

بیست و یکمین کنفرانس ملی
علوم و صنایع غذایی ایران
۱۳۹۱

21st National Congress of Food Science and Technology
29 - 31 Oct 2011



بررسی

پژوهشگر محترم: دکتر سید محمد مهدی میرزاپور

پایان دوره شرکت علمی: دانشکده مهندسی صنایع، دانشگاه صنعتی امیرکبیر

درست و کج گزیده، همه در صحیح غذایی بیرون که در این آفرینش، ۱۳۹۱ و ۱۳۹۰ در کشور ایران، با همکاری و مشارکت علمی و تخصصی بیست و یکمین کنفرانس ملی علوم و صنایع غذایی ایران، برگزار گردید. این کنفرانس در راستای توسعه و ارتقای دانش و فناوری در صنعت غذایی و صنایع وابسته به آن، با هدف تبادل نظر و آشنایی با آخرین دستاوردهای علمی و فناوری در این زمینه، با حضور اساتید برجسته و دانشجویان محترم از دانشگاه‌های مختلف برگزار گردید. بدین مناسبت، به شما تبریک عرض می‌نمایم و امیدواریم که با بهره‌گیری از تجربیات و دستاوردهای این کنفرانس، در توسعه و ارتقای دانش و فناوری در صنعت غذایی و صنایع وابسته به آن، موفق گردید.

مهندس سید محمد مهدی میرزاپور
دانشکده مهندسی صنایع
دانشگاه صنعتی امیرکبیر



پایان
دوره شرکت علمی





کاربرد و مکانیسم عمل نایسین در مواد غذایی

ندا نیری^۱، محمد رضا عدالتیان دوم^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، رشته علوم و صنایع غذایی، گرایش میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

n_nayyeri66@yahoo.com

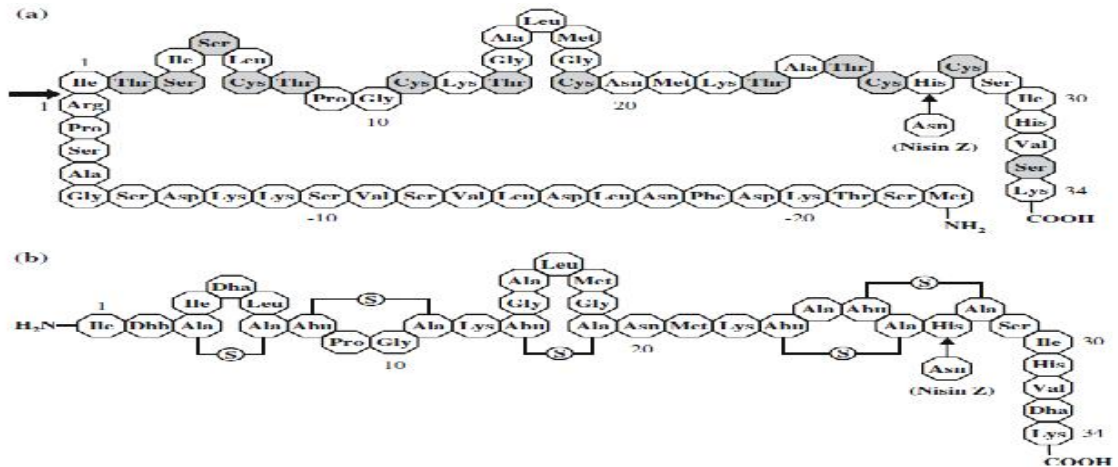
چکیده:

نایسین تولید شده توسط گونه‌های مختلفی از لاکتوکوکوس لاکتیس، به زیر گروهی از باکتریوسین‌ها به نام لانتی‌بیوتیک‌ها تعلق دارد. لانتی‌بیوتیک‌ها پپتید-های کوچک و مقاوم به گرما هستند و در ساختمان خود اسید آمینه لانتیونین و متیل لانتیونین دارند. لانتی‌بیوتیک‌ها به دو زیر گروه طبقه بندی میشوند؛ یکی از این زیر گروه‌ها که دارای ساختمان کشیده و انعطاف پذیر بوده و دارای بار مثبت است که به عنوان منفذ در ساختمان غشای گونه‌های هدف، نفوذ پذیر است. باکتریوسین نایسین عضوی از این گروه است. غشا سیتوپلاسمی هدف اصلی برای عمل نایسین است که عملکرد آن با ایجاد منفذ صورت میگیرد. نایسین‌ها از طریق بر هم کنش با ترکیبات فسفولیپیدی غشا سیتوپلاسمی توسط پیوند های یونی عمل میکنند. حساسیت باکتری‌های گرم منفی در مقابل نایسین محدود است که ناشی از دیواره سلولی غیر نفوذ پذیر نسبت به آن است. اثر نایسین بر اسپورها شدیدتر از سلولهای رویشی است و مراحل اولیه جوانه زنی را کنترل میکند.

