٨٧/١/١٠٦٦٣٠
٨٧/١٢/٢١

١٠٩٠٩٥

١٠٩٠٩٥

۸۷/۱/۱۰۶۹۳
۸۷_۱۲_۲۱

دانشگاه ارومیه
دانشکده دامپزشکی

سال تحصیلی: ۸۶-۸۷ شماره ثبت : ۴۰-۱

پایان نامه :

جهت اخذ دکترای تخصصی دامپزشکی در رشته بهداشت مواد غذایی

عنوان:

بررسی برخی روشهای افزایش اثرات ضد میکروبی لیزوزیم بر روی باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس واشریشیا کولای O157:H7

نگارنده:

سید سیاوش ساعی دهکردی

۱۳۸۷ /۱۲/۲۱

دکتر سید مهدی رضوی روحانی	استاد راهنما و رئیس هیأت داوران با مرتبه علمی(استاد)
دکتر حسین تاجیک	استاد راهنمای دوم با مرتبه علمی(دانشیار)
دکتر افشین آخوند زاده	داور خارجی با مرتبه علمی (دانشیار)
دکتر مسعود خیامی	داور خارجی با مرتبه علمی (دانشیار)
دکتر علی احسانی	داور داخلی با مرتبه علمی (استادیار)
دکتر کریم مردانی	داور داخلی با مرتبه علمی (استادیار)

۱۰۹۰۹۵

پیشکش به پدرم

او که میخواند، می نویسد، می سراید، می اندیشد و پندارهای نیک از کوزه ذهنش برایم بُرون می تراود.

پیشکش به مادرم

هم او که همواره می بخشد، ترانه زندگی را عاشقانه می نوازد، گوهر وجودش پرتوی مهرم می تاباند، و هیچ ثمنی نمی ستاند.

پیشکش به برادرم

یاوری که در سنگلاخ نشیب و فراز زندگی، یاری گری اش را هماره در گاهنامه زندگی ام ایمان دارم.

پیشکش به خواهرم

پرنیان افکنده ای بر مهواره سیمایی دل افروز، امیدی و راهنمایی در کوره راههای سرگردانی و ژاله ای طراوت بخش بر برگهای پیکر تازه از سحر برخاسته ام.

پیشکش به همسرخواهرم

مردی از تبار کوشیدن و دلپاکی، رونده مسیر منهاج و نیوشنده آوای آگاهی.

پیشکش به دوستدارنی که...

ستاره مهر و دوستی شان در آسمان قلب و خیالم سوسو زد، درخشیدن گرفت و وفایشان آنچنان پایدار ماند که افول نکردند و نخواهند کرد.

سپاس بی کران از استاد فرزانه، به پاس حسن نظر و راهنمایی بی شائبه در این پایان نامه، استاد آموزنده ادب، رهرو و راه نمای مسیر دانش **جناب آقای پروفسور سید مهدی رضوی روحانی**، که در سایه پر خیرشان همواره دلخوش می زیم و حقا که شاعر بهتر می سراید:

در میان خلق، یک تن صوفی اند　　دیگران در سایه او می زیند

سپاس بی پایان از استاد گرانمایه **جناب آقای دکتر حسین تاجیک** که دلی بی غل و غش و روندی توأم با عمل دارند و از هیچ کوششی در به ثمر رساندن این پایان نامه دریغ نورزیدند.

سپاس فراوان از داوران ارجمند:

جناب آقای **دکتر افشین آخوند زاده**
جناب آقای **دکتر مسعود خیامی**
جناب آقای **دکتر کریم مردانی**
جناب آقای **دکتر علی احسانی**

که با پذیرش داوری این پایان نامه مرا عمری رهین لطفشان نمودند.

سپاس ویژه از دوستان ارزشمندم **آقایان دکتر مهران مرادی ودکتر تورج مهدیزاده** که اندر گاه استمداد، همواره یاری رسان بودند.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه	۹
مقدمه	۱۰
فصل دوم: کلیات	۱۲
لیزوزیم	۱۳
سوابق و خصوصیات عمومی لیزوزیم	۱۳
خصوصیات لیزوزیم	۱۵
عملکرد مربوط به طیف ضد باکتریایی	۲۱
تأثیر لیزوزیم بر روی مقاومت حرارتی اسپورهای باکتریایی	۲۳
استفاده و پایداری در غذاها	۲۵
فعالیت لیزوزیم بر علیه ارگانیسم‌های مرتبط با مواد غذایی	۲۸
افزایش فعالیت لیزوزیم به وسیله عوامل شیمیایی	۳۰
کاربرد لیزوزیم در غذا	۳۲
عملکرد ضد میکروبی غیر آنزیمی لیزوزیم و پپتیدهای لیزوزیم	۳۵
چشم اندازهای آینده	۳۶
لیزوزیم از دیدگاه شیمی مواد غذایی	۳۶
لیزوزیم به عنوان یک هیدرولاز	۳۹
مقدمه ای بر گیاهان و ادویه جات	۴۲
استفاده از روغنهای اساسی در دوران امروزی	۴۴
ادویه جات	۴۵
استفاده‌های پزشکی	۴۶
اجزای گیاهی فعال	۴۶
نگاهی مختصر به ادویجات و روغنهای اساسی از دیدگاه شیمیایی	۴۹
نقش عملکردی ادویه جات گیاهی	۵۰
خواص ضد – اکسیدانی	۵۰
ویژگیهای ضد میکروبی	۵۱
ویژگیهای دافع حشرات	۵۲

