (L.C) از ٦/٣٨ به ٤/٦١ کاهش یافت که این مقدار کاهش در هر دو گروه از نمونه‌ها به لحاظ آماری معنادار (P< ۰/۰۱) بود. اما در ادامه دوره نگه‌داری (روز ۱ تا روز ٦٠)، تغییرات محسوسی در میزان pH نمونه‌های شاهد و تیمار مشاهده نشد. در نمودار (۲-ج) تغییرات غلظت نایسین در نمونه‌های پنیر تلقیح شده با *لاکتوکوکوس لاکتیس* نشان داده است. این نتایج با استفاده از منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مشخص نایسین و قطر هاله مهاری ایجاد شده، به‌دست آمد (نمودار ۲-د). با توجه به این‌که تفاوتی بین قطر هاله مهاری *لیستریا مونوسایتوجنز* استاندارد و نوع بومی جدا شده از پنیر سنتی مشاهده نگردید، لذا عدد میانگین برای ترسیم نمودار استاندارد استفاده شد. طبق نمودار (۲-ج) بعد از گرمخانه‌گذاری (روز ۱)، غلظت نایسین به ۲/۰۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و در روز ۵ نگه‌داری به بیش‌ترین مقدار، یعنی ۳/۱۸ میکروگرم در میلی‌لیتر رسید. در ادامه غلظت نایسین روند نزولی داشت.



نمودار (۲)- (الف): تغییرات جمعیت (میانگین ± انحراف معیار) باکتری‌های آغازگر در نمونه‌های مختلف پنیر سفید فراپالایشی طی دوره نگه‌داری؛ C. Lc و C. Lb به‌ترتیب نشان‌دهنده جمعیت لاکتوکوکوس‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها در نمونه شاهد؛ L. Lc و L. Lb به‌ترتیب نشان‌دهنده جمعیت لاکتوکوکوس‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها در نمونه‌های تلقیح شده با *لاکتوکوکوس لاکتیس* است؛ (ب): تغییرات pH (میانگین ± انحراف معیار) در نمونه‌های پنیر سفید فراپالایشی طی دوره نگه‌داری؛ C و Lc: به‌ترتیب نشان‌دهنده پنیر فراپالایشی شاهد و حاوی *لاکتوکوکوس لاکتیس* است؛ (ج): تغییرات (میانگین ± انحراف معیار) نایسین طی دوره نگه‌داری؛ (د): منحنی استاندارد نایسین و ارتباط غلظت‌های مختلف نایسین و قطر هاله مهار رشد در باکتری‌های شاخص.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

