مجلة ديالى للعلوم الزراعية المجلد (12) عدد خاص بوقائع المؤتمر العلمي الرابع والدولي الأول للبحوث الزراعية
15 -16 تموز 2020 ISSN: 2073-9524

دراسة بعض الصفات المايكروبية للغلاف الدقيق المحضر من الدارسين باستخدام تقنية طبقة بعد طبقة Layer By Layer والمستخدم في تغليف جبن التشدر

ازهار جواد شيماء رفعت خيري*
قسم علوم الاغذية / كلية علوم الهندسة الزراعية / جامعة بغداد
dr.azharjawad@yahoo.com

المستخلص

نفذت هذه الدراسة لتقييم تحضير أغلفة دقيقة مكونة من خمس طبقات حضرت بتقنية طبقة فوق طبقة (Layer By Layer -LBL) عن طريق استعمال محلولين هما الجينات الصوديوم والآخر عامل مضاد للاحياء المجهرية هو مستخلص الدارسين، تم تقدير قطر الهالة على طبق بتري يحتوي على البكتريا الموجبة *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* أو السالبة لصبغة كرام وهي *E. coli* و *Pseudomonas aeuroginosa*، *Enterococcus* ssp. والعفنين *Aspergillus niger* و*Fusarium* لتقدير فعالية المستخلص المضادة للأحياء المجهرية وأوضحت النتائج أن تركيز 0.2% من مستخلص الدارسين قد أظهر فعالية تثبيطية ضد هذه الاحياء المجهرية ، لتحديد صفات الغلاف الدقيق المحضر استخدم المجهر الالكتروني الماسح في الكشف عن سمك الاغلفة الدقيقة المحضرة حيث بلغ سمك الغلاف الكلي المكون من الألجينات والدارسين 22.47 مايكرون، بلغ جهد الزيتا لمحلول الألجينات 28.49- ملي فولت على pH =7 ولمستخلص الكركم 28.69 ملي فولت، كانت قيم نفاذية بخار الماء WVP للـ PET المشحونة 29.091 ($g.m^2/24h$) وللـ PET المشحون والمغلف بالالجينات ومستخلص الدارسين،OTR للغلاف النانوي اذ كانت للـ PET المشحونة هي 14.78 ($ml/m^2.day$)، وللـ PET المشحون والمغلف بالالجينات ومستخلص الدارسين 17.95 ($ml/m^2.day$). صنعت ثلاث معاملات من جبن التشدر، غلفت المعاملة الأولى بالغلاف الشمع البرافيني(M1)، والثانية غلفت بالغلاف الجيلاتيني (M2) والثالثة غلفت بالغلاف الدقيق المكون من الجينات الصوديوم ومستخلص الدارسين (M3) أشارت النتائج الى ان وجود مستخلص الدارسين في حدد من النمو المايكروبي للمعاملة (M3) مما جعلها متفوقة على معاملتي المقارنة.

الكلمات المفتاحية: طريقة LBL، جبن المونتري، الدارسين، الاغلفة الدقيقة.
***البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثاني.**

STUDY OF SOME MICROBIAL PROPERTIES FOR MICROLAMINATE OF ALGINATE AND CINNAMON IN LBL TECHNIQUE USED IN THE CHEDDAR CHEESE COATING

Azhar Jawad **Shaymaa R. Khairi**

University of Baghdad /College of Agriculture/Food Science Dep.
Baghdad
dr.azharjawad @yahoo.com

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the preparation of five-layer microlaminates that were introduced by Layer By Layer (LBL) technique by the use of two solutions, namely, the sodium alginate, and the other antimicrobial

