# بررسی اثر ضدمیکروبی نایسین استخراج شده از *لاکتوکوکوس لاکتیس* جدا شده از شیر بز بر برخی باکتری‌های عامل فساد مواد غذایی

هما خراسانی[۱]، **نادیا کاظمی پور***[۱]، سید منصور میبدی[۲]، سید محمد رضا خوشرو[۱]، محمد مهدی متقی[۱]

[۱]گروه میکروبیولوژی،واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران
[۲]گروه میکروبیولوژی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

**تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۱۷**

## چکیده

نایسین یک باکتریوسین، با دامنه عملکرد وسیع علیه باکتری‌های بیماری‌زای غذایی است. مضرات نگهدارنده‌های شیمیایی در موادغذایی، توجه محققان را به مواد طبیعی، از جمله نایسین جلب کرده است. در این پژوهش، خاصیت ضد میکروبی نایسین استخراج شده از *لاکتوکوکوس لاکتیس* جدا شده از شیر بز، ارزیابی شد. ۱۰ نمونه شیر بز از اطراف شهرستان کرمان، تحت شرایط سترون جمع‌آوری و باکتری‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* روی محیط انتخابی Eliker-Trimethoprim جدا شدند. سپس، آزمون‌های بیوشیمیایی برای شناسایی سویه‌های جداشده، انجام شد. برای تایید ژن نایسین از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. برای تأیید وجود نایسین استخراج شده باکتریایی، از HPLC استفاده شد. خاصیت ضدباکتریایی نایسین با روش انتشار از دیسک بر علیه سویه‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اسینتوباکتر بومانی* و *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی و سپس حداقل غلظت ممانعت‌کننده باکتریوسین با روش تهیه‌ی رقت‌های متوالی در میکروتیترپلیت انجام شد. یکی از ۴ سویه‌ی جداشده‌ی *لاکتوکوکوس لاکتیس* تخلیص و شناسایی شد و تحت شرایط بهینه‌ی رشد برای بررسی بیشتر انتخاب شد. حضور ژن نایسین در *لاکتوکوکوس لاکتیس* با پرایمر اختصاصی و روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تائید شد. مقدار پروتئین نایسین تولید شده ۴۱/۵ mg/kg بود. قطر هاله عدم رشد، به ترتیب برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اسینتوباکتر بومانی* و *سودوموناس آئروژینوزا* برابر با ۱۳ mm، ۱۷، ۱۴ و ۰ و حداقل غلظت ممانعت‌کننده ی رشد نایسین استخراج شده برای باکتری‌های یادشده در رقت‌های $10^{-5}$، $10^{-6}$، $10^{-5}$، $10^{-1}$ مشاهده شد. بنابراین، نایسین استخراج شده از *لاکتوکوکوس لاکتیس*، می‌تواند جایگزین مناسبی برای نگهدارنده‌های شیمیایی باشد.

**واژگان کلیدی:** نایسین، خاصیت ضدمیکروبی، شیر بز، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، *لاکتوکوکوس لاکتیس*

* n.kazemipour@iauk.ac.ir

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

## مقدمه

در دهه گذشته با افزایش تقاضای مصرف کنندگان برای غذاهای آماده تغییر مهمی در حوزه علوم غذایی مشاهده شده که سبب افزایش آگاهی از خطرات عوامل بیماری های غذازاد و مواد نگهدارنده شیمیایی آن‌ها شده است(۱). هنگام صحبت از نگهداری غذا، توجهات به باکتری‌های لاکتیکی، در محصولات غذایی جلب می‌شود. باکتری‌های اسید لاکتیک، میکروب‌هایی هستند که بشر سال‌هاست از آن‌ها برای تهیه انواع غذاهای فرآوری شده استفاده می‌کند. مطالعات نشان داده‌اند که خاصیت ضد میکروبی ناشی از باکتری‌های یادشده، مربوط به تاثیر باکتریوسین‌ها[1] و متابولیت‌هایی مانند لاکتیک‌اسید و هیدروژن پراکسید است. باکتری‌های اسید لاکتیک شامل باکتری‌های گرم مثبت، کوکسی یا میله‌ای و کاتالاز[2] منفی هستند که توانایی تولید لاکتیک اسید را به‌عنوان محصول نهایی تخمیر کربوهیدرات‌ها دارند. در طول دو دهه گذشته، کاربرد *لاکتوکوکوس لاکتیس*[3] به‌عنوان یک کارخانه موفق سلولی میکروبی گسترش پیدا کرده است(۳،۲).

تعداد زیادی از باکتری‌های لاکتیک اسید خواص ضدمیکروبی خود را در برابر عوامل بیماریزا، باکتری‌های مولد فساد، مخمرها و کپک‌ها با روش‌های مختلفی مانند تولید اسیدهای فرار، هیدروژن پروکساید، کربن دی اکساید، ممانعت رقابتی و تولید باکتریوسین‌ها اجرا می‌کنند (۵-۴). باکتریوسین‌ها پپتیدهای ضدمیکروبی تولید شده توسط تعداد بیشماری از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی هستند که منفعت خاصی در علوم غذایی دارند و در حال حاضر، تاریخچه طولانی مصرف امن آن‌ها نشان دهنده ارتباط مثبت آن‌ها با غذاها است. علاوه بر این، استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک یامتابولیت‌های آن‌ها، به‌عنوان عامل طبیعی و مسبب ارتقای سلامت برای نگهداری غذا پذیرفته شده است(۷، ۶، ۱).

باکتریوسین نایسین[4] در سال ۱۹۶۹ توسط سازمان غذا و کشاورزی، کمیته اختصاصی مواد غذایی سازمان بهداشت جهانی (JECFA) ارزیابی و در سال ۱۹۸۳ به لیست افزودنی مواد غذایی اروپا اضافه شد. این باکتریوسین در سال ۱۹۸۸ توسط FDA تایید شد. این ماده‌ی مقاوم به حرارت بار مثبت دارد و از ۳۴ اسیدآمینه با وزن مولکولی ۳۵۱۰ دالتون تشکیل شده است و در ساختار آن ۵ حلقه داخلی با پل‌های دی‌سولفیدی و بقایای لانتیونین و بتا متیل لانتیونین وجود دارد. نایسین با تأثیر بر روی غشاء سیتوپلاسمی، بر روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت تأثیر گذار است(۱۰، ۹، ۸،۴).

هدف از انجام این پژوهش غربالگری سویه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* از نمونه‌های شیر بز است. سپس سویه‌ای که بهترین شرایط رشد بهینه را تحت شرایط فیزیکوشیمیایی دما، اسیدیته و میزان نمک داشته باشد انتخاب و حضور ژن نایسین در آن بررسی می‌شود. پس از استخراج پروتئین، حضور پروتئین نایسین جداشده با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تأیید شد و پس از تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد آن، تاثیر ضدمیکروبی نایسین بر باکتری‌های شاخص مانند *سودوموناس آئروژینوزا*[5]، *اسینتوباکتر بومانی*[6]، *استافیلوکوکوس اورئوس*[7]، *باسیلوس سرئوس*[8] ارزیابی خواهد شد.

