گلیکاسیون نایسین با گلوکز، لاکتوز و دکسترن و بررسی اثر مهاری آن بر علیه باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم*

مهدی هاشم‌پور صادقیان[۱]، نسرین کاظمی‌پور[۲*]، سیدشهرام شکرفروش[۳]، محمدهادی اسکندری[٤]

۱. دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۲. دانشیار بخش علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۳. استاد بخش بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
٤. دانشیار بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: kazemipour@shirazu.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹٦/٦/۱۱ پذیرش نهایی: ۹٦/۱۰/۷)

چکیده

نایسین یکی از پپتیدهای ضدمیکروبی است که در صنایع غذایی به‌عنوان ماده نگهدارنده کاربرد دارد. با این وجود، این پپتید فاقد اثر ضدمیکروبی قابل توجه برعلیه باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. در این مطالعه تاثیر گلیکاسیون بر فعالیت ضدمیکروبی نایسین بر علیه باکتری‌های *اشریشیا کولای* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* بررسی گردیده است. بدین منظور محلول نایسین و پنج برابر غلظت قندهای گلوکز، لاکتوز و دکستران و هم‌چنین محلول نایسین بدون حضور قند تهیه و سپس لیوفیلیزه گردید. پودر لیوفیلیزه به‌مدت هفت روز در شرایط دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰٪ قرار گرفت. در هر ۲٤ ساعت یک نمونه از انکوباتور خارج گردید و در آب مقطر محلول شد. با استفاده از روش اندازه‌گیری پروتئین برادفورد، غلظت‌های مولی مساوی از نایسین طبیعی و کنژوگه تهیه شد. درصد گلیکاسیون نمونه‌ها با استفاده از روش OPA (ortho-phthalaldehyde) و MIC50 نایسین کنترل و کنژوگه‌ها با روش میکرودایلوشن بر علیه باکتری‌های *اشریشیا کولای* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* تعیین گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که درصد گلیکاسیون نایسین ارتباط معکوسی با اندازه کربوهیدرات دارد، به شکلی که نایسین-گلوکز بیشترین و نایسین-دکستران کمترین درصد گلیکاسیون را نشان می‌دهند. گلیکاسیون نایسین پس از هفت روز باعث افزایش MIC50 نایسین بر علیه *اشریشیا کولای* گردید. در مقابل MIC50 نایسین طبیعی و کنژوگه تفاوت معنی‌دار نداشتند. از این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که کنژوگه کردن نایسین با کربوهیدرات‌ها نمی‌تواند موجب گسترش فعالیت آن به این دو باکتری گرم منفی گردد.

واژه‌های کلیدی: نایسین، گلیکاسیون، واکنش میلارد، باکتری‌های گرم منفی

مقدمه

نایسین یک پپتید ضدمیکروبی است که متعلق به خانواده باکتریوسین‌ها می‌باشد و توسط سویه‌های مختلف *لاکتوکوکوس لاکتیس* تولید می‌گردد. فعالیت اصلی نایسین عمدتاً از طریق ایجاد منفذ در غشای سیتوپلاسمی ارگانیسم هدف است که منجر به از دست رفتن شیب غلظتی یون‌ها، از دست رفتن متابولیت‌ها و مرگ تدریجی سلول می‌شود. هنگامی که پتانسل آستانه 100 mV وجود داشته باشد نایسین ایجاد کانال می‌کند (Sahl *et al.*, 1987). مکانیسم عمل نایسین بر اساس مدل barrel stave است. بر اساس این مدل نایسین ابتدا با برهم کنش الکتروستاتیک به غشاء متصل می‌شود. به‌دنبال آن تجمع نایسین انجام می‌شود و متعاقب انرژی دار کردن غشاء، ایجاد منفذ القا می‌شود. برخی مطالعات نشان داده‌اند که نایسین ترجیحاً با لیپیدهای حاوی بار منفی واکنش می‌دهد (Driessen *et al.*, 1995). این پپتید در بیش از ۹۰ کشور به‌عنوان ماده نگه دارنده غذایی ایمن شناخته شده است (Cleveland *et al.*, 2001; Khan and Oh, 2016). با این وجود این پپتید فاقد فعالیت ضدمیکروبی قابل توجه در برابر باکتری‌های گرم منفی می‌باشد (Zhou *et al.*, 2016). تاکنون مطالعات مختلفی جهت گسترش فعالیت‌های ضدمیکروبی نایسین بر علیه باکتری‌های گرم منفی گردیده است (Stevens *et al.*, 1991; Cao-Hoang *et al.*, 2008; Elliason and Tatini, 1999). با این وجود هنوز تلاش‌ها برای استفاده از نایسین در برابر باکتری‌های گرم منفی ادامه دارد (Prudêncio *et al.*, 2015).