واژه های کلیدی: "نایسین"، "باکتریوسین"، "لاکتوکوکوس لاکتیس"، "باکتری/اسید لاکتیک"

مقدمه:

نایسین در سال ۱۹۲۸ توسط Rogers و گروه کاری خود کشف شد. اثر باکتریوسیدی نایسین در برابر اکثر باکتری‌های اسید لاکتیک تایید شده است. 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 گونه های لاکتوکوکوس لاکتیس به دلیل خاصیت ممانعت کنندگی از رشد بسیاری از باکتری های گرم مثبت شامل پاتوژن ها و آلوده کننده های مواد غذایی، میکروارگانیزم های مولد فساد و برخی از باکتری های گرم منفی (که دچار آسیب دیدگی غشاء بیرونی گردیده اند) شدیداً مورد توجه می باشد. (Laridi et al, 2003). این ترکیب همچنین قادر به جلوگیری از جوانه زنی اسپورها است. همچنین مطالعات نشان می دهد نایسین قادر است رشد و تشکیل (اندو) اسپور در گونه های مختلف جنس کلستریدیوم و باسیلوس را تحت کنترل درآورد (Davidson et al, 2003). استفاده از نایسین به منظور افزایش مدت زمان ماندگاری و کنترل باکتری های نامطلوب در بسیاری از مواد غذایی از جمله پنیر رایج میباشد (Laridi et al 2003). نایسین در پنیر از رشد میکروب های مولد فساد و بیماری زا، نظیر گونه های اسپورزای هوازی و بی هوازی و گونه های لیستریا منوسیتوژنز جلوگیری می نماید. لیستریا منوسیتوژنز عامل بروز بیماری یهایی نظیر انسفالیت، مننژیت و یا سقط جنین در زنان حامله می باشد، که وجود آن در شیر خام و پاستوریزه گزارش گردیده است. (Laridi et al 2003). باکتری های اسید لاکتیک (LAB) تعدادی از مواد ضد میکروبی از قبیل اسید های آلی، پراکسید هیدروژن، آنزیم دی استیل، مهار کننده ها و باکتریوسین ها را تولید میکنند. قرن ها در تخمیر مواد غذایی، نه تنها برای طعم و بافت آن، بلکه به دلیل توانایی تولید مهار کننده های مشتق شده از آغازگر برای جلوگیری از رشد فساد و میکروارگانیزم های پاتوژن استفاده می شده است. (Stiles 1996 Daeschel 1992). این مهار کننده، باکتریوسین ها هستند یا همان پروتئین یا پپتید ضد باکتری که مانع رشد سایر باکتری ها، اغلب گونه های بسیار نزدیک به خودشان، در محیط زیست میشوند. این نشان دهنده یک گروه بزرگ از آنتاگونیستهای باکتریایی ناهمگن است که بطور قابل توجهی از نظر توده مولکولی، طیف وسیعی از میزبان ها، حساسیت و نوع عملکرد متفاوت می باشند. باکتریوسین ها ی تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیک که به علت استفاده بالقوه خود به عنوان یک ماده نگهدارنده غذایی مورد توجه خاص هستند. پپتید ضد میکروبی، نایسین، تولید شده توسط گونه های مختلفی از لاکتوکوکوس لاکتیس، به کلاس آباکتریوسین ها به نام لانتی بیوتیک، تعلق دارد که از نظر تجاری در نگهداری مواد غذایی استفاده میشود. (Klaenhammer 1993)



