مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۹، شماره ۳، پاییز ۸۸، صفحات ۱۹۷ تا ۲۰۰

Original Article

# ارزیابی تأثیر نایسین روی کاهش غلظت نگهدارنده‌های شیمیایی مواد غذایی

صاعد مبصری[۱]، فریدون ملک زاده[۲]، احمد علی پورابایی[۳]،پوریاجندقی[۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم
[۲] استاد، دکترای میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران
[۳] استادیار، دکترای میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم
[۴] کارشناسی ارشدمیکروبیولوژی ، دانشگاه آزاداسلامی ، واحدپزشکی تهران

## چکیده

**سابقه و هدف**: *به دلیل توجه روز افزون به نگهدارنده‌های طبیعی، مطالعات فراوانی در طی سالهای اخیر صورت گرفته است که در آنها از نایسین به عنوان نگهدارنده، جهت کنترل پاتوژن‌های غذایی و میکروارگانیسم‌های عامل فساد مواد غذایی استفاده شده است. هدف از این مطالعه بررسی فعالیت ضد باکتریایی نایسین و تأثیر آن در کاهش غلظت نگهدارنده‌های شیمیایی رایج بود.*

**روش بررسی**: *در این مطالعه تجربی، فعالیت ضد باکتریایی نایسین و تأثیر آن در کاهش غلظت نگهدارنده‌های شیمیایی رایج، بر علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس (سویه ۱۱۱۲) و لیستریا منوسایتوجنز (سویه ۱۳۰۱) بررسی شد. آزمایش‌ها به دو مرحله اساسی تقسیم بندی شدند. مرحله اول شامل تعیین MIC (حداقل غلظت مهار کننده رشد) و MBC (حداقل غلظت کشندگی) مواد نگهدارنده نیتریت سدیم، بنزوئیک اسید و نایسین در pH بهینه (۵/۵) بود که برای این کار از روش تهیه رقت استفاده شد. در مرحله بعد، MIC نیتریت سدیم و بنزوئیک اسید در حضور MIC نایسن تعیین شد.*

**یافته‌ها**: *ترکیبات فوق بر علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس و لیستریا منوسایتوجنز خاصیت ضد باکتریایی داشته و MIC آنها به ترتیب برای استافیلوکوکوس ارئوس ۳۵۰، ۲۰۰ و ۲۵ ppm و برای لیستریا منوسایتوجنز ۱۰۰، ۲۰۰ و ۱۰ ppm به دست آمد. هنگامی که نگهدارنده‌های شیمیایی همراه با نایسین به کار رفتند، نایسین MIC این ترکیبات را کاهش داد (به ترتیب ۲۰۰ و ۵۰ ppm برای استافیلوکوکوس ارئوس و ۲۵ و ۲۵ ppm برای لیستریا منوسایتوجنز ).*

**نتیجه‌گیری**: *این مطالعه نشان داد که می توان از نایسین به عنوان یک نگهدارندهٔ بی‌ضرر در میکروبیولوژی غذایی استفاده کرد و غلظت نگهدارنده‌های شیمیایی را کاهش داد.*

**واژگان کلیدی**: *نایسین، سرطان، نیتریت سدیم، بنزوئیک اسید، باکتری.*

## مقدمه

اغلب تکنیک‌های نگهداری مواد غذایی که اخیراً به کار می‌روند، عملکردشان متکی بر مهار میکروارگانیسم‌ها و یا کند کردن رشد آنها می‌باشد. از این روش‌ها می‌توان به سرما دادن، منجمد کردن، خشک کردن، کنسرو کردن، استفاده از اتمسفر اصلاح شده، اسیدی کردن، تخمیر و افزودن مواد نگهدارنده اشاره کرد.