طبق نمودار (۱-الف)، در اوایل دوره (روز ۱ تا ۵) تغییرات قابل‌ملاحظه‌ای در جمعیت *لیستریا مونوسایتوجنز* مشاهده نشد؛ اما از روز ۵ به بعد و هم‌زمان با افزایش جمعیت باکتری‌های آغازگر لاکتیکی، روند کاهشی لیستریا آغاز گردید. به‌نظر می‌رسد کاهش تدریجی جمعیت *لیستریا مونوسایتوجنز* در نمونه‌های شاهد می‌تواند در نتیجه فعالیت باکتری‌های آغازگر، تولید اسیدلاکتیک و احتمالاً ترکیبات آنتاگونیستی دیگر نظیر آب‌اکسیژنه و باکتریوسین‌ها باشد. کاهش تعداد لیستریا با گذشت زمان را می‌توان به کاهش مواد مغذی در محیط و انباشته شدن متابولیت‌های میکروبی مرتبط دانست. مطالعات متعددی در ارتباط با رفتار باکتری‌های بیماری‌زای غذایی تحت تأثیر کشت آغازگر در پنیر فراپالایشی انجام گرفته است. برای مثال در تحقیقی اثر بازدارندگی کشت آغازگر لاکتیکی بر بقای *یرسینیا انتروکولیتیکا* مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاکی از مهار معنادار ($P< ۰/۰۱$) *یرسینیا انتروکولیتیکا* بود؛ به‌نحوی که در پایان دو ماه نگه‌داری، تفاوت Log ٤ CFU/g بین نمونه‌های دارا و فاقد کشت آغازگر مشاهده شد (Vaseghi Bakhshayesh and Hanifian, 2015). این اختلاف، البته با نتایجی کم و بیش متفاوت، در *استافیلوکوکوس اورئوس* (Mohammadi and Hanifian, 2014) و *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* (Hanifian, 2014) مشاهده گردید. با این توضیح که در نمونه‌های حاوی کشت آغازگر، جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از روز ۳۰ دوره نگه‌داری به میزان Log CFU/g ٦ کاهش یافت در حالی‌که در نمونه‌های فاقد آغازگر، جمعیت باکتری مزبور تا پایان دوره (روز ٦٠) ثابت ماند. اما اختلاف جمعیت *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* در نمونه‌های حاوی و فاقد کشت آغازگر فقط Log CFU/g ۱ بود. این موضوع نشانگر تفاوت در حساسیت باکتری‌های مختلف به شرایط اسیدی و ترکیبات آنتاگونیستی ناشی از فعالیت باکتری‌های آغازگر لاکتیکی است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که جمعیت *لیستریا مونوسایتوجنز* در نمونه‌های حاوی *لاکتوکوس لاکتیس* مولد نایسین نسبت به نمونه‌های شاهد به‌طور معناداری ($P< ۰/۰۱$) کم‌تر است. طبق نمودار (۲-الف و ۲-ج) کاهش جمعیت *لیستریا مونوسایتوجنز* به موازات تولید نایسین در دوره گرمخانه‌گذاری اتفاق افتاده است. گرمخانه‌گذاری پنیر در ۲۹ درجه سلسیوس به‌مدت ٢٤ ساعت شرایط لازم برای فعالیت *لاکتوکوکوس لاکتیس* و تولید مقادیر مناسب نایسین را فراهم آورده است. در همین راستا، در مطالعه‌ای نشان دادند که کشت *لاکتوکوکوس لاکتیس* در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و مدت ٣٦ ساعت می‌تواند مقدار مناسبی نایسین تولید کند که روی باکتری‌های بیماری‌زای شاخص اثر مهاری ایجاد کند (Penna *et al.*, 2005). هم‌چنین نشان داده شده است که اثر ضدباکتریایی نایسین با کاهش pH از ۷ به ۵، افزایش پیدا می‌کند (Thomas and Wimpenny, 1996)؛ لذا نزول pH نمونه‌های پنیر بعد از گرمخانه‌گذاری به حدود ٤/٦ باعث عملکرد موثر نایسین بر *لیستریا مونوسایتوجنز* شده است (نمودار ۲-ب). توأم شدن تولید نایسین با pH اسیدی محیط و سنتز ترکیبات آنتاگونیستی احتمالی توسط باکتری‌های آغازگر لاکتیکی مورد استفاده در تهیه پنیر فراپالایشی، موجب تسریع روند کاهشی *لیستریا مونوسایتوجنز* در

www.SID.ir

Archive of SID

گروه تیمار شده است. مطالعاتی در ارتباط با اثر مهاری *لاکتوکوکوس لاکتیس* مولد نایسین بر *لیستریا مونوسایتوجنز* انجام گرفته است. طبق یافته‌های این تحقیقات، به‌کارگیری *لاکتوکوکوس لاکتیس* مولد نایسین در پنیر دهقانی (Cottage cheese) موجب مهار رشد *لیستریا مونوسایتوجنز* شد (Dal Bello, *et al.*, 2012). در مطالعه دیگری افزودن *لاکتوکوکوس لاکتیس* مولد نایسین (جداسازی شده از شیر بز) موجب کاهش سریع جمعیت *لیستریا مونوسایتوجنز* در پنیر میناس (Minas) گردید. هم‌چنین افزودن *لاکتوکوکوس لاکتیس* به پنیر موزارلا (Mozzarella) کاهش قابل‌توجهی در جمعیت *لیستریا مونوسایتوجنز* ایجاد کرد (Stecchini *et al.*, 1995).