## مواد و روش‌ها

### جداسازی و شناسایی *لاکتوکوکوس لاکتیس*

تعداد ۱۰ نمونه شیر بز طی شرایط سترون از شهرستان‌های ماهان، جوپار و قریه‌العرب در استان کرمان جمع‌آوری و تحت شرایط سترون در دمای ۴ °C به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان انتقال داده شدند. ابتدا نمونه‌های شیر در محیط MRS broth به مدت ۴۸ h در دمای ۳۰ °C کشت و غنی‌سازی شدند. سپس، از هر نمونه غنی شده، رقت‌های

[1] Bacteriocins
[2] Catalase
[3] *Lactococcus lactis*

[4] Nisin
[5] *Pseudomonas aeruginosa*
[6] *Acinetobacter baumannii*
[7] *Staphylococcus aureus*
[8] *Bacillus cereus*

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

متوالی تهیه و بر روی محیط Eliker-trimethoprim که یک محیط انتخابی برای جداسازی و رشد *لاکتوکوکوس* است، کشت خطی داده شدند. پلیت‌های مربوطه به مدت h ۷۲ در دمای °C ۳۰ قرار گرفتند و از لحاظ رشد پرگنه باکتریایی بررسی شدند(۱۷،۱۶). کلونی‌های رشد یافته تخلیص و از نظر ریخت‌شناسی، رنگ‌آمیزی گرم و آزمون کاتالاز شناسایی اولیه شدند. رشد سویه‌های جداشده در دماهای مختلف °C ۱۰، ۴۰ و ۴۵ ، نمک۴ و ۵/۶ ٪ و اسیدیته ۹/۲ بررسی شدند(۱۸). آزمون‌های بیوشیمیایی شامل رشد در حضور ۰/۱ ٪ متیلن‌بلو در شیر، هیدرولیز آرژینین، تولید $CO_2$ از سیترات، تولید دی‌استیل و استوئین، تخمیر مالتوز و هیدرولیز نشاسته به‌منظور شناسایی *لاکتوکوکوس لاکتیس* انجام شد. سویه‌های برتر *لاکتوکوکوس لاکتیس* پس از شناسایی، در MRS broth (Merck) حاوی گلیسرول ۲۰ ٪ (v/v) در °C ۷۰- ذخیره شدند(۲۱، ۱۸-۵).

## بررسی وجود ژن نایسین در *لاکتوکوکوس لاکتیس*(L1)

بررسی وجود ژن نایسین در سویه انتخابی با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) انجام شد. برای اجرای این روش، ازپرایمرهای Fwd و Rev تهیه شده از شرکت تکاپوزیست، به‌عنوان جفت پرایمر برای دستیابی به طول تقریبی ۲۰۸ جفت باز با توالی‌های F: 5'ATAAGGAGGCACTCAAAATG3' و R: 3'TACTATCCTTTGATTTGGTT5' استفاده شد(۲۱).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی µl ۲۵ در دستگاه ترموسایکلر(Biometra) انجام شد. مخلوط واکنش در جدول ۱ نشان داده شده است.

**جدول۱. مقدار و مواد مورد استفاده در هر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز**

| ردیف | نوع ماده | مقدار مورد استفاده (µl) |
|---|---|---|
| ۱ | بافر PCR (10X) | ۲/۵ |
| ۲ | منیزیم کلراید mM ۵۰ | ۱/۵ |
| ۳ | مخلوط dNTP mM ۱۰ | ۰/۵ |
| ٤ | پرایمر F (pmol/µl ۱۰) | ۱ |
| ٥ | پرایمر R (pmol/µl ۱۰) | ۱ |
| ٦ | الگوی DNA (ng/µl ۲۰) | ۲ |
| ۷ | آنزیم Taq DNA پلیمراز(u/µ۵) | ۰/۳ |
| ۸ | آب مقطر دو بار تقطیر | تا ۲۵ |

**جدول۲. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز**

| فرایند | دما(°C) | زمان(min) |
|---|---|---|
| واسرشت سازی اولیه (جدایی دو رشته DNA) | ۹۴ | ۳ |
| واسرشت سازی هر چرخه | ۹۴ | ۱ |
| اتصال پرایمر به توالی هدف در DNA | ۵۷ | ۱ |
| بسط و ساخت رشته جدید | ۷۲ | ۱ |
| تکثیر نهایی | ۷۲ | ۱۰ |

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

در ادامه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز طبق مدل دمایی جدول ۲ در ۳۲ چرخه انجام شد (۲۱). محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ ٪ با ولتاژ ثابت ۷۵ V در بافر TBE ۰/۵X به مدت ۶۰ min الکتروفورز و سپس از آن توسط دستگاه ژل داک عکس‌برداری شد. از سویه استاندارد *لاکتوکوکوس لاکتیس* PTCC:۱۳۳۶ به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد(۲۱).

### بهینه‌سازی شرایط رشد *لاکتوکوکوس لاکتیس*(L1)

رشد سویه‌ی جدا شده حاوی ژن نایسین در محیط MRS در دماهای ۳۰°C، ۳۵ و ۴۰ ، اسیدیته‌ی ۵، ۷ و ۹ و غلظت نمک ۰، ۲ و ۴٪ در انکوباتور شیکردار با ۱۵۰rpm به مدت ۷۲ h بررسی و بهترین شرایط رشد سویه ی موردنظر با خوانش جذب نوری آن توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر نوری تعیین شد(۱۱).

### استخراج باکتریوسین نایسین با کمک لیزوزیم

استخراج با تیمار لیزوزیم بر اساس روش سیئو و همکاران(۲۰۰۷) انجام شد. سلول‌های باکتری در ml ۰/۸ بافر M Tris/HCl ۰/۱۵ ، اسیدیته ۶/۸ معلق و µl ۱۰۰ از mg/ml ۱۰ لیزوزیم به مدت min ۹۰ نگهداری شدسپس، µl ۱۰۰ نمونه بافر SDS اصلاح شده حاوی M ۰/۵ بافر HCl/Tris ، pH ۶/۸، (w/v) ٪ ۱۰ SDS، ۲۰ ٪ (w/v) گلیسرول ، ۱ ٪ آبی برومونفول ، ۱۰ ٪ (w/v) ۲- مرکاپتواتانول افزوده شد. سوسپانسیون در دمای °C ۱۰۰ به مدت min ۱۰ گرم و سپس در g ۱۳۰۰۰ به مدت min ۱۰ در °C ۴ سانتریفیوژ شد تا بقایای سلولی یا غیر پروتئینی تداخل‌کننده حذف شود. مایع رویی به‌دست آمده در دمای °C ۸۰ – تا زمان استفاده بعدی ذخیره شد(۲۲).

### تایید حضور پروتئین نایسین جداشده با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

دو نمونه *لاکتوکوکوس لاکتیس* PTCC:۱۳۳۰ (به‌عنوان کنترل مثبت) و سویه‌ی جداشده *لاکتوکوکوس لاکتیس*(L1) برای تشخیص حضور نایسین، با روش HPLC بررسی شدند. ستون با ژل سفادکس G100 پر شد و به‌عنوان فاز متحرک از بافر پتاسیم فسفات استفاده شد. نمونه‌ها روی ستون وارد و ستون توسط بافر شستشو شد تا کلیه پروتئین های متصل نشده از ستون خارج شوند. فراکنش‌های خارج شده از ستون فراکنش کالکتور جمع‌آوری شد و فعالیت باکتریوسین آن بررسی شد(۱).