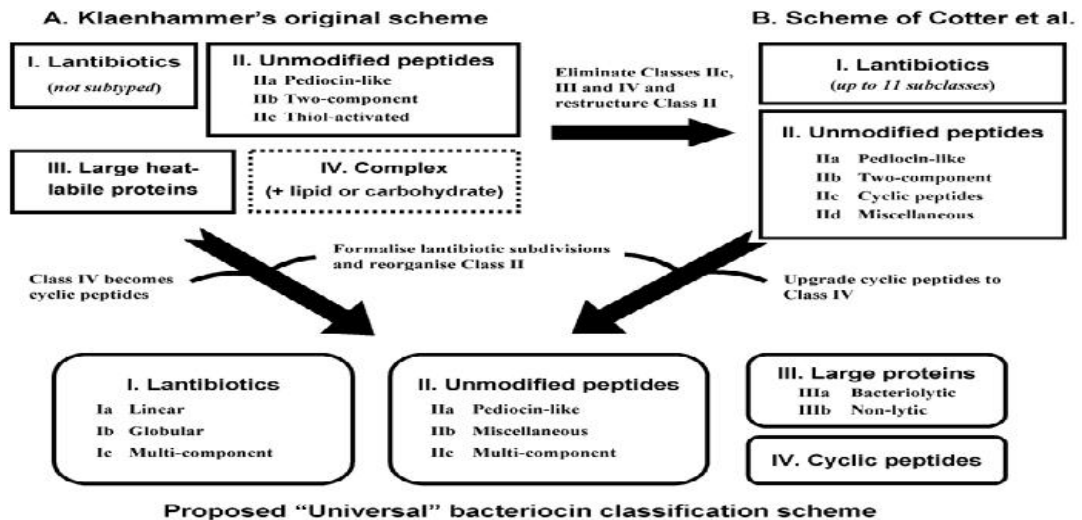
شکل ۱- نمایی از ساختار های پیش ساز نایسین (a) و نایسین رسیده (b).

نتایج و بحث:

باکتریوسین ها ، پپتید های ریبوزومی سنتز شده میباشند که دارای فعالیت ضد میکروبی بوده و توسط میکروب های مختلفی تولید میشوند. در سال های اخیر مقاومت آنتی بیوتیکی باکتریایی به عنوان یک مشکل اساسی مطرح شده است. باکتریوسین ها پپتید های غیر سمی تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیک هستند که دارای فعالیت ضد میکروبی بوده و به اسید و گرما مقاوم و سهل الهضم هستند. Kaiser و Montville مطرح کردند که باکتریوسین ها باید دارای دو ویژگی شاخص باشند. ۱. دارا بودن ماهیت پروتئینی ۲. عدم کشندگی بر سلول تولید کننده آنها. نامگذاری باکتریوسین ها معمولا بر اساس افزودن cin به آخر نام جنس یا گونه تولید کننده آن انجام می گیرد. طبقه بندی باکتریوسین ها بر اساس خواص بیوشیمیایی و ویژگی های ژنتیکی به ۳ گروه اصلی تقسیم بندی می شود. گروه اول: لنتی بیوتیک ها ؛ پپتید های کوچک و مقاوم به گرما هستند و در ساختمان خود اسید های آمینه methyllanthionine و lanthionine دارند. لنتی بیوتیک به دو زیر گروه تقسیم می شوند: زیر گروه اول که دارای ساختمان کشیده و انعطاف پذیر بوده و دارای بار مثبت است که به عنوان منفذ در ساختمان غشاء به گونه های هدف نفوذ پذیر است. باکتریوسین نایسین عضوی از این گروه است نایسین توسط لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه لاکتیس تولید می شود. نایسین در ابتدا به صورت پره نایسین تولید می شد که دارای ۵۷ اسید آمینه بود. سپس تغییراتی در اسید آمینه های آن بوجود آوردند که به پرونایسین تبدیل شد. و در نهایت باخروج ۲۳ اسید آمینه به نایسین فعال دارای ۳۴ اسید آمینه مبدل شد. زیر گروه دوم پپتید های کروی و دارای ساختمان سفت و محکم و دارای بار منفی یا خنثی هستند. آنها در واکنش های آنزیمی ضروری و حساس باکتری ها مداخله می کنند. گروه دوم: باکتریوسین های با وزن های مولکولی متغیر ، اما معمولا کوچک ، مقاوم به گرما و دارای اسید آمینه های منظم هستند . این گروه به ۳ زیر گروه تقسیم می شود. زیر گروه اول شامل پپتید های فعال در مقابل لیستریا است که از مهمترین آنها می توان sakacin P و pediocin PA-1 را نام برد. زیر گروه دوم شامل دو پپتید مکمل می باشد که شامل lactococcin G , plantaricins JK و plantaricins EF است. و زیر گروه سوم شامل پپتید های کوچک و مقاوم به حرارت است که بوسیله پپتید رهبر انتقال پیدا می کنند. باکتریوسین های divergicin A و acidocin B در این گروه قرار دارند گروه سوم: پپتید های بزرگ با وزن مولکولی بالای ۳۰ کیلو دالتون هستند. در این گروه باکتریوسین های helveticins J , helveticins V , acidofilicin A , lactacins A و lactacins B جای می گیرند. باکتریوسین ها می تواند به عنوان آنتی بیوتیک ها در نظر گرفته شوند ، اما باکتریوسین ها خصوصیات دارند که آنها را از آنتی بیوتیک ها از جهات مختلفی متمایز میکند : سنن ریبوزومی دارند، سلول های میزبان تولید کننده باکتریوسین نسبت به آنها ایمن هستند، نحوه عمل متفاوتی با آنتی بیوتیک ها دارند و هدف باکتریوسین ها دیواره سلولی میباشد. تولید کننده آن ها باکتری های گرم مثبت و گرم منفی می- باشند. طیف محدود ضد باکتریایی دارند و معمولا بر علیه گونه های نزدیک در این رابطه فعال میباشند. خواص هیدروفوبیک یا خواص آمفی فیلک (بخشی از مولکول آبگریز و بخشی دیگر آبدوست) دارند. باکتریوسین ها تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیک (LAB) بعنوان نگهدارنده های طبیعی توجه ویژه ای در سال های اخیر به دلیل کاربرد بالقوه خود را در صنعت مواد غذایی یافته اند. تقریبا تمام باکتری های جدا شده امروزه، تولید باکتریوسین میکنند ولی برای صنایع غذایی باکتریوسین ها ی تولید شده بوسیله باکتری های اسید لاکتیک ، به دلیل وضعیت خود و پوشش دادن استانداردهای GRAS مورد