در برخی دیگر از مطالعات، از نایسین به‌شکل آزاد و کپسوله شده برای کنترل *لیستریا مونوسایتوجنز* در پنیر استفاده شده است. برای مثال در تحقیقی از نایسین آزاد و نانوکپسوله شده در لیپوزوم برای کاهش جمعیت *لیستریا مونوسایتوجنز* در پنیر سفید فراپالایشی استفاده گردید. نتایج نشان داد که نایسین نانوکپسوله شده اثر تدریجی و معناداری ($P< ۰/۰۱$) روی کاهش جمعیت *لیستریا مونوسایتوجنز* دارد (Zaerzadeh *et al.*, 2011). در پژوهش‌های مشابه دیگر اثر نایسین کپسوله شده روی بقای *لیستریا مونوسایتوجنز* در پنیر میناس (Cui *et al.*, 2016) و چدار (Malheiros, *et al.*, 2012) مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج هر دو پژوهش نشان داد که نایسین کپسوله شده موجب مهار *لیستریا مونوسایتوجنز* می‌شود. در این قبیل مطالعات، مزیت کپسوله کردن نایسین در مقایسه با استفاده آزاد آن و هم‌چنین به‌کارگیری *لاکتوکوکوس لاکتیس*، آزادسازی تدریجی نایسین در حالت کپسوله و در نتیجه به حداقل رساندن اثر مهاری آن روی باکتری‌های آغازگر لاکتیکی عنوان می‌کنند. در حالی‌که در مطالعه حاضر متعاقب مرحله گرمخانه‌گذاری نمونه‌های پنیر، جمعیت باکتری‌های کشت آغازگر در نمونه‌های تیمار و شاهد رشد یکسانی داشتند (نمودار ۲-الف) و مقدار pH ناشی از فعالیت آن‌ها در نمونه‌های دارا و فاقد *لاکتوکوکوس لاکتیس* تفاوتی نداشت (نمودار ۲-ب).

مقایسه تغییرات جمعیت سویه‌های استاندارد و بومی *لیستریا مونوسایتوجنز* در پنیر سفید فراپالایشی (نمودار ۱-الف) نشان می‌دهد سویه *لیستریا مونوسایتوجنز* جدا شده از پنیر سنتی بومی مقاومت بیش‌تری در مقایسه با سویه استاندارد داشته است. در نمونه‌های شاهد و تیمار جمعیت سویه‌های بومی و استاندارد لیستریا تا روز ۵ تفاوت نشان ندادند. اما با پیشرفت زمان، تفاوت جمعیت لیستریاهای بومی و استاندارد آشکارتر شد. طوری‌که در انتهای دوره نگه‌داری، بین جمعیت دو سویه لیستریا تفاوت ۰/۵ Log CFU/g (۵ برابری) مشاهده شد. در مطالعات مشابه دیگر تفاوت رفتار سویه‌های بومی و آزمایشگاهی گزارش شده است. برای مثال در مطالعه تأثیر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و دمای گرمخانه‌گذاری بر زنده‌مانی سویه‌های *لیستریا مونوسایتوجنز*، مشخص گردید که سویه بومی لیستریا به‌طور معناداری ($P< ۰/۰۱$) مقاومت بیش‌تری داشته است (Ahmadzadeh Nia and Hanifian, 2017). این موضوع در *مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس* (Donaghy *et al.*, 2004; Cammi *et al.*, 2019; Hanifian, 2020) نیز گزارش شده است. قرارگیری طولانی سویه‌های بومی در معرض تنش‌های محیطی