نگهدارنده‌ها ترکیباتی هستند که برای به تأخیر انداختن و یا ممانعت از فساد شیمیایی و یا میکروبیولوژی غذا استفاده می‌شوند. بنزوئیک اسید یک ماده جامد بلورین و بی رنگ می‌باشد. از این ترکیب و نمک‌های آن (سدیم، کلسیم، پتاسیم) برای نگهداری مربا، چاشنی‌ها، نوشابه‌ها، سالادها و زیتون استفاده می‌شود. تنها نگرانی در مورد بنزوئیک اسید ومشتقات آن، امکان واکنش این ترکیبات با آسکوربیک اسید (ویتامین C)

آدرس نویسنده مسئول: قم دانشگاه آزاد اسلامی-دانشکده علوم پایه-گروه میکروبیولوژی، صاعد مبصری
(email: saed_mob@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۱۲/۱٤
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۷/۱۲

Archive of SID
www.SID.ir

است که می‌تواند منجر به تشکیل مقادیر جزئی از بنزن گردد که یک ترکیب سرطان زا است. گرما و نور می‌توانند بر سرعت تشکیل بنزن موثر باشند. حداکثر میزان مجاز بنزوئیک اسید در مواد غذایی $mg/ml^{-1}$ ۲/۵-۱/۵ می‌باشد (۱).

از مواد نگهدارندهٔ دیگر می‌توان به نیتریت‌ها و نیترات‌ها اشاره کرد. اگرچه نیتریت‌ها و نیتراتها از سال‌ها قبل در مواد غذایی بکار برده می‌شدند، ولی مکانیسم عملکرد آنها تا قرن نوزدهم نامشخص بود. از سال ۱۹۰۰ که مشخص شد نیترات توسط باکتری‌ها به نیتریت تبدیل می‌شوند، استفاده از نیتریت رونق گرفت. امروزه از نیتریت‌ها و نیتراتها برای نگهداری گوشت و ماهی استفاده می‌شود.

اگر چه تنها مصرف نگهدارنده‌هایی مجاز است که بدون اثرات نامساعد باشند، ولی نگرانی‌هایی در مورد نیتریت وجود دارد. بی شک نیتریت در غلظت‌های بالا برای انسان سمی است و یکی از اثرات سمی مهم نیتریت‌ها، اکسیداسیون اکسی‌هموگلوبین به فری‌هموگلوبین است که سرانجام موجب تشکیل مت‌هموگلوبین می‌گردد. این امر به ویژه در کودکان تازه متولد شده می‌تواند کشنده باشد، چرا که مت‌هموگلوبین احیاء شده، ظرفیت حمل اکسیژن پایینی دارد و ممکن است در نهایت به سندرم blue baby منجر شود. از اثرات نامساعد دیگر نیتریت‌ها، خاصیت بازدارندگی بر روی میزان جذب مواد غذایی در روده است (۲). از سال ۱۹۷۰ نگرانی‌های در مورد امکان رابطه بین نیتریت و سرطان‌ها بروز کرده است و دوزهای بالای نیتریت با سرطان همراهی داشته است. میزان بروز سرطان مری در استان Henan چین بسیار بالاست و این امر را به مصرف سبزی‌های آبیاری شده حاوی مقادیر بالای نیتریت و نیترات نسبت داده‌اند. مطالعات اخیر در نشان دادن ارتباط بین نیتریت موجود در رژیم غذایی و سرطان معده ناموفق بوده است. همچنین مشخص شده است که ترکیبات نیتروزآمین ممکن است از نیتریت‌ها حاصل شوند و نشان داده‌اند که ترکیباتی از قبیل نیتروز و دی متیل‌آمین در طیف وسیعی از گونه‌های حیوانی سرطان زاست. حداکثر غلظت مجاز آن در محصولات گوشتی ppm ۲۰۰ می‌باشد (به استثناء گوشت خوک که ppm ۱۲۰ است). در سال ۱۹۸۵، اتحادیه اروپا میزان مجاز نیتریت را در آب آشامیدنی $mg\ Lit^{-1}$ ۵۰ تعیین کرد (۳).

دسته دیگری از مواد نگهدارنده که امروزه مورد توجه بسیاری هستند، نگهدارنده‌های طبیعی می‌باشند که نایسین از مهم‌ترین آنها است. نایسین، پپتیدی حاوی ۳۴ آمینو اسید است که از زیرگونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس لاکتیس تولید می‌شود. این ترکیب به هیچ وجه سمی نبوده و به سرعت توسط آنزیم‌های گوارشی غیر فعال می‌شود به همین دلیل در سال ۱۹۶۹ سازمان‌های FAO (Food and Agriculture Organization) و WHO (World Health Organization) اجازه استفاده از آن را به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی صادر کردند (۴). امروزه از نایسین برای نگهداری پنیرهای پاستوریزه، دسرهای لبنی، غذاهای کنسرو شده، گوشت‌های نمک‌زده و غذاهای دریایی استفاده می‌شود (۵ ).