توجه قرار دارند. باکتریوسین ها در 4 گروه عمده تقسیم شده اند. این طبقه بندی بر اساس ساختار اصلی نحوه عمل آنها می باشد: کلاس I یا لانتی بیوتیک، کلاس II، کلاس III و کلاس IV.



شکل ۲- مسیر های پیشنهادی جهانی برای طبقه بندی باکتریوسین ها

لانتی بیوتیک ها دارای اصلاحات پس از ترجمه یا اصطلاحاً Post-translational modifications هستند بدین معنی که اسید آمینه غیر معمول (به طور طبیعی در طبیعت یافت نمی شود مانند lanthionine) پس از ترجمه پدید می آید. کلاس پپتیدهای I متشکل از بیش از ۵۰ اسید آمینه است. کلاس باکتریوسین ها I توسط اسید آمینه های غیر معمول مانند lanthionine، متیل lanthionine، dehydrobutyrine و dehydroalanine مشخص می شود. پپتید ضد میکروبی نایسین، تولید شده توسط گونه های مختلفی از لاکتوکوکوس لاکتیس، که متعلق به کلاس I A باکتریوسین ها به نام لانتی بیوتیک که ۵ ویژگی اصلی به شرح زیر دارند: کوچکند (۳/۴ کیلو دالتونی)-دارای ۳۴ آمینو اسید در ساختار خود هستند-ترکیباتی کاتیونی هستند-دارای حلقه b-methyl lanthionine) که به طور عمده پس از مرحله ترجمه تشکیل می شود -مقاوم به حرارتند-قابلیت نفوذ در غشا را دارا می-باشند. دو نوع طبیعی دیگری از نایسین، نایسین A و Z، نیز گزارش شده است. آنها دارای ساختار مشابه و طیف ضد میکروبی نزدیک به هم هستند، اما در واحد باقیمانده اسید آمینه در موقعیت 27 متفاوتند که همان هیستیدین در نایسین A و اسپارازین در نایسین Z میباشد. تولید نایسین توسط لاکتوکوکوس لاکتیس نشان دهنده سینتیک سوخت و ساز اولیه است که در فاز رشد تنظیم و تولید می شود. این تفاوت اثری روی فعالیت ضد میکروبی ندارد اما باعث می شود nisZ حلالیت بیشتری و خصوصیت پخش شدن بهتری در مقایسه با nisA داشته باشد که برای کاربرد در صنایع غذایی اهمیت دارد (Laridi., 2003). سازمان خوشه ژن نایسین و بیوسنتز لانتی بیوتیک توسط تعدادی از باکتری های اسید لاکتیک و به طور کلی توسط خوشه های حاوی ژن کد گذاری میشود. رمزگذاری این ژن همچنین برای تولید، بلوغ و ایمنی سلول نیز کاربرد دارد. در چند گونه لاکتوکوکوس لاکتیس، بیوسنتز نایسین به صورت مجموعه ای میباشد که توسط یک خوشه از ۱۱ ژن کد گذاری شده است که به نظر میرسد با رونویسی مرتب، nisRK nisA (Z) BTCIP، nisFEG حاصل میشود. برای تولید لانتی بیوتیک ها ژن هایی لازمند که در کنار هم قرار می گیرند و عمل می کنند. ۱. ژن های ساختاری مثل lan A که در ساختار نقش دارد.