www.SID.ir

Archive of SID

موجب فعال شدن ژن‌های مقاومت در آن‌ها شده و در نتیجه در مواجهه با تنش‌های بعدی، مقاوم بیش‌تری (در مقایسه با سویه‌های آزمایشگاهی) بروز می‌دهند (Bergholz *et al.*, 2012). سویه بومی *لیستریا مونوسایتوجنز* از پنیر سنتی لیقوان جداسازی شده بود که این نوع پنیر دارای pH اسیدی (۵-٤/٤) و درصد بالای نمک (۷-۳ درصد) است (Mirzaei *et al.*, 2008). بنابراین انتظار می‌رود جدایه‌های به‌دست آمده از این پنیر مقاومت بیش‌تری به اسیدیته و نمک بالا و حضور جمعیت میکروبی رقیب (Competing microbial flora) داشته باشند.

میزان عدد D در نمونه‌های فاقد آغازگر، ۲/٤۹ برابر نمونه‌های دارای آغازگر تخمین زده شد. این موضوع حاکی از اثر مهاری موثر باکتری‌های لاکتیکی روی *لیستریا مونوسایتوجنز* است. فراهم آوردن شرایط مورد نیاز از نقطه‌نظر دما و مدت زمان لازم جهت رشد و تکثیر باکتری‌های آغازگر، می‌تواند به‌نحو موثری در کنترل انواع آلودگی‌های باکتریایی پنیر سفید فراپالایشی به‌کار گرفته شود. به‌ویژه این‌که شدت آلودگی با باکتری‌های بیماری‌زای غذایی، چه انواعی که به‌دلیل فرایندهای حرارتی غیرمؤثر زنده باقی مانده‌اند و چه آن‌هایی که از طریق آلودگی ثانویه وارد پنیر شده‌اند، در حالت واقعی کم‌تر از مقداری است که در مطالعات تلقیحی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. استفاده از سویه‌های ایمن و مولد نایسین *لاکتوکوکوس لاکتیس* می‌تواند بدون ایجاد اثرات منفی بر رشد و فعالیت باکتری‌های آغازگر لاکتیکی، موجب مهار *لیستریا مونوسایتوجنز* و احتمالاً باکتری بیماری‌زای غذایی دیگر (به‌ویژه انواع گرم مثبت) در پنیر سفید فراپالایشی شود. این روش نه‌تنها در قیاس با به‌کارگیری نایسین آزاد و کپسوله اقتصادی‌تر است، بلکه با قوانین موجود در ارتباط با منع استفاده از نایسین خالص در فرآورده‌های شیر در برخی از کشورها، مطابقت دارد.

عدد D میانگین برای سویه بومی *لیستریا مونوسایتوجنز* ۱/۵۳ برابر بیش‌تر از سویه استاندارد بود. با در نظر گرفتن تفاوت‌های آشکار در رفتار لیستریای با منشأ غذایی و نوع استاندارد، بهتر است در مطالعات تلقیحی رفتار جدایه‌های غذایی تعیین هویت‌شده با سویه‌های آزمایشگاهی مورد مقایسه قرار گیرد تا نتایج حاصله به‌حالت واقعی نزدیک‌تر باشد.

تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر مستخرج از نتایج پایاننامه کارشناسی ارشد رشته علوم و صنایع غذایی است که با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انجام گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

