تحديد تراكيز الحد الأدنى للتثبيط من انزيم اللايسوزايم وEDTA و الناتامايسين المضافة للأغشية القابلة للاكل ضد نمو بعض الأحياء المجهرية

ضياء ابراهيم جرو البدراني
كلية الزراعة/ جامعة بابل

حميد عبود جبر
كلية الزراعة / جامعة بغداد

الخلاصة :

اجريت الدراسة الحالية لاجل تقدير تراكيز الحد الادنى للتثبيط من بعض العوامل المضادة للاحياء المجهرية وذلك بدمج العوامل مع محاليل الاغشية البروتينية البسيطة الكازينية والجيلاتينية وتجربة تأثير تلك العوامل على مجموعة من الاحياء المجهرية على الطبق ، حيث شملت العوامل المضادة للاحياء المجهرية على انزيم اللايسوزايم من بياض بيض الدجاج ، والناتامايسين المنتج من بكتريا *streptomyces natalensis* ، واستخدم EDTA مع انزيم اللايسوزايم . مزجت هذه العوامل بمحاليل أغلفة كازينات الصوديوم والأغلفة الجيلاتينية كل على انفراد . واستخدمت طريقة تقدير قطر الهالة على طبق بتري يحتوي على نوع من البكتريا الموجبة أو السالبة لصبغة كرام أو أحد أنواع الأعفان لتحديد تراكيز الحد الأدنى للتثبيط من هذه العوامل المضادة للاحياء المجهرية. أوضحت النتائج أن تركيز الحد الأدنى للتثبيط من انزيم اللايسوزايم ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* ; *Bacillus* sp ; *Lactococcus lactis* *Staphylococcus aureus.* (حجم اللقاح 1×10^8 وحدة تكوين مستعمرة / مل) هو 1 ملغم /لتر ، في حين كان تركيز الحد الأدنى للتثبيط من النتامايسين ضد نمو *Aspergillus* sp. و *Penicillium* sp. (حجم اللقاح 1 $\times10^6$بوغ / مل) هو 20 ملغم / لتر ، وإن تركيز الحد الأدنى للتثبيط من EDTA (بوجود انزيم اللايسوزايم بتركيز الحد الأدنى للتثبيط) هو 200 ملغم / لتر عند استخدامه لتثبيط مجموعة من البكتريا السالبة لصبغة كرام مثل *E. coli* و *Pseudomonas* sp. (بحجم لقاح 1 $\times10^8$ وحدة تكوين مستعمرة / مل من كل منهما).

الكلمات الدالة : انزيم اللايسوزايم ، الناتامايسين ، EDTA ، الاغشية القابلة للاكل .

Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Lysozyme , EDTA , Natamycin added to edible film against microorganism growth .

Abstract

This study was performed to find the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of some of antimicrobial agents added to solution of casein and gelatin edible film against some of microorganisms. These agents includes lysozyme from hens egg white , Natamycin from *streptomyces natalensis* and EDTA with lysozyme. These agents were added to Na-caseinate and gelatin film solutions separately. Determination of clear zone diameter in petridish contains one of G^+ or G^- bacteria or molds were used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of these antimicrobial agents. Results showed that the MIC of lysozyme against some of G^+ bacteria such as *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* ; *Lactococcus lactis*; *Bacillus* sp. and

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

ISSN 2072-3875

S*taphylococcus aureus (* with inoculation of $1x10^8$CFU/ml from each one) were 1mg/ L , while the MIC for Natamycin against *Aspergillus* sp . and *Penicillium* sp . (with inoculation of 1x 10^6 spore/ ml) were 20 mg / L and the MIC of EDTA were 200mg / L when it used with lysozyme (1mg/ L) to inhibit G^- bacteria such as *E. coli* and *Pseudomonas* sp. (inoculation of $1x10^8$ CFU/ml).

Key Words : Lysozyme, EDTA, Natamycin; Edible film

المقدمة :

تعدَ التعبئة والتغليف بالعوامل المضادة للاحياء المجهرية هي إحدى هذه الطرق الناجحة جداً في حفظ الاغذية والتي راج استعمالها مؤخراً بشكل ملفت للانتباه . وتبنى هذه العملية على أساس إحدى الطرق الآتية : - (Appendini and Hotchkiss 2002) .

1- إضافة العوامل المضادة للاحياء المجهرية بشكل ظروف أوحشوات صغيرة في داخل عبوة الغذاء.

