«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2024.2003124.1431

مطالعه مقایسه‌ای خاصیت ضدمیکروبی نایسین و ناتامایسین در سفیده تخم‌مرغ مایع پاستوریزه و افزایش زمان ماندگاری آن

خاصیت ضدمیکروبی نایسین و ناتامایسین در سفیده تخم‌مرغ پاستوریزه

الهام یغما[۱]، محمدعلی تربتی[۲*]، افشین جوادی[۳و ۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز، تبریز، ایران

۳- استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، ، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۴- مرکز تحقیقات ارتقاء سلامت، علوم پزشکی تبریز ، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

*نویسنده مسئول: torbatima@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۹/۱۴ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۱۰/۲۷)

چکیده

هدف مطالعه حاضر مقایسه خاصیت ضدمیکروبی نایسین و ناتامایسین در سفیده تخم‌مرغ مایع پاستوریزه می باشد. برای این منظور ابتدا تخم‌مرغ‌ها پس از شکسته شدن و انجام عملیاتی همچون فیلتراسیون و هموژناسیون، مایع سفیده تخم‌مرغ به داخل مخازن جهت انجام پاستوریزاسیون در دمای ۵۶ تا ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه و با دبی ۱۸۰۰m3/s هدایت می‌شود و بعد از اتمام پاستوریزاسیون به داخل مخزن بسته‌بندی جهت مخلوط با محلول‌های ۰/۰۸ و ۰/۱ درصدی نایسین و ناتامایسین انتقال می‌یابد. سپس آزمون‌های میکروبی در زمان‌های نگهداری صفر، هفت، چهارده و سی روز بررسی شدند. بر اساس نتایج هر دو نگهدارنده طبیعی نایسین و ناتامایسین از نظر شمارش‌کلی، کلی‌فرم و کپک و مخمر در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با بقیه نمونه‌ها دارند. در شمارش کلی نمونه حاوی نایسین ۰/۱ ٪ روز هفتم نگهداری با ۱/۷۱ log CFU/g کمترین شمارش‌کلی و نمونه شاهد روز سی‌ام با ۴/۴۹ log CFU/g بیشترین میزان شمارش را دارد. در مورد ناتامایسین نیز نمونه‌های ۰/۱ ٪ روز هفتم و ۰/۰۸ ٪ روز هفتم هر دو به ترتیب با ۲/۶۳ log CFU/g و ۲/۶۷ log CFU/g کمترین و نمونه کنترل روز سی‌ام نیز با log CFU/g ۴/۵ بیشترین میزان شمارش‌کلی را دارد. در آزمون‌های کلی‌فرم، کپک و مخمر، *اشریشیاکولای*، *استافیلوکوکوس‌آرئوس* و سالمونلا نیز در تمامی نمونه‌های حاوی نایسین و ناتامایسین رشد هیچ میکروارگانیسمی دیده نشد. میزان شدت کاهش شمارش‌کلی در نمونه‌های نایسین نسبت به ناتامایسین بیشتر است و با گذشت زمان، خاصیت ضدمیکروبی خود را بیشتر نشان داده است.

واژه‌های‌کلیدی: سفیده تخم‌مرغ مایع پاستوریزه، زمان ماندگاری، ضدمیکروبی، ناتامایسین، نایسین

مقدمه

رشد میکروبی بر روی سطوح مواد غذایی، که می‌تواند از آلودگی پس پردازش در طول رسیدگی و بسته‌بندی ناشی شود، منجر به فساد مواد غذایی، بیماری‌های جدی و زیان‌های ناشی از آن برای صنعت مواد غذایی می‌شود (Ariyapitipun *et al*., 2000; Avery and Buncic, 1997). عوامل ضد میکروبی را می‌توان از طریق تکنیک‌های کاربرد مستقیم مانند فرو بردن، اسپری کردن و یا شستشو با برس برای حذف آلودگی، بر روی سطوح غذایی به کار برد. کاربرد مستقیم مواد ضد میکروبی ممکن است منجر به خنثی‌سازی یا تبخیر عوامل فعال و انتشار سریع از سطح به بخش‌های داخلی غذاها شود. قرار دادن عوامل ضد میکروبی طبیعی در مواد بسته‌بندی زیستی یک روش نوآورانه برای غلبه بر این مشکلات است (Ture *et al*., 2008). از گذشته تا حال، محصولات لبنی سهم قابل توجهی حدود ۴۳ ٪ از بازار غذاها و نوشیدنی های عملکردی را دارا می‌باشند (Tavakli, 2019) در pH پایین، باکتری‌ها با تولید اسید لاکتیک، سطح اسیدیته را افزایش و در نتیجه کیفیت محصول را کاهش می‌دهند، بنابراین جلوگیری از کاهش pH و افزایش تعداد باکتری، دو عامل حیاتی برای افزایش عمر مفید این محصولات است (Bodaszewska-Lubas *et al*., 2012). لذا با توجه به قلیایی بودن پروتئین سفیده تخم‌مرغ، برخلاف شیر و پروتئین‌های لبنی، با کنترل pH آن، می‌توان فساد اسیدی را کاهش داد (Buncic *et al*., 1995).

یکی از انواع روش‌های تامین پروتئین در ورزشکاران، مصرف سفیده تخم‌مرغ مایع به‌صورت خام است که عوارض جانبی زیادی از جمله عدم هضم و جذب در بدن (به خاطر وجود آویدین در سفیده تخم مرغ) را دارد و علاوه بر آن آویدین، مانع جذب بیوتین در بدن می‌شود، عوارض پوستی و مشکلات بینایی ایجاد می‌کند و خطرات باکتری سالمونلا نیز وجود دارد که پودر سفیده تخم‌مرغ، فاقد این مشکلات است. نوع دیگر مصرف سفیده تخم مرغ به شکل پخته می‌باشد که پختن تخم مرغ و جداسازی پوسته و سفیده از زرده بسیار وقتگیر است، لذا سفیده تخم مرغ پاستوریزه آماده مصرف در باشگاه‌ها و مدارس به سهولت در هر زمان قابل مصرف است (Cegielska-Radziejewska *et al*., 2008; Davies, *et al*., 1997; Pina-Pérez *et al*., 2009).

نگهدارنده‌ها موادی هستند که اجازه رشد میکروارگانیسم‌ها (باکتری‌ها، مخمرها و کپک‌ها یا قارچ‌ها) را در مواد غذایی مختلف که به صورت صنعتی تولید می‌شوند، نمی‌دهند. نگهدارنده‌ها بطور عمده به دو دسته طبیعی و شیمیایی تقسیم‌بندی می‌شوند. نگهدارنده‌های شیمیایی برای جلوگیری یا به تأخیر انداختن فساد مواد غذایی دارای کاربرد وسیع اما سرطان‌زا و سمی هستند (Tavakli, 2019). بسیاری از مواد شیمیایی ضد میکروبی برای طولانی مدت بدون هیچ گونه عوارض شناخته شده‌ای استفاده شده‌اند. امروزه مصرف کنندگان در مورد مواد نگهدارنده شیمیایی مانند نیترات سدیم، بنزوئیک اسید، پروپیونیک اسید و غیره که در مواد غذایی مورد استفاده قرار میگیرند نگرانند، در نتیجه تمایل به غذاهای کمتر فرآوری شده دارند. بدین منظور استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی مورد توجه قرار گرفته است از جمله نگهدارنده های طبیعی می‌توان به سیتریک

اسید، اسید آسکوربیک و باکتریوسین‌ها اشاره کرد (Soomro *et al*., 2012).