- Abdollahi, E. and Hanifian, S. (2016). Behavior of *Yersinia enterocolitica* in UF White Cheese: Impact of different storage temperatures on various strains. Journal of Food Safety, 36: 247–253.
- Adams, M., Ray, B. and Miller, K.W. (2003). Nisin in multifactorial food preservation, bacteriocin other than nisin: the pediocin-like cystibiotics of lactic acid bacteria, In: Roller, S. (Ed.). Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods. Woodhead Publishing Limited & CRC Press LLC, pp. 11, 64–77.
- Ahmadzadeh Nia, S. and Hanifian, S. (2017). Survival of *Listeria monocytogenes* strains in ultra-filtered white cheese: Effect of *Lactobacillus plantarum* and incubation period. Journal of Food Processing and Preservation, 41(6): e13283.
- Benech, R.O., Kheadr, E.E., Laridi, R., Lacroix, C. and Fliss, I. (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.
- Bergholz, T.M., Bowen, B., Wiedmann, M. and Boor, K.J. (2012). *Listeria monocytogenes* shows temperature-dependent and -independent responses to salt stress, including responses that induce cross-protection against other stresses. Applied and Environmental Microbiology, 78(8): 2602–2612.
- Cammi, G., Ricchi, M., Galiero, A., Daminelli, P., Cosciani-Cunico, E., Dalzini, E., *et al*. (2019). Evaluation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survival during the manufacturing process of Italian raw milk hard cheeses (Parmigiano Reggiano and Grana Padano). International Journal of Food Microbiology, 305: 108247.
- Castro, H., Ruusunen, M. and Lindström, M. (2017). Occurrence and growth of *Listeria monocytogenes* in packaged raw milk, International Journal of Food Microbiology, 261: 1–10.
- Chen, Y., Chen, M., Wang, J., Wu, Q., Cheng, J., Zhang, J. *et al*. (2020). Heterogeneity, characteristics, and public health implications of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and pasteurized milk in China. Frontiers in Microbiology, 11: 642.
- Churchill, K.J., Sargeant, J.M., Farber, J.M. and O'Connor, A.M. (2019). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in select ready-to-eat foods–deli meat, soft cheese, and packaged salad: a systematic review and meta-analysis. Journal of Food Protection, 82(2): 344–357.
- Cui, H.Y., Wu, J., Li, C.Z. and Lin, L. (2016). Anti-listeria effects of chitosan-coated nisin-silica liposome on Cheddar cheese. Journal of Dairy Science, 99(11): 8598–8606.
- Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P.D. and Hill, C. (2012). Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. International Journal of Food Microbiology, 153(1-2): 58–65.
- Donaghy, J.A., Totton, N.L. and Rowe, M.T. (2004). Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of Cheddar cheese. Applied and Environmental Microbiology, 70: 4899–4905.
- Hanifian, S. (2014). Survival of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ultra-filtered white cheese. Letters in Applied Microbiology, 58(5): 466–471.
- Hanifian, S. (2020). Behavior of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in Lighvan cheese tracked by propidium monoazide qPCR and culture. LWT, 133: 109886.
- Hanifian, S. and Jodeiri, H. (2013). Impact of salt concentration on persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Iranian UF white cheese. Food Hygiene, 2(8): 1–14. [In Persian]
- Hanson, H., Whitfield, Y., Lee, C., Badiani, T., Minielly, C., Fenik, J. *et al*., (2019). *Listeria monocytogenes* associated with pasteurized chocolate milk, Ontario, Canada. Emerging Infectious Diseases. 25(3): 581–584.