### بررسی فعالیت ضدباکتریایی باکتریوسین نایسین بر علیه چهار باکتری مولد فساد مواد غذایی

فعالیت ضدباکتریایی باکتریوسین نایسین بر روی دو پاتوژن گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*) و دو پاتوژن گرم منفی (*سودوموناس آئروژنوزا*، *اسینتوباکتر بومانی*) با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار بررسی شد. باکتری‌ها در محیط MRS مایع تلقیح و تا رسیدن کدورت آن‌ها به کدورت نیم مک‌فارلند در دمای °C ۳۰ گرمخانه‌گذاری شدند. برای اطمینان از کدورت نیم مک‌فارلند، جذب نوری محیط‌کشت باکتریایی تلقیح شده در nm ۶۰۰ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در حضور شاهد بررسی شد. سپس µl ۱۰۰ از محیط‌کشت مایع حاوی کدورت نیم مک‌فارلند به محیط TSA اضافه و توسط سوآب سترون در شرایط آسپتیک به طور کامل پخش شد. سپس دیسک حاوی پروتئین نایسین در محیط قرار داده و از آب مقطر به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. سپس، پلیت در دمای °C ۳۷ به مدت h ۲۴ گرمخانه‌گذاری شدند و از لحاظ ایجاد یا عدم ایجاد هاله رشد ارزیابی شدند (۲۶-۲۳).

### تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کننده (MIC) نایسین با روش تهیه‌ی رقت‌های متوالی در میکروتیترپلیت

برای بررسی حداقل بازدارندگی رشد از روش تهیه‌ی رقت‌های متوالی در محیط مایع با استفاده از میکروتیترپلیت های پلی استایرنی ۹۶ خانه‌ای با ظرفیت ۳۰۰ میکرولیتری استفاده شد. µl ۱۵۰ محیط ذخیره نایسین صاف شده، به داخل چاهک اول که حاوی µl ۱۵۰ محیط TSB است، افزوده شد که برابر با رقت $10^{-1}$ است. سپس رقت‌های متوالی تا ۶ چاهک ادامه پیدا کرد و در مرحله بعد به هر چاهک µl ۱۰ از باکتری با کدورت نیم مک فارلند اضافه

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

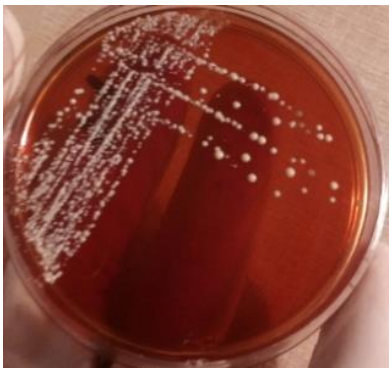
شد و پروتئین استخراج شده سویه استاندارد *لاکتوکوکوس لاکتیس* PTCC: ۱۳۳۰ به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. برای اطمینان از تعیین غلظت MIC، مقدار µl ۵۰ از هر چاهک بر روی محیط TSA لکه‌گذاری شد (۲۷،۱).

## نتایج

چهار پرگنه‌ی باکتریایی ازنمونه‌های شیر بز کشت داده شده در محیط Eliker- Trimethoprim جداسازی شد. پس از اطمینان از خلوص نمونه‌های باکتریایی (شکل ۱)، تست کاتالاز انجام شد. نتیجه آزمون کاتالاز بر روی این نمونه‌ها منفی بود. سپس، سویه‌های جداشده به طریقه‌ی بیوشیمیایی شناسایی شدند. این سویه‌ها قادر به رشد در دمای ۴ °C و ۱۰، غلظت ۴ ٪ سدیم کلرید، pH برابر با ۹/۲، شیر حاوی ۰/۱٪ متیلن بلو، غلظت ۴۰ ٪ صفرا و دآمیناسیون آرژینین بودند. در نهایت، شناسایی چهار سویه‌ی *لاکتوکوکوس لاکتیس* تأیید شد و از *لاکتوکوکوس لاکتیس* PTCC: ۱۳۳۰ به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

در نتایج بررسی بهینه رشد چهار سویه‌ی جداشده ی *لاکتوکوکوس لاکتیس*، سویه‌ی با بهترین رشد در شرایط بهینه انتخاب شد و بقیه آزمون‌ها بر روی آن انجام شد. شرایط رشد بهینه سویه‌ی برتر *لاکتوکوکوس لاکتیس*(L1) در جدول ۳ آورده شده است و مشخص شد که در عدم حضور نمک، دمای ۳۰°C و اسیدیته ۷ نسبت به بقیه شرایط رشد بهتری دارد. از *لاکتوکوکوس لاکتیس* PTCC:۱۳۳۰ به‌عنوان سویه‌ی مثبت استفاده شد.

در ادامه، نمودار شرایط بهینه رشد سویه‌ی L1 و *لاکتوکوکوس لاکتیس* PTCC:۱۳۳۰ رسم شد که در شکل ۲ (درصدهای نمک)، شکل ۳ (اسیدیته) و شکل ۴ (دما) آورده شده است.

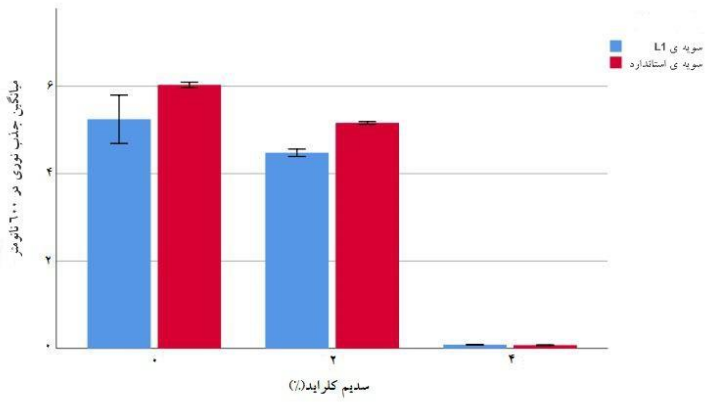


***شکل ۱. کشت خطی از لاکتوکوکوس لاکتیس***

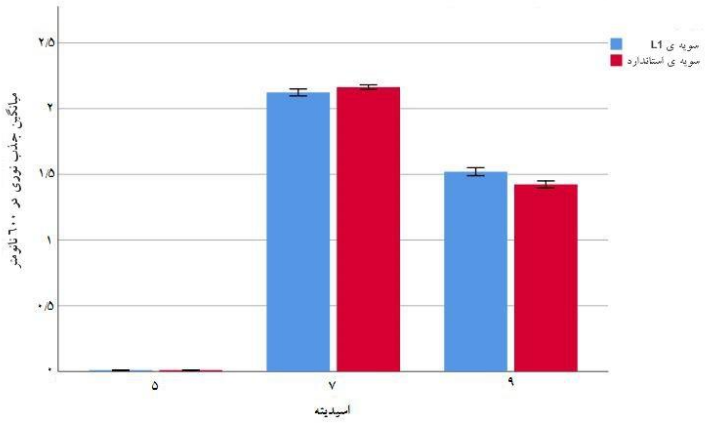
**جدول ۳. جذب نوری رشد سویه‌ی L1 و سویه‌ی استاندارد PTCC: 1330**