یکی از ویژگی مهم نایسین ماهیت باردار مثبت آن است که در نتیجه حضور سه ریشه لیزین می‌باشد و در موقعیت‌های ۱۲، ۲۲ و ۳٤ قرار دارند و هم‌چنین حضور یک هیستیدین در موقعیت ۳۱ (Mulders *et al.*, 1991). حضور ریشه‌های لیزین موجب حساسیت این پپتید به گلیکیشن از طریق واکنش‌های میلارد می‌گردد (Liu *et al.*, 2012). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که واکنش‌های میلارد می‌توانند موجب بهبود برخی از خواص پروتئین‌ها شود. برخی از خواصی که توسط گلیکیشن بهبود می‌یابند عبارتند از مقاومت به حرارت (Sato *et al.*, 2005)، امولسیون شوندگی (Zhu *et al.*, 2010)، فوم شوندگی (Medrano *et al.*, 2009)، آنتی‌اکسیدانی (Lertittikul *et al.*, 2007)، بافت (Gerrard *et al.*, 2003) و خاصیت ضدمیکروبی (Usui *et al.*, 2004). در مقابل برخی مطالعات نشان دهنده کاهش فعالیت ضدمیکروبی پپتیدهای ضدمیکروبی در اثر واکنش‌های میلارد می‌باشند (Abdullah *et al.*, 2010; Sant'Anna *et al.*, 2012). مطالعات گذشته در خصوص تأثیر گلیکیشن بر فعالیت ضدمیکروبی نایسین نتایج متفاوتی را نشان می‌دهند. یک مطالعه نشان داد که نایسین گلایکه شده در غلظت‌های بالا موجب فعالیت ضدباکتری‌های گرم منفی می‌گردد، در مقابل مطالعه دیگر نشان داد که گلیکاسیون نایسین تأثیری در فعالیت ضدمیکروبی نایسین بر علیه باکتری *اشریشیا کولای* ندارد (Muppalla *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014). با توجه به ابهامات موجود در مطالعات پیشین مطالعه حاضر با هدف انجام گلیکاسیون نایسین با استفاده از یک مونوساکارید (گلوکز)، یک الیگوساکارید (لاکتوز) و یک پلی ساکارید (دکستران) و هم‌چنین مقایسه

فعالیت ضدمیکربی کنژوگه‌های حاصل در غلظت‌های مولی یکسان بر علیه دو باکتری گرم منفی *اشریشیا کولای* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

- گلیکاسیون

محلول نایسین (Handary CA, Belgium) در در بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار و ٦ pH تهیه گردید. محلول تهیه شده به چهار حجم مساوی تقسیم گردید و به آن‌ها به‌ترتیب پنج برابر غلظت گلوکز (Merck, Germany)، لاکتوز (Merck, Germany) یا دکستران (Sigma, USA) با وزن مولکولی ۵۰۰۰ دالتون اضافه گردید و نهایتاً به قسمت آخر هیچ قندی به آن اضافه نگردید. هر چهار قسمت لیوفیلیزه (Christ Alpha 2-4 LD plus, Germany) شدند تا پودر سفید و خشک حاصل گردد. سپس پودر حاصل از هر نمونه در هفت بشر ۲۵ میلی‌لیتری قرار گرفت. بشرها درون یک دسیکاتور قرار گرفته و در دمای ٦۰ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۰ درصد (که توسط برمید پتاسیم اشباع (Merck, Germany) ایجاد شده بود) به‌مدت یک هفته انکوبه گردید. در این مدت هر ۲٤ ساعت یک بشر از انکوباتور خارج گردید و تا زمان مصرف به فریزر منتقل گردید.

- آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌ها در آب مقطر حل شده و برای مدت ۳۰ دقیقه توسط هم‌زن به صورت ملایم به‌هم زده شدند. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در g ٤۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. غلظت نایسین و محلول کنژوگه آن با روش برادفورد و با استفاده از غلظت‌های سریالی آلبومین سرم گاو (Biorad-USA) که در محدوده بین ۱۰ الی ۱٦۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌عنوان استاندارد تهیه شده بودند تعیین گردید (Bradford, 1976). در نهایت غلظت مولی نمونه‌ها با تقسیم غلظت جرمی بر وزن مولکولی نایسین A تعیین گردید.