2-طلاء أو تقييد او إضافة العامل المضاد للاحياء المجهرية بشكل مباشر في مادة تعبئة الغذاء. 3- أستخدام مواد تعبئة تكون هي نفسها مواد مضادة للاحياء المجهرية . إستخدمت المواد الكيمياوية مثل الحوامض العضوية وغير العضوية ، المعادن ، الكحولات ، مركبات الامونيوم او الامينات التي يمكن دمجها في مادة تعبئة الغذاء كمضادات للاحياء المجهرية (Appendini and Hotchkiss 2002, Suppakul et al. 2003). ولكن بسبب المتطلبات الصحية للمستهلكين فقد أصبح المنتجون مشغولين جدا في استعمال المواد الحافظة الحيوية في عملية التعبئة هذه . وتتضمن المواد الحافظة الحيوية المقترحة في مثل هذه التعبئة البكتريوسينات مثل البيديوسين Pedocine والنيسين Nisin واللاكتيسين lacticin كذلك استخدام الإنزيمات المضادة للاحياء المجهرية مثل اللايسوزايم Lysozyme واللاكتوبيروكسيديز Lactoperoxidase الكايتينيز Chitinase وكلوكوزاوكسيديز Glucose oxidase .

ويعدَ انزيم اللايسوزايم واحد من اكثر العوامل المضادة للاحياء المجهرية استخداما في التعبئة الذي ابدى فعالية عالية جدا وخصوصا ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام (Han 2000, Quintavalla and Vicini 2002). وعندما يضاف EDTA مع اللايسوزايم فان الانزيم يصبح فعالا ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام ايضا (Padgett et al. 1998, Branen and Davidson 2004) . كذلك يستخدم الناتامايسين مادة حفظ حيوية في أنظمة التعبئة آنفة الذكر وذلك لحماية الأغذية من التلف بالأعفان ، ويتميز الناتامايسين بإمكانية بقائه فعالا تحت ظروف الخزن الجيدة للمنتج ولا يؤثر إطلاقا على خصائص جودة المنتج (Datta, 2005). وانزيم اللايسوزايم هو (Peptidoglycan N-acetylmuramoyl hydrolases) الذي يسمى أيضاً Muramidases (Chipman & Sharon , 1969) . يهاجم اللايسوزايم الاصرة من نوع 4-1-***B*** التي تربط الوحدات الثانوية N- acetylglucoseamine (G) و N-acetylmuramic acid (M) المكون لسلاسل Peptedoglycan مما يؤدي إلى تحلل الجدران الخلوية للبكتريا (Salton, 1957 ; Chipman & Sharon ,1969; Mine et al,2004) . إن مادة التفاعل الطبيعية لفعل هذا الإنزيم هي طبقة الببتيدوكلايكان الموجودة في جدار الخلية البكتيرية التي تحمي المكونات الداخلية للخلية وتعطي شكل الخلية وثباتيتها تجاه الضغط الداخلي لمكونات الخلية وتحميها من الأضرار الميكانيكية الخارجية . عملية تحليل طبقة الببتيدوكلايكان تقود إلى تحليل الجدار الخلوي ، إذ يتركب جدار خلية البكتريا الموجبة لصبغة كرام من طبقة سميكة من الببتيدوكلايكان مع سلسلة ناعمة من حامض التكويك وحامض اللاييوتكوك ،أما جدار البكتريا السالبة لصبغة كرام فيتركب من طبقتين طبقة داخلية مكونة من طبقة واحدة من الببتيدوكلايكان بدون حامض التكويك أما الطبقة الخارجية من الغلاف فانها مكونة من طبقة سميكة من اللاييوبولي سكرايد .هذه الطبقة الخارجية في جدارالبكتريا السالبة لصبغة كرام تمنع تاثير اللايسوزايم ضد طبقة الببتيد وكلايكان مما يقلل حساسية هذه البكتريا لفعل هذا الانزيم (Salton,1958) .

ISSN 2072-3875

أشاربعض الباحثين إلى زيادة طيف الفعالية المضادة تجاه الاحياء المجهرية لهذا الإنزيم وذلك عن طريق دمجه مع (EDTA) الذي سيعطيه فعالية عالية ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام (Appendini & Hotchkiss,1997; Buonocore et al. 2004) وينحصر تأثيرEDTA على الاحياء المجهرية بانه يقوم بسحب العناصر من طبقة اللايبوبولي سكرايد ويخلخل الجدار كذلك فانه يعمل على ازالة عنصري الكالسيوم والمغنسيوم اللذان يعتبران من عوامل تقليل فعالية اللايسوزايم وبذلك سيزداد طيف فعالية هذا الانزيم (Perry et al,1960).

اما الناتامايسين فانه يستخدم كمضاد للاعفان حيث شاع استعماله في حفظ الاجبان ومنتجات اللحوم المملحة والصوصج ويعتبر الناتامايسين عامل حفظ غذائي جيد وذلك لأنه يحقق المتطلبات الآتية:

1- فعال جداً ضد مسببات الفساد من الاحياء المجهرية وخاصة الخمائر والأعفان مثله مثل حامض الاسكوربيك لكن تاثيره قليل على البكتريا .2-إمكانية بقائه فعالاًتحت ظروف الخزن الجيدة للمنتج وبذلك يطيل العمر الخزني للغذاء. 3- صلاحيته للاستهلاك البشري .4-لايشكل عبئاً اضافياً على اسعار المنتجات.5-لايؤثر اطلاقاً على خصائص جودة المنتج ومظهره ولونه ونكهته ورائحته.