| نام | دما (°C) | | | | اسیدیته | | | نمک(٪) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ۳۰ | ۳۵ | ۴۰ | ۵ | ۷ | ۹ | ۰ | ۲ | ۴ |
| L1 | ۵/۵۱ | ۱/۳۱ | ۱/۱۸ | ۰/۰۱ | ۲/۱۰ | ۱/۵۴ | ۵/۵۱ | ۴/۴۲ | ۰/۰۹ |
| سویه استاندارد | ۵/۵۹ | ۱/۳۴ | ۱/۱۶ | ۰/۰۱ | ۲/۱۶ | ۱/۴۱ | ۶/۰۱ | ۵/۱۵ | ۰/۰۸ |

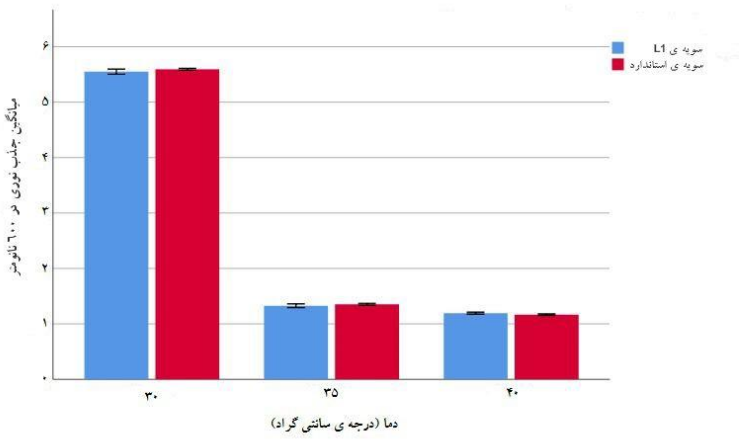
[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]




**شکل ۲. رشد سویه‌ی L1 و سویه‌ی استاندارد PTCC: 1330 در درصدهای مختلف نمک($P<0.05$)**




**شکل ۳. رشد سویه‌ی L1 و سویه استاندارد PTCC: 1330 در pH های مختلف($P<0.05$)**



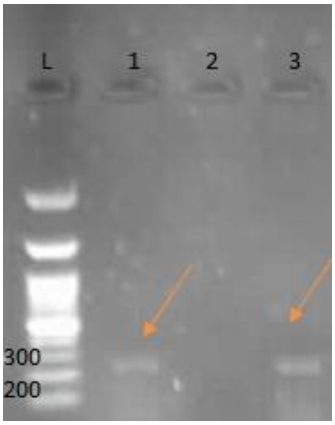

**شکل ٤. رشد سویه‌ی L1 و *سویه‌ی استاندارد* PTCC: 1330 در دماهای مختلف($P<0.05$)**

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

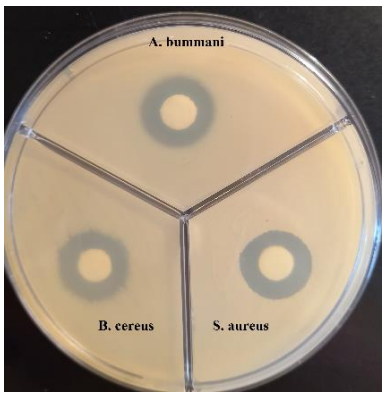
در ادامه نتایج حضور ژن نایسین با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در باکتری جداشده ی برتر، مشخص شد که نوار تشکیل شده در ژل الکتروفورز مشخص و در شکل ۵ آورده شده است.

نتایج کروماتوگرافی:*لاکتوکوکوس لاکتیس* PTCC: ۱۳۳۰ (به‌عنوان کنترل مثبت) و سویه‌ی جداشده هر دو طبق نایسین تجاری وارد شده به دستگاه، قابلیت تولید نایسین را به ترتیب به میزان ۵۹/۸ mg/kg و ۴۱/۵ داشتند. بنابراین، مشخص شد که *لاکتوکوکوس لاکتیس* جدا شده از شیر بز دارای پروتئین نایسین است. بررسی قطر هاله عدم رشد نشان داد که پروتئین استخراج شده از سویه‌ی جداشده ی *لاکتوکوکوس لاکتیس* که حاوی باکتریوسین نایسین است، بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و *اسینتوباکتر بومانی* اثر ضدمیکروبی دارد (شکل ۶) و منطقه ممانعت‌کننده از رشد ایجاد شده به ترتیب برای باکتری‌های نام برده شده برابر با ۱۳ mm ، ۱۷ و ۱۴ بوده است. از سویه‌ی استاندارد PTCC:۱۳۳۰ به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. این آزمون در سه تکرار انجام شد و نتایج در جدول ۴ آورده شده است.

قطر هاله عدم رشد در سویه‌ی جداشده(L1)، در *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* نسبت به قطر هاله عدم رشد سویه استاندارد PTCC: ۱۳۳۰ بیشتر است. در حالی‌که، قطر هاله عدم رشد مربوط به سویه استاندارد در *اسینتوباکتر بومانی* نسبت به قطر هاله عدم رشد سویه‌ی جداشده بیشتر شده است. حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد پروتئین حاوی نایسین سویه‌ی جداشده‌ی *لاکتوکوکوس لاکتیس* و سویه‌ی استاندارد PTCC:۱۳۳۰ بررسی شد که رقت MIC ایجاد شده در جدول ۵ آورده شده است.




**شکل ۵. به ترتیب از چپ به راست: L: خط کش، ۱: شاهد مثبت (PTCC: 1330)،۲: شاهد منفی،۳: سویه L1**




**شکل ٦. اثر ضد باکتریایی باکتریوسین نایسین**

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

**جدول ٤. نتایج قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط نایسین سویه L1 و نایسین استخراج شده از سویه استاندارد PTCC:۱۳۳۰**

| | قطر هاله بر حسب mm | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *استافیلوکوکوس اورئوس* | *باسیلوس سرئوس* | *اسینتوباکتر بومانی* | *سودوموناس آئروژینوزا* |
| **L1** | ۱۳ | ۱۷ | ۱۴ | ۰ |
| **سویه‌ی استاندارد** | ۱۰ | ۹ | ۴۱ | ۰ |

**جدول ۵. نتایج بررسی MIC نایسین سویه L1 و نایسین استخراج شده از سویه استاندارد PTCC:۱۳۳۰**

| | ***استافیلوکوکوس اورئوس*** | ***باسیلوس سرئوس*** | ***اسینتوباکتر بومانی*** | ***سودوموناس آئروژینوزا*** |
|---|---|---|---|---|
| **L1** | $۱۰^{-۵}$ | $۱۰^{-۶}$ | $۱۰^{-۵}$ | $۱۰^{-۱}$ |
| **سویه‌ی استاندارد** | $۱۰^{-۵}$ | $۱۰^{-۶}$ | $۱۰^{-۵}$ | $۱۰^{-۱}$ |

## بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر با مشخص شدن مضرات برخی از نگهدارنده‌های شیمیایی، محققین توجه خود را به استفاده از ترکیبات نگهدارنده طبیعی معطوف کرده‌اند. بیماری‌های منتقل شونده از طریق مواد غذایی هنوز از اهمیت بالایی برخوردار هستند. از شایعترین این بیماری‌ها می‌توان به بیماری‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی*[1]، *سالمونلا*[2] و *لیستریا مونوسیتوژنز*[3] اشاره کرد. مواد ضد میکروبی ترشحی، مانند باکتریوسین‌های باکتری های تخمیرکننده، مانند *لاکتوکوکوس لاکتیس*، می‌توانند جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی مانند، سولفور دی اکساید، بنزوئیک اسید، سوربیک اسید، نیترات و نیتریت باشند(۲۸،۱). در طول دو دهه گذشته، کاربرد *لاکتوکوکوس لاکتیس* به‌عنوان یک کارخانه سلولی میکروبی، به‌طور چشمگیری گسترش پیدا کرده است. باکتریوسین‌ها پپتیدهای فعال خارج سلولی هستند و یکی از انواع آن‌ها که اکنون در صنعت غذا کاربرد فراوان دارد، نایسین است. نایسین توسط *لاکتوکوکوس لاکتیس* بیان و ترشح شده و به‌عنوان نگهدارنده زیستی در فراورده‌های غذایی استفاده می‌شود (۱۹، ۶، ۲، ۱). نایسین تأثیر خوبی می‌تواند علیه باکتری‌های گرم مثبت داشته باشد و از رشد آن‌ها جلوگیری کند. اما بر باکتری‌های گرم منفی اثر چندانی ندارد. این ماده از طریق ایجاد سوراخ در غشای سیتوپلاسمی و مهار بیوسنتز دیواره سلولی موجب مرگ باکتری می‌شود (۲۹).

در پژوهش حاضر، *لاکتوکوکوس لاکتیس* جدا شده از شیر بز(L1) از نظر ریخت شناسی، رنگ‌آمیزی گرم و آزمون کاتالاز بررسی شد. سپس، با استفاده از رشد در دماهای ۱۰ °C، ۴۰ و ۴۵ ، نمک ۴ و ۵/۶ ٪، و pH ۹/۲ و همچنین، آزمون‌های بیوشیمیایی مانند رشد در حضور ۰/۱ ٪ متیلن‌بلو در شیر، هیدرولیز آرژینین، تولید کربن دی اکساید از سیترات، تولید دی‌استیل و استوئین، تخمیر مالتوز و هیدرولیز نشاسته شناسایی شد. مطابق با پژوهش محققانی چون ناگالاشمی و همکاران (۲۰۱۳)، خماریا و همکاران(۲۰۱۳)، این باکتری با کمک آزمون‌های بیوشیمیایی مشابه از نمونه‌ی شیر بز شناسایی شده است(۵، ۱۱). در پژوهش محمدی(۲۰۱۸) و میردامادی و همکاران (۱۳۹۳)، *لاکتوکوکوس لاکتیس* از پنیر جدا شده است(۱، ۳۰). همچنین، این باکتری توسط محققانی چون کیمیتو و همکاران(۲۰۰۴) و المایهو و همکاران(۲۰۱۴) از گیاهان و در پژوهش خماریا و همکاران(۲۰۱۳) از منابع لبنی و غیر لبنی جدا شده است(۳، ۵، ۱۲). در این مطالعه حضور ژن

[1] *Escherichia coli*
[2] *Salmonella*
[3] *Listeria monocytogenes*

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

نایسین با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مشخص شد و نوار تشکیل شده در ژل الکتروفورز مشخص و در ادامه فرایند استخراج پروتئین، با استفاده از SDS PAGE انجام شد. در پژوهش مالاس و همکاران(۲۰۱۷) تعیین ژن نایسین با روش PCR با پرایمر اختصاصی نایسین انجام شد(۴). در پژوهش حاضر نیز از این روش استفاده شد و نشان داده شد که در ناحیه ی ۲۰۰ جفت باز باند تشکیل داده است. اما در پژوهش خماریا و همکاران(۲۰۱۳)، ژن نایسین در ناحیه ۱۷۴جفت باز نوار ایجاد کرد(۵). در مطالعات میردامادی و همکاران(۲۰۱۰) و محمدی (۲۰۱۸)، *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه لاکتیس توانایی تولید باکتریوسین نایسین را داشت و پس از تخلیص و الکتروفورز نشان داد که می تواند یک نگهدارنده زیستی در فراورده‌های غذایی باشد(۱، ۳۰).

در پژوهش حاضر در انطباق با مطالعه‌ی خماریا و همکاران(۲۰۱۳)، *لاکتوکوکوس لاکتیس* در مقابل باکتری های گرم مثبت و گرم منفی فعالیت ضدمیکروبی نشان داده است(۵). در این بررسی قطر هاله عدم رشد پاتوژن‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و پاتوژن گرم منفی *اسینتوباکتر بومانی* به ترتیب mm ۱۳ ، ۱۷ و ۱۴ بود که نشان از خاصیت ضدمیکروبی سویه جداشده دارد، در صورتی که قطر هاله عدم رشد برای *باسیلوس سرئوس* در پژوهش مالاس و همکاران(۲۰۱۷) mm ۹ بوده است(۴). در مطالعه میردامادی و همکاران(۲۰۱۴)، تولید نایسین از *لاکتوکوکوس لاکتیس* در دو محیط M17,MRS بررسی شد و نشان داد این تولید در محیط MRS بهتر انجام می‌شود. همچنین، در آن پژوهش نشان داده شد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسایتوژنز* در اسیدیته ی برابر با ۴/۷، در°C ۸ به نایسین حساس هستند(۱). در پژوهش حاضر تولید نایسین در محیط MRS انجام شد و نشان داد *استافیلوکوکوس اورئوس* در شرایط بهینه اسیدیته ی ۷ ، در دمای °C ۳۰ ، هاله مهارکننده رشد ایجاد می کند. میردامادی و همکارانش(۱۳۹۳) در مطالعه دیگری، نشان دادند در محیط کشت و پنیر فتا *استافیلوکوکوس اورئوس* با وجود حساسیت کمتر به نایسین، مهار می‌شود و تعداد *اشرشیاکلی* با وجود مقاومت به نایسین در کشت توام افزایش نمی‌یابد و حتی روندی کاهشی نشان می‌دهد. در این پژوهش رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* مهار شد، اما *اشرشیاکلی* به آن مقاومت نشان داد. در نهایت نشان داده شد استفاده از *لاکتوکوکوس لاکتیس* تولید کننده‌ی نایسین در افزایش کیفیت محصول مؤثر است و مانع رشد باکتری های بیماری‌زای مهم می‌شود(۱). در پژوهش حاضر سویه‌ی L1 تولید کننده‌ی نایسین که از شیر بز جدا شد، باعث مهار رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* شد که با روش انتشار از دیسک ثابت شد. در مطالعه مال و همکاران (۲۰۱۰) تولید نایسین تحت تأثیر پارامترهای فیزیکی بررسی شد و نشان داد این تولید به شدت تحت تأثیر حضور شیر بدون چربی در محیط MRS است. حداکثر تولید نایسین در دمای °C ۳۰ و دمای مطلوب برای تولید زیست توده °C ۳۷ بود(۱۵). در مطالعه حاضر بدون در نظرگرفتن پارامترهای فیزیکی، دمای بهینه برای تولید نایسین °C ۳۷ بود.