- تعیین درصد گلیکاسیون

درصد گلیکاسیون با روش ۸ (Ortho-phthalaldehyde) تعیین گردید. در این روش از تغییرات آمین آزاد به‌عنوان شاخص گلیکاسیون استفاده می‌گردد (Nielsen *et al.*, 2001). محلول OPA از ترکیب ۲ میلی‌لیتر تتراهیدروبورات سدیم (Merck, Germany) ۱۰۰ میلی مولار، ۲/۵ میلی‌لیتر سدیم دودسیل سولفات ۲۰٪، ۱۰۰ میکرولیتر ۲-مرکاپتواتانول (Sigma-Aldrich, USA) و ٤۰ میلی‌گرم OPA حل شده در یک میلی‌لیتر متانول (Merck, Germany) تهیه گردید. مقدار ۲۰ میکرولیتر از نمونه (که حاوی ۷۲/۸ مولار نایسین طبیعی و یا کانژوگه بود) در چاهک ریخته شد و به آن ۱۰۰ میکرولیتر محلول OPA اضافه گردید. پس از سه دقیقه جذب توسط دستگاه میکروپلیت‌ریدر (BioteK Power wave, XS2, USA) در طول موج ۳٤۰ نانومتر قرائت گردید. درصد گلیکاسیون از معادله زیر محاسبه شد (Casey *et al.*, 2004).

۱۰۰٪ × جذب نایسین کنترل/(جذب نایسین کنترل- جذب نایسین کنژوگه)=درصد گلیکاسیون

- اندازه‌گیری فعالیت ضدمیکروبی

فعالیت ضدمیکروبی نایسین گلیکه و غیرگلیکه در محیط مایع و با استفاده از روش microdilution و در

میکروپلیت استاندارد ۹۶ خانه، توسط دستگاه میکروپلیت‌ریدر، بر علیه باکتری‌های *اشریشیا کولای* (ATCC 35218) و *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC 14028) مورد ارزیابی قرار گرفت.

رقت‌های متوالی دو برابری نایسین در محیط کشت TSB (Triple sugar broth) در محدوده بین ٤٥ الی ۰/۷۰ نانومولار و با حجم ۱۰۰ میکرولیتر تهیه گردید. مقدار ۱۰ میکرولیتر از باکتری که در روز قبل کشت شده بود، رقیق شده و به ۱۰۰ میکرولیتر مجموع نمونه و محیط کشت TSB اضافه گردید به شکلی که غلظت نهایی 10^6 CFU/ml به‌دست آمد. کنترل بدون نایسین شامل محیط کشت و باکتری و کنترل استریلیتی نیز شامل محیط کشت بود. میکروپلیت در دستگاه پلیت-ریدر (BioTek'sPowerWave XS2, USA) و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. جذب نور در طول موج ٦۰۰ نانومتر در فواصل زمانی یک ساعته به‌مدت ٢٤ ساعت قرائت گردید. هم‌چنین میکروپلیت به‌مدت ۱۰ ثانیه قبل از قرائت جذب شیک گردید.

منحنی رشد توربیدومتریک بر اساس تغییر در جذب نوری ناشی از رشد باکتری برای هر غلظت رسم گردید و درصد مهار با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\%\ Inhibition = 100 - \left[\frac{\text{OD of wells containing metabolite - OD of negative control}}{\text{OD of the posetive control - OD of negative control}}\right]\times 100$$

منحنی درصد مهار در برابر غلظت محاسبه گردید و از طریق آن MIC50 برای هریک از محصولات محاسبه گردید.

- تجزیه و تحلیل آماری

درصد گلیکاسیون به‌صورت میانگین ± خطای معیار محاسبه گردید. تفاوت آماری میانگین داده‌ها از طریق آزمون انحراف از معیار یک طرفه و به‌دنبال آن آزمون تعقیبی توکی بررسی گردید. MIC50 با استفاده از آزمون کروسکال والیس بررسی گردید. سطح معنی‌داری برای کلیه آزمون‌ها ($P<۰/۰۱$) در نظر گرفته شد. تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) نسخه ۲۲ انجام شد.