ویژگیهای پزشکی ---- ۵۲
گیاهان، ادویه جات و ضد میکروبها ---- ۵۳
موانع موجود بر سر راه استفاده از گیاهان و روغن‌های اساسی ادویه جات به عنوان ضد میکروب در غذاها. ---- ۵۳
اندازه گیری فعالیت ضد میکروبی ---- ۵٤
روش آگار دیفیوژن ---- ۵۷
روش رقت سازی ---- ٦۰
روشهای غیر مرسوم ---- ٦۱
روش میکرو اتمسفر ---- ٦۱
بیواتوگرافی ---- ٦۲
کدورت سنجی ---- ٦۲
روش بیو امپدیمتریک ---- ٦۲
سیستم واقعی غذا ---- ٦۳
فاکتورهای مؤثر بر ارزیابی فعالیت ضد میکروبی روغن‌های اساسی ---- ٦۳
خاستگاه سویه میکروارگانیسم ---- ٦۳
عوامل پخش کننده امولسیفایر ---- ٦۳
سایر فاکتورها ---- ٦٤
مقایسه روشهای گوناگون ارزیابی فعالیت ضد میکروبی روغنهای اساسی ---- ٦٤
مکانیسم عملکرد روغن‌های اساسی بر روی میکروارگانیسم‌ها ---- ٦۵
حساسیت میکروارگانیسم‌ها به روغن‌های اساسی ---- ٦۷
ترکیبات روغنهای اساسی ---- ۷۰
مطالعات in vitro ---- ۷۷
کاربردها در سیستم‌های غذایی ---- ۷۸
طریقه عملکرد و گسترش مقاومت ---- ۸۲
ملاحظات قانونی ---- ۸٤
چشم اندازهای آینده و نگهداری مولتی فاکتوریال ---- ۸٤
رز ماری ---- ۸۵
ترکیب شیمیایی ---- ۸٦

استخراج روغن ---------- ۸۶
مصارف ---------- ۸۸
فرآوری غذایی ---------- ۸۸
پزشکی ---------- ۸۹
سایر غذاها ---------- ۸۹
آویشن ---------- ۸۹
روغن اساسی ---------- ۹۰
فلاوونوئیدها ---------- ۹۰
تانن‌ها و سایر ترکیبات فنلی ---------- ۹۰
سایر ترکیبات ---------- ۹۱
استفاده‌های اصلی در فرآوری غذایی ---------- ۹۱
فعالیت ضد میکروبی روغن آویشن ---------- ۹۲
زنجبیل ---------- ۹۳
تاریخچه ---------- ۹۳
ریخت شناسی گیاه زنجبیل ---------- ۹۴
پراکندگی جغرافیایی گیاه زنجبیل ---------- ۹۵
ترکیبات اصلی گیاه زنجبیل ---------- ۹۵
مصارف طبی زنجبیل ---------- ۹۷
زیره ---------- ۹۸
فصل سوم مواد و روشها ---------- ۱۰۱
مواد، ابزار و روش کار ---------- ۱۰۲
فصل چهارم نتایج ---------- ۱۰۷
فصل پنجم بحث ---------- ۱۳۵
بحث ---------- ۱۳۶
فصل ششم منابع ---------- ۱۴۰
منابع ---------- ۱۴۱

خلاصه:

عنوان پایان نامه: بررسی برخی روشهای افزایش اثرات ضد میکروبی لیزوزیم بر روی باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کولای O157:H7. **نگارنده:** سید سیاوش ساعی دهکردی **سال تحصیلی** ۸۶-۸۷

این مطالعه به منظور بررسی کارآمدی و ارتقای اثرات ضد باکتریایی لیزوزیم با استفاده از برخی فاکتورها و تیمارها ودر ترکیب لیزوزیم با یک ماده ضد باکتریایی دارای خاستگاه طبیعی بر علیه باکتریهای اشریشیا کولای O157:H7 و استافیلوکوکوس اورئوس در سه فاز صورت پذیرفت. فاز اول در دومرحله اجرا گردید، در مرحله اول لیزوزیم در غلظتهای ۱۰۰،۲۰۰،۴۰۰،۸۰۰،۱۶۰۰ میکروگرم/میلیگرم تهیه و اثرات ضد باکتریایی آن در حضور فاکتورهای pH (۴،۵،۶،۷)، غلظتهای نمک(۲/۵،۴،۶، ۰ ٪)، دماهای گرمخانه گذاری(C ° ۲۰،۲۵،۳۵،۴۰) وتیمار حرارت دهی لیزوزیم (C ° ۵۰،۶۲،۷۲،۸۰) مورد بررسی قرار گرفت ودر مرحله دوم سطوح هر فاکتوربا اثر بهتر بر فعالیت لیزوزیم انتخاب(pH ۵ ،۶ – نمک ۰/۵ ،۲ %– گرمخانه گذاری C ° ۲۵،۱۵) و اثر ضد باکتریایی در سطوح مذکور بررسی گردید. در فاز دوم، روغنهای اساسی ۸ گیاه یا ادویه دارویی شامل آویشن شیرازی،پونه کوهی،جوز هندی،دارچین،رزماری،زنجبیل،زیره سبزو میخک باروش تقطیر توسط مایع استخراج و ترکیبات موجود در هر روغن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی/طیف سنج جرمی شناسایی و آنالیز گردید.سپس اثرات ضد باکتریایی هر روغن در غلظتهای ۵۰،۱۵۰،۳۰۰،۴۵۰،۶۰۰ میکروگرم/میلیگرم بررسی گردید که روغن آویشن به عنوان مؤثرترین روغن بالاترین اثر را بروز داد.