۲. ژن های ایمنی مثل lan E lan F lan G که سبب حفاظت باکتری از باکتریوسین های تولید شده توسط خود باکتری می شوند. ۳. ژن lan P که سبب عبور لنتی و پروس ها از میان غشاء می شود. ۴. دو ژن lan B lan C یا در بعضی مواقع ژن lan M که گمان می رود در تشکیل لنتی یونین و متیل لنتی یونین نقش داشته باشند. از این ژن ها، ژن nisA (Z) یا همان پیش ماده کد پپتید نایسین (Z) متشکل شده از ۵۷ اسید آمینه آزاد که حاوی ۲۳ اسید آمینه در بخش N تریمینال است که در اداره اصلاح و هدف قرار دادن روند پیش ماده نایسین موثر می باشد. nisB nisC مرتبط با رمزگذاری پروتئین های غشا بوده و در فرایندهای داخل سلولی پس از ترجمه و اصلاح دارای نقش میباشند.



مکانیسم عمل نایسین:

غشای سیتوپلاسمی، هدف اصلی برای عمل نایسین است، که با ایجاد منفذ صورت می گیرد. طبیعت انعطاف پذیر و خصوصیات آمفی فیلک مولکول نایسین نقش مهمی در عملکرد آن دارد. از طریق بر همکنش نایسین ها با ترکیبات فسفولیپیدی غشای سیتوپلاسمی توسط پیوند های یونی (با توجه به ماهیت کاتیونی نایسین) باکتریوسین های باکتری های اسید لاکتیک را می توان علاوه بر اساس ساختار، بلکه بر اساس نحوه عمل گروه بندی کرد. برخی از اعضای طبقه لانتی بیوتیک باکتریوسین ها، مانند نایسین، نشان داده اند به یک حالت دوگانه عمل میکنند: ۱. آنها می توانند به چربی II انتقال دهنده اصلی زیرواحدهای پپتیدوگلیکان از سیتوپلاسم به دیواره سلولی متصل شوند، و در نتیجه باعث جلوگیری از سنتز دیواره سلولی گردند و در نهایت منجر به مرگ سلول شوند ۲. آنها می توانند چربی II را به عنوان یک بخش اساسی از ساختار غشا خارج کرده و تشکیل منافذی در غشا سلول دهند که منجر به مرگ سلولی سریع میشود.

تولید نایسین:

تولید نایسین تحت تاثیر عوامل متعددی مانند سو به تولید کننده- ترکیبات مغذی محیط کشت-pH- دما سیستم هوادهی-همزن- و... است. همچنین جذب نایسین به سلول های تولیدکننده و تجزیه آنزیمی آن مربوط میگردد. کاهش محسوس در تولید نایسین بعد از رسیدن به نقطه اوج نتیجه تجزیه پروتئولیتیک یا جذب نایسین توسط سلول های تولیدکننده است. حلالیت و پایداری و فعالیت بیولوژیکی نایسین وابسته به pH محلول است و با کاهش pH به طور موثری افزایش می یابد. در فرایند تخمیر در pH < 6 بیش از 80% نایسین تولید شده به داخل محیط رها می شود. نایسین در pH=2 پایدار است و در آن شرایط میتواند در دمای ۱۲۱ درجه اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه بدون اینکه غیرفعال شود قرار گیرد. نایسین در شرایط خنثی و قلیایی تقریباً نامحلول است. مهمترین مشکل در تولید نایسین ممانعت از رشد ناشی از افزایش غلظت لاکتات و در نتیجه کاهش pH است. برای جلوگیری از تجمع لاکتات و جلوگیری از کاهش pH در سیستم تخمیری -روش های کنترل pH بوسیله افزودن ترکیبات قلیایی یا استخراج لاکتات توسط حلال های آلی پیشنهاد شده است.