باکتریوسین‌ها پروتئین‌های باکتری‌کش و بازدارنده رشد اسپورها هستند که تولید آنها توسط لاکتوباسیل‌ها انجام می‌شود و به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های درمانی بطور گسترده‌ای مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند (Tavakli, 2019; Mirhosseini *et al*., 2018). مهمترین مزیت باکتریوسین‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های معمولی متابولیت اولیه طبیعی آنهاست (Buncic *et al*., 1995). نایسین ($C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$) یکی از مورد مطالعه‌ترین و مهمترین عوامل ضد میکروبی علیه باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زای گرم مثبت از جمله *لیستریا مونوسیتوژنز* است (Jung *et al*., 1992) که خاصیت مهارکنندگی علیه لیستریا در گوشت‌های آماده مصرف، مرغ، تخم‌مرغ و لبنیات را نشان می‌دهد (Knight et al., 1999; Zhang *et al*., 1999; Lungu and Johnson, 2005; Ruiz *et al*., 2009; Janes, 2012). آماده‌سازی نایسین به عنوان یک ماده ضدمیکروبی تحت دستورالعمل ۷۱۲۰,۱ USDA FSIS (ایمنی و مواد مغذی مناسب) که از ۲۵۰ ppm (معادل ۶/۲۵ ppm نایسین) در محصولات تخم‌مرغ تجاوز نکند (FSIS, 2021). اسیدهای آلی مانند پروپیونیک، لاکتیک و استیک و نمک‌های مربوط به آن‌ها برای حفظ محصولات غذایی به کار می‌روند. تحقیقات نشان داده‌است که اسیدهای آلی ممکن است هنگامی که با نایسین برای مبارزه با لیستریا ترکیب می‌شوند، اثر هم‌افزایی یا افزایشی ایجاد می‌کنند (Buncic *et al*., 1995; Davies *et al*., 1997; Georgnaras *et al*., 2005; Samelis *et al*., 2005; Ukuku *et al*., 2005). نایسین یک باکتریوسین پلی پپتید طبیعی است که به‌طور گسترده در صنایع غذایی به عنوان نگهدارنده ایمن و سالم در بیش از ۵۰ کشور جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Zendo, 2013).

ناتامایسین ($C_{33}H_{47}O_{13}N$) یک پپتید ضد میکروبی طبیعی است که توسط سویه‌های (*Streptomyces natalensis*) تولید می شود. این ماده به طور موثر به عنوان یک نگهدارنده ضد قارچ و کپک روی محصولات غذایی مختلف (مانند ماست، سوسیس، آب میوه، شراب و غیره) عمل می کند. این ماده که با نام پیماریسین (pimaricin) نیز شناخته می شود، یک قارچ کش از گروه پلی ان ماکرولید است که معمولاً به عنوان یک نگهدارنده زیستی در تیمار سطحی پنیر و سوسیس برای مهار رشد مخمرها و کپک ها استفاده می شود. همچنین می توان از آن در تولید ماست، محصولات پخته شده، نوشیدنی ها و شراب ها استفاده کرد. شماره افزودنی غذایی اروپایی برای آن (E235) است. این ترکیب در چهار نوع در بازار موجود است: ناتامایسین خالص، فرآورده های ۵۰ ٪ ناتامایسین با مواد کمکی لاکتوز، گلوکز یا نمک. با توجه به مزایای آن به عنوان یک روش طبیعی و کارآمد نگهداری مواد غذایی، استفاده از آن پتانسیل زیادی برای افزایش عمر مفید محصولات غذایی و جلوگیری از فساد دارد (Ture *et al*., 2008; Shrestha *et al*., 2023).

با این حال، مشخص شده‌است که برخی از عوامل ضد میکروبی ممکن است اثرات هم افزایی در مهار رشد باکتری داشته باشند وقتی که به صورت ترکیبی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Shrestha *et al*., 2023). هدف از بررسی حاضر افزایش زمان ماندگاری تخم‌مرغ مایع پاستوریزه شده بیشتر از ۷ روز نگهداری رایج در صنعت غذا می‌باشد تا با افزودن نگهدارنده‌های طبیعی علاوه بر کاهش خطرات

افزودنی‌های مصنوعی، با افزایش ماندگاری تخم‌مرغ مایع پاستوریزه در هزینه و انرژی مصرف شده در پروسه پاستوریزاسیون نیز صرفه‌جویی شود. لازم به ذکر است که در این بررسی به مقایسه اثر ضدمیکروبی هر دو نگهدارنده نیز پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی قبل از پاستوریزاسیون

ابتدا تخم‌مرغ‌ها توسط نوار نقاله به قسمت تخم‌مرغ‌شکن منتقل و در آنجا توسط چاقوهای متصل به دستگاه شکسته شده و داخل ظروف مخصوص داخل دستگاه ریخته شدند. لازم به توضیح است که جداسازی زرده از سفیده تخم‌مرغ به‌خاطر لرزش پیاله‌ها در قسمت جداسازی خط تولید انجام شده و از طریق لوله‌های متصل به آنها مایع سفیده تخم‌مرغ پس از گذراندن مراحل جداسازی ذرات خارجی اعم از ذرات پوسته و غیره به داخل مخازن (مخصوص به خود) قبل از پاستوریزاسیون ریخته و مدت زمانی توسط هم‌زن‌های داخل مخازن همزده شدند تا مایع نسبتا صاف و یکنواختی به داخل دستگاه پاستور (Miracle ساخت چین) فرستاده شود.

پاستوریزاسیون

تخم‌مرغ مایع توسط دستگاه پاستور در دمای ۵۶ تا ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه پاستوریزه شده و با دبی $۱۸۰۰ m^3/s$ از طریق لوله مخصوص سفیده تخم‌مرغ مایع پاستوریزه به داخل مخزن بسته‌بندی (حاوی مایع پاستور شده سفیده) هدایت شد تا پس از مخلوط با محلول‌های ۰/۰۸ و ۰/۱ درصدی از قبل آماده شده نایسین و ناتامایسین به داخل دستگاه بسته‌بندی تزریق شوند. لازم به توضیح است که نمونه‌های شاهد در این بررسی در مرحله بسته‌بندی بدون ترکیب با محلول‌های نایسین و ناتامایسین به دستگاه تزریق جهت بسته‌بندی هدایت شدند.

مخلوط محلول‌های نایسین و ناتامایسین با تخم‌مرغ مایع

در این مرحله در شرایط کاملا ایمن و ضدعفونی و در ظروف استریل محلول‌های نایسین ۰/۰۸ و ۰/۱ درصد و ناتامایسین ۰/۰۸ و ۰/۱ درصد آماده و داخل مخزن بسته‌بندی ریخته شدند. با توجه به حساسیت بالای نایسین و ناتامایسین به درجه حرارت بالا این محلول‌ها را نمی‌توان قبل از پاستوریزاسیون به تخم‌مرغ مایع اضافه کرد. بعد از ریختن محلول‌های درست شده بایستی به فرآیند مخلوط شدن در داخل تانک، مدتی کوتاه زمان داد که این عمل توسط پره‌های همزن متصل به درب بالای مخزن بسته‌بندی انجام گرفت. بعد از اتمام فرآیند، سفیده تخم‌مرغ مایع پاستوریزه به داخل ستون تزریق هدایت شد تا جهت بسته‌بندی توسط دستگاه بسته‌بندی مخصوص مایعات PLC1000 PN (ساخت ماشین‌سازی حکمایی) در نایلون‌های پلی‌اتیلنی به داخل آنها تزریق شدند.