در فاز سوم اثر ضد باکتریایی لیزوزیم حرارت دیده(C ° ۸۰) در ترکیب با مؤثر ترین روغن(آویشن)،درpH۵ ،نمک ۰/۵ ،۲ درصد و گرمخانه گذاری در C ° ۲۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند.بر اساس نتایج فاز اول، به طور کلی بهترین pH ،غلظت نمک،دمای گرمخانه گذاری و تیمار حرارتی لیزوزیم به ترتیب برابربا ۵ ،۰/۵٪، C ° ۱۵،وC ° ۸۰ بود.حداقل غلظتهای مهاری(MICs) بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کولای درهر یک از فاکتورهای ذکرشده به طور جداگانه به ترتیب برابر:(۸۰۰،۱۶۰۰،۸۰۰ ،۱۶۰۰) و(۱۶۰۰،۱۶۰۰ <، ۱۶۰۰ ، ۸۰۰) محاسبه گردید.همچنین درمرحله دوم کمترین مقادیر MICs درpH ۵ ،نمک۰/۵٪ ،تیمار حرارتی لیزوزیم C ° ۸۰ و دمای گرمخانه گذاریC ° ۲۰حاصل و برای استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کولای به ترتیب معادل۴۰۰ و۱۰۰ میکروگرم/میلیگرم بود.کمترین MICدر فاز دوم مربوط به روغن اساسی آویشن که در pH ۵ ونمک٤٪ به دست آمدو برای استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کولای به ترتیب برابر: (۷۵و۱۵۰) و(۷۵و۱۵۰) میکروگرم/میلیگرم محاسبه گردید. بر اساس نتایج فاز سوم،در ترکیب لیزوزیم تیمار شده درC ° ۸۰ با روغن آویشن در pH ۵ ونمک۰/۵٪ کمترین MICs حاصل و برای استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کولای به ترتیب برابر لیزوزیم تیمار شده درC ° ۸۰ + آویشن: (۲۰۰ ،۱۸/۷۵) و (۱۸/۷۵،۱۲/۵) بود.

بر پایه نتایج میتوان اذعان نمود بهترین حالت ایجاد شرایط: pH ۵ ،نمک۰/۵٪ ، گرمخانه گذاری در C ° ۲۰ و تیمار لیزوزیم درC ° ۸۰ منجر به افزایش اثر ضد باکتریایی لیزوزیم شده و ترکیب لیزوزیم خصوصا تیمار شده با حرارت با روغن اساسی آویشن تحت شرایط یاد شده این اثر را افزایش وکاهش مقادیر MICs را به دنبال خواهد داشت.

فصل اول

مقدمه

INTRODUCTION

مقدمه

بارشد جمعیت، نیاز به فراهم آوردن منابع غذایی مکفی و ارزشمند از لحاظ غذایی و سالم از لحاظ بهداشتی امری اجتناب ناپذیر است و باتوجه به گسترش تولید محصولات غذایی و افزایش تنوع در غذاها و نیز افزایش تعداد افراد یا منابعی که می‌توانند به نوعی سبب ایجاد و انتقال آلودگی‌های گوناگونی میکروبی (به خصوص باکتریایی) در غذاها چه به صورت مستقیم و چه از طریق آلودگی ثانویه گردند، چاره اندیشی برای یافتن راهها و روشهای جلوگیری از این آلودگی‌ها و نیز افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی با افزودن عوامل ضد باکتریایی خصوصاً با خاستگاه طبیعی امری بدیهی به نظر می‌رسد(Naidu, 2000).

اشرشیاکولای O157:H7[1] دارای توانایی ایجاد کولیت هموراژیک[2]، سندرم اورمی همولیز کننده[3]، پورپورای ترمبوسایتوپنیک ترمبوززا[4] و در موارد شدید منجر به مرگ خواهد شد (Tarr, 1995) و مصرف گوشت نپخته (Rodrigue et al.,1995) و شیر خام (Chapman et al.,1993) با خاستگاه گاوسانان مسؤول ایجاد همه گیری‌های متعدد ناشی از اشرشیاکولای O157:H7 بوده است و این نگرانی وجود دارد که این عامل بیماری زا در سایر غذاهای با منشا حیوانی مثل غذاهای مرتبط با محصولات حاصل از خوک سانان و بزسانان (Pritchad et al., 2000) و طیور (Carter et al., 1987) نیز موجود باشد.

استافیلوکوکوس اورئوس[5] نیز با تولید ۱۰ نوع انتروتوکسین سبب مسمومیت‌های غذایی می‌گردد و نیز با تولید عواملی موسوم به سوپر آنتی ژنها سبب ایجاد عوارضی مانند سندرم شوک سمی[6] می‌باشد و از طریق غذاهای آلوده به راحتی به انسان انتقال می‌یابد(Barbrà et al., 2000).

لیزوزیم[7] به عنوان یک آنزیم، توانایی لیزسلولهای باکتری را داراست (Scaman et al., 2006). لیزوزیم در محصولات غذایی از قبیل پنیر، محصولات شراب و در محصولات غذایی دریایی و سبزیجات، میوه جات و در ترکیب محصولات دارویی، به عنوان یک نگهدارنده طبیعی استفاده فراوانی دارد (Nakimbugwe et al., 2006).

روغن‌های اسانسی[8] موادی با ویژگی‌های ضد اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد قارچی، ضدویروسی و دافع حشرات و آفات محسوب می‌گردند (Kalemba & kunicka, 2003).

---

[1] *Escherichia. coli* O157:H7
[2] hemorrhagic colitis
[3] hemolytic uremic Syndrome
[4] thrombotic thrombocytopenic purpura
[5] *Staphylococcus aureus*
[6] toxic shock syndrome
[7] Lysozyme
[8] Essential oil

باتوجه به این که هنوزهم بیماری‌های دارای خاستگاه غذایی، دربرخی از کشورهای درحال توسعه به عنوان یک موضوع نگران کننده مطرح هستند و با در نظر گرفتن اقبال جهانی به استفاده از افزودنی‌ها و نگهدارنده‌های مطمئن تر در مقایسه با نگهدارنده‌های شیمیایی، بنابراین تمرکز به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی که عموما به عنوان سالم و بی خطر[1] شناخته می شوند ضروری به نظر می‌رسد (Fazeli et al., 2007).