هناك ثلاث طرق رئيسية لإختبار تأثير هذه العوامل المضادة للاحياء المجهرية في الأغلفة (Appendini & Hotchkiss,2002) الطريقة الاولى هي طريقة تحديد تركيز الحد الأدنى للتثبيط ويسمى Minimum Inhibitory Concentration (MIC)والذي هو أدنى تركيز للعامل المضاد للاحياء المجهرية في البوليمرالذي يثبط تماماً نمو الأحياء المجهرية قيد الاختبار. وفي هذه الطريقة يحوي الغلاف على تراكيز مختلفة من العامل المضاد للاحياء المجهرية المعين والموضوع في أنابيب حاوية على وسط زرعي سائل ملقح بأحياء مجهرية معينة . تحضن الأنابيب لفترة من الزمن ويلاحظ تكون العكارة التي ترتبط بمدى التثبيط للاحياء المجهرية وأقل تركيز لا يعطي عكارة سيكون هوتركيز الحد الادنى للتثبيط اما الطريقة الثانية فهي الأختبار الديناميكي للدورق الهزا ز اذ انه في هذه الطريقة يخلط مع الدوارق الحاوية على أوساط زرعية سائلة بوليمر حامل للعوامل المضادة للنمو الميكروبي، وتلقح الدوراق بأحياء مجهرية معينة وتحضن مع التحريك الهادئ. تترك النماذج مدة من الزمن ثم يقدر الاختزال في معدل النمو.هذه الطريقة تعطي معلومات مفصلة عن حركية العامل المضاد للاحياء المجهرية .اما الطريقة الثالثة فهي طريقة اختبار طبق الآكار وفي هذا الاختبار ، يوضع الغلاف الحاوي على العامل المضاد للنمو للاحياء المجهرية في بيئة صلبة ملقحة بأحياءمجهرية معينة ، ثم تحضن أطباق الآكار مدة زمنية تتناسب مع نوع تلك الأحياء المجهرية .الهالات الشفافة التي تتكون حول مناطق تواجد الغلاف الحامل للعامل المضاد للاحياء المجهرية المعين تدل على أن العامل للاحياء المجهرية قد انتشر من الغلاف وثبط نمو الأحياء المجهرية . يمكن أن يقاس قطر الهالة الشفافة ليساعد في التقدير الكمي لفعالية العامل المضاد للاحياء المجهرية. إن هذا النوع من التطبيق يدل على أن الغلاف يقيد العامل المضاد للاحياء المجهرية ويجعل انتشاره بطيئاًجداً من خلال ملاحظة انتشارها على الطبق وهي مدمجة مع بعض مواد التغليف الحيوي .

واستنادا الى كل خصائص الفعالية العالية للعوامل المضادة لنمو الاحياء المجهرية (خاصة االمفسدة للغذاء) المذكورة فقد جاءت هذه الدراسة الحالية لغرض تقدير تراكيز الحد الأدنى للتثبيط من هذه العوامل عن طريق اختبار طبق الآكار.

ISSN 2072-3875

المواد وطرائق العمل :

المواد :

استخدمت مواد كازينات الصوديوم المحضرة في المختبر والجيلاتين البقري الغذائي المجهز من شركة Gelita Do Brasil البرازيلية كذلك استخدمت الملدنات التي شملت على الكليسيرول Glycerol مجهز من شركة BDH Chemical Ltd Poole الانكليزية و السوربيتول Sorbitol (-) D مجهز من شركة Hi - Media Laboratories Pvt الهندية كمواد لتكوين الاغشية الحاملة للعوامل المضادة للاحياء المجهرية والتي شملت بدورها على العوامل التالية:

إنزيم اللايسوزايم ، ومصدره بياض بيض الدجاج مجهز من شركة BIO BASIC INC. الأمريكية و الناتامايسين مجهز من شركة DANISCO الدانماركية والمصنع للاستخدام الغذائي و أثيلين ثنائي امين رباعي حامض الخليك EDTA المجهز من شركة BDH limited Poole الانكليزية.اما الاوساط الزرعية التي تم استخدامها فشملت اوساط (Nutrient agar و MacConkey agar و Eosine Methylen Blue agar (E.M.B. agar و Mannitol Salt –agar وSabouraud Dextrose agar والتي حضرت مختبريا وحسب تعليمات الشركة المجهزة . عقمت بالمؤصدة على درجة حرارة121 م° وبضغط 15 باوند / أنج ^{2} مدة 15 دقيقة باستثناء الحالات الواردة إزاءها علاوة على استخدام الكلورومفينكول (Chloramphenicol) مع بيئة تنمية الأعفان والخمائر Saubourd dextrose agar لمنع نمو البكتريا.