آزمون‌های میکروبی

پس از تولید تمام نمونه‌های سفیده تخم‌مرغ مایع پاستوریزه، مطابق استاندارد ملی شماره ۱۳۲۴۸ (استاندارد تخم‌مرغ مایع پاستوریزه) تمامی آزمون‌های میکروبی لازم اعم از شمارش‌کلی به طریق تهیه رقت و کشت به صورت کشت آمیخته و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس (مطابق استاندارد ملی ایران/ شماره ۲-۵۲۷۲)، کلی‌فرم به روش کشت نه لوله‌ای و محاسبه بیشترین تعداد احتمالی- MPN (مطابق استاندارد ملی ایران/ شماره ۱۱۱۶۶)، *اشریشیاکولای* به

روش جستجو و شمارش *اشریشیاکولای* با استفاده از کشت در محیط کشت بریلیانت گرین بایل براث – Brilliant Green Bile Broth (مطابق استاندارد ملی ایران/ شماره ۲۹۴۶)، کپک و مخمر به روش شمارش کلنی در فرآورده‌هایی با فعالیت آبی بیشتر از ۰/۹۵ و کشت سطحی به مقدار ۰/۱ میلی‌گرم بر روی محیط کشت رزبنگال – RBC (مطابق استاندارد ملی ایران/ شماره ۱-۱۰۸۹۹)، *استافیلوکوکوس آرئوس* به روش جستجو، شناسایی و شمارش به شیوه محتمل‌ترین تعداد (MPN) برای تعداد کم میکروارگانیسم‌ها (مطابق استاندارد ملی ایران/ شماره ۶۸۰۶-۳) و سالمونلا به روش جامع جستجو، شناسایی و شمارش گونه‌های سالمونلا (مطابق استاندارد ملی ایران/ شماره ۱۸۱۰-۱) بر روی نمونه‌های تولیده شده (شاهد و فاقد آنتی‌بیوتیک) و نمونه‌های هدف این مطالعه (حاوی آنتی‌بیوتیک) در روز اول تولید (روز صفر) انجام و کشت داده شدند. سپس تمامی نمونه‌های تولید شده به سردخانه با دمای ۰ تا ۴ درجه سلسیوس جهت نگهداری و انبارش انتقال داده شدند تا تمامی آزمون‌های میکروبی ذکر شده در روز هفتم، چهاردهم و سی‌ام تولید بر روی تمامی نمونه‌های شاهد و نمونه‌های حاوی آنتی‌بیوتیک انجام شود.

تحلیل آماری

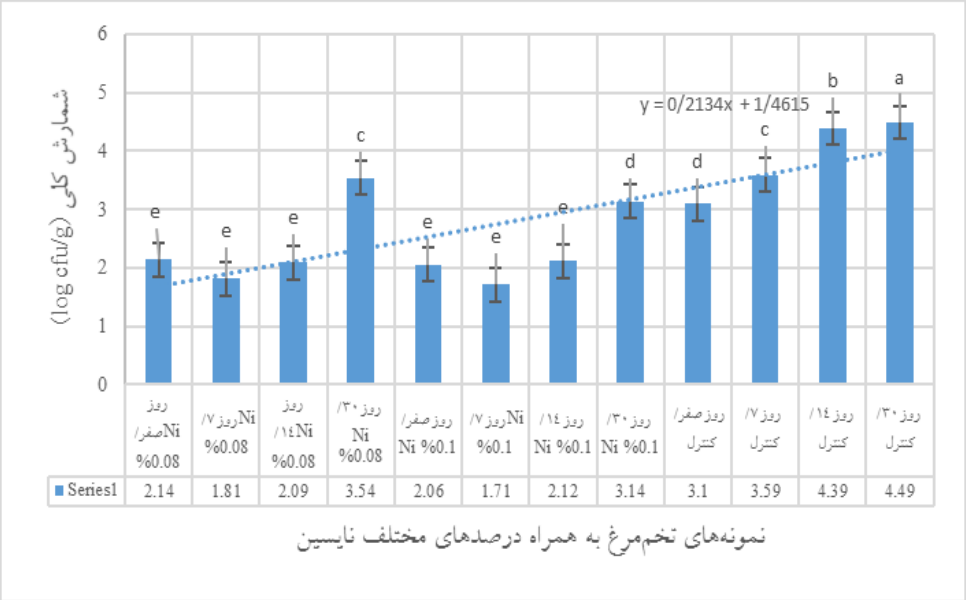
تمامی آزمون‌ها اعم از آزمون‌های تیمار نایسین و ناتامایسین با استفاده از طرح بلوک‌های کامل تصادفی و در سه تکرار توسط نرم‌افزار SPSS 20 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسات میانگین آنها نیز توسط آزمون دانکن با دامنه اطمینان ۹۵ درصد برآورده شد.

یافته‌ها

نتایج نایسین با سفیده تخم‌مرغ مایع

با توجه به نتایج نمودار (۱) تیمارهای مختلف سفیده تخم‌مرغ مایع در سطح احتمال ۵ ٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر از نظر شمارش کلی میکروبی دارند ($p<۰/۰۵$). تیمار کنترل روز سی‌ام نگهداری با ۴/۴۹ log CFU/g بیشترین میزان شمارش کلی را در میان بقیه نمونه‌ها دارد و بعد از آن نیز تیمار کنترل روز چهاردهم نگهداری با ۴/۳۹ log CFU/g میزان شمارش بیشتری دارد که در بین این دو، تیمار ۳۰ روزه با توجه به اینکه از حد مجاز استاندار ملی شماره ۱۳۲۴۸ (استاندارد تخم‌مرغ مایع پاستوریزه) بیشتر بوده است قابل قبول نمی‌باشد. لازم به ذکر است تیمار نایسین ۰/۱ ٪ روز هفتم نگهداری با ۱/۷۱ log CFU/g کمترین میزان شمارش کلی را در میان بقیه نمونه‌ها دارد. این در صورتی است که این نمونه در روز اول تولید خود (روز صفر) میزان شمارش کلی برابر ۲/۰۶ log CFU/g را داشته است و با وجود گذشت ۷ روز نگهداری به‌جای افزایش در میزان جمعیت میکروبی، کاهش در آن مشاهده شده است یعنی گذشت زمان نگهداری با جمعیت میکروبی تا ۷ روز نگهداری در نمونه حاوی نایسین ۰/۱ ٪ رابطه عکس داشته است ولی بعد از گذشت ۷ روز این رابطه روند صعودی به خود گرفته است به گونه‌ای که با افزایش زمان نگهداری میزان جمعیت میکروبی نیز افزایش یافته است. ابتدا این میزان افزایش در روز سی‌ام نگهداری با میزان ۳/۱۴ log CFU/g به حداکثر مقدار خود رسیده است که همین میزان میکروبی نیز با حداکثر حدمجاز استاندارد (۳×۱۰^{۴} CFU/g معادل ۴/۴۷ log CFU/g) فاصله زیادی داشته است و از نظر

این آزمون میکروبی مورد قبول می‌باشد. این مسأله در مورد نمونه‌های حاوی نایسین ۰/۰۸ ٪ نیز مشاهده می‌شود. به‌گونه‌ای که میزان شمارش کلی در نمونه روز صفر بیشتر از روز هفتم نگهداری همان غلظت یعنی ۰/۰۸ ٪ بوده است ولی بعد از روز هفتم نگهداری تا روزهای ۱۴ و ۳۰ این روز رشد صعودی به خود گرفته است ولی مشابه غلظت ۰/۱ ٪ نایسین حتی در روز سی‌ام نگهداری نیز میزان شمارش کلی کمتر از حد مجاز استاندارد بوده و همانند نایسین ۰/۱ ٪ مورد قبول می‌باشد ولی میزان شمارش‌کلی نمونه ۰/۰۸ ٪ روز سی‌ام نگهداری با ۳/۵۴ log CFU/g بیشتر از نمونه مشابه آن با غلظت بالای نایسین بوده است که این مسأله دور از انتظار نمی‌باشد.