www.SID.ir

Archive of SID

- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (1993). Cheese in brine: Specifications & test methods. 1st edition, ISIRI No. 2344-1. [In Persian]
- Kalantaripour, A. and Hanifian, S. (2017). Listeria isolated from traditional cheeses of Tabriz area: Occurrence, diversity and phenotypic characteristics. Journal of Food Microbiology, 4(6): 83–96. [In Persian]
- Karami, M., Ehsani, M.R., Mousavi, S.M., Rezaie K. and Safari, M. (2009). Changes in the rheological properties of Iranian UF-Feta cheese during ripening. Food Chemistry, 112: 539–544.
- Koch, J., Dworak, R., Prager, R., Becker, B., Brockmann, S., Wicke, A. *et al*. (2010). Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006-2007. Foodborne Pathogens and Disease, 7 (12): 1581–1584.
- Liu, D., Lawrence, M.L., Ainsworth, A.J. and Austin, F.W. (2005). Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains. FEMS Microbiology Letters, 243(2): 373–378.
- Malheiros, P.D.S., Daroit, D.J. and Brandelli, A. (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in minas frescal cheese by free and nanovesicle-encapsulated nisin. Brazilian Journal of Microbiology, 43(4): 1414–1418.
- Matereke, L.T. and Okoh, A.I. (2020). *Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and environmental persistence: A Review. Pathogens, 9(7): 528.
- Mirzaei, H., Khosroshahi, A.G. and Karim, G. (2008). The microbiological and chemical quality of traditional Lighvan cheese (white cheese in brine) produced in Tabriz, Iran. Journal of Animal and Veterinary Advances, 7(12): 1594–1599.
- Mohammadi, K. and Hanifian, S. (2014). Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in Iranian ultra-filtered white cheese. International Journal of Dairy Technology, 68(1): 111–117.
- Mohammadi, K., Karim, G., Razavilar, V. and Hanifian, S. (2009). Study on the growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and storage of Iranian white cheese in brine. Iranian Journal of Veterinary Research, 4(29): 346–351.
- Mohammadi, Kh. and Jodeiri, H. (2013). Effect of different concentrations of nisin on starter culture of model cheeses manufactured from ultrafiltrated milk. Food Hygiene, 3(1): 33–43. [In Persian]
- Penna, T.C.V., Jozala, A.F., Novaes, L.C.D.L., Pessoa, A. and Cholewa, O. (2005). Production of nisin by *Lactococcus lactis* in media with skimmed milk. Applied Biochemistry and Biotechnology, 122(1-3): 619–637.
- Pietrysiak, E., Smith, S. and Ganjyal, G.M. (2019). Food safety interventions to control *Listeria monocytogenes* in the fresh apple packing industry: a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 18(6): 1705–1726.
- Stecchini, M.L., Aquili, V. and Sarais, I. (1995). Behavior of *Listeria monocytogenes* in Mozzarella cheese in presence of *Lactococcus lactis*. International Journal of Food Microbiology, 25(3): 301–310.
- Swetha, C.S., Madhava Rao, T., Krishnaiah, N. and Vijaya Kumar, A. (2012). Detection of *Listeria monocytogenes* in fish samples by PCR assay. Annals of Biological Research, 3: 1880–1884.
- Thomas, L.V. and Wimpenny, J.W. (1996). Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Applied and Environmental Microbiology, 62: 2006–2012.
- Tirloni, E., Bernardi, C., Pomilio, F., Torresi, M., De Santis, E.P., Scarano, C. *et al*. (2020). Occurrence of Listeria spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from PDO Taleggio production plants. Foods, 9(11): 1636.
- Vaseghi Bakhshayesh, V. and Hanifian, S. (2015). Behavior of various strains of *Yersinia enterocolitica* in Ultra-filtered cheese and inhibitory effect of lactic starter bacteria. Food Hygiene, 5(17): 13–26. [In Persian]

www.SID.ir

Archive of SID

- Zaerzadeh, E., Mortazavi, S.A., Jafari, M.R., Afsharnejad, S. Tabatabaii, F. and Nassiri Mahallati, M. (2011). Antibacterial effect of nano-encapsulated nisin in liposoms in contrast to free nisin in control of *Listeria monocytogenes* in Iranian feta cheese (uf). Iranian Food Science and Technology Research Journal, 7(3): 191–199. [In Persian]
- Zafar, N., Nawaz, Z., Anam, S., Kanwar, R., Ali, A., Mudassar, M. *et al*. (2020). 31. Prevalence, molecular characterization and antibiogram study of *Listeria monocytogenes* isolated from raw milk and milk products. Pure and Applied Biology (PAB), 9(3): 1982–1987.
- Zhao, X., Chen, L., Wu, J.E., He, Y. and Yang, H. (2020). Elucidating antimicrobial mechanism of nisin and grape seed extract against *Listeria monocytogenes* in broth and on shrimp through NMR-based metabolomics approach. International Journal of Food Microbiology, 319: 108494.

www.SID.ir