طرائق العمل :

تحديد تركيز الحد الادنى للتثبيط من اللايسوزايم

اضيفت تراكيز مختلفة من إنزيم اللايسوزايم تراوحت من 0 -2 ملغم / لتر ، فعاليته النـوعية 20000 وحدة /ملغم والتي تم تقديرها وفق الطريقة التي ذكرها (1986) Lichan et al الى محاليل الاغشية الكازينية والجيلاتينية حيث أضيف اللايسوزايم على شكل محاليل مذابة بالماء مع التحريك بجهاز المحرك المغناطيسي وعلى درجة حرارة 25 م°، ثم صبت محاليل الأغلفة الحاوية على اللايسوزايم في إطباق بتري للحصول على الأغشية وبعد إزالة الاغشية من سطوح إطباق بتري تم تقطيعها على شكل أقراص باستخدام آلة تقطيع خاصة بقطر 6 ملم للقرص الواحد حسب ما ذكره (2005) Nadarajah ، اجري تعقيم الأقراص باستخدام الأشعة فوق البنفسجية ولمدة 1–5 دقيقة (Andrady et al ,1996 ; Maria & Adam,2002) . جرى تحضير التخافيف اللازمة من مزارع بكتيرية موجبة لصبغة كرام شملت على : - ; *Staphylococcus aureus ; ,Lactococcus lactis* . *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* وأخرى سالبة لصبغة كرام شملت على :- *E. coli ; Pseudomonas sp ; Salmonella sp* . تم الحصول عليها من جامعة بابل - كلية العلوم وتم نقل 1 مل منها الى اطباق بتري بحيث كان حجم اللقاح 1×10^{8} وحدة تكوين مستعمرة / مل وباستخدام أوساط زرعية مناسبة حسب نوع البكتريا.

أضيفت أقراص الأغشية المحضرة الكازينية والجيلاتينية الحاوية على اللايسوزايم (مع مراعاة ظروف التعقيم) بمعدل4 أقراص لكل طبق وبمكررين ، حضنت الإطباق بدرجات حرارية ملائمة لكل نوع من الأحياء المجهرية ولمدة تراوحت بين 24 -48 ساعة .بعد انتهاء فترة الحضن تم ملاحظة تأثير الأغشية الحاوية على اللايسوزايم على نمو الأحياء المجهرية عن طريق قياس قطر الهالة المتكونة وتم تحديد تركيز الحد الأدنى من اللايسوزايم الذي يمنع نمو الأحياء المجهرية وأطلق عليه تركيز الحد الأدنى للتثبيط Minimum Inhibitory Concentration (MIC) . كذلك تم تحديد تركيز الحد الأدنى للتثبيط من الناتامايسين Natamycin **باستخدام** تراكيـز مختلفة تراوحت من10 – 50 ملغم / لتر بدلا من اللايسوزايم . حضرت أطباق من الوسط الزرعي Sabouraud dextrose agar ولقحت بـ 1مل من عالق أعفان معزولة من أجبان محلية ملوثة وبواقع 1×10^{6} بوغ / مل حيث حضر عالق الابواغ بنقل عروتين بأبرة التلقيح (2Loopful)من مزارع عزلات الاعفان الى انبوبة

ISSN 2072-3875

اختبار حاوية على 5 مل من الماء المقطر المعقم ، رجت الانبوبة جيدا ثم حسب عدد الابواغ باستعمال شريحة Haemocytometer بعدها حضرت التخافيف اللازمة للحصول على الحجم المطلوب من اللقاح (بوغ / مل).

أضيفت أقراص الأغشية الكازينية والجيلاتينية الحاوية على الناتامايسين إلى أطباق تلك الأعفان وبعد الحضن على درجة 22 – 25 م°لمدة2 – 5 أيام تم ملاحظة قطر الهالة المتكونة في الأطباق الزرعية وتم تحديد تركيز الحد الأدنى للتثبيط من الناتامايسين على نمو الفطريات.كذلك تم تحديد تركيز الحد الأدنى للتثبيط باستخدام اثلين ثنائي امين رباعي حامض الخليك EDTA **وذلك** باستخدام تراكيز مختلفة منه تراوحت بين 50 – 300 ملغم/ لتر وذلك لغرض تحديد تراكيز الحد الأدنى لتثبيط نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام وبوجود اللايسوزايم .