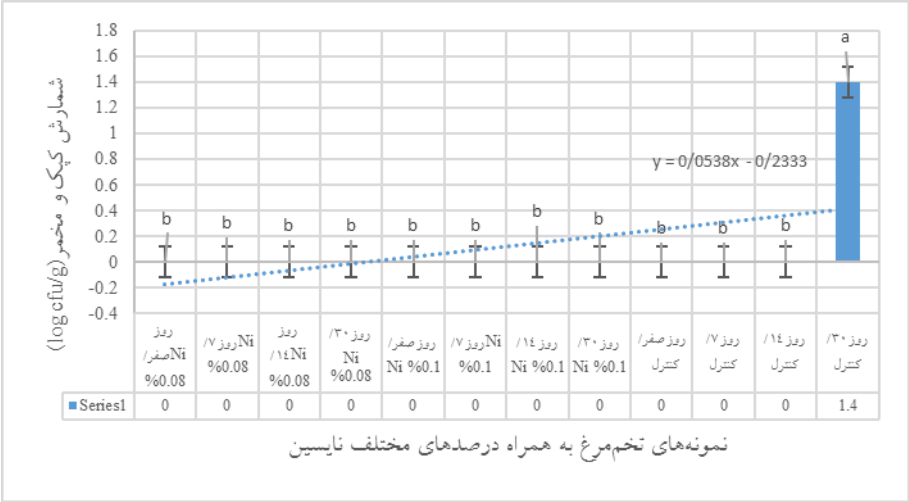


نمودار ۱- میزان شمارش کلی در نمونه‌های مختلف سفیده تخم‌مرغ مایع پاستوریزه به همراه نایسین

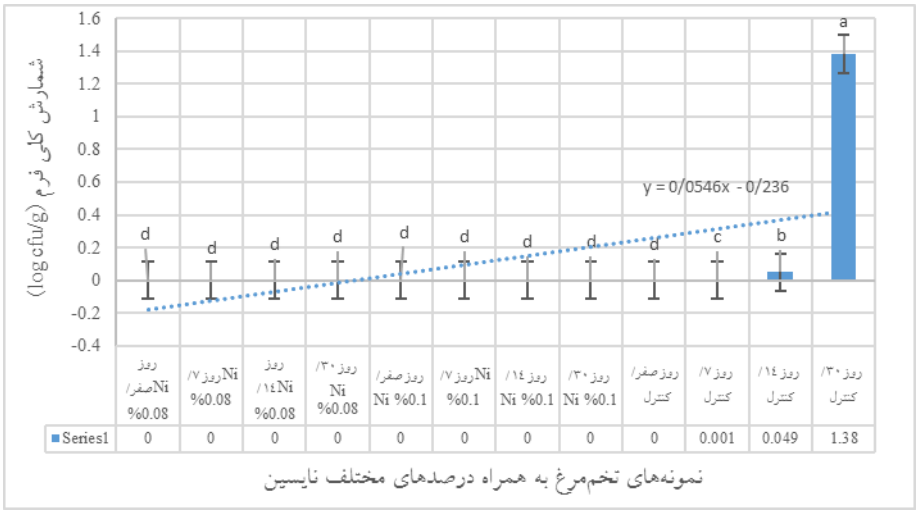
بر اساس نمودار (۲) مشاهده می‌شود که بین تیمارهای مختلف سفیده تخم‌مرغ مایع پاستوریزه در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<0/05$). با توجه به نتایج تنها در تیمار کنترل با ۳۰ روز نگهداری میزان ۱/۴۰ log CFU/g کپک و مخمر دیده شده است و در بقیه تیمارها در روزهای مختلف نگهداری هیچ کپک و مخمری رشد نکرده است که این مورد حاکی از این مطلب است که وجود نایسین در نمونه‌های سفیده تخم‌مرغ منجر به عدم رشد کپک و مخمر حتی در روز سی‌ام نگهداری نیز شده است و این در صورتی است که نمونه کنترل روز سی‌ام نگهداری با رشد ۲۵/۷ بیشتر از حد مجاز استاندارد ملی ۱۳۲۴۸ که کمتر از ۱۰ اعلام شده است، بوده است.

با توجه به نمودار (۳) نیز میان تیمارهای مختلف از نظر رشد کلی‌فرم نیز در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p<0/05$). همانطور که مشاهده می‌شود تیمار کنترل روز سی‌ام نگهداری با میزان ۱/۳۸ log CFU/g بیشترین میزان کلی‌فرم را در میان بقیه نمونه‌ها داشته است و بعد از آن نیز نمونه

کنترل روز چهاردهم نگهداری با میزان جمعیت کلی‌فرمی ۰/۰۴۹ log CFU/g میزان کلی‌فرم بیشتری را دارد. لازم به ذکر است که به‌جز تیمارهای کنترل، در میان نمونه‌های حاوی نایسین با غلظت‌های مختلف آن هیچ کلی‌فرمی رشد نکرده است و این از اثر خوب نایسین بر علیه باکتری‌های کلی‌فرمی می‌باشد به گونه‌ای که حتی در روزهای نگهداری بیشتر نیز این خاصیت ضدمیکروبی نایسین علیه باکتری‌های کلی‌فرمی بارز بوده است و این مطلب در نمونه‌های ۳۰ روز نگهداری با نایسین در هر دو غلظت ۰/۰۸ و ۰/۱ درصد کاملا مشهود است و هیچ کلی‌فرمی در آنها بعد از ۳۰ روز نگهداری رشد نکرده است.



نمودار ۲- میزان شمارش کپک و مخمر در نمونه‌های مختلف سفیده تخم‌مرغ مایع پاستوریزه به همراه نایسین

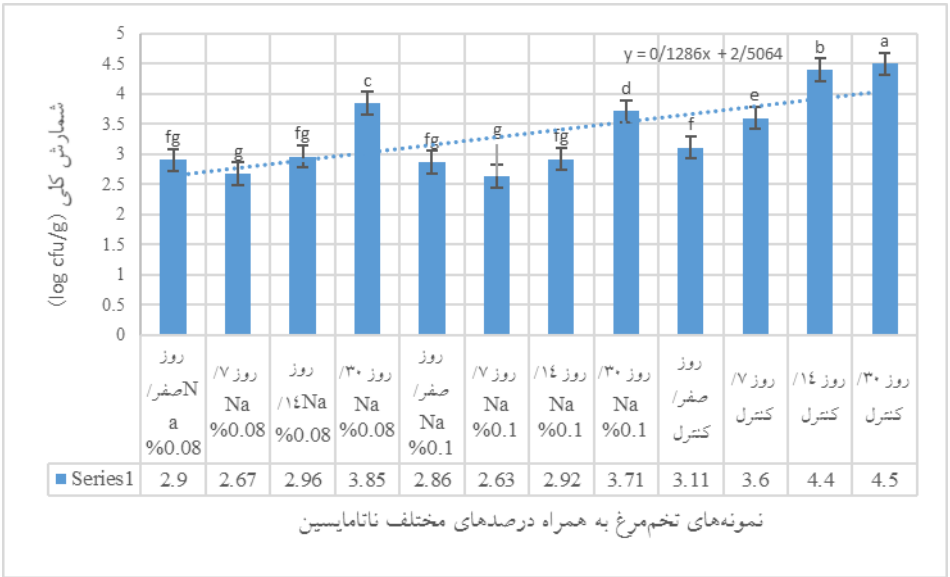


نمودار ۳- میزان شمارش کلی‌فرم در نمونه‌های مختلف سفیده تخم‌مرغ مایع پاستوریزه به همراه نایسین