agent is the cinnamon extract. The halo diameter was estimated on a petri dish containing the positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* or negative gram bacteria *E. coli* and *Pseudomonas aeuroginosa*, *Enterococcus ssp*. *Aspergillus niger* and *Fusarium* were used to estimate the effectiveness of antimicrobial extracts. Results showed that 0.2% concentration of cinnamon extract showed inhibitory activity against these microorganisms. The scanning electron microscope was used to detect the thickness of prepared microlaminates . The thickness of the total alginate and cinnamon microlaminate was 22.47 micron , The Zeta Potential voltage of the alginate solution reached -28.49 mV at pH = 7 and the cinnamon extract was 28.69 mV, The WVP water permeability values for the micrlayered PET film without any addition to the charged PET (treatment 1) were 29.091 g.m^2/24h) and for the microlayered PET-charged for sodium alginate and Cinnamon extract (treatment 2), OTR was obtained for the micrlayered with no addition of the charged PET (treatment 1), 14.78 ml / m^2.day), and for the PET-charged, covered with sodium alginate and cinnamon extract (treatment 2) 17.95 ml /m^2.day.Three treatments were made of Monterey cheese, the first treatment was covered with the paraffin wax as control M1, the second was covered with gelatin (M2) and the third was coated with a micrlayered film consisting of the sodium alginate and the cinnamonextract (M3). The results indicated that the presence of the cinnamon extract was determined by the microbiological growth of the treatment (M3), which made it superior to the comparison treatments.

Kay words: LBL method, Microlaminate, Cinnamon, Monterey cheese.

المقدمة

تعد تقنية طبقة فوق طبقة (Layer By Layer - LBL) والتي تتألف من طبقات متجمعة ذاتياً الكتروستاتيكياً على سطح المادة هي التقنية المستخدمة في تصنيع الأغلفة النانوية واالمايكروية، وقد طبقت في حقول متنوعة مثل الطب الحيوي وفي تصنيع الأغذية، أشار Bertuzzi و Salvutsky (2017) الى ان الغلاف الدقيق يتكون من اثنين أو اكثر من الطبقات من مواد ذات ابعاد نانوية او مايكروية ومرتبطة مع بعضها بأواصر بشكل كيميائي أو فيزيائي والتي تحسن من خواص حجز الماء للنشأ الذي يدخل في صناعة الأغلفة القابلة للأكل لحماية الغذاء ضد التلف المايكروبي مع مراعاة تأثر خواص الغلاف الوظيفية بالمحتوى المائي اقترحت تقنية طبقة فوق طبقة (Layer By Layer- LBL) كطريقة مناسبة للحصول على غلاف دقيق مكون من بوليمرات طبيعية صالح للإستهلاك ويستعمل في تغليف الأغذية والذي يجب ان يكون مشحونا الكتروستاتيكياً مع الخواص الوظيفية المهمة متل المضادات الحيوية والمانعة للتأكسد وخواص حمل الغاز الوظيفية Carneiro-da-Cunha واخرون (2010). تم اختبار استعمال الغلاف الدقيقة لتغليف الأغذية على الفواكه Medrios واخرون (2012) ولم يستعمل ابداً على الجبن المنضج الذي يعد منتجاً غذائياً معقداً يتكون بصورة رئيسة من الماء والكازين والدهن فضلاً عن انه منتوج واسع الإستهلاك. ان نمو الأحياء المجهرية على سطح الغذاء هو السبب الرئيسي لتلف وفساد الأغذية ولإجل اطالة مدة خزن وحفظ

الغذاء والحفاظ على جودته يتم طلاء الغذاء بالعوامل التثبيطية او يتم دمج المثبطات في مواد التعبئة والتغليف وهذا مايسمى بالتغليف المضاد للأحياء المجهرية وهو احد فروع التغليف الفعال وهو وسيلة مبتكرة يرتكز مفهومها حول تثبيط نمو الأحياء المجهرية الناتجة من العوامل البيئية المحيطة بالغذاء واحدة من السكريات الأكثر استخداما في البناء متعدد الطبقات هو الألجينات، وهو بوليمر جيد نال العديد من التطبيقات بسبب توافقه مع الحياة، وقابلية التحلل البيولوجي وغير سام كما انه يؤدي إلى تشكيل طبقات متعددة .فضلاً عن إنه يمكن استخدام تقنية LBL لتغليف المواد المختلفة (ماء، المحبة للماء أو محبة للدهون) داخل الأغلفة النانوية عن طريق دمجها، كما في دمج عوامل وظيفية نشطة مثل مضادات الميكروبات، مضادات الإسمرار الإنزيمي، مضادات الأكسدة، الانزيمات، النكهات والألوان في الأغلفة. وهذه الأخيرة ستزيد من العمر الافتراضي ونوعية الأغذية المغلفة للمنتجات بينت البحوث المتعلقة بدراسة محتوى القرفة (الدارسين) من المكونات الكيمائية الفعالة على احتوائها عدة انواع من المركبات الفينولية و الفلافونويدية و البروانثوسيانيدين، ففي دراسة قام بها Shan وآخرون (2007) للكشف عن فعالية البروانثوسيانيدين المستخلص من القرفة ضد الاحياء المجهرية ، تبين ان قيم اقل تركيز مثبط (MIC) Inhibition Minimum concentration واقل تركيز قاتل للبكتريا (MBC) Minimum concentration bactericidal منخفضة تجاه بكتريا *B.cereus* و *L.monocytogens* بينما كانت قيم MIC وMBC عالية تجاه بكتريا *S.aureus* و *S.anatum* و*E.coli* . يهدف البحث الى دراسة بعض الصفات المايكروبية للغلاف الدقيق المحضر من الدارسين باستخدام تقنية طبقة بعد طبقة Layer By Layer والمستخدم في تغليف جبن التشدر.