در مطالعه خسرو محمدی(۱۳۹۶)، از ۱۸ سویه‌ی جداشده از شیر خام و پنیر، ۴ جدایه برای تولید نایسین مثبت شدند و رشد باکتری‌های گرم مثبت بیماری‌زای غذایی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *کلستریدیوم پرفرنجنز* و *لیستریا مونوسایتوژنز* را با روش لکه گذاری روی آگار متوقف کرد. آزاد و همکاران(۲۰۲۱)، ۱۵ سویه *لاکتوکوکوس لاکتیس* را از شیر بز و گوسفند در محیط M17 جدا کردند که با آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شد. شرایط بهینه برای تولید باکتریوسین با روش Taguchi statistical در انواع دما، اسیدیته و زمان گرمخانه‌گذاری انجام شد. سپس، فعالیت ضدباکتریایی باکتریوسین روی سویه‌های استاندارد پاتوژن غذازاد با روش انتشار در چاهک اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج، مایع رویی به‌دست آمده از کشت *لاکتوکوکوس لاکتیس* I8 که از شیر بز جدا شده بود، فعالیت ضدباکتریایی بر علیه *سالمونلا تیفی موریوم*، *شیگلا فلکسنری* و *استافیلوکوکوس*

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

*ارئوس* نشان داد در حالی‌که، *اشرشیاکلی* به آن مقاوم بود.در آن پژوهش نشان داده شد که اسیدیته‌ی ۷، دمای °C ۲۶ و h ۲۲ دوره گرمخانه‌گذاری بهترین شرایط برای تولید باکتریوسین هستند. فعالیت ضدمیکروبی این سویه در مقابل *شیگلا فلکسنری* و *سالمونلا تیفی موریوم*، آن را به‌عنوان یک کاندید خوب به‌عنوان سویه‌ی پروبیوتیک و نگهدارنده ی مناسب غذایی معرفی می کند(۳۰، ۳۱).

تفرشی و همکاران در مطالعه‌ی دیگری(۲۰۱۰)، شناسایی، جداسازی، تخلیص و بررسی طیف اثر باکتریوسین‌های چند سویه *لاکتوباسیلوس* بومی جدا شده از محصولات لبنی ایران را انجام دادند. در آن مطالعه همچون پژوهش حاضر برای تعیین فعالیت باکتریوسینی سویه‌ها از روش چاهک استفاده شد و اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد پاتوژن‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* نشان داد که سویه‌های جدا شده در این دو پژوهش خاصیت ضدمیکروبی مشابهی دارند. برای اندازه‌گیری باکتریوسین تولیدشده‌ی سویه‌های بومی در پژوهش میردامادی و پژوهش حاضر از روش کروماتوگرافی استفاده شد و سپس خاصیت ضدمیکروبی آن‌ها تایید شد(۱۹). در مطالعه قشونی زاده و همکاران(۱۳۹۴)، نقش نایسین بر رشد و بقاء *استافیلوکوکوس اورئوس* در گوشت چرخ کرده، بررسی شد. بر آن اساس، مقادیر مختلف نایسین بر رشد باکتری مورد مطالعه تاثیر معنی‌داری داشت و البته با گذشت زمان از خاصیت مهارکنندگی نایسین بر رشد *استافیلوکوکوس ارئوس* کاسته شد(۳۲).

در مطالعه شارما (۲۰۱۷) از ۱۲۰ سویه‌ی جداشده‌ی لاکتیکی از شیر، ۶۸ سویه فعالیت ضدباکتریایی داشتند که همچون پژوهش حاضر با استفاده از ویژگی‌های ریخت شناسی و آزمایش‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. در آن مطالعه با استفاده از رسوب آمونیوم سولفات، کروماتوگرافی تبادل کاتیونی و فیلتراسیون ژل Sephadex G-50 باکتریوسین خالص شد. در حالی‌که، در پژوهش نایسین یک نگهدارنده زیستی مناسب با پتانسیل افزایش ایمنی و افزایش طول عمر محصولات غذایی است(۲۴).

حاضر روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و ستون با ژل سفادکس G100 و بافر پتاسیم فسفات در تخلیص استفاده شد(۳۳). در پژوهش آبتس و همکاران(۲۰۱۱) برای تخلیص از کروماتوگرافی تبادل کاتیونی در pH پایین با استفاده از شستشوی ۵ مرحله‌ای NaCl استفاده شده است(۳۴). باکتریوسین‌های جداشده در پژوهش شارما نسبت به طیف گسترده‌ای از عوامل میکروبی مانند *سالمونلا تیفی، لیستریا مونوسیتوژنز، کلستریدیوم پرفرنجنز، باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، شیگلا فلکسنری، انتروکوکوس فکالیس* مؤثر بودند. باکتریوسین مربوطه در اسیدیته ی ۷ و دمای °C ۳۵ پس از h ۲۴ گرمخانه‌گذاری در محیط مایع MRS همراه با ۱/۵ ٪ Tween-80 بهینه شد. شرایط بهینه در سویه جداشده ی این پژوهش، در MRS broth عاری از Tween-80 و در اسیدیته ۷ و دمای °C ۳۷ تعیین شد(۳۳).

هولکاپکووا و همکاران(۲۰۱۷)، محتوای نایسین جدا شده از نمونه‌های آب پنیر را با کمک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و الکتروفورز تعیین کردند که همچون پژوهش حاضر بود. فعالیت ضدمیکروبی نایسین با استفاده از روش انتشار در چاهک با استفاده از *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان میکروارگانیسم شاخص تعیین شد. با تلقیح معادل کدورت نیم مک فارلند باکتری روی محیط مولر هینتون آگاری که به چاهک های آن g/ml ۲۵ نایسین اضافه کرده بودند کشت انجام شد. سپس این کشت ها به مدت h ۲۴ در دمای°C ۳۵ نگهداری شدند. پس از گرمخانه‌گذاری، قطر مناطق بازدارنده اندازه‌گیری شد که همچون پژوهش حاضر نشان دهنده خاصیت ضدمیکروبی نایسین است(۳۵).