نتایج ناتامایسین با تخم‌مرغ مایع

با توجه به نتایج نمودار (۴) تمامی نمونه‌های تخم‌مرغ در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند ($p<0/05$). در بین آنها بیشترین میزان شمارش‌کلی مربوط به نمونه‌ی کنترل روز سی‌ام نگهداری با ۴/۵ log CFU/g است و بعد از آن نیز

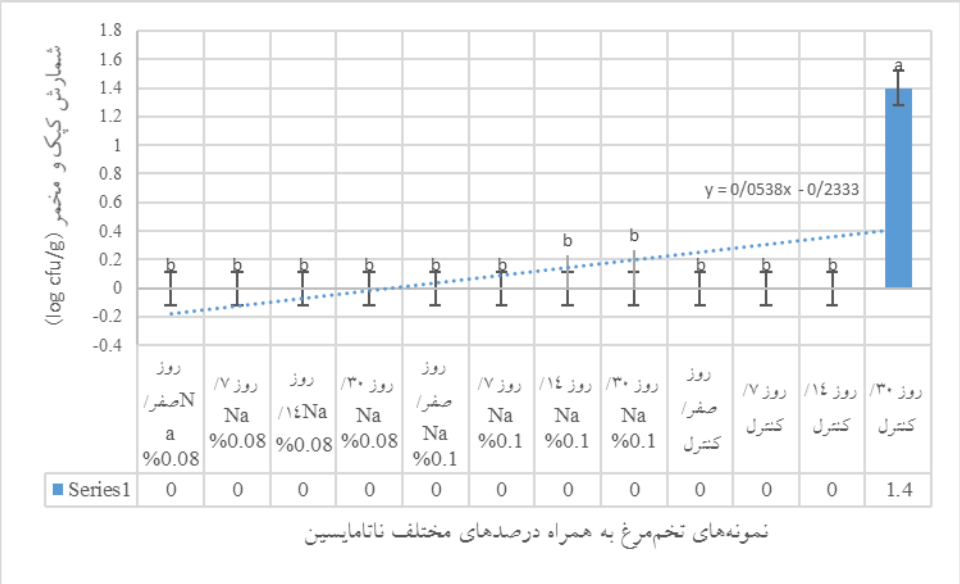
نمونه شاهد روز چهاردم با ۴/۴۰ log CFU/g میزان شمارش‌کلی بیشتری نسبت به بقیه نمونه‌ها دارد. همانند نایسین بعد از افزودن محلول‌های ۰/۰۸ و ۰/۱ ناتامایسین به نمونه اصلی نیز میزان شمارش کلی به‌صورت بسیار بارزی کاهش می‌یابد به گونه‌ای که کمترین میزان شمارش کلی مربوط به نمونه‌های ۰/۱ درصد روز هفتم و ۰/۰۸ درصد روز هفتم به ترتیب با ۲/۶۳ log CFU/g و ۲/۶۷ log CFU/g می‌باشند و این خاصیت ضدمیکروبی در ناتامایسین نیز همانند نایسین با گذشت زمان رابطه عکس دارد زیراکه روز صفر نمونه‌های ۰/۰۸ و ۰/۱ درصد ناتامایسین بیشتر از روز هفتم نگهداری آنها بوده است ولی در طول نگهداری اثر ضدمیکروبی ناتامایسین بروز کرده و منجر به کاهش در جمعیت میکروبی اولیه آن شده است. البته لازم به ذکر است که کاهش جمعیت میکروبی تا روز هفتم نگهداری بوده است و بعد از آن با گذشت زمان میزان جمعیت میکروبی افزایش یافته که این افزایش دور از انتظار نیست ولی روند افزایشی جمعیت میکروبی در نمونه‌های حاوی ناتامایسین نسبت به نمونه‌های فاقد آن (کنترل) قابل مقایسه نیست و در نمونه‌های کنترل با گذشت زمان میزان جمعیت میکروبی بیشتر از حد مجاز استاندارد ملی شماره ۱۳۲۴۸ شده است و این به گونه‌ای است که نمونه کنترل روز سی‌ام نگهداری قابل قبول از نظر استاندارد نبوده است. از طرف دیگر بایستی به این مطلب اشاره کرد که حداکثر زمان نگهداری سفیده تخم‌مرغ مایع پاستوریزه ۱۴ روز می‌باشد و این مطلب در نمونه‌های کنترل کاملا مشهود بوده و نمونه بعد از ۱۴ روز نگهداری خارج از محدوده استاندار بوده است ولی در نمونه‌های حاوی ناتامایسین حتی نمونه‌های سی‌ام نگهداری نیز کمتر از حد مجاز استاندارد بوده و قابل قبول می‌باشند. همچنین بایستس به این نکته اشاره کرد که با افزایش غلظت ناتامایسین میزان خاصیت ضدمیکروبی نیز افزایش یافته است به گونه‌ای که نمونه‌هایی که غلظت بالای ناتامایسین را نسبت به نمونه مشابه خود در غلظت ۰/۰۸ درصد میزان شمارش کلی کمتری دارند.



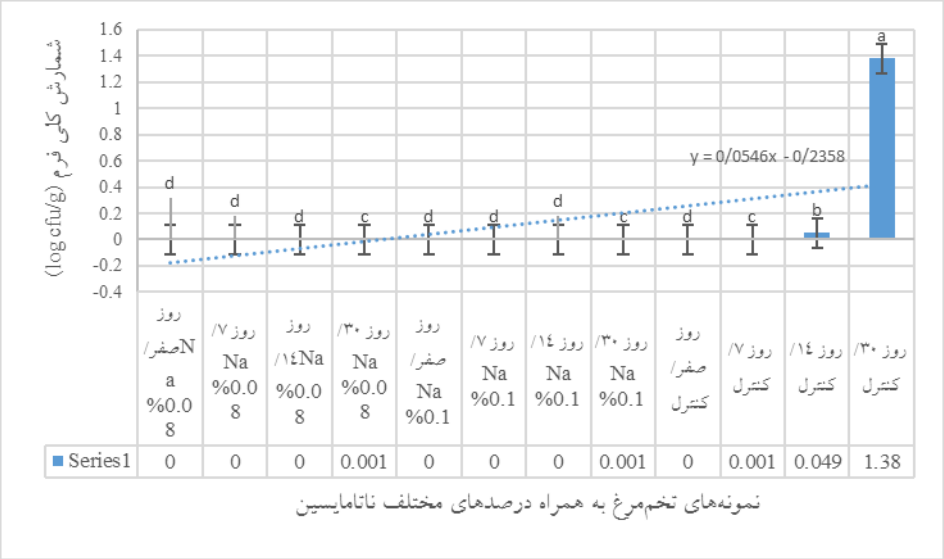
نمودار ۴- میزان شمارش کلی در نمونه‌های مختلف سفیده تخم‌مرغ مایع پاستوریزه به همراه ناتامایسین

بر اساس نتایج نمودار (۵) همانطور که مشاهده می‌شود به جز نمونه کنترل روز سی‌ام نگهداری با log ۱/۴ CFU/g در هیچ‌کدام از نمونه‌ها کپک و مخمری رشد نکرده است. البته در نمونه‌های کنترل تا روز ۱۴ با توجه به اینکه سفیده تخم‌مرغ مایع تحت فرآیند پاستوریزاسیون قرار گرفته است این مسأله امری طبیعی بود است ولی در نمونه‌های دیگر حاوی ناتامایسین، این علت بعد از روز ۱۴ دیگر مربوط به فرآیند پاستوریزاسیون نبوده است زیراکه در نمونه‌های شاهد روز سی‌ام این امر کاملا صادق است. در نتیجه نمونه‌های حاوی ناتامایسین به‌دلیل وجود ناتامایسین همه آنها حتی در روزهای سی‌ام نگهداری نیز کاملا سالم مانده و هیچ کپک و مخمری رشد نکرده است. بایستی به این مطلب اشاره کرد طبق استاندارد ۱۳۲۴۸ بایستی میزان کپک و مخمر کمتر از log CFU/g ۱ باشد در نتیجه نمونه کنترل روز سی‌ام نگهداری از نظر استاندارد قابل قبول نمی‌باشد.