یافته‌ها

- اندازه‌گیری درصد گلیکاسیون

اندازه‌گیری درصد گلیکاسیون، نشان داد انکوباسیون نایسین به‌مدت هفت روز تأثیری بر میزان آمین آزاد ندارد. کنژوگه کردن نایسین با گلوکز، لاکتوز و دکستران باعث تغییر معنی‌دار در میزان گلیکاسیون آن گردید (جدول ۱). تغییرات درصد گلیکاسیون به‌نحوی بود که یک فاز سریع و به‌دنبال آن فاز کندتری از گلیکاسیون را نشان داد. بدین ترتیب گلیکاسیون نایسین با گلوکز تا روز دوم و گلیکاسیون نایسین با لاکتوز و دکستران تا روز اول به‌صورت سریع‌تر و پس از آن به‌صورت کندتری ادامه داشت. در پایان درصد گلیکاسیون نایسین در کنژوگه نایسین-گلوکز بیشترین مقدار و در کنژوگه

نایسین دکستران کم‌ترین مقدار بود، به شکلی که درصد گلیکاسیون برای کنژوگه نایسین-گلوکز، نایسین-لاکتوز و نایسین- دکستران نهایتاً به‌ترتیب به ۸۳، ۷۲ و۴۲ درصد بود.

جدول (۱)- درصد گلیکاسیون نایسین، پس از کنژوگه شدن با گلوکز، لاکتوز و دکستران

ترکیبات	روزهای انکوباسیون (۶۰ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۰ درصد)						
	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷
نایسین	۷/۱±٤/۸۷^{a}	۲/۳±۱/۵۹^{a}	۸/۱±۱/۵۲^{a}	٦/۰±۲/٦۸^{a}	۱/۰±۷/۹٥^{a}	٤/۰±٦/۸٤^{a}	٥/۲±٤/۳۲^{aA}
نایسین گلوکز	٥/۰±٦/۷۳^{a}	٥۱/۲±۳/۱۷^{b}	٦٥/٤±۸/۱۷^{c}	۷٥/۰±٦/۷٤^{c,d}	۷۱/۱±۲/۳۱^{c,d}	۷۳/۱±۰/٥۳^{c,d}	۸۲/۰±٦/۸۳^{dD}
نایسین لاکتوز	٥۲/۱±۳/۳۲^{a}	٤۹/۱±۱/۷۰^{a}	٥۳/۲±۹/۰۰^{a}	۷۱/۰±۹/٤۰^{b}	۷۳/۰±٦/۹۳^{b}	٦۹/۲±۰/۱۲^{b}	۷۲/۰±٤/۸۱^{bC}
نایسین دکستران	٤٥/۰±۱/۸۸^{a}	٤۸/۰±۹/٦۷^{a,b}	٥٤/۳±۹/۲۹^{a,b,c}	٥۳/۱±۸/۷٤b,^{c}	۳٦/۰±٦/۰۰b,^{c}	٤۷/۲±۳/۲۰^{c}	٤۲/۰±۸/٥۹^{cB}

داده‌ها بر اساس میانگین ± خطای معیار مرتب شده‌اند (n=۳)؛ حروف متفاوت کوچک نشان دهنده تفاوت‌های آماری در هر ردیف و حروف بزرگ متفاوت نشان دهنده تفاوت‌های آماری در ستون می‌باشند.

- فعالیت ضدمیکروبی

نایسین تأثیر زیادی بر باکتری سالمونلا نداشت و در غلظت ٤٥ نانومولار تنها به‌میزان ۲٦ درصد رشد سالمونلا را مهار کرد به‌نحوی که MIC50 آن معادل ٦۰/٤±۱/۹۷ نانومولار بود. قرار گرفتن نایسین به‌عنوان کنترل، در دمای ٦۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۷ روز تغییری بر MIC50 آن ایجاد نکرد. در مقایسه با *سالمونلا*، نایسین مهار بیشتری بر باکتری *اشریشیا کولای* داشت. به‌نحوی که در غلظت ٤٥ نانومولار به‌میزان ۹۳ درصد رشد این باکتری را مهار نمود و MIC50 آن ۲۳/۱+۱/۲۳ نانومولار محاسبه گردید. قرار گرفتن نایسین به‌عنوان کنترل، در دمای ٦۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۷ روز تغییری بر فعالیت ضدمیکروبی آن بر علیه سالمونلا *تیفی موریوم* (P=۰/۰٥) و *اشریشیاکولای* (P=۰/۷) ایجاد نکرد (جدول ۲). گلیکیشن نایسین با استفاده از گلوکز، لاکتوز و دکستران تغییر معناداری در MIC50 نایسین در مقابل سالمونلاتیفی‌موریوم ایجاد نکرد (جدول ۳). با این وجود کانژوگه کردن نایسین با گلوکز، لاکتوز و دکستران موجب افزایش MIC50 نایسین بر علیه باکتری *اشریشیا کولای* شد (جدول٤).