نتیجه گیری کلی:

با وجود اینکه مواد نگهدارنده طبیعی (باکتریوسین ها) رشد باکتری های بیماریزا و مولد فساد را مهار می کنند، اما محدودیت هایی دارند، مانند طیف کم فعالیت آنها، عدم مهار باکتری های گرم منفی و مخمرها، ایجاد جمعیت های مقاوم در بین ارگانسیم های حساس و قیمت بالا. استفاده از نایسین به فرم آزاد درمواد غذایی، اقتصادی نبوده و بر تولید اسید و آرومای باکتری های آغازگر، اثر بازدارندگی دارد، در نتیجه کاهش رشد و تولید اسید را در پی خواهد داشت. علاوه بر این اضافه نمودن نایسین به فرم آزاد، می تواند محدودیت های دیگری را به دنبال داشته باشد. از جمله اینکه بخش اعظم نایسین به طور یکنواخت در بافت ماده غذایی پخش و توزیع نمیگردد و مقادیر بیشتری از نایسین مورد نیاز خواهد بود. روش جایگزین برای فرم آزاد، استفاده از گونه های استارتر تولیدکننده نایسین میباشد. از طرفی این راهکار نیز دارای محدودیت هایی است. اضافه نمودن گونه های مولد باکتریوسین (نایسین) در فرایند تولید رشد، تولید اسید و آرومای باکتری های آغازگر را تحت تاثیر قرار داده اسیدی کردن را به تأخیر انداخته و میزان لاکتوز باقیمانده در فرآورده نهایی را افزایش می دهد از این رو نهایتاً منجر به کاهش کیفیت محصول نهایی خواهد شد. به منظور حل مشکلات مذکور، انکپسولاسیون نایسین در گویچه های فسفولیپیدی می تواند راهکاری مناسب باشد این تکنیک میتواند توزیع مناسب و پایداری باکتریوسین را در شبکه ماده غذایی تضمین نماید. اتصال نایسین به غشاء لیپیدی سبب ایجاد تغییراتی در ساختار ثانویه پپتید می شود بر هم کنش بین نایسین و غشاء فسفولیپیدی، از طریق انتخاب ترکیب فسفولیپیدی مناسب کاهش یافته یا مهار می گردد.

منابع:

- 1) Arauz, L. J. , A. F. Jozala , G. S. Pinheiro , P. G. Mazzola, Jr., A. Pessoa & T. C. Vessoni Penna, (2008), Nisin expression production from *Lactococcus lactis* in milk whey medium. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83, 325-328.
- 2) Cheigh Chan-Ick & Yu-Ryang Pyun _ (2005) , Nisin biosynthesis and its properties . *Biotechnology Letters* 27: 1641-1648



- 3) Deegan, L. H., P. D. Cotter, C. Hill, & P. Ross, (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 1058-1071.
- 4) Fernández, L., S. Delgado, H. Herrero, A. Maldonado, & J. M. Rodríguez. (2008). The bacteriocin nisin, as effective agent for the treatment of Staphylococcal mastitis during lactation. *Journal of Human Lactation*, 24, 311-316.
- 5) Hurtado, A., N.B. Othman, N. Chammem, M. Hamdi, S. Ferrer, C. Reguant, A. Bordons, N. Rozès. (2011). Characterization of Lactobacillus isolates from fermented olives and their bacteriocin gene profiles *Food Microbiology*. 28, 1514-1518
- 6) Montville T. J, K. Winkowski & R.D. Ludescher. (1995). Models and Mechanisms for Bacteriocin Action and Application. *International Dairy Journal*, 5, 797-814,
- 7) Schneider N, K. Werkmeister, M. Pischetsrieder. (2011). Analysis of nisin A, nisin Z and their degradation products by LCMS/MS. *Food Chemistry, Volume 127, Issue 2, , Pages 847-854*