بر اساس نمودار (۶) نیز مشاهده می‌شود که بین نمونه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد ($p<۰/۰۵$). بیشترین میزان کلی‌فرم در نمونه کنترل روز سی‌ام نگهداری با log ۱/۳۸ CFU/g مشاهده شده است. بر اساس نتایج مقایسات میانگین نمودار (۶) می‌توان به این نکته اشاره کرد که نتایج نمونه‌های حاوی ۰/۰۸ درصد و ۰/۱ درصد ناتامایسین یکسان بوده است و به‌جز روزهای سی‌ام نگهداری آنها که میزان بسیار ناچیز یعنی log CFU/g ۰/۰۰۱ کلی‌فرم رشد کرده است در بقیه روزهای نگهداری آنها هیچ کلی‌فرمی رشد نکرده است. البته log CFU/g ۰/۰۰۱ کلی‌فرم نیز بسیار کم بوده و با حد مجاز استاندارد ۱۳۲۴۸ در مورد کلی‌فرم که کمتر و مساوی ۱۰ اعلام شده است بسیار فاصله دارد. با مقایسه روز سی‌ام نگهداری محلول‌های حاوی ناتامایسین با نمونه کنترل (فاقد ناتامایسین) می‌توان به اثر مستقیم ناتامایسین در کاهش رشد کلی‌فرم نیز اشاره کرد.



نمودار ۵- میزان شمارش کپک و مخمر در نمونه‌های مختلف سفیده تخم‌مرغ مایع پاستوریزه به همراه ناتامایسین



نمودار ۶- میزان شمارش کلی‌فرم در نمونه‌های مختلف سفیده تخم‌مرغ مایع پاستوریزه به همراه ناتامایسین

در ادامه با توجه به اهمیت آزمون‌های میکروبی *اشریشیاکولای*، سالمونلا و *استافیلوکوکوس اورئوس* از یک طرف و همچنین لزوم انجام تمامی آزمون‌های شناسایی این باکتری‌ها در محصول تخم‌مرغ مایع پاستوریزه مطابق با استاندارد ملی شماره ۱۳۲۴۸ از طرف دیگر این الزام را ایجاب کرد تا آزمون‌های مربوطه نیز در مورد تمامی نمونه‌های مورد بررسی انجام گیرد. بر اساس نتایج جدول (۱) مشاهده می‌شود که به‌جز نمونه‌های کنترل روز سی‌ام نگهداری که باکتری‌های *اشریشیاکولای*، سالمونلا و *استافیلوکوکوس اورئوس* در آنها مشاهده شده است، بقیه نمونه‌ها اعم از نمونه‌های کنترل روزهای صفر، هفتم، چهاردهم و همچنین نمونه‌های حاوی نایسین و ناتامایسین هیچ باکتری از خانواده‌های *اشریشیاکولای*، سالمونلا و *استافیلوکوکوس اورئوس* رشد نکرده است. با توجه به تشخیص باکتری‌های *اشریشیاکولای*، سالمونلا و *استافیلوکوکوس اورئوس* در روز سی‌ام نگهداری در مقابل عدم وجود این باکتری‌ها در همان روز نگهداری در بین نمونه‌های حاوی نایسین و ناتامایسین می‌توان به خاصیت ضد میکروبی نایسین و ناتامایسین در مورد باکتری‌های *اشریشیاکولای*، سالمونلا و *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز اشاره کرد.

جدول ۱- شناسایی باکتری‌های *اشریشیاکولای*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و سالمونلا در نمونه‌های مختلف سفیده تخم‌مرغ مایع پاستوریزه به همراه نایسین و ناتامایسین

نوع آزمون/ تیمار	شاهد / روز صفر	شاهد/رو ز هفتم	شاهد/رو ز چهاردهم	شاهد/رو ز سی‌ام	روزصفر/ نایسین ۰/۰۸٪	روز هفتم/ نایسین ۰/۰۸٪	روزچهاردهم / نایسین ۰/۰۸٪	روز سی‌ام/ نایسین ۰/۰۸٪	روزصفر/ نایسین ۰/۱٪	روز هفتم/ نایسین ۰/۱٪	روزچهاردهم / نایسین ۰/۱٪	روزسی‌ام / نایسین ۰/۱٪
	شاهد / روز صفر	شاهد/رو ز هفتم	شاهد/رو ز چهاردهم	شاهد/رو ز سی‌ام	روزصفر/ ناتامایسین ۰/۰۸	روز هفتم/ ناتامایسین	روزچهاردهم / ناتامایسین ۰/۰۸٪	روز سی‌ام/ ناتامایسین	روز صفر/ ناتامایسین	روز هفتم/ ناتامایسین	روزچهاردهم / ناتامایسین ۰/۱٪	روز سی‌ام/ ناتامایسین

							٪	ن ۰/۰۸				ن ۰/۱ ٪		ن ۰/۱ ٪		
							٪				٪ ۰/۰۸					
اشریشیاکولای	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی
	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی
استافیلوکوکو	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی
س اورئوس	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی
سالمونلا	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی
	منفی	منفی	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی	منفی

بر اساس مشاهده نتایج کلی و مقایسه بین اثرات نایسین و ناتامایسین می‌توان به این نتیجه‌گیری کلی دست یافت که اثر ضدمیکروبی هر دو نگهدارنده طبیعی نایسین و ناتامایسین کاملاً واضح و اثبات‌شده است. ولی با مشاهده نتایج شمارش‌کلی و میزان شدت کاهش در نمونه‌های حاوی نایسین و ناتامایسین می‌توان به این نتیجه رسید که شدت کاهش در نمونه‌های حاوی نایسین بیشتر از ناتامایسین می‌باشد و این مطلب را با مشاهده میزان شیب خط میانگین در نمودار (۱) که برابر ۰/۲۱۳ بوده در مقایسه با میزان شیب خط نمودار (۴) که برابر ۰/۱۲۸ بوده است بیشتر می‌باشد و همچنین اثر بخشی و میزان کاهش در نمونه حاوی نایسین با غلظت و زمان نگهداری بالا نسبت به ناتامایسین بیشتر است. لازم به توضیح است در مورد رشد کپک و مخمر و کلی‌فرم نیز عملکرد تمامی نمونه‌های حاوی نایسین و ناتامایسین به صورت یکسان بوده و در هیچ‌کدام رشدی دیده نشده است. در مورد شناسایی *اشریشیاکولای*، سالمونلا و *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز در هر دو نگهدارنده منفی گزارش شده است و هیچ‌کدام از باکتری‌های *اشریشیاکولای*، سالمونلا و *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده نشده است.