المواد وطرائق العمل

PET: تم الحصول على Poly Ethylene Terephthalate (PET) من شركة Sigma Aldrich الألمانية ذو سمك 0.005 ملمتر اذ عد كغشاء داعم لصب محاليل الغلاف عليه عند دراسة صفاتها.

تحضير المستخلص النباتي الفلافونيدي للدراسين: اجريت عملية الإستخلاص تبعاً لطريقة Harbone (1973) والمحورة من الكوري (2000).

محاليل الغلاف المستعملة في تغليف الجبن: حضرت محاليل الغلاف المستعملة في تغليف الجبن حسب الطريقة الموصوفة من قبل Carneiro-da-Cunha وآخرون (2010) والمحورة من قبلنا وشملت :

محلول الجينات الصوديوم Sodium Alginate: حضر بتركيز 0.2 % (وزن/حجم) باذابة الجينات الصوديوم (مجهزة من شركة .Hi Media Lab الهندية لصناعة المواد الكيميائية) في ماء مقطر وباستعمال مازج مغناطيسي بسرعة 200 دورة/ دقيقة لمدة ساعتين بدرجة حرارة 70°م ، ثم على درجة حرارة 20مْ لمدة 22 ساعة ، عدل pH لمحلول الألجينات الى 7 بإستعمال محلول NaOH (1 مولار) وأجري له عملية تكسير بجهاز المجنس ذو الأمواج فوق الصوتية Ultra Sonic Homogenizer وبواقع 80 ذبذبة لمدة 4 دقائق وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

محلول مستخلص الدارسين: حضر مستخلص الدرسين (حصل عليه من الاسواق المحلية لمدينة بغداد) بتركيز 0.2% (وزن/حجم) بإذابة مسحوق الدارسين في ماء مقطر وباستعمال مازج مغناطيسي بسرعة 200 دورة/ دقيقة لمدة ساعتين على 20°م وعدل pH للمستخلص الى 3.8 بإستعمال حامض اللاكتيك (1 مولار) وأجري له عملية تكسير بجهاز المجنس ذو الأمواج فوق الصوتية Ultra Sonic Homogenizer وبواقع 80 ذبذبة لمدة 4 دقائق وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

محلول الغلاف الجيلاتيني: حضر محلول الغلاف الجيلاتيني بتركيز 10% تبعا للطريقة التي ذكرتها الجنابي (2008) بوزن 10 غم من مسحوق الجيلاتين البقري وإذابتها في حوالي 70-80 غم من الماء المقطر مع التحريك المستمر والتسخين إلى درجة حرارة 60-65 °م باستخدام جهاز المحرك المغناطيسي ذي الصفيحة الساخنة ولمدة 15 دقيقة، ثم أضيفت المادة الملدنة السوربيتول بنسبة 30% من وزن الجيلاتين الجاف وإكمل الحجم إلى 100مل بالماء المقطر وعدل (PH) الى7 باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم (1 مولار) ثم ترك المحلول ليبرد وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال.