در این تحقیق از نایسین به عنوان نگهدارنده طبیعی و بی‌ضرر برای کاهش میزان MIC مواد نگهدارنده شیمیایی علیه میکربهای پاتوژن مواد غذایی کنسروشده استفاده شد تا در این شرایط میزان نیاز به نگهدارنده‌های شیمیایی سنجیده شود.

## مواد و روشها

این تحقیق به روش تجربی انجام شد. نیتریت سدیم و بنزوئیک اسید از شرکت مرک و نایسین از شرکت هایمدیا خریداری شد. برای تهیه محلول‌های ذخیره، مقادیر مناسبی از هر یک از مواد نگهدارنده وزن شده و در داخل حلال مناسب حل شد. حلال مناسب برای بنزوئیک اسید، الکل اتیلیک ۹۰ درجه و برای نیتریت سدیم و نایسین بترتیب آب مقطر و HCL ۰/۰۲ بود. محلول‌های ذخیره به طور جداگانه و به وسیله صافی میلی‌پور با قطر ۰/۲۲ میکرومتر استریل گردیدند. غلظت هر یک از محلول‌های استوک استریل شده برابر با $mg/ml^{-1}$ ۳۰ و در مورد نایسین $mg/ml^{-1}$ ۱۰ بود.

محیط‌های کشت مولر هینتون آگار (MHA) و مولر هینتون براث (MHB) از شرکت مرک خریداری شدند و به ترتیب برای تعیین MIC (حداقل غلظت مهارکننده رشد)، MBC (حداقل غلظت کشندگی) و محیط کشت باکتری‌ها و تهیه استوک استفاده شدند. سویه‌های میکروبی استافیلوکوکوس ارئوس (PTCC 1112) و لیستریا منوسایتوجنز (PTCC 1301) از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. پس از باز کردن ویال‌های لیوفریزه، باکتری‌ها به محیط TPB (تریپتوز فسفات براث) منتقل شده و در دمای مناسب (۳۷ درجه سانتی‌گراد) گرماگذاری شدند.

آزمایش‌ها به دو مرحله اساسی تقسیم‌بندی شدند. مرحله اول شامل تعیین MIC و MBC مواد نگهدارنده نیتریت سدیم، بنزوئیک اسید و نایسین در pH بهینه (۵/۵) بود که برای این کار از روش تهیه رقت استفاده شد. به این منظور لوله‌هایی که هر کدام حاوی محیط کشت MHB، سوسپانسیون باکتری و مواد نگهدارنده بودند، انتخاب شدند. لوله‌ها طوری طراحی

Archive of SID
www.SID.ir

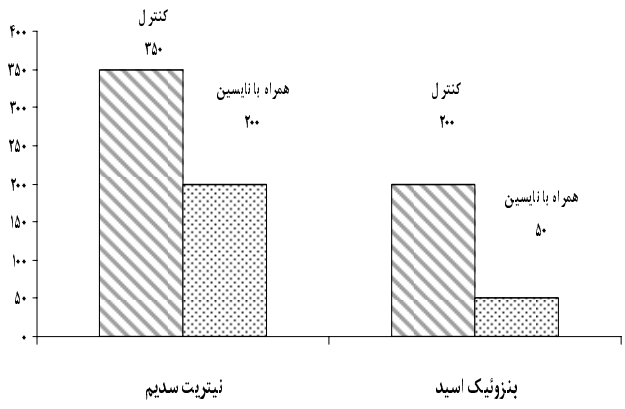
شده بودند که غلظت مواد نگهدارنده در لوله‌ها به ترتیب ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۵۰، ۵۰۰ ppm بود.

در مرحله بعد MIC نیتریت سدیم و بنزوئیک اسید در حضور MIC نایسین تعیین شد و به این منظور غلظت‌هایی بین ppm ۵ تا ppm ۵۰۰ از نیتریت سدیم و بنزوئیک اسید تهیه شد، با این تفاوت که هر لوله حاوی غلظتی معادل MIC نایسین نیز بود. لازم به ذکر است که لوله‌ها در هر دو مرحله به مدت ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند.