تم تحضيرالتخفيفات اللازمة من بكتريا سالبة لصبغة كرام شملت على *E. coli, Pseudomonas* sp. *Salmonella* sp. ولقحت الأطباق الخاصة بتلك المزارع بـ 1مل منها وبواقع 1×10^8 وحدة تكوين مستعمرة/ مل أضيفت أقراص الأغشية الكازينية والجيلاتينية الحاوية على اللايسوزايم و EDTA معا وبواقع 4 أقراص لكل طبق وبمكررين . حضنت الإطباق بدرجة حرارة مناسبة لنمو كل بكتريا تراوحت بين 25 - 35 م°مدة 24 – 48 ساعة . قيس قطر الهالة المتكونة وتم حساب تركيز الحد الأدنى للتثبيط من استخدام اللايسوزايم و EDTA معا على نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام .

النتائج والمناقشة :

دراسة تحديد الحد الادنى للتثبيط من العوامل المضادة للاحياء المجهرية

تحديد تركيز الحد الأدنى للتثبيط للايسوزايم

استخدم في هذه الدراسة انزيم اللايسوزايم بتركيز 0 – 2 ملغم \ لتر مضافا إلى خليط محاليل الأغلفة الكازينية و الجيلاتينية ودرس تأثيره على تثبيط نمو مجموعة من البكتريا الموجبة لصبغة كرام شملت على بكتريا *Staphylococcus aureus* ; *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* ; *Bacillus* sp ; *Lactococcus lactis* وأخرى بكتريا سالبة لصبغة كرام شملت على *E. coli* و *Pseudomonas* sp. ، وقد لقحت الأوساط المتخصصة في أطباق بتري بهذه الأنواع من البكتريا كل على إنفراد وبمكررين وبحجم لقاح حوالي 1×10^8 وحدة تكوين مستعمرة / مل ووضعت أقراص الأغلفة الكازينية والجلاتينية الحاوية على التراكيز أعلاه من اللايسوزايم .

بينت النتائج أن إضافة انزيم اللايسوزايم سواء إلى الأغلفة الكازينية أو الجيلاتينية يثبط نمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام المذكورة في أعلاه باستثناء بكتريا *Staphylococcus aureus* (جدول 1) . اذ بلغ معدل قطر هالة التثبيط لنمو بكتريا *Lactococcus lactis* 18.7ملم في حين بلغ معدل قطر هالة التثبيط لنمو بكتريا *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* 13.7 ملم عند استخدام اللايسوزايم بتركيز 1 ملغم \ لتر في كلا نوعي الغلاف الكازيني والجيلاتيني .

وازداد قطر هالة التثبيط لنمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام بشكل عام عند زيادة تركيز اللايسوزايم إلى 2 ملغم \ لتر المضاف إلى الأغلفة الكازينية والجيلاتينية إذ بلغ قطرالهالة في بكتريا *Lactococcus lactis* و بكتريا *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* 19 ملم و 18.4 ملم على التوالي ، عند تنميتها تحت الظروف السابقة نفسها.ويعود تأثير اللايسوزايم على تثبيط نمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام إلى فعاليته في كسر الآصرة الكلايكوسيدية نوع 4 -1 – ***B*** التي تربط بين الوحدات البنائية N-acetyl muramic acids و acetyl N- glucose amine المكونة لطبقة الببتيدوكلايكان الأمر الذي يؤدي الى كسر الجدار الخلوي وتحطيمه وبالتالي تثبيط نمو هذه البكتريا أو إيقافه (Mine et al ,2004) وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره العديد من الباحثين Xue et al 2004; Ibrahim , 1996) الذين أشاروا إلى فاعلية اللايسوزايم على البكتريا الموجبة لصبغة كرام . وعلى خلاف ذلك فإن بكتريا *Staphylococcus aureus* بالرغم من كونها بكتريا موجبة لصبغة كرام إلا أن نتائج هذه الدراسة أشارت إلى عدم وجود تأثير للايسوزايم وبجميع التراكيز المستعملة على تثبيط نمو هذه البكتريا(جدول 1) وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره Bera et al(2005) الذي اشار الى عدم وجود أي تأثير او فعل تثبيطي

ISSN 2072-3875

للايسوزايم على بكتريا *Staph aureus* وذلك بسبب التحوير في طبقة الببتيدوكلايكان المكونة للجدار الخارجي لهذه البكتريا ،إذ ان تكون اصرة من نوع O-acetylation في ذرة الكاربون رقم 6 في الوحدة الفرعية N-acetyl muramic acid يحول دون امكانية وصول اللايسوزايم الى موقع التأثير في طبقة الببتيدوكلايكان.