قياس فعالية المستخلص الفلافونيدي للدارسين المضاد للبكتريا : استعملت طريقة الإنتشار بالآكار بوساطة الحفر The agar well diffusion method حسب ماجاء بطريقة Hammer وآخرون (2003) وتضمنت الطريقة عمل خمسة حفر بقطر 6 ملم بواسطة ثاقب فليني Cork porer وبأبعاد متساوية لكل نوع من البكتريا، ثم نشر 0.1 مل من العالق البكتيري بماسح قطني Cotton Swap بصورة متجانسة على وسط Muller Hinton agar بعد مقارنتها مع انبوبة ماكفرلاند القياسي المحضر بمزج 0.5 مل من كلوريد الباريوم 1 % (المحضر من إذابة 1.175 غرام من كلوريد الباريوم في 100 مل من الماء المقطر) مع 9.5 مل من حامض الكبريتيك 1 % (المحضر من مزج 1 مل من حامض الكبريتيك المركز في 100 مل من الماء المقطر) و حفظ في أنبوبة زجاجية ذات غطاء محكم وحفظت في الظلام لحين الاستعمال في معايرة عدد الخلايا البكتيرية و المساوي لتركيز 1.5×10^8 (Baron و Finegold ، 1994) ، ثم اضيفت التراكيز المحضرة من المستخلص في الحفر بمقدار 0.1 مل بالماصة الدقيقة Micropipette لكل حفرة مع بقاء حفرة السيطرة حاوية على الماء المقطر المعقم ، ثم حضنت الأطباق في الحاضنة على درجة 37°م لمدة 24 ساعة ، وأمكن معرفة فعالية المستخلص عند قياس قطر التثبيط بوساطة الهالة حول كل حفرة ، بواقع 3 قراءات لكل عزلة.

تحضير الغلاف : حضر الغلاف لغرض توصيفه على مرحلتين شملت المرحلة الأولى شحن غلاف البوليمر(PET) Poly Ethylene Terephthalate اذ عد كغشاء داعم لصب محاليل الغلاف عليه عند دراسة صفاتها، واجريت الطريقة كما وصفهاFu وآخرون (2005) اذ نظفت قطع PET بمحلول (ايثانول : ماء) (1:1) لمدة 3 ساعات بعدها شطفت بالماء المقطر وجففت على 30°م لمدة 24 ساعة، ومن ثم غمر الغلاف بـ 0.06 غم من hexandiamine/Propanol 1,6 على درجة 37°م لمدة 4 ساعات وبعد انتهاء المدة المحددة غسل بالماء المقطر للتخلص من المادة السابقة الذكر وجفف على 37° م لمدة 24 ساعة، عوملت الغلاف المشحونة بـ 0.1 مولار من HCl لمدة 3 ساعات على درجة حرارة الغرفة وغسلت بكمية كبيرة من الماء المقطر وجففت على 30° م لمدة 24 ساعة ، أما المرحلة الثانية فشملت عملية طلاء لغلاف PET اذ قطعت الى اشكال مستطيلة ذات بعد (1×1) سم وغطست في محلول الألجينات لمدة 15 دقيقة بعدها شطفت بالماء الخالي من الأيونات ذو pH 7 والمشابه للأس الهيدروجيني لمحلول الألجينات وتركت لحين الجفاف ثم غطست بمحلول الدارسين ولمدة 15 دقيقة بعدها شطفت بالماء المحمض بحامض اللاكتيك ذو 3.8pH والمشابه للأس الهيدروجيني للمستخلصات الفلافونيدية. كررت العملية خمس مرات لتكوين خمس طبقات بالتناوب (الجينات - مستخلص- الجينات- مستخلص- الجينات) على درجة حرارة 20ْم ورطوبة نسبية 50% .

توصيف الغلاف

تحويل فورير الأشعة تحت الحمراء**Fourier transform spectroscopy (FTIR):** اجري قياس FTIR في مدى اطوال موجية 650 -4000 سم $^{-1}$ لفحص المجاميع الفعالة لسطوح قطع PET المشحونة وغير المشحونة من محاليل المستخلصات النباتية الكركم ، والدارسين واكليل الجبل ووضعت على عدسة الجهاز الحساسة في درجة حرارة الغرفة .