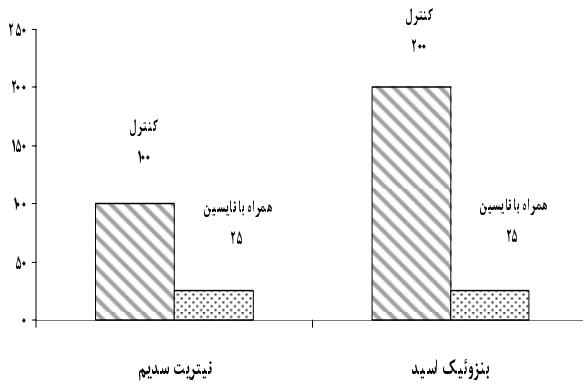
## یافته‌ها

نیتریت سدیم، بنزوئیک اسید و نایسین بر علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس و لیستریا منوسایتوجنز خاصیت ضد باکتریایی داشته و MIC آن به ترتیب برای استافیلوکوکوس ارئوس ۳۵۰، ۲۰۰ و ۲۵ و برای لیستریا منوسایتوجنز ۱۰۰، ۲۰۰ و ۱۰ بود. هم‌چنین میزان MBC نیتریت سدیم، بنزوئیک اسید و نایسین علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس ولیستریا منوسایتوجنز به ترتیب ۵۰۰، ۳۵۰ و ۵۰ ppm و ۲۰۰، ۳۵۰ و ۲۵ ppm به دست آمد. هنگامی که نگهدارنده‌های شیمیایی همراه با نایسین به کار رفتند، نایسین MIC این ترکیبات را بر روی دو سویه باکتری به کار رفته کاهش داد و میزان آن را به ترتیب در باکتری استافیلوکوکوس ارئوس به ۲۰۰ و ۵۰ ppm و در باکتری لیستریا منوسایتوجنز به ۲۵ و ۲۵ ppm رساند (نمودارهای ۱ و ۲).

بنابراین در حضور نایسین که یک نگهدارندهٔ بی‌ضرر است، تراکم لازم برای توقف رشد باکتری‌ها (MIC) یا اثر کشندگی آن (MBC) برای سایر مواد نگهدارنده مانند نیتریت‌سدیم و بنزوئیک‌اسید به مراتب کمتر بود.




**نمودار ۱**- تعیین MIC مواد نگهدارنده در pH بهینه در باکتری استافیلوفیکوکوس ارئوس.




**نمودار ۲**- تعیین MIC مواد نگهدارنده در pH بهینه در باکتری لیستریا منوسایتوجنز.

## بحث

مواد نگهدارنده دارای جایگاه‌های اثر مختلفی در میکروارگانیسم‌ها هستند. نیتریت در pHهای اسیدی می‌تواند به نیتروزاسید تبدیل شود و مشخص شده که این ترکیب قادر است با مواد مختلفی نظیر میوگلوبین، اسکوربیک‌اسید، فنل‌ها، ساختمان دوم آمین‌ها، ترکیبات دارای گروه آمین، متالوپورفیرین‌ها و دستجات آهن- گوگردی واکنش دهد و رشد میکروارگانیسم‌های مختلف را مهار کند (۶).

فعالیت مهارکنندگی بنزوئیک اسید در pHهای پایین است، زیرا در این شرایط بعلت افزایش نفوذپذیری غشاء، فرم تجزیه نشده این ترکیب می‌تواند آزادانه از میان غشاء سیتوپلاسمی عبور کرده و وارد سلول شود و اثر خود رانشان دهد (۷).

محل اثر نایسین، غشاء سیتوپلاسمی است و می‌تواند منافذی را در غشاء تشکیل دهد که از طریق این منافذ ترکیبات ضروری مانند یون‌های پتاسیم، ATP و اسیدهای آمینه خارج می‌شوند. این امر باعث می‌شود که نیروی محرکه پروتونی (PMF) تحلیل رفته و در نهایت تمام فرآیندهای بیوسنتزی سلول متوقف شده و سلول باکتری از بین برود (۸).

در این پژوهش به بررسی تأثیر افزودن نایسین در کاهش MIC نیتریت‌سدیم و بنزوئیک‌اسید پرداخته شد و مشخص گردید که نایسین می‌تواند به طور قابل ملاحظه‌ای MIC نیتریت‌سدیم را در باکتری‌های گرم مثبت کاهش دهد و میزان آنرا در حد مجاز مصرف نیتریت ۲۰۰ppm قرار دهد. هم‌چنین نایسین توانست MIC بنزوئیک‌اسید را در باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس و لیستریا منوسایتوجنز از ۲۰۰ppm به حدود ۵۰ppm کاهش دهد.