أما بالنسبة لتأثيرانزيم اللايسوزايم على تثبيط نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام فقد أشارت النتائج الموضحة في الجدول (1) إلى عدم وجود تأثير لهذا الأنزيم وبالتراكيز المستخدمة 0 – 2 ملغم \ لتر في تثبيط البكتريا السالبة مثل *E. coli* و *Pseudomonas sp.* ويعود السبب في ذلك إلى احتواء الجدار الخلوي لهذه البكتريا على طبقة كبيرة من السكريات المتعددة الدهنية Lipopolysaccharides التي تمثل حوالي 80% من مكونات الجدار الخلوي لهذه البكتريا مما يحول دون وصول اللايسوزايم إلى طبقة peptidoglycan الواقعة تحتها التي تمثل حوالي 20% من مكونات الجدار الخلوي لهذه البكتريا (Salton,1957) وتتفق هذه النتائج مع ما وجده الكثير من الباحثين الذين أشاروا إلى عدم تأثر البكتريا السالبة لصبغة كرام بالتراكيز المختلفة لانزيم اللايسوزايم (Masschalk & Michiels,2003). وبناءً على ما تقدم فقد تم اعتماد إضافة انزيم اللايسوزايم بتركيز 1 ملغم \ لتر كحد أدنى للتثبيط مع الأغلفة الكازينية والجلاتينية لغرض الحد من نمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام .

تحديد تركيز الحد الأدنى للتثبيط من EDTA

لغرض السيطرة على نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام فقد أضيف EDTA مع انزيم اللايسوزايم كون الأول يقوم بدور العامل المخلبي الذي يعمل على ازالة الآيونات المعدنية التي تسهم في ثبات الجدار الخلوي للبكتريا السالبة لصبغة كرام ، لذا فهو يساعد على خلخلة الجدار الخلوي وبذلك هو يمهد الطريق للايسوزايم في التأثير على طبقة الببتيدوكلايكان ويعمل على تحطيمها ومن ثم يؤدي إلى توقف نمو البكتريا أو منعه (Pellegrini et al ,1992) .وعليه فقد استخدمت تراكيز من EDTA تراوحت بين 50 – 300 ملغم \ لتر لأنها تمثل الحدود المسموح باستعمالها تغذوياًوفق ما اشار اليه CFR برقم دلالة (21CFR172.135 and 21CFR 173.315) .

أشارت النتائج الموضحة في الجدول(2) إلى أن استخدام EDTA بتركيز 200 ملغم \ لتر مع وجود أنزيم ا اللايسوزايم بتركيز 1 ملغم \ لتر كان له تأثير واضح في تثبيط نمو بكتريا *Pseudomonas sp. , E.coli* السالبة لصبغة كرام ، فقد بلغ قطر هالة تثبيط النمو 16.5 ملم و 15 ملم في كلا نوعي البكتريا على التوالي . وتتفق هذه النتائج مع ما أشارت إليه الدراسات التي ذكرت أن استخدام EDTA مع اللايسوزايم أثبت فعالية عالية ضد نمو البكتريا عن طريق تحطيم جدرانها الخلوية (Padgett et al, 1998; Branen & Davidson, 2004) وبناءً على ما تقدم فقد تم اعتماد استخدام EDTA بتركيز200 ملغم \ لتر مضافاً مع أنزيم اللايسوزايم بتركيز 1 ملغم \ لتر إلى الأغلفة الكازينية والجلاتينية كحد أدنى للتثبيط ضد نمو البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام .

تحديد تركيز الحد الأدنى للتثبيط من النتامايسين

نقلت اقراص الاغشية الكازينية والجيلاتينية المضمنة للناتامايسين بتراكيز تراوحت من 0 - 50 ملغم/لتر بطريقة معقمة إلى أطباق بتري حاوية على وسط Sabouroad Dextrose agar وملقحة بالأعفان *Aspergillus* sp و *Penicillium* sp وبواقع 1×10^6 بوغ / مل من كل منهما وعلى انفراد واجري الحضن مدة 5 ايام على درجة 22مْ .

بينت النتائج عدم ملاحظة أي تأثير للنتامايسين عند تركيز 10 جزء بالمليون ، في حين لوحظ تأثيره واضحاً عند التركيز 20 جزء بالمليون اذ بلغ قطر هالة التثبيط 9 ملم و 9.2 ملم لعفن *Aspergillus* sp وعفن *Penicillium* sp على التوالي (جدول 3). وازداد قطر هالة تثبيط النمو لتلك الأعفان بزيادة تركيز الناتامايسين ، إذ بلغ عند التركيز 50 ملغم \ لتر من النتامايسين 20 ملم لعفن *Aspergillus* sp و20.9 ملم لعفن *Penicillium* sp .

وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره (Suloff,1999) الذي ذكر بان التركيز20جزء بالمليون من الناتامايسين فعال جدا في خفض معدل نمو الاعفان حيث ادى الى اختزال النمو للاعفان المختبرة الى 10^3 وحدة تكوين مستعمرة /

ISSN 2072-3875

غم وبناءاً على هذه النتائج فقد عَد التركيز 20 ملغم \ لتر أو 20 جزء بالمليون ، هو تركيز الحد الأدنى للتثبيط من الناتامايسين.