جهد الزيتا Zeta Potential : تم حساب جـهد الزيتا لـمحاليل الألجينات والمستخلص النباتي للدارسين واكليل في مركز بحوث النانوتكنولوجي في الجامعة التكنولوجية وذلك عن طريق تفكك الضوء الديناميكي بمحلل الزيتا باستخدام جهاز Micr book Zeta plus zeta potential analyzer واجريت التحـاليل فـي درجة حرارة الغرفة 25°م، كـررت القياسات للعينات ثـلاث مرات (Bajelan *et al.*, 2012).

مقياس طيف الاشعه فوق البنفسجية المرئي (UV) UV-visible spectrometer: تم قياس امتصاصية طيف الاشعه فوق البنفسجية المرئي باستعمال جهاز المطياف الضوئي واستعمل للغلاف المتعددة المحضرة وقيست الإمتصاصية في طول موجي 260 نانومتر (Sinkowska , 2006). تم قياس 3 قراءات لكل عينة.

قياس معدل نفاذية بخار الماء (WVP): اجري قياس معدل نفاذية بخار الماء للغلاف باستخدام جهاز (WVTR) حسب التصنيف الامريكي ASTM-E96 (2010) في مقر هيأة البحث والتطوير الصناعي /المركز الوطني للتعبئة والتغليف والذي يعتمد اسلوبه على وضع العينة افقيا في حجرة بداخلها ماء مقطر يصل الى (1سم^3) مع استمرار تدفق الهواء عبر الجانب العلوي للغلاف، في حين يتعرض الجانب السفلي فيه لبخار الماء وتوزن الحجرة كل ساعة للحصول على شكل يبين فقدان الوزن مقابل الوقت كما في الشكل (3-2)، يستخدم لحساب (WVTR) معدل (4-5) قراءات لقياس معدل نفاذية بخار الماء والتي حسبت على وفق المعادلة:

$$\mathbf{WVTR} = \frac{\mathbf{\Delta w}}{\mathbf{A.t}}$$

اذ:

ΔW التغير في وزن العينة (gm) A = مساحة العينة (cm-^{2}) **t** = وقت وضع العينة (Sec.).

قياس معدل نفاذية إنتقال الأوكسجين (OTR) : جرى الفحص للكشف عن معدل نفاذية الاوكسجين للغلاف باستخدام جهاز OTR في مقر هيأة البحث والتطوير الصناعي /المركز الوطني للتعبئة و التغليف شكل (3-3) الذي يعتمد اسلوبه على امرار غاز النتروجين على العينة لإزالة الاوكسجين من حجرات الفحص وعلى جانبي العينة ، ثم يستبدل النتروجين على جانب واحد بالأوكسجين مع استمرار تدفق النيتروجين على الجانب الاخر ثم تقاس كمية الاوكسجين التي تنفذ من خلال العينة باستخدام الكاشف بعد الانتهاء من وضع العينة لمدة (30) ساعة يتم تحديد نفاذية الاوكسجين للعينات المفحوصة في درجة حرارة ثابتة (23C°) ورطوبة نسبية (50%) ويقاس معدل نفاذية الاوكسجين حسب التصنيف الامريكي ASTM-D-3985-02 (2002).

$$ORT = \frac{V}{A.t}$$

إذ إن :

V = حجم العينة (cm-^{3}). A = مساحة العينة (cm-^{2}). t = وقت وضع العينة (Sec.).

المجهر الإلكتروني الماسح Scanning electron microscopy (SEM): تم فحص الغلاف المحضر قيد الدراسة على سطح PET المشحون المكون من 5 طبقات فضلاً عن سطح PET غير المشحون باستعمال المجهر الإلكتروني الماسح في مركز بحوث النانوتكنولوجي في الجامعة التكنولوجية.

تصنيع جبن التشدر : صنع جبن التشدر بحسب الطريقة الموصوفة من الدهان (1983).

تغليف الجبن: اتبعت طريقة التغطـيس Dipping لتغليف الجبن وعلى النحو الاتي:- لتحضير المعاملة T3 تم غسل قطع الجبن (وزن القطعة 75 