بنابراین مطالعه اخیر به منظور استفاده از مواد طبیعی به عنوان نگهدارنده[2] شامل لیزوزیم و روغن‌های اساسی به عنوان عوامل ضد باکتریایی با خاستگاه طبیعی و ارتقای خاصیت ضد باکتری از طریق دستیابی به ترکیبی مؤثر از این مواد تحت شرایط گوناگون محیطی یا تیمارهای مختلف به صورت In Vitro صورت پذیرفت. بدیهی است استفاده از مواد ضد میکروبی مذکور چه به صورت مجزا و چه به صورت ترکیب با یکدیگر به عنوان نگهدارنده می تواند به عنوان روشی جایگزین به جای نگدارنده های زیانبار شیمیایی دارای اثرات مضر بر روی سلامتی انسان باشد. امید است با استفاد از نتایج این تحقیق بتوان کابردهای مشابه را در محیط واقعی غذا[3] تعمیم داد و از کاربردهای عملی آن بهره جست.

[1] GRAS
[2] Preservative
[3] In Situ Application

فصل دوم

کلیات

REVIEW OF LITERATURE

سوابق و خصوصیات عمومی لیزوزیم

لیزوزیم در سال ۱۹۲۱ توسط الکساندر فلمینگ (۱۹۵۵ – ۱۸۸۱) کشف شد، او لیزوزیم را به عنوان یک ماده باکتریولایتیک قابل توجه توصیف کرد. کشف بعدی وی یعنی پنی سیلین در اواخر دهه ۱۹۲۰ اتفاق افتاد. فلمینگ نشان داد که مخاط بینی از رشد یکی از گونه‌های میکروکوکوس جلوگیری می کند و این یک کشف توأم با شانس بود چرا که این ارگانیسم یکی از حساس ترین ارگانیسم‌ها در برابر لیزوزیم می باشد. او در ابتدا تصور نمود که فاکتور ممانعت کننده، یک باکتریوفاژ می باشد ولی بعداً نشان داد که فاکتور مذکور یک آنزیم لیز کننده سلولهای باکتریایی است. او ذاتی بودن یا اندوژن بودن لیزوزیم رادر بدن تصدیق نمود و تحقیق وی این مفهوم راکه یکی از راههای مؤثر برای درمان عفونتها افزایش پاسخ‌های ایمنی ذاتی و خودی میزبان می باشد تأیید نمود. فلمینگ دریافت که لیزوزیم در مخاط بینی و اشک چشم وجود دارد و سفیده تخم مرغ دارای یک سطح بالای خاصی از پروتئین می‌باشد. در دهه ۱۹۰۰ دو محقق به نامهای Laschenko و Rettger نشان دادند سفیده تخم مرغ قادر به لیز کردن برخی از سویه‌های باکتریها و اسپورها می باشد، هر چند در واقع این فلمینگ بود که خاصیت لیز کنندگی لیزوزیم را بیان و وجود آن را در ترشحات انسانی نشان داد (Davidson et al., 2005).

لیزوزیم اولین آنزیمی است که توالی اولیه اسیدهای آمینه آن تعیین گردید و نیز اولین آنزیمی است که ساختمان آن با استفاده از کریستالو گرافی اشعه X[1] تعیین گردید. لیزوزوم دارای ساختمان بیضوی، با ابعاد ۳۰ × ۳۰ × ٤٥ آنگستروم می باشد. فعالیت کاتالایتیک آن در ۱۹٦٦ توسط John Rupley ارائه گردید، وی نشان داد که لیزوزیم سبب شکسته شدن الیگوساکاریدهای خالص شده ان – استیل گلوکوز آمین دارای یک پیوند گلیکوزیدی (٤ – ۱) – β می گردد. الیگوساکاریدهای دارای بیش از سه واحد قندی هیدرولیز می گردند و در بین قندها بهترین اثر لیزوزیم بر روی هگزاساکاریدها به عنوان سوبستراهایی با طول زنجیره کربن مشخص می باشد. خانواده‌های مختلفی از لیزوزیم شناسایی شده است، ولی همگی دارای خاصیت ایجاد شکست در یک پیوند بتا – گلیکوزیدی در بین کربن شماره ۱ از ان – استیل مورامیک اسید و کربن شماره ٤ از ان – استیل گلوکوز آمین در پپتید و گلیکان باکتریایی می باشند (Davidson et al., 2005).

لیزوزیم به عنوان یک آنزیم معروف توانایی هیدرولیز پیوند گلیکوزیدی بین ان – استیل مورامیک اسید[2] و ان – استیل گلوکوزآمین[1] موجود در پپتیدوگلیکان را داراست. این پلی مر در دیواره سلولی عمده اوباکتری‌ها[2] وجود دارد و مسؤول استحکام مکانیکی و شکل آن است.

---

[1] X ray crystallography
[2] N-acetyl muramic acid

لیزوزیم بر روی پپتید و گلیکان بسیاری از باکتریهای گرم مثبت مؤثر است ولی در برابر بسیاری از باکتریهای گرم منفی غیر فعال است. لیزوزیم به شکل تجاری از سفیده تخم مرغ تهیه شده و برای کنترل بادکردگی دیررس در برخی پنیرها از طریق ممانعت از رشد افسار گسیخته کلستریدیوم تایروبوتریکوم عمل می کند. عملکرد هم افزایی بین لیزوزیم و نیسین در برابر لیستریا مونوسیتوژنز و لاکتوباسیلهای فسادزا از غذا گزارش گردیده است. این حالت احتمالاً به دستیابی نیسین به غشای سلولی که توسط لیزوزیم تسهیل می گردد و یا ممانعت ار ترمیم آسیب ناشی از لیزوزیم در نتیجه تأثیر سوء نیسین بر روی ذخیره کننده‌های انرژی سلولی حاصل می گردد (Roller, 2003).