جدول (۲)- MIC50 نایسین بر علیه باکتری‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *اشریشیا کولای* قبل و پس از هفت روز انکوباسیون در دمای ٦۰ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۰ درصد

	نام باکتری			
	سالمونلا تیفی‌موریوم		*اشریشیا کولای*	
زمان	روز ۰	روز ۷	روز ۰	روز ۷
MIC50 (نانومولار)	۹۱/۱±٦/۸۸	٦۰/٤±۱/۹۷	۲٤/۱±۰/۲٤	۲۳/۱±۱/۲۳

داده‌ها بر اساس میانگین ± خطای معیار مرتب شده‌اند (n=۳).

جدول (۳): MIC50 نایسین کنژوگه با گلوکز، لاکتوز و دکستران در برابر باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* بر حسب نانومولار

ترکیبات	روزهای انکوباسیون (۶۰ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۰ درصد)						
	کنرل	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷
نایسین گلوکز	٦٠/٤±١/٩٧^{a}	٨١/٤±١/٩٧^{a}	٥٧/٥±٦/٠٨^{a}	٥٩/٤±٧/٥١^{a}	٩٣/٦±٦/٦٥^{a}	٩٣/٦±٧/٦٦^{a}	٧٥/٤٢±١/٣٨^{a}	٨٩/٦±٣٢/١٦^{aA}
نایسین لاکتوز	٦٠/٤±١/٩٧^{a}	٩٥/١٥±٢/٢٣^{a}	٩٨/١٣±٩/٧^{a}	٦٩/٤±٢/٦١^{a}	٦٨/١±٤/٣٦^{a}	٦٨/١±٤/٣٦^{a}	١٠٦/١٢±٥/١٠^{a}	٧٧/٥±٩١/٥٥^{aA}
نایسین دکستران	٦٠/٤±١/٩٧^{a}	٧٤/٠±١/٢١^{a}	٧٥/٤±٦٤/٨٤^{a}	٨٠/٣±٨/١٦^{a}	٧٨/٤±٦١/٤٧^{a}	٤٩/٢±١١/٠١^{a}	٥٧/٥±١٤/٨٩^{a}	٦٠/٢±٥/٣٧^{aA}

داده‌ها بر اساس میانگین ± خطای معیار مرتب شده‌اند (n=۳).

حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری در هر ردیف‌ها و حروف بزرگ نشان دهنده تفاوت آماری در هر ستون می‌باشد (P<۰/۰۱).

جدول (٤): MIC50 نایسین کنژوگه با گلوکز، لاکتوز و دکستران در برابر باکتری *اشریشیا کولای* بر حسب نانومولار

ترکیبات	روزهای انکوباسیون (۶۰ درجه سلسیوس و رطوبت ۷۰ درصد)						
	کنترل	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷
نایسین گلوکز	٢٣/١±١/٢٣^{a}	٢٨/١±٤/٣٠^{a}	٤٤/٠±٨/٨٣^{a}	٥١/١±٣/١٢^{a}	٥٦/٤±٧/١٩^{a}	٤٥/٠±٨/٦٣^{a}	٤٧/١±٥١/٣٢^{a}	٦٢/٣±٥٢/٣٨^{bA}
نایسین لاکتوز	٢٣/١±١/٢٣^{a}	٤٤/٠±٠/٦٨^{a}	٤٩/٣±٤/٣٣^{a}	٤٧/٠±٧/٨٧^{a}	٥٧/١±١/٣٠^{a}	٤٣/٠±٨/٩٤^{a}	٤٧/٠±١/٨٧^{a}	٧١/١٥±٧/٩٠^{bA}
نایسین دکستران	٢٣/١±١/٢٣^{a}	٢٣/٠±٣/٥٦^{a}	٢٩/٠±٥/٢٩^{a}	٢٩/٠±٨/١٠^{a}	٣١/١±١/٨٤^{a}	٦٨/١±٩/٣٠^{a}	٧٢/٥±٣/٢١^{a}	١٠٦/١٢±٢/٣٣^{bA}

داده‌ها بر اساس میانگین ± خطای معیار مرتب شده‌اند (n=۳).