گزارش‌های فراوانی در مورد اثر ترکیبی مواد نگهدارنده روی میکروارگانیسم‌های مختلف وجود دارد. Siragusa و Cutter در

Archive of SID
www.SID.ir

سال ۱۹۹۵ گزارش کردند که ترکیب نایسین با مهارکننده‌ها می‌تواند بر علیه اشریشیاکلی و سالمونلا مؤثر باشد (۹). Huncock و Chung در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که رابطه همکاری بین لیزوزیم و نایسین علیه باکتری‌های لاکتیک وجود دارد (۱۰). هم‌چنین حالت سینرژیسم بین نایسین و منولورین روی استرپتوکوکوس آگالاکتیه و بین نایسین و لوریک اسید روی لاکتوباسیلوس پلانتاروم نیز مشاهده شده است (۱۱).

Gill و همکاران در سال ۲۰۰۰ مشاهده کردند که ترکیب EDTA و نیتریت می‌تواند روی اشریشیاکلی و سالمونلا مؤثر باشد (۱۲ ). هم‌چنین Rayman و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که ترکیب ۴۰ppm نیتریت با ۱۰۰-۷۵ppm نایسین در اغلب موارد کاملاً رشد باکتری‌هایی نظیر کلاستریدیوم اسپوروجنز را مهار می‌کند. بنابراین ترکیب نایسین و نیتریت با یکدیگر اثر سینرژیتیک داشته و مشخص شده است که این میزان پایین نیتریت برای نگهداری رنگ گوشت کافی می‌باشد و از طرف دیگر اثرات سوء آن نیز کاهش خواهد یافت (۱۳). با توجه به اینکه نتایج این طرح در شرایط آزمایشگاهی بدست آمده است و از آنجایی که عوامل دیگری مانند ترکیب ماده غذایی، علاوه بر pH و دما بر روی MIC و MBC مواد نگهدارنده علیه میکرب‌ها مؤثر است، لازم است که نتایج این طرح در شرایط صنعتی نیز مورد بررسی قرار گیرد.

**تشکر و قدردانی**

بدین وسیله ازهمکاری کارکنان محترم آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم در انجام این تحقیق برگرفته از پایان نامه تشکر و قدر دانی می گردد.

## *REFERENCES*

1. Goldstein, David. "FDA finds benzene in soft drinks". Knight Ridder 2006-03-03.
2. Fan AM, Steinberg VE. Health implications of nitrate and nitrite in drinking water: an update on methemoglobinemia occurrence and reproductive and developmental toxicity. Regul Toxicol Pharmacol 1996; 23:35-43.
3. Ivanov VM. The 125th Anniversary of the Griess Reagent. Journal of Analytical Chemistry 2004; 59:1002-1005.
4. Noonpakdee W, Snativarangekna C, Jumriangrit P, Sonomot K, Panyim S. Isolation of nisin producing Lactococcus)
5. .lactis WNC20 from Nham, a traditional Thi. Int J Food Microbiol 2003; 81:137-45.
6. Ross RP, Morgan S, Hill C. Preservation and fermentation: past, present and future. Int J Food Microbiol 2002; 15; 79:3-16.
7. Fang FC. NO contest: nitric oxide plays complex roles in infection. ASM News 1997; 63:668-73.
8. Booth IR, Kroll RG. The preservation of foods by low pH. In: Gould GW, ed. Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures. London: Elsevier; 2006. p.119-60.
9. Chen H, Hoover DG. Bacteriocins and their food application. Comprehens Rev Food Sci Food Safety 2003;2:82-100.
10. Cutter C, Siragusa G. Population reductions of gram negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. J Food Prot 1995; 58:977-83.
11. Chung W, Hancock REW. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol 2000; 60:25–32.
12. Dawson PL, Han IY, Padgett TR. Effect of lauric acid nisin activity in edible protein packaging films. Poult Sci 1997; 76:74.
13. Gill AO, Holley RA. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenetic bacteria by lysosyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 °C. Int J Food Microbiol 2003; 2:251-59.
14. Rayman MK, Aris B, Hurst A. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. Appl Environ Microbiol 1981; 41:375-80.

Archive of SID

www.SID.ir