هر چند آنزیم به صورت تجاری به تخم پرندگان و خصوصاً ماکیان اهلی مربوط می باشد، لیزوزیم در طبیعت گسترده بوده و در بسیاری از منابع شامل : برخی سبزیجات، حشرات، گیاهان و قارچها یافت می شود. لیزوزیم در آغوز انسان و بافتهای پستانداران و مایعاتی از قبیل شیر، بزاق، مخاط، خون و اشک چشم وجود دارد .

لیزوزیم همچنین با غلظت بالا در ماکروفاژها، لکوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و گرانولوسیت‌های نوتروفیلیک وجود دارد. لیزوزیم دارای نقش‌های مهم در پاسخ ایمنی ارگانیسم‌ها در واکنش به عفونت‌ها و التهابات می باشد.خانواده‌های اصلی لیزوزیم موجود به شکل طبیعی که تفاوت قابل توجه شان در ساختمان اولیه اسیدهای آمینه آنهاست، عبارتند از : C نوع کلاسیک یا نوع ماکیان، G یا فرم غازی، لیزوزیم باکتریایی(اتولیزین‌ها)، لیزوزیم فاژی و لیزوزیم‌های گیاهی می باشد، ولی تنها نوع C حاصل از سفیده تخم مرغ به عنوان هدف نگهداری در مواد غذایی استفاده می گردد. تقریباً ۳/۵ درصد از محتوای پروتئینی تام سفیده تخم مرغ را لیزوزیم تشکیل می دهد. لیزوزیم در غلظت‌هایی در حدود ۰/۱، ۰/۱۳ و ۰/۲۵ میکروگرم به ازای میلی لیتر به ترتیب در شیر گوسفند، گاو و بزان موجود است، در صورتی که شیر انسان حاوی ۰/٤ میکروگرم لیزوزیم به ازای هر میلی لیتر می باشد. لیزوزیم به عنوان یکی از مهمترین فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی در شیر انسان تلقی می شود. این آنزیم‌ها همچنین در آغوز با غلظت‌های بالاتر نسبت به شیر وجود دارد. و می تواند دارای نقش مثبت بر روی فلور روده ای نوزادان شیرخوار باشد. از لیزوزیم می توان در اهداف بالینی مختلف به عنوان ماده‌ای ضد باکتریایی، ضد ویروسی و درمانهای ضد التهابی در انسان و گونه‌های حیوانی، استفاده نمود.از لیزوزیم همچنین برای کنترل رشد میکروبی در مواد غذایی از قبیل پنیر و شراب استفاده میگردد و استفاده‌های بالقوه دیگر آن، به عنوان ماده نگهدارنده در سیستم‌های غذایی است .لیزوزیم به عنوان یک مدل مناسب از یک نگهدارنده غذایی ایده آل از بسیاری جهات مورد استفاده است چرا که به عنوان یک جزء ذاتی از سیستم ایمنی انسان تلقی شده و بنابراین انتظار می رود دارای سمیت اندکی باشد. لیزوزوم آنزیمی است که به

---

[1] N-acetyl glucosamine
[2] Eubacteria

شکل کاتالایتیک عمل می کند و می تواند با غلظت‌های پایین در غذاها استفاده گردد و بر روی پپتید و گلیکان باکتریایی دارای ویژگی عملکردی بوده، با بافت انسانی واکنش نمی دهد و دارای خصوصیات خاص مقاومت در برابر حرارت، pH و سایر فاکتورهای درون اثر و برون اثر در مواد غذایی است (Davidson et al., 2005).

خصوصیات لیزوزیم

محققان اولیه، روشهای مختلفی را برای خالص سازی و سنجش لیزوزیم سفیده تخم مرغ توصیف نموده اند، لیزوزیم خالص شده به شکل تجاری برای استفاده در غذا، به شکل رایج از تخم مرغ و با بازده بالا از طریق رزین‌های تعویض کاتیونی، تولید می گردد. تمایل بالای لیزوزیم به رزین‌های کاتیونی، نتیجه خصوصیت پایه ای آنزیم، نقطه ایزوالکتریک آن از ۱۰/۵ تا ۱۱ و ساختمان مونومری اش و وزن مولکولی تقریباً معادل با ۱٤٤۰۰ دالتونی آن است. لیزوزوم با استفاده از NaCl از رزین‌ها شسته می شود و به عنوان نمک هیدروکلرید، استحصال می گردد (Davidson et al., 2005).

علاوه بر حذف لیزوزیم از آلبومن تخم، همچنین فرآیند سبب حذف بیش از ۹۰ درصد آویدین از تخم می گردد. سفیده‌های استخراج شده تخم مرغ از لحاظ تغذیه ای یا عملکردی تغییر نیافته اند و برای مصارف غذایی مورد تصویب می باشند.

عموماً لیزوزیم به عنوان نمک هیدروکلراید مورد استفاده قرار می گیرد که به آسانی در آب و بافرها حل می گردد. لیزوزیم هیدروکلراید به صورت یک پودر ریز سفید می باشد و طعم آن اندکی شیرین است. یک محلول ۲ درصد لیزوزیم هیدروکلراید دارای pH ای در حدود ۳/۳ می باشد. این ماده در اکثریت نمک‌های آلی و محلولهای نمکی تغلیظ شده، غیر محلول است ولیکن هنگامی که به یک محلول آبی برگردانده می شود، فعالیت خود را باز می یابد. لیزوزیم بر اساس شرایط pH می تواند به فرم پلی مریزه در آید. خصوصیات اصلی لیزوزیم در جدول 2-۱ شرح داده شده است.