هاونهلم و همکاران(۲۰۱۳) فعالیت ضدمیکروبی سویه جداشده را با آزمون انتشار در ژل بررسی کردند. طیف گسترده‌ی این فعالیت در برابر باکتری‌های مولد فساد و پاتوژن‌های منتقله از غذا در آن پژوهش نشان می‌دهد

در مورد مشابه مورنو و همکاران(۲۰۰۰) گزارش کردند *L. lactis subsp. ITAL 383* باکتریوسینی با طیف

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

گسترده تولید می‌کند که فعالیت شبیه به نایسین *L. lactis subsp. lactisATCC11454* دارد و میکروارگانیسم‌های گرم مثبت از جمله *لیستریا مونوسایتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را مهار می‌کنند اما در برابر باکتری‌های گرم منفی غیر فعال است (۳۷). نونپاکدی و همکاران(۲۰۰۳) گزارش دادند که سویه *L. lactis WNC 20* باکتریوسینی تولید می کند که برخی از پاتوژن‌های منتقله از غذا از جمله لیستریا *مونوسایتوژنز*، *کلستریدیوم پرفرنجنز*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را مهار می‌کند. علاوه بر این، نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر با مطالعات قبلی مطابقت دارد و نشان می‌دهد که نایسین تولیدی توسط سویه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* دارای فعالیت ضدمیکروبی در برابر سویه‌های باکتریایی گرم مثبت مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* است(۳۸).

سیمک و همکاران(۲۰۰۹) تأثیر شرایط رشد مانند محیط‌کشت، اسیدیته و دماهای مختلف بر تولید نایسین توسط سویه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* بیومهندسی شده و وحشی را بررسی کردند و اسیدیته مناسب بسته به سویه تولیدکننده نایسین از ۵/۵ تا ۶/۸ متغیر است و نایسین Zتولید شده توسط سویه *L. lactis IO-1* در اسیدیته‌ی برابر با ۶ بیشترین میزان خود را داشت. طبق پژوهش‌ها آن‌ها هر دو سویه وحشی و مهندسی شده در اسیدیته برابر با ۶ بیشترین تولید نایسین را داشتند و نوع وحشی و سویه‌های نوترکیب رفتارهای مشابهی از نظر رشد سلولی در هر یک از دماهای آزمایش شده نشان دادند. رشد سلولی همه سویه ها در دمای ۲۵ °C کمتر از۳۰ °C و ۳۷ بودند با این حال، فعالیت‌های نایسین به‌دست‌آمده در دمای ۳۰ °C نسبت به سایر دماها بالاتر بود. در پژوهش حاضر بنا به نوع سویه جداشده اسیدیته ی مناسب برابر با ۷ و دمای بهینه مشابه پژوهش سیمسک و همکاران برابر با دمای ۳۰ °C بود(۳۹).

طبق مطالعات اکبر و همکاران(۲۰۱۶) و سایر پژوهشگران، دیدگاه‌های صنعتی باکتری‌های اسید لاکتیک برای استفاده به‌عنوان نگهدارنده زیستی و ایمنی مواد غذایی بررسی شده است(۴۰). طبق این پژوهش و مطالعه لوپز و همکاران(۲۰۱۶)، سعید و همکارن(۲۰۱۴)، زاچاروف و همکاران(۲۰۱۲)، آرائوزا و همکاران(۲۰۰۹)، موکوتنا(۲۰۱۷) و دیگر پژوهشگران، تا به امروز نایسین تنها آنتی بیوتیکی است که به‌عنوان یک مکمل غذایی مجاز استفاده می‌شود و بهترین جایگزین در مقابل مواد نگهدارنده مضر است(۸، ۹، ۲۹، ۴۱، ۴۲). بنابراین، دانشمندان اکنون در حال گزارش باکتریوسین‌های تولیدی از میکروارگانیسم ها به خصوص *لاکتوکوکوس لاکتیس*ها هستند که به خوبی اهمیت پژوهش بر سویه‌های تولید کننده مواد زیستی در محافظت از فراورده‌های غذایی و دارویی را نشان می‌دهد. همچنین امکان غنی‌سازی و تخلیص باکتریوسین در شرایط آزمایشگاهی و کاربرد آن برای کنترل باکتری‌های بیماری‌زا وجود دارد و در پژوهش حاضر، صحت اثربخشی باکتریوسین نایسین بر میکروب‌های بیماری‌زا به خوبی مشخص شده است.

## منابع


1- Mirdamadi S, Agha Ghazvini Sh. comparative study between inhibitory effect of *L. lactis* and nisin on important pathogenic bacteria in Iranian UF Feta cheese. Biological Journal of Microorganism, 2015; 3(12):72-92

2- Song A, L.A.In L, Lim S. H. E, Abdulrahim R. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. 2017; 16:55

3- Alemayehu D, Hannon J A, McAuliffe O, Ross R. P. Characterization of plant-derived lactococci on the basis of their volatile compounds profile when grown in milk. International Journal of Food Microbiology.2014; 172: 57–61.

4- Malas B, Mihamad M, Yazji S. Nisin production condition optimization and its effect on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. I. F. R. J., .2017; 24(2):900-903

5- Khemaria P, Singh, S, Nath G, Gulati A K. Isolation, Identification, and Antibiotic Susceptibility of nis+ *Lactococcus lactis* from

6- Fahim H. A, Khairalla A.S, Elgendy A.O. Nanotechnology: A valuable strategy to improve

Dairy and Non-dairy Sources. Czech J. Food Sci.2013; 31(4):323–331


[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

19- Tafreshi S. H, Mirdamadi S, Norouzian D, Khatami S, Sardari S. Effect on non-nutritional factors on nisin production. Journal of Biotechnology, 2010; 9(9): 1382–1391

20- Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K.H, Stackebrandt E. The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria.2006; 4: 212

21- El-hadedy D.E., El-gammal E.W. Cloning of nis gene and Nisin purification from *Lactococcus lactis* subsp. Lactis Fc2. African journal of biotechnology. 2014; 13(53):4711-4719

22 -Sieo C.C, Wong B.T, Abdullah N, Ho Y.W. Effects of Extraction Methods and Age of Cells on the Whole-cell Protein Patterns of *Lactobacillus*. Research Journal of Microbiology, 2007; 2: 727-734

23- Badr S, Abdel karem H, Hussein H, El-hadedy D. Characterization of Nisin Produced by *Lactococcus lactis*. International journal of agricultur & biology, 2005; 7(3):499–503

24- Hwanhlem N, Biscola V, El-Ghaish Sh, Jaffre`s, Dousset E , Haertle Th, H-Kittikun A , Chobert J-M. Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Mangrove Forests in Southern Thailand as Potential Bio-Control Agents: Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis subsp. lactis KT2W2L*. Probiotics & Antimicro, Prot. 2013; 5:264–278

25- Todorov S.D. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. Brazilian Journal of microbiology. 2008; 39(1):178–187

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

27-Moshtaghi H, Rashidimehr A, Shareghi B. Antimicrobial Activity of Nisin and Lysozyme on Foodborne Pathogens *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* at Different Ph. JNFS. 2018; 3(4): 193-201

28- Suganthi V E, Selvarajan C, Subathradevi V, Mohan Srinivasan. Lantibiotic nisin: natural preservative from *Lactococcus lactis*. International research journal of pharmacy, 2012; 3(1): 13-19

29- Saeed M, Alikhan W, Shabbir M, Issakhan M, Randhawa M.a, Yasmin I. Bacteriocins as a natural bacteriocin formulations. Fronitiers in microbiology.2016; 7