بحث و نتیجه‌گیری

نایسین نسبتا آمفی‌پاتیک است. آمفی‌پاتیک بودن نایسین به علت تعامل آن با چربی و دیگر مواد غذایی و کاهش توانایی ضدنایسین در ماتریکس مواد غذایی باعث محدود شدن گستره فعالیت آن شده است. این بدان معنی است که عامل حفاظتی نایسین درمحصولات لبنی موثرتر از گوشت است و فعالیت نایسین به دلیل دخالت اجزای گوشتی مانند فسفولیپید محدود شده است. نایسین در ترکیب با سیانید آلدهید روغن استحصال شده از پوست دارچین به عنوان یک نگهدارنده مواد غذایی استفاده می‌شود و می‌تواند مشکل مقاومت باکتریایی راتا حدی کاهش دهد (Shi *et al.*, 2016; Saxelin *et al.*, 2003). نایسین به عنوان یک دارو برای پیشگیری و درمان ورم پستان گاو در دامپزشکی (Perez *et al.*, 2014) و در پزشکی نیز در گروه داروهای ضد عفونت پستان زنان، کاهش جمعیت انتروکوکی در روده (Bodaszewska-Lubas *et al.*, 2012)، درمان درماتیت آتوپیک، زخم معده و عفونت‌های کولون برای بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی (Arauza et al., 2009) مورد استفاده قرار می‌گیرد. در محصولات پنیر فرآوری شده، نایسین در مقدار ۱۲/۵میلی‌گرم در کیلوگرم و بیشتر در تاخیر رشد و تولید سم *کلستریدیوم بوتولونیوم* نوع A و نوع B موثر می‌باشد. همچنین باسیلوس‌های هوازی

اختیاری که در فساد پنیر فرآوری شده دخیل هستند با مقادیر ۵ تا۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نایسین قابل کنترل هستند. کاربرد نایسین در تولید پنیرهای سخت و نیمه سخت مثل Dutch و Suiss از رشد اسپورهای *کلستریدیوم بوتولونیوم* و *کلستریدیوم تیروبوتیریکوم* جلوگیری می‌کند. استفاده از نایسین باعث تولید پنیرهایی با رطوبت بالاتر و فسادپذیری کمتر می‌شود (Jaafari and Elhami Rad, 2000).

افزودن نایسین در ماست نیز پس از تولید آن، موجب جلوگیری از رشد استارتر (ترکیبی از *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* است) می‌شود. بنابراین از اسیدی شدن ماست جلوگیری می‌شود. بدین ترتیب مدت نگهداری ماست با نگهداری طعم ماست و جلوگیری از سینرزیس افزایش می‌یابد. معمولا مقادیر افزوده شده حدود ۱/۲۵–۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم است. در محصولات تخم مرغ، نایسین در حدود ۲/۵ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش مدت ماندگاری و حفاظت در مقابل رشد باکتری‌های سمی سایکروتروف *باسیلوس‌سرئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* می‌شود. در محصولات آردی افزودن نایسین به مخلوط خمیردر مقادیر بیشتر از ۳/۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم برای جلوگیری از رشد *باسیلوس‌سرئوس* در استرالیا و نیوزلند به تصویب رسیده است. استفاده از نایسین در غذاهای کنسروی بیشتر برای جلوگیری از فساد ترموفیلی به‌کار می‌رود و باعث می‌شود بتوان این محصولات را به مدت طولانی در دمای اتاق نگهداری کرد و از رشد اسپورهای ترموفیل جلوگیری نمود و با کاربرد آن می‌توان حداقل فرایند حرارتی را انجام داد، بدون اینکه خطر فساد افزایش یابد. مقدار نایسین کاربردی در غذاهای کنسروی کم اسید ۲/۵ تا ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم است. همچنین در چاشنی‌های سالاد غلظت‌های۲/۵ تا ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم نایسین می‌تواند از فسادهای ناشی از لاکتیک اسید باکتریایی جلوگیری کند. (Javan Yar and Sohrabi, 2012).

غلظت‌های مختلف نایسین تاثیر معنی‌داری بر رشد باکتری *استافیلوکوکوس‌اورئوس* دارند بنابراین استفاده از غلظت‌های مختلف نایسین می‌تواند اثر باز دارندگی مناسبی را بر روی رشد باکتری مورد بررسی ایجاد نماید. در نهایت با استناد به نتایج بدست آمده از نایسین می‌تواند از آن به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در گوشت و فرآورده‌های گوشتی به منظور افزایش زمان ماندگاری استفاده کرد. غوطه‌ور کردن سوسیس پخته شده در محلول ۵ تا ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم نایسین می‌تواند عمر نگهداری آن را تا دمای ۱۲ درجه سلسیوس افزایش دهد (Qashunizadeh *et al.*, 2014). این مطالعه همسو با نتایج سایر محققان است که بر روی تخم‌مرغ‌های آماده مصرف انجام دادند. طبق بررسی آنها حضور نایسین و اثر ضدمیکروبی آن در تخم‌مرغ‌های آماده مصرف منجر به کاهش معنی‌داری در جمعیت میکروبی *لیستریا مونوسیوژنز* از ۰/۴۶ log CFU/g به ۰/۳۶ log CFU/g رسید (Shrestha *et al.*, 2023).

نایسین بهتر است به‌صورت یک محلول آبی به بخش مایع محصول در طی فرآوری اضافه شود مثلا در غذاهای کنسرو شده می‌توان نایسین را با آب نمک کنسرو ترکیب کرد و به داخل کل محصول افزود. نایسین را در دسرهای لبنی می‌توان به شیر افزود و سپس به کل محصول اضافه کرد. سیراگوسا و همکاران (۱۹۹۹) از نایسین به صورت مایع در اتصال

با فیلم پلاستیکی بر پایه پلی‌اتیلن برای بسته بندی وکیوم لاشه گوشت گاو استفاده کردند. در مطالعه دیگری نیز که انجام شده بود مشاهده کردند که اسانس آویشن شیرازی و نایسین هر کدام به تنهایی روی *باسیلوس سرئوس* مؤثر هستند ولی استفاده به‌صورت تؤام روی مهار باکتری حالت سینرژیست دارد و با کاهش درجه حرارت از ۳۰ درجه سلسیوس به ۱۰ درجه سلسیوس اثرات ضدمیکروبی هر کدام به تنهایی یا تؤام افزایش می‌یابد (Misaghi and Basti, 2007).

ناتامایسین در آب کم محلول است و کریستال های آن فعالیت ضد قارچی ندارند. بنابراین، آزمایش‌ها برای تعیین MIC با استفاده از صفحات آگار حاوی سوسپانسیون‌های ناتامایسین بالاتر از حداکثر حلالیت آن در حالت خنثی است. بررسی‌های متعددی در مورد مایکوفلورا در صنعت پنیر گزارش شده است (Stark, 2003). اتواکسیداسیون ناتامایسین با ناپدید شدن یک پیوند دوگانه در یک انتهای پلی ین کروموفور و از دست دادن فعالیت ضد قارچی آن همراه است (Duchateau and van Scheppingen, 2018). در بررسی دیگری که بر روی فیلم‌های بیوپلیمری حاوی ناتامایسین و عصاره رزماری انجام شده بود، به این نتیجه دست یافتند که فیلم‌های حاوی ناتامایسین خاصیت ضد قارچی بالایی داشته‌اند و منجر به کاهش معنی‌داری در جمعیت کپک و مخمر شده‌اند (Ture *et al*., 2008).

در مطالعه‌ای دیگر نیز که با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع در خصوص بررسی میزان غلظت نایسین و ناتامایسین در گذشت زمان انجام شده است و اذعان داشته‌اند که بعد از گذشت یک سال در دمای اتاق (۲۲ درجه سلسیوس) و در شرایط نگهداری تاریک و بدون نور، میزان غلظت ناتامایسین و نایسین به ترتیب ۱۰ تا ۱۵ درصد کاهش می‌یابد و این مطالعه آنها صرفا جهت ماندگاری اثر آنتی‌بیوتیکی نایسین و ناتامایسین بوده است (Duchateau and van Scheppingen, 2018).