جدول2-۱: ویژگیهای لیزوزیم هیدروکلراید مورد استفاده در غذا در ایالات متحده(Davidson et al., 2005).

a. Generally recognized as safe substance:	Egg-white lysozyme (CAS Reg. No. 9001–62–2) obtained by extraction of egg whites.
b. Enzyme property:	Peptidioglycan N-acetylmuramoyl hydrolase (EC No. 3.2.1.17) that catalyzes the hydrolysis of peptidoglycan in the cell walls of certain bacteria. The ingredient is used as an enzyme as defined in Sec. 170(o)(9) in 21 CFR Part 184.
c. Primary food application:	Cheeses as defined in 1 CFR, Part 51, Sec. 170.3(n)(5), in accordance with Sec. 184.1(b)(3). The primary enzyme targets are germinating spores of *Clostridium tyrobutyricum*, an organism responsible for late blowing of certain cheese varieties.
d. Use level:	Levels not to exceed current good manufacturing practices in cheese.
e. Label requirement:	Bulk and packaged foods that contains cheese manufactured using egg-white lysozyme shall include the usual name "egg-white lysozyme" on its ingredient label.
f. Commercial ingredient:	Food grade lysozyme hydrochloride.
g. Food use properties:	Freely soluble in water; pH 3.3; electrophoretically pure.
h. Limit specifications:	Satisfies limit tests and regulations for heavy metals, arsenic, and microbial limit tests. According to IDF (1987) salmonellae absent in 25 g; *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, E. coli;* sulfite-reducing clostridia absent in 1 g; Coliforms max 30/g.

[a] Sources include: International Dairy Federation 1987; U.S. FDA 1998; http://www.fordras.com; http://www.inovat-ech.com. For regulatory information for other countries, the manufacturer is advised to contact the major manufacturers of lysozyme, whose Web sites are listed here.

لیزوزیم (C. E .۳. ۲. ۱. ۱۷) توسط کمیسیون آنزیمها به عنوان یک موکوپپتید ان – استیل مورامیل هیدرولاز طبقه بندی شده است و عموماً از آن به عنوان مورآمیداز یاد می شود. توالی ابتدایی آمینواسید ی به وسیله کریستالوگرافی اشعه X بر روی لیزوزیم حاصل از سفیده تخم مرغ به صورت جزئی و دقیق مشخص شده است. لیزوزیم سفیده تخم مرغ یک زنجیره پلی پپتیدی منفرد با ۱۲۹ اسیدآمینه و دارای ٤ پل دی سولفیدی ایجاد کننده اتصال عرضی است که وزن مولکولی تقریباً ١٤٤٠٠ دالتون را شامل می شود. چنانچه حداقل دو عدد از پلهای دی سولفیدی دچار اشکال شود و یا کل پیوندهای دی سولفیدی تخریب شوند، فعالیت آنزیمی مولکول، مختل می شود. لیزوزیم دارای یک هسته آبگریز و زنجیره‌های جانبی اسید آمینه‌های آبدوست به سمت سطح است که درکل مولکول ثبات و پایداری می بخشد.

فعالیت لیز کنندگی لیزوزیم به شکل مرسوم از طریق مشاهده لیز کنندگی سلولهای میکروکوکوس لوتئوس(میکروکوکوس لایزودیکتیکوس)[1] لیوفیلیزه و کشته شده – با اشعه فرابنفش بر اساس مشاهدات اولیه فلمینگ، اندازه گیری می شود و این آزمون توسط Shugar به شکل بهینه درآمده است.

اختلاف متعددی برای آزمودن لیزوزیم از طریق توربیدومتری گزارش شده است. یک واحد لیزوزیم معادل کوچکترین کمیتی است که منجر به کامل شدن لیز میکروکوکوس لوتئوس در یک آزمایش رقت‌های سری می گردد. به شکل اختصاصی، یک واحد Shugar، کمیتی از آنزیم در ۱ میلی لیتر از

[1] Micrococcus lysodenticus

سوسپانسیون سلولهای غیر فعال شده میکروکوکوس لوتئوس در pH ۷، با یک initial absorbance ۰/۷۵ در ٤٥۰ نانومتر در یک طول مسیر[1] cm ۱ ای است که موجب می گردد، absorbance به میزا ن ۱ ۰۰/ ۰ به ازای هر دقیقه، کاهش یابد. فعالیت ویژه حداکثر[2] مربوط به لیزوزیم با استفاده از میکروکوکوس لوتئوس به عنوان سوبسترایی که عموماً معادل ۵۰۰۰۰ واحد به ازای میلی گرم می باشد، ولیکن وابسته به آماده سازی لیزوزیم می تواند کمتر (units / mg ۲۰۰۰۰) باشد. از حیث کاربردی و عملی غالباً استفاده از یک طول موج ٦۵۰ نانومتری برای کاهش جذب از طریق مواد رنگی در عصاره‌های غذایی، مطلوب می باشد. برخی ترکیبات می توانند بر روی لیزوزیم ممانعت اعمال کنند که شامل سدیم دودسیل سولفات، ید، اسیدهای چرب و الکلهای دارای C۱۲ یا بیشتر می باشند.از روشهای دیگری برای آزمودن موردمذکور استفاده می شود که شامل جداسازی‌های کروماتوگرافیک، لیز از طریق پلت آگار، روشهای آزمون رادیو ایمنی و سیستم‌ها فلورسنس می باشند ولی غالباً از این روشها برای اهداف خاص استفاده می گردد .روش لیز میکروکوکوس لوتئوس، روش استاندارد است.یک روش آشکار کننده کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا به صورت فاز معکوس[3] برای لیزوزیم در نمونه‌های شیر و پنیر در سال ۲۰۰۰ مورد استفاده قرار گرفته است (Davidson et al., 2005).

pH بهینه برای لیز میکروکوکوس لایزودیکتیکوس در شرایط آزمایشگاهی از طریق لیزوزیم سفیده تخم مرغ تقریباً معادل ٦/٦ می باشد. لیزوزوم دارای فعالیت آنزیمی در محدوده pH معادل با ۳/۵ تا ۷ است، هر چند در مقادیر pH بالای ۷ و زیر ۳/۵ نیز فعالیت آنزیمی ولیکن کمتر، مشاهده گردیده است، pH بهینه برای فعالیت به شدت به غلظت نمک وابسته است.در مقادیر pH کمتر از ۵/۳، محصولات واکنش می توانند سبب ممانعت از آنزیم گردند. لیزوزیم در شرایط آزمایشگاه از ۱ درجه سانتی گراد تا نزدیک درجه حرارت جوش فعال است (Davidson et al., 2005).