حروف کوچک متفاوت نشان دهنده تفاوت آماری در هر ردیف‌ها و حروف بزرگ نشان دهنده تفاوت آماری در هر ستون می‌باشد (P<۰/۰۱).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه به روشنی نشان داد که گلیکاسیون نایسین نمی‌تواند موجب افزایش درصد مهار رشد نایسین گردد. نایسین به‌صورت کنژوگه و غیرکنژوگه فاقد فعالیت ضدمیکروبی قابل توجه بر علیه *سالمونلا تیفی‌موریوم* می‌باشد. فعالیت نایسین گنژوگه در مطالعات قبلی بر علیه این باکتری مورد ارزیابی قرار نگرفته بود. فعالیت نایسین کنژوگه بر علیه باکتری سالمونلا تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته بود. نتایج این مطالعه با مطالعه دیگر در تضاد می‌باشد. در مطالعه مذکور نشان داده شد که کنژوگه‌های نایسین-گلوکز، و نایسین-دکستران که توسط تشعشع امواج گاما ایجاد شده بودند، می‌توانند موجب کاهش رشد باکتری‌های *اشریشیا کولای* و *سودوموناس فلوئورسنس* گردند، هرچند حداقل غلظت باکتریسیدال آن بیش از مقدار لازم برای باکتری‌های گرم مثبت بود (Muppalla *et al.*, 2012). در مقابل، در مطالعه دیگری محصولات واکنش میلارد نایسین در شرایط خشک و با استفاده از گرما تولید گردید. در مطالعه مذکور نایسین با استفاده از لاکتوز، مالتودکسترین و دکستران کانژوگه گردید. در این مطالعه تغییری در فعالیت ضد میکروبی نایسین در مقابل چهار سویه *اشریشیا کولای* مشاهده نگردید (Chen *et al.*, 2014). مطالعه حاضر نشان داد که غلظت‌های بالای نایسین می‌تواند موجب کاهش رشد باکتری *اشریشیا کولای* گردد. گلیکاسیون نایسین موجب کاهش فعالیت ضدمیکروبی نایسین بر علیه باکتری

اشریشیا کولای گردید. در این مطالعه بر خلاف مطالعات قبلی از غلظت مولی نایسین و نایسین کنژوگه به‌منظور یکسان‌سازی غلظت‌ها استفاده گردید. زیرا با توجه به این‌که وزن مولکولی و هم‌چنین فعالیت ضدمیکروبی نایسین در اثر گلیکاسیون تغییر می‌کند، لذا در صورت استفاده از وزن جرمی و هم‌چنین واحد بین‌المللی که در مطالعات پیشین مورد استفاده قرار گرفته است (Muppalla *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014) تعداد مولکول‌های استفاده شده در هر آزمون متفاوت خواهند بود.

این مطالعه نشان داد کاهش فعالیت ضدمیکروبی نایسین بر علیه *اشریشیا کولای* با درصد گلیکاسیون نایسین ارتباط مستقیم دارد. این امر ممکن است به‌علت کاهش بار مثبت ناشی از گروه‌های آمین آزاد باشد. بارهای مثبت گروه‌های آمین نقش مهمی در اتصال نایسین به اسیدهای چرب حاوی بارهای مثبت دارد (Breukink *et al.*, 1997; Breukink *et al.*, 2003) لذا به‌نظر می‌رسد کاهش گروه‌های آمین آزاد از این طریق موجب کاهش فعالیت نایسین بر علیه باکتری *اشریشیا کولای* گردیده است. در مطالعه حاضر قرار گرفتن نایسین به‌عنوان کنترل در شرایط دما و رطوبتی که برای واکنش میلارد لازم بود، نشان داد که تغییر در فعالیت ضدمیکروبی نایسین کانژوگه بر علیه *اشریشیا کولای* ناشی از قرار گرفتن آن در دمای انکوباسیون نمی‌باشد. بر اساس مطالعه حاضر روش‌های که مبتنی بر تغییر بار الکتریکی نایسین هستند نمی‌توانند موجب القاء فعالیت ضدمیکروبی نایسین بر علیه این دو باکتری گرم منفی گردند. این امر به‌علت لایه بیرونی باکتری‌های گرم منفی است که موجب مقاومت آن‌ها در برابر نایسین می‌گردد (Prudêncio *et al.*, 2015). بر همین اساس روش‌هایی که باعث بی‌ثباتی این لایه می‌گردند می‌توانند باکتری‌های گرم منفی را نسبت به نایسین حساس نمایند. این روش‌های شامل اضافه کردن هم‌زمان برخی مواد نگهدارنده (مانند شلاته کننده‌ها (Stevens *et al.*, 1991; Boziaris and Adams, 1999) و یا روغن‌های ضروری گیاهی (Moosavy *et al.*, 2008; Govaris *et al.*, 2010)، استفاده هم‌زمان از سایر مواد ضدمیکروبی (هیپوکلریت سدیم) (Molinos *et al.*, 2008) و یا روش‌های نگهداری غذا (مانند منجمد کردن (Cao-Hoang *et al.*, 2008، فشار بالا (Masschalck *et al.*, 2000) و استفاده از جریان الکتریکی(Viedma *et al.*, 2008) می‌باشد.