جدول (1) تأثير استخدام تراكيز مختلفة من اللايسوزايم المضاف للأغشية الكازينية والجيلاتينية على نمو البكتريا الأختبارية لتحديد تركيز الحد اللأدنى للتثبيط MIC.

البكتريا- حجم اللقاح 10^8 X 1 وحدة تكوين مستعمرة / مل	تركيز اللايسوزايم ملغم / لتر	*قطـــر الهالـــة (ملم)		معدل قطرالهالة (ملم)
		الغشاء الكازيني	الغشاء الجيلاتيني	
Lactococcus lactis	0 (Control	0.0	0.0	0.0
	0.5	0.0	0.0	0.0
	1	18.8	18.6	18.7
	1.5	18.6	19	18.8
	2	19.2	18.8	19
Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus	0 (Control)	0.0	0.0	0.0
	0.5	0.0	0.0	0.0
	1	13.6	13.8	13.7
	1.5	15.4	14.6	15.0
	2.0	18.0	18.8	18.4
Bacillus sp.	0 Control)	0.0	0.0	0.0
	0.5	0.0	0.0	0.0
	1	15.6	14.8	15.2
	1.5	15.8	17.2	16.5
	2	17.8	18.2	18.0
Staphylococcus aureus	0 (Control	0.0	0.0	0.0
	0.5	0.0	0.0	0.0
	1	0.0	0.0	0.0
	1.5	0.0	0.0	0.0
	2	0.0	0.0	0.0
Pseudomonas sp.	0 (Control	0.0	0.0	0.0
	0.5	0.0	0.0	0.0
	1	0.0	0.0	0.0
	1.5	0.0	0.0	0.0
	2	0.0	0.0	0.0
Escherichia coli	0 (Control)	0.0	0.0	0.0
	0.5	0.0	0.0	0.0
	1	0.0	0.0	0.0
	1.5	0.0	0.0	0.0
	2	0.0	0.0	0.0

قطر الهالة يمثل معدل القراءات لمكررين لكل نوع من الأغشية .*

ISSN 2072-3875

جدول (2) التأثير المشترك لتراكيز مختلفة من (EDTA) واللايسوزايم المضافين للأغشية الكازينية والجيلاتينية على نموالبكترياالسالبة لصبغة كرام لتحديد تركيز الحد الأدنى للتثبيط MIC .

البكتريا - حجم اللقاح 1 X 10^8 وحدة تكوين مستعمرة / مل	تركيز EDTA ملغم / لتر	*قطر الهالة (ملم)		معدل قطر الهالة(ملم)
		الغشاء الكازيني	الغشاء الجلاتيني	
E.coli	0 (Control)			0
	50	0.0	0.0	0.0
	100	0.0	0.0	0.0
	150	0.0	0.0	0.0
	200	16.4	16.6	16.5
	250	18.3	17.7	18
	300	20	19.6	19.8
Pseudomonas sp.	0 (Control)			0
	50	0.0	0.0	0.0
	100	0.0	0.0	0.0
	150	0.0	0.0	0.0
	200	14.8	15.2	15
	250	16.8	15.8	16.3
	300	17.8	18.2	18

*** قطر الهالة يمثل معدل القراءات لمكررين لكل نوع من الأغشية .**

جدول (3) تأثير استخدام تراكيز مختلفة من الناتامايسين المضاف للأغشية الكازينية والجيلاتينيةعلى نمو الأعفان الأختبارية لتحديد تركيز الحد الأدنى للتثبيط MIC

الأعفان- حجم اللقاح 1 X 10^6 وحدة تكوين مستعمرة / مل	تركيز الناتامايسين ملغم / لتر	*قطر الهالة (ملم)		معدل قطر الهالة (ملم)
		الغشاء الكازيني	الغشاء الجيلاتيني	
Aspergillus sp	0 (Control)			0
	10	0.0	0.0	0.0
	20	9.2	8.8	9
	30	11.8	12.2	12
	40	17.7	16.9	17.3
	50	21	19	20
Penicillium sp	0 (Control)			0
	10	0.0	0.0	0.0
	20	9.4	9	9.2
	30	13.9	14.5	14.2
	40	19.3	18.7	19
	50	21	20.8	20.9

*** قطر الهالة يمثل معدل القراءات لمكررين لكل نوع من الأغشية**

ISSN 2072-3875

الاستنتاجات والتوصيات :

يتضح من نتائج هذه الدراسة انه بالامكان استخدام بعض العوامل المضادة لنمو الاحياء المجهرية بتراكيز الحد الادنى للتثبيط والتي شملت على انزيم اللايسوزايم بتركيز 1 ملغم / لتر والـ EDTA بتركيز 200 ملغم / لتر والناتامايسين بتركيز 20 ملغم /لتر واضافتهما سوية الى محاليل الاغشية الكازينية والجلاتينية واستخدامهما في حفظ الاعذية ولاسيما حفظ الاجبان الجافة ونصف الجافة مثل جبن المونتري وغيره .

المصادر :

Andrady AL; Torikai A .; Kobatake T. 1996. Spectral sensitivity of chitosan photodegradation. J .Appl Polym Sci 62:1465-71.

Appendini, P.; Hotchkiss, J.H. 1997. "Immobilization of lysozyme on food contact polymers as potential antimicrobial films", Packaging Technology and Science, 10: 271.

Appendini, P. ; Hotchkiss, J.H. 2002. "Review of antimicrobial food packaging", Innovative Food Science & Emerging Technologies. 3 :113.

Bera,A.S.Herbert,A.Jakob,W.vollmer and F.Giotz.2005.Why are pathogeni staphylococci so lysozyme resistance.Mol.Microbiology 55:778- 787.

Branen, J.K. Davidson, P.M. 2004. "Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylene diamine tetra acetic acid and Lactoferrin",International Journal of Food Microbiology. 90: 63.

Buonocore, G.G.; Sinigaglia , M.; Corbo, M.R.; Bevilacqua, A.; La Notte, . E. ; Del Nobile, M.A. 2004. Controlled release of antimcirobial compounds from highly swellable polymers. Journal of food products . 67 :1190.

Chipman, D.M.; Sharon, N. 1969. Mechanism of lysozyme action. Science.165:454- 4 65.

Datta, S.2005. Purification of lysozyme from shell liquor of eastern oysters(*crassostrea virginica*) and its use in antimicrobial films to preserve smoked fish,P.6 -15.

Han, J.H. 2000. "Antimicrobial Food Packaging", *Food Technology.* 54 : 56. Ibrahim , H . R . ; Higashiguchi,S . ;Sugimoto , Y . ; Aoki ,T. , 1996. Antimicrobial synergism of partially denatured lysozyme with glycine: Effect of sucrose and sodium chloride . Food Research International , 29: 771-777.

Ibrahim,H.R. 1997.Insights into the structure –function relationship of ovalbumine, ovotransferrin and lysozyme .In: hen eggs their basic and applied science (Ed.by Yamamoto,T.,Juneja,L.R.,Hatta,H.and Kim,M.,. CRC Press Inc.,Boca Raton,37-56.

Lichan,E.; Nakai.S. Sim,J.; Bragg,D.B.; Lo,K.V. 1986 . Lysozyme separation from egg white by cation exchange column chromatography. J. Food. Sci. 51:1032.

Masschalck, B. ; Michiels, C.W.,2003. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 29:191-214.

Mine, Y. ; Ma, F., ;Lauriau, S. 2004. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. J. Agric. Food Chem. 52:1088-1094.

ISSN 2072-3875

Nadarajah,K.2005. Development and characterization of antimicrobial edible films from crawfish chitosan . A Dissertation Ph .D Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.

Padgett, T. ; Han, I.Y. ; Dawson , P.L. 1998. "Incorporation of food - grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films", Journal of Food Protection. 61: 1330-1335.

Pellegrini, A. ;Thomas , U. ; von Fellenberg , R . ; Wild, P. 1992. Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against gram-negative , gram-positive bacteria related to their basic character. J. appl. bacteriol. 72:180-187.

Perry,Jr., and Camel,G.,Someeffects of Ca Na2EDTA on plasma cholesterol and urinary zinc in man ,in:Metal Binding in Medicine, by Marvin J.Seven and L.Audrey Johnson(eds),1960,J.B.Lippincott Company ,Philadelphia,209 – 215.

Quintavalla, S. ; Vicini, L. 2002. "Antimicrobial food packaging in meat industry", Meat Science. 61: 373.

Salton, M.R. 1957. The properties of lysozyme and its action on microorganisms. Bacteriology Rev. 21:82-100.

Salton, M.R. 1958. The lysis of micro-organisms by lysozyme and related enzymes. J.G Microbiol. 18:481-490.

Suloff,E.C,1999.Compretative study of semi-synthetic derivative of natamycin and the parent antibiotic on the spoilage of shredded chedder cheese. Master thesis submitted to the faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University Suppakul , P. ; Miltz, J. ; Sonneveld , K. ; Bigger , S .W. 2003. "Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging its applications", Concise Reviews and Hypotheses in Food Science. . 68 : 408.

Xue .QG; Schey KL ; Volety AK ; Chu FL; La Peyre JF. 2004. Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Comp. Biochem. Physiol B Biochem. Mol Biol. 139:11-25.

ISSN 2072-3875