سوبسترای اصلی لیزوزیم، پپتیدوگلیکان دیواره سلولهای باکتریایی است که در آن پلی ساکارید از اتصالات (٤- ۱) – β، ان – استیل گلوکوز آمین و ان – استیل مورامیک اسید تشکیل شده است . لیزوزیم، لایه پپتیدوگلیکان دیواره سلولهای باکتریایی را هدف قرار داده و باعث هیدرولیز پیوند (٤- ۱) – β بین ان – استیل مورامیک اسید و ان – استیل گلوکوز آمین می گردد که در نتیجه اش لیز شدن سلول است. لیزوزیم دارای فعالیت آنزیماتیک ضعیف تری بر روی کیتین است. لیزوزیم بر روی برخی از باکتریهای گرم مثبت دارای بیشترین عملکرد است، خصوصاً میکروکوکوس لوتئوس که برای بررسی فعالیت مورد استفاده قرار می گیرد، همچنین بر روی برخی از کلستریدیوم‌ها، باسیلوس‌هاوسایر باکتریهای گرم مثبت دارای اثر عملکردی بالایی است(جدول۲- ۲).

---

[1] pathlength
[2] maximal specific activity
[3] HPLC

جدول۲- ۲:طیف ضد میکروبی لیزوزیم سفیده تخم مرغ در برابر باکتریهای بیماری زا با منشأ غذایی و ارگانیسمهای فساد زا (Davidson et al., 2005).

Organisms Strongly Lysed or Inhibited

Bacillus coagulans
Bacillus stearothermophilus
Clostridium thermosaccharolyticum
Clostridium tyrobutyricum
Micrococcus spp.
Sarcina spp.

Organisms Moderately Inhibited or Showing Marked Strain Sensitivity

Bacillus cereus
Brucella spp.
Campylobacter jejuni
Clostridium botulinum serotypes types A, B, and E
Listeria monocytogenes
Enterococcus faecalis
Lactobacillus spp.
Moraxella spp.
Pseudomonas aeruginosa
Yersinia enterocolitica
Yeasts—*Candida albicans, Cryptococcus neoformans,* select others

Organisms Usually Not Lysed or Inhibited

Aeromonas hydrophila
Brocothrix thermosphacta
Clostridium butyricum
Clostridium perfringens
Escherichia coli O157:H7
Klebsiella pneumoniae
Lactococcus spp.
Leuconostoc spp.
Salmonella enterica serotype Typhimurium
Shewanella putrefaciens
Shigella spp.
Staphylococcus aureus
Streptococcus thermophilus and other starter streptococci
Vibrio cholerae

فعالیت لیزوزوم در بین باکتریهای گرم مثبت، تفاوتهای گسترده ای دارد. به عنوان مثال، وقتی لیزوزیم برای ممانعت از گاز دیررس ناشی از اسپورهای کلستریدیوم تا یروبوتریکوم (International Dairy Federation , 1987)، استفاده میشود، باکتریهای اسید لاکتیکی مایه کشت، عموماً متأثر نمی شوند. لیزوزیم بر علیه برخی از باکتریهای گرم مثبت مثل استافیلوکوکوس اورئوس غیر فعال است، در باکتری مذکور، گروه آمینوی موجود در پپتیدوگلیکان به وسیله گروه‌های شیمیایی، وضعیت خاصی یافته یا اینکه برخی گونه‌ها دارای کپسولهای بزرگ هستند. لیزوزیم بر روی باکتریهای گرم منفی فعالیت ضعیف یا ناچیز دارد که احتمالاً دلیل عمده اش عدم توانایی لیزوزیم برای نفوذ به دیواره خارجی می باشد. هر چند لیزوزیم به علت خاصیت کاتیونی قوی با اجزای دارای بار منفی شامل اسیدهای نوکلئیک،

برخی پروتئین‌ها و لیپوساکاریدها با از دست دادن مقداری از فعالیت نیز واکنش ایجاد می کند. در شرایط موجود در غذاها، لایه لیپوپلی ساکاریدی در غشای خارجی باکتریهای گرم منفی از طریق ایجاد بار منفی و اتصالات عرضی با کاتیونهای دی والان، نوعی محافظت در برابر لیزوزیم ایجاد می کند. به هر حال، گسیختگی غشای خارجی توسط تیمارهای فیزیکی یا شیمیایی از قبیل اضافه نمودن اتیلن دی آمین تترااستیک اسید، می تواند موجب افزایش حساسیت باکتریهای گرم منفی در برابر لیزوزیم گردد. یک موتانت خشن از سالمونلا انتریکا، سروتیپ تایفی موریوم که در دیواره سلولی اش نقص در لایه لیپوپلی ساکاریدی وجود داشته باشد، بر خلاف سویه‌های نرم که برای ممانعت توسط لیزوزوم به حضور EDTA نیاز دارند، در برابر لیزوزیم و بدون نیاز به تیمار EDTA، ممانعت می گردد. لیزوزیم با توجه به خصوصیتش، می توان موجب به هم چسبندگی[1] باکتریها یا توکسین‌های مختلف گردد(Davidson, et al., 2005).