نتایج این مطالعه **نشان** می‌دهد که کنژوگه کردن نایسین با گلوکز، لاکتوز و دکستران نه تنها نمی‌تواند موجب ایجاد فعالیت ضدمیکروبی بر این دو باکتری گرم منفی گردد بلکه موجب کاهش فعالیت ضدمیکروبی آن برعلیه باکتری *اشریشیا کولای* می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع

- Abdullah, S.U., Badaruddin, M., Ali, R. and Riaz, M.N. (2010). Effect of elementary and advanced glycation products of nisin on its preservative efficacy and digestibility. Food Chemistry, 122(4): 1043-1046.
- Boziaris, I. and Adams, M. (1999). Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram negatives. International Journal of food microbiology, 53(2): 105-113.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72(248-254.
- Breukink, E., van Heusden, H.E., Vollmerhaus, P.J., Swiezewska, E., Brunner, L., Walker, S., et al. (2003). Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes. Journal of Biological Chemistry, 278(22): 19898-19903.
- Breukink, E., van Kraaij, C., Demel, R.A., Siezen, R.J., Kuipers, O.P. and de Kruijff, B. (1997). The C-terminal region of nisin is responsible for the initial interaction of nisin with the target membrane. Biochemistry, 36(23): 6968-6976.
- Cao-Hoang, L., Marechal, P., Le-Thanh, M. and Gervais, P. (2008). Synergistic action of rapid chilling and nisin on the inactivation of Escherichia coli. Applied Microbiology and Biotechnology, 79(1): 105-109.
- Casey, J., O'Cleirigh, C., Walsh, P. and O'Shea, D. (2004). Development of a robust microtiter plate-based assay method for assessment of bioactivity. Journal of microbiological methods, 58(3): 327-334.
- Chen, H., Davidson, P.M. and Zhong, Q. (2014). Antimicrobial properties of nisin after glycation with lactose, maltodextrin and dextran and the thyme oil emulsions prepared thereof. International Journal of food microbiology, 191: 75-81.
- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of food microbiology, 71(1): 1-20.
- Driessen, A.J., van den Hooven, H.W., Kuiper, W., van de Kamp, M., Sahl, H.G., Konings, R.N., et al. (1995). Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. Biochemistry, 34(5): 1606-1614.
- Elliason, D. and Tatini, S. (1999). Enhanced inactivation of Salmonella typhimurium and verotoxigenic Escherichia coli by nisin at 6· 5° C. Food Microbiology, 16(3): 257-267.
- Gerrard, J., Brown, P. and Fayle, S. (2003). Maillard crosslinking of food proteins III: the effects of glutaraldehyde, formaldehyde and glyceraldehyde upon bread and croissants. Food Chemistry, 80(1): 45-50.
- Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A. and Chatzopoulou, P. (2010). The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against Salmonella Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. International Journal of food microbiology, 137(2): 175-180.
- Khan, I. and Oh, D.-H. (2016). Integration of nisin into nanoparticles for application in foods. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 34(376-384.
- Lertittikul, W., Benjakul, S. and Tanaka, M. (2007). Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–glucose model system as influenced by pH. Food Chemistry, 100(2): 669-677.
- Liu, J., Ru, Q. and Ding, Y. (2012). Glycation a promising method for food protein modification: physicochemical properties and structure, a review. Food Research International, 49(1): 170-183.
- Masschalck, B., Garcí, C., Van Haver, E. and Michiels, C.W. (2000). Inactivation of high pressure resistant Escherichia coli by lysozyme and nisin under high pressure. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 1(1): 39-47.
- Medrano, A., Abirached, C., Panizzolo, L., Moyna, P. and Añón, M. (2009). The effect of glycation on foam and structural properties of β-lactoglobulin. Food chemistry, 113(1): 127-133.