7- Gomes Bruna C, Lizzianek. Winkelstroter, Fernanda B. dos Reis, Elaine C.P.De Martinis, Biopreservation, chapter 11Food microbiology and food safety.2009; 294-311

8- Zacharof M.P, Lovittb R.W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria،A Review Article. Biological & Environmental Engineering Society, 2012; 2:50 – 56

9- Lopez – cuellar Ma. DR, Rodriguez- Hernandez A-I, chavarria- Hernandez N. LAB Bacteriocins in the last decade, review food biotechnology. Biotechnology Biotechnological Equipment.2016; 30 (6):1039-1050

10- Moosavy M, Shaveisi N, Effect of temperature, NaCl concentration and pH on anti-Listerial activity of nisin, Iranian Food Science and Technology Research Journal, 2015; 11(2): 211-217

11-Nagalakshmi P.K, Sumathi R., Kanimozhi K, Sivakumar T. Isolation of bacteriocin nisin producing *Lactococcus lactis* from dairy products. J. Acad. Indus. Res. 2013; 1(10):627-630

12- Kimoto H, Nomura M, Kobayashi M, Okamoto T, Ohmomo S. Identification and probiotic characteristic of *Lactococcus* strains from plant materials. Jpn. Agric. Res. Q, .2004; 38:111–117

13- Jozala A.F, de Lencastre Novaes L.C, Cholewa O, Dante M, Vessoni Penna T.C. Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. African Journal of Biotechnology, 2005; 4 (3):262-265

14- Samaržija D, Antunac N, Luka Havranek J. Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. Mljekarstvo. 2001;51 (1): 35-48.

15- Mall P, KumarMohanty B, Patankar D.B, Mody R, Tunga R .Physiochemical Parameters Optimization for Enhanced Nisin Production by *Lactococcus lactis* (MTCC 440).2010;53 (1):203-209

16- Svec P, Sedlacek I. Characterization of *Lactococcus lactis* subsp. Lactis isolated from surface waters. Folia Microbial.2008; 53(1):53-56

17- Mebrouk K, Djamal S,Miloud H. Trimethoprim and rifampicin a new selected culture medium with for with for the growth of *Lactococcus lactis* species. J Bacterial Parasitol.2017; 8(6):86

18- Kumari A, Akkoc N, Akcelik M. Purification and partial characterization of Bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* ssp. lactis LL171. World J Microbiol Biotechnol, 2012; 28:1647–1655

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

antimicrobial agent in food preservation: A review. pak. J. food sci. 2014; 24 (4), 244-255

30- Mohamadi Kh. Isolation and identification of nisin producer strains of *Lactococcus lactis* from Lighvan cheese. Journal of food hygiene.2018; 7(28):1-13

31- Azad A, Naghavi NS, Karbasizade V. Optimization and antibacterial activity of Bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolates from dairy products against Foodborne Pathogen. International Journal of Molecular and Clinical Microbiology, 2021; 11(1): 1416-1422

32- Ghoshoonizade R, Hoseini E, Mahasty P, Shabani Sh.The antimicrobial effect of nisin, against *Staphylococcus aureus* in minced sheep during refrigerated storage.JFM.2015; 2(4):69-77

33 - Sharma M .Production of a nisin-like bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis ccsu1011* strain isolated from milk. Int. J. Adv. Res.2017; 5(8): 1857-1870

34- Abts A, Mavaro A, Stindt J.Easy and Rapid Purification of Highly Active Nisin. International Journal of Peptides.2011, 1-9

35- Holcapkova P, Kolarova Raskova Z, Hrabalikova M, SalakovaA, DrbohlavJ, Sedlarik V . Isolation and Thermal Stabilization of Bacteriocin Nisin Derived from Whey for Antimicrobial Modifications of Polymers. International Journal of Polymer Science.2017, 1-7

36 - Hwanhlem N, Biscola V, El-Ghaish Sh, Jaffre`s E, Dousset X, Haertle Th, H-Kittikun A, Chobert J. Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Mangrove Forests in Southern Thailand as Potential BioControl Agents: Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. lactis KT2W2L. Probiotics & Antimicro, Prot. 2013; 5:264–278

37- Moreno I, Lerayer ALS, Baldini VLS, de Leita˜o MF F. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. Braz J Microbiol. 2000; 31:183–191

38- Noonpakdee W, Santivarangkna C, Jumriangrit P, Sonomoto K, Panyim S. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage.Int J Food Microbiol. 2003; 81:137–145

39- Simek O¨, Con A. H., Akkoc N. ¸ Saris P. E. J, Akcelik Mustafa .Influence of growth conditions on the nisin production of bioengineered *Lactococcus lactis* strains. J Ind Microbiol Biotechnol, 2009; 36:481–490

40- Akbar A, Ali I, Anal1 A. K. Industrial perspectives of lactic acid bacteria for biopreservation and food safety. The Journal of Animal & Plant Sciences, 2016; 26(4): 938-948

41- Arauza L, Jozalaa A, Gava Mazzolab P, Penna T. Nisin biotechnological production and application: a review Trends in Food Science & Technology. 2009; 20:146-154

42- Mokoena MP. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. Molecules, 2017; 22, 1255

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]

# Antimicrobial effect of nisin extracted from *Lactococcus lactis* isolated from goat milk on some bacteria causing food spoilage

Homa Khorasani[1], **Nadia Kazemipour**[*1], Seyed Mansour Meybodi[2], Seyed Mohammadreza Khoshroo[1], Mohammadmehdi Motaghi [1]

[1]Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran
[2]Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

**Abstract**

Nisin is a biological bacteriocin with many functions against food pathogenic bacteria. The disadvantages of chemical preservatives in foods have attracted attention to natural preservatives such as nisin. This study evaluated the antimicrobial properties of nisin extracted from *Lactococcus lactis* isolated from goat milk. Ten goat milk samples were collected from around Kerman city under sterile conditions, and *Lactococcus lactis* were isolated in the selected environment of Eliker-trimethoprim. Biochemical tests were used to Strain identification and nisin gene confirm by polymerase chain reaction with specific primers was used. HPLC method was used to confirm the presence of nisin using bacterially extracted proteins. The antibacterial properties of nisin were performed by disk diffusion agar method against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa*. The minimum inhibitory concentration of bacteriocin was performed by Provide serial dilution in a microtiter plate. One of the four strains of *Lactococcus lactis* was identified and selected with the best growth conditions for further investigation. The presence of the nisin gene in *Lactococcus lactis* was confirmed by a specific primer and polymerase chain reaction method. The amount of nisin produced protein was 41.5 mg/kg. The diameter of inhibitory zone for *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa* were 13, 17, 14, and 0, respectively, and minimum inhibitory concentrations for extracted nisin were in dilutions of $10^{-5}$, $10^{-6}$, $10^{-5}$ and $10^{-1}$, respectively. Therefore, nisin extracted from *Lactococcus lactis* in goat milk can be a suitable substitute for chemical preservatives.

**Keywords**: Antimicrobial properties, nisin, Goat milk, High-performance liquid chromatography, *Lactococcus lactis*

* n.kazemipour@iauk.ac.ir

[ Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08 ]