سپاسگزاری

از آزمایشگاه میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز که همکاری و مساعدت لازم را در پیشبرد این مطالعه داشتند کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Arauza, L., Jozalaa, A., Mazzolab, P. and Penna, T. (2009). Nisin biotechnological production and application. Trends in Food Science and Technology, 20(2009): 146-154.
- Ariyapitipun, T., Mustapha, A. and Clarke, A.D. (2000). Survival of Listeria monocytogenes Scott A on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin. Journal of Food Protection, 63(1):131–136.

- Avery, S.M. and Buncic, S. (1997). Antilisterial effects of a sorbate-nisin combination in vitro and on packaged beef at refrigeration temperature. Journal Food Protection, 60(9): 1075–1080.
- Bodaszewska-Lubas, M., Brzychczy-Wloch, M., Gosiewski, T. and Heczko, P.B. (2012). Antibacterial Activity of Selected Standard Strains of Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocins – Pilot Study. Postepy Hig Med Dosw (online), 66: 787-794.
- Buncic, S., Fitzgerald, C.M., Bell, R.G. and Hudson, J.A. (1995). Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperature. Journal of Food Safety, 15(3): 247–264.
- Cegielska-Radziejewska, R., Lesnierowski, G., and Kijowski, J. (2008). Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations- A review. Food Nutrition and Science, 58(10): 5-10.
- Davies, E., Bevis, H. and Delves-Broughton, J. (1997). The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen Listeria monocytogenes. Letters in Applied Microbiology, 24(5): 343–346.
- Duchateau, A.L.L and van Scheppingen, W.B. (2018). Stability study of a nisin/natamycin blend by LC-MS, Food Chemistry, 46(18): 1-15.
- Geornaras, L., Belk, K.E., Scanga, J.A., Kendall, P.A., Smith, G.C. and Sofos, J.N. (2005). Postprocessing antimicrobial treatments to control Listeria monocytogenes in commercial vacuum-packaged bologna and ham stored at 10°C. Journal of Food Protection, 68(5): 991–998.
- Jafari, M. and Elhami Rad, A. (2000). The role of bacteriocins as natural preservatives in milk and its products, National conference of new achievements in the food industry and healthy nutrition. [In Persian]
- Janes, M.E. (2012). Control of Listeria monocytogenes on the surface of refrigerated, ready-to-eat chicken coated with edible zein film coatings containing nisin and/or calcium propionate. Journal of Food Science, 67(7): 2754–2757.
- Javan Yar, A. and Sohrabi, F. (2012). Niacin as a food preservative, National conference of new achievements in food industry and healthy nutrition. [In Persian]
- Jung, D.S., Bodyfelt, F.W. and Daeschel, M.A. (1992). Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting Listeria monocytogenes in fluid milk. Journal of Dairy Science, 75(2): 387–393.
- Knight, K.P., Bartlett, F.M., McKellar, R.C. and Harris, L.J. (1999). Nisin reduces the thermal resistance of Listeria monocytogenes Scott A in liquid whole egg. Journal of Food Protection, 62(9): 999–1003.
- Lungu, B. and Johnson, M.G., (2005). Fate of Listeria monocytogenes inoculated onto the surface of model turkey frankfurter pieces treated with zein coatings containing nisin, sodium diacetate, and sodium lactate at 4°C. Journal of Food Protection, 68(4): 855–859.
- Mirhosseini, M., Nahvi, E., Emtiazi, G. and Tavasolli, M. (2018). Investigating the diversity of bacteriocin-producing lactic acid cocci in some unpasteurized dairy samples. Iran biology magazine. No: 23, pp: 808-815. [In Persian]
- Misaghi, A. and Basti, A.A. (2007). Effect of Zataria multiflora Boiss. Essential oil and nisin on Bacillus cereus ATCC 11778. Food control; 18 (9): 1043 - 9.
- Pearson, L. J., and Marth, E. H. (1990). Behavior of Listeria monocytogenes in the presence of cocoa, carrageenan and sugar in a milk medium incubated with and without agitation. Food Protection, 53(1): 30–37.
- Perez, R., Zendo, T. and Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB) various structures and applications. Microbial Cell Factories,13(1): 3-16.
- Pina-Pérez, M. C., Silva-Angulo, A. B., Rodrigo, D., and Martínez-López, A. (2009). Synergistic effect of pulsed electric fields and cocoa OX 12% on the inactivation kinetics of

Bacillus cereus in a mixed beverage of liquid whole egg and skim milk. International Food Microbiology, 130(3): 196–3204.

- Qashunizadeh, H.A., Mehsti, P. and Shaabani, S. (2014). Investigating the antibacterial effects of nisin on Staphylococcus aureus bacteria in minced sheep meat stored in a refrigerator. Microbiology Foods, 4: 69-77. [In Persian]
- Ruiz, A., Williams, S.K., Djeri, N., Hinton, A. and Rodrick, G.E. (2009). Nisin, rosemary, and ethylenediaminetetraacetic acid affect the growth of Listeria monocytogenes on ready-to-eat turkey ham stored at 4°C for sixty-three days. Poultry Science, 88(8): 1765–1772.
- Samelis, J., Bedie, G.K., Sofos, J.N., Belk, K.E., Scanga, J.A. and Smith, G.C. (2005). Combinations of nisin with organic acids or salts to control Listeria monocytogenes on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. LWT - Food Science and Technology, 38(1): 21–28.
- Saxelin, M., Corpela, R., and MaryaMakinen, A. (2003). Functional dairy product. Dairy Processing, 229–260.
- Soomro, A.H., Masud, T. and Anwaar, K. (2012). Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health. Pakistan Journal of Nutrition, 1(1): 20-24.
- Shrestha, S., , Erdmann, J.J., Riemann, M., Kroeger, K., Juneja, V.K. and Brown, T. (2023). Ready-to-Eat Egg Products Formulated with Nisin and Organic Acids to Control Listeria monocytogenes, Journal of Food Protection, 86: 100081.
- Shi, C., Zhang, X., Zhao, X., Meng, R., Liu, Z., Chen, X. and Guo, N. (2016). Synergistic interactions of nisin in combination with cinnamaldehyde against Staphylococcus aureus in pasteurized milk. Food Control, 71(2017): 10-16.
- Stark, J. (2003). Natamycin: an effective fungicide for food and beverages, pp: 82-97
- Tavakli, M. (2019). Bacteriocins are safe antimicrobial compounds. In: The first national seminar on food security, Sawad Koh 28-29 May. [In Persian]
- Ture, H., Erog, E., Soyer, F. and Zen, B.O. (2008). Antifungal activity of biopolymers containing natamycin and rosemary extract against Aspergillus niger and Penicillium roquefortii, International Journal of Food Science and Technology, 43: 2026–2032
- Ukuku, D.O., Bari, M.L., Kawamoto, S. and Isshikim, K. (2005). Use of hydrogen peroxide in combination with nisin, sodium lactate and citric acid for reducing transfer of bacterial pathogens from whole melon surfaces to fresh-cut pieces. International Journal of Food Microbiology, 104(2): 225–233.
- U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2021). Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg production. Retrieved from https://www.fsis.usda.gov/policy/fsis-directives/7120.1. Accessed October 24, 2022.
- Zendo, T. (2013). Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 77(5): 893-899.
- Zhang, S. and Mustapha, A. (1999). Reduction of listeria monocytogenes and *Escherichia coli* O157:H7 numbers on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin or nisin combined with EDTA. Journal of Food Protection, 62(10): 1123–1127.