- Molinos, A.C., Abriouel, H., López, R.L., Valdivia, E., Omar, N.B. and Gálvez, A. (2008). Combined physico-chemical treatments based on enterocin AS-48 for inactivation of Gram-negative bacteria in soybean sprouts. Food and chemical toxicology, 46(8): 2912-2921.
- Moosavy, M.-H., Basti, A.A., Misaghi, A., Salehi, T.Z., Abbasifar, R., Mousavi, H.A.E., et al. (2008). Effect of Zataria multiflora Boiss. essential oil and nisin on Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus in a food model system and on the bacterial cell membranes. Food Research International, 41(10): 1050-1057.
- Mulders, J.W., Boerrigter, I.J., ROLLEMA, H.S., SIEZEN, R.J. and VOS, W.M. (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. European Journal of Biochemistry, 201(3): 581-584.
- Muppalla, R., Sonavale, R., Chawla, S. and Sharma, A. (2012). Functional properties of nisin–carbohydratec onjugates formed by radiation induced Maillard reaction. Radiation Physics and Chemistry, 81(12): 1917-1922.
- Nielsen, P., Petersen, D. and Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. Journal of food science, 66(5): 642-646.
- Prudêncio, C.V., Dos Santos, M.T. and Vanetti, M.C.D. (2015). Strategies for the use of bacteriocins in Gram-negative bacteria: relevance in food microbiology. Journal of food science and technology, 52(9): 5408-5417.
- Sahl, H.G., Kordel, M. and Benz, R. (1987). Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. Arch Microbiol, 149(2): 120-124.
- Sant'Anna, V., Cladera-Olivera, F. and Brandelli, A. (2012). Kinetic and thermodynamic study of thermal inactivation of the antimicrobial peptide P34 in milk. Food Chemistry, 130(1): 84-89.
- Sato, R., Sawabe, T. and Saeki, H. (2005). Characterization of fish myofibrillar protein by conjugation with alginate oligosaccharide prepared using genetic recombinant alginate lyase. Journal of food science, 70(1): C58-C62.
- Stevens, K., Sheldon, B., Klapes, N. and Klaenhammer, T. (1991). Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other gram-negative bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 57(12): 3613-3615.
- Usui, M., Tamura, H., Nakamura, K., Ogawa, T., Muroshita, M., Azakami, H., et al. (2004). Enhanced bactericidal action and masking of allergen structure of soy protein by attachment of chitosan through Maillard-type protein-polysaccharide conjugation. Food/Nahrung, 48(1): 69-72.
- Viedma, P.M., López, A.S., Omar, N.B., Abriouel, H., López, R.L., Valdivia, E., et al. (2008). Enhanced bactericidal effect of enterocin AS-48 in combination with high-intensity pulsed-electric field treatment against Salmonella enterica in apple juice. International Journal of food microbiology, 128(2): 244-249.
- Zhou, L., van Heel, A.J., Montalban-Lopez, M. and Kuipers, O.P. (2016). Potentiating the activity of nisin against Escherichia coli. Frontiers in cell and developmental biology, 4(7): 1-9.
- Zhu, D., Damodaran, S. and Lucey, J.A. (2010). Physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate (WPI)− dextran conjugates produced in aqueous solution. Journal of agricultural and food chemistry, 58(5): 2988-2994.

Glycation of nisin with glucose, Lactose and dextran and investigation of its inhibitory effect on *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium

Hashempour Sadeghian, M.[1], Kazemipour N.[2*], Shekarforoush, S.S.[3], Eskandari, M.H.[4]

1. Student of biochemistry, Department of basic science, School of veterinary medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. Associate professor of biochemistry, Department of basic science, School of veterinary medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
3. Professor of Food Hygiene, Department of Food Hygiene, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
4. Professor of Food Hygiene, Department of Food science and technology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

[*]Corresponding author E.mail: kazemipour@shirazu.ac.ir
(Received: 2017/9/2 Accepted: 2017/12/28)

Abstract

Nisin is an antimicrobial peptide used in the food industry as a preservative. However, this peptide has no considerable effect on gram-negative bacteria. In this study, the effect of glycation on the antimicrobial activity of nisin was elucidated against *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. A solution of nisin and fivefold concentration of glucose, lactose and dextran and solution of nisin without any sugar were prepared in phosphate buffer and were lyophilized. The lyophilized powder was exposed to 60°C temperature and 70% humidity for 7 days. Every 24 hours, one sample was collected and dissolved in distilled. The equal molar concentration of native and conjugated nisin was made. Percentage of glycation was measured by OPA (ortho-phthalaldehyde) method. MIC50 of nisin was assayed by microdilution method against *E. coli* and *S.* Ttyphimurium. The result of this study has revealed that the percentage of glycation is conversely related to the size of carbohydrates in which nisin-glucose had the highest and nisin-dextran had the least percentage of glycation. Glycation of nisin increased the MIC50 of nisin against *E. coli* after seven days. MIC50 of native nisin and glycated nisin had no difference against *S.* Typhimurium. From this study, it was concluded that conjugation of nisin with carbohydrates is not able to extend the antimicrobial activity of nisin to gram-negative bacteria.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Nisin, Glycation, Maillard reaction, gram-negative