ترکیب نیسین و لیزوزیم در بسیاری از سیستم‌های غذایی مورد آزمون قرار گرفته است. هم نیسین و هم لیزوزیم در ترکیب با اتیلن دی آمین ترا استیک اسید[2] باعث کاهش اولیه باکتریهای گرم مثبت در هام[3] و بلوگنا [4] گردیده اند و رشد این باکتریها را در طول ٤ هفته ذخیره در ٨ درجه سانتی گراد کنترل کرده اند، هر چند نتایج موجود در مورد برخی گونه‌های خاص و یا در بین گوشتهای مختلف، متفاوت بوده است. ممانعت از سالمونلا[5] و اشرشیا کولی O157 : H7 تحت برخی شرایط مورد توجه و بررسی قرار گرفته است. همچنین عملکرد هم افزایی بین نیسین و لیزوزیم در برابر گونه‌های بروکوتریکس ترموسفاکتا [6]وکارنوباکتریوم [7] در گوشت‌های پر چرب و لخم خوک مشاهده گردیده است (Davidson, et al., 2005).

Nattress و همکاران(٢٠٠١) توانایی لیزوزیم و نیسین را برای ممانعت از بروکوتریکس ترموسفاکتا و گونه‌های کارنوباکتریوم تلقیح شده به محیطهای کشت، عصاره‌های گوشت خوک و بافت‌های چرب و لخم بدون چربی خوک ارزیابی نمودند. لیزوزیم و نیسین بروکوتریکس ترموسفاکتا را با درجات متفاوتی در محیطهای کشت، عصاره گوشت خوک و بافت ممانعت نمودند (Nattress et al., 2001).

نیسین (١٠٠٠ IU/mg) و لیزوزیم (22800 Shugar / unites / mg) و ترکیب نیسین (لیزوزوم به نسبتهای ١ : ٣، ١ : ١، ٣ : ١ در غلظتهای ٢٥٠، ٥٠٠ و ١٠٠٠ µg / ml براث APT و در غلظتهای ١٢٥،

---

[1] Flocculation
[2] EDTA
[3] Ham
[4] bologna
[5] *Salmonella*
[6] *Brochothrix thrrmosphacta*
[7] *Carnobacterium*

۲۵۰، ۵۰۰، و ۱۰۰۰ µg / ml محیط کشت عصاره گوشت خوک به کار گرفته شد. آماده سازی‌های مشابه از نیسین، لیزوزیم و ترکیبات حاصل از این دو ماده در نسبتهای ۳ : ۱ و ۱ : ۱ نیسین به لیزوزیم برای پوشش دادن بافتهای پرچرب و بدون چربی خوک در غلظتهای ٦٥، ۱۳۰ و ۲٦۰ µg / cm^3 مورد استفاده قرار گرفت. واحد Shugar مقیاسی برای اندازه گیری فعالیت لیزوزیم بر اساس مقدار آنزیم به ازای یک میلی لیتر از سوسپانسیون سلول باکتریایی می باشد که موجب کاهش در جذب نوری به میزان ۱ /۰۰ ۰ در هر دقیقه در طول موج ٤٥۰ نانومتر می گردد. نیسین، لیزوزیم و مخلوطهای آنها باعث ممانعت از بروکوتریکس ترموسفاکتااز محیط براث در غلظت ۲۵۰ µg/ ml به مدت ۱۰ روزدر ۲ درجه سانتی گراد گردید، در صورتی که در غلظتهای ۱۳۰ µg / cm^3 و غلظتهای بالاتر در هر دو تیمار ذکر شده از رشد ارگانیسم در سطح بافتهای بدون چربی و پر چرب به مدت ٦ هفته و در ۲ درجه سانتی گراد ممانعت نمود. نیسین و لیزوزیم در کنار هم در کاهش تعداد گونه‌های کارنوباکتریوم به میزان log ۳ cfu / g در مقایسه با نمونه‌های شاهد مؤثر بودند (Davidson, et al., 2005).

میزان کاتالیز از طریق لیزوزیم به pH محیط کشت وابسته است. پروفایل pH به صورت زنگی – شکل و دارای حداکثر فعالیت در pH معادل ۵ و سقوط شیب فعالیت[1] در pH های ۸. ۳ و ۷. ٦ است. جذب اسمزی آب منجر به تورم سلولی و از هم گسیختگی غشای سیتوپلاسمی که منجر به مرگ سلول خواهد شد. حدود ۹۰ درصد از دیواره سلولی باکتریهای گرم مثبت از پپتیدوگلیکان ساخته شده که منجر به حساس شدن آنها در برابر لیزوزیم می گردد. در برخی باکتریهای گرم مثبت مثل باسیلوس سرئوس[2]، غیاب ان –استیل گلوکوز آمین منجر به مقاومت در برابر لیزوزیم می گردد. در باکتریهای گرم منفی، اجزای پپتیدوگلیکانی، تنها ۵ تا ۱۰ درصد از دیواره سلول را تشکیل می دهند. لایه لیپو پلی ساکاریدی موجود در غشای خارجی به عنوان یک سد در برابر ماکروملکولها و ترکیبات هیدروفوبی عمل می کند. از این رو، باکتریهای گرم منفی در برابر لیزوزیم حساس نیستند. فعالیت ضد ویروسی لیزوزیم شارژ مثبت آن مربوط بوده و ربطی به فعالیت لیز کنندگی آن ندارد. اخیراً، During و همکاران، به شکل غیر منتظره ای کشف کردند که لیزوزیم دناتوره شده در برابر حرارت که فعالیت آنزیماتیکی آن از بین رفته است، فعالیت ضد میکروبی خود را حفظ می نماید. فعالیت مختل تمامیت غشائی ناشی از لیزوزیم دناتوره شده بر روی سلولهای باکتریایی، قارچی و گیاهی به اثبات رسیده است. به نظر می رسد نواحی آمفی پاتیک موجود در سی – ترمینال در لیزوزیم، فعالیتهای مربوط به باکتری کشی و قارچ کشی اش را توجیه می کند. این اطلاعات جدید نشان می دهد که لیزوزیم هم دارای طریقه عملکرد بیوسیدالی

[1] inflection
[2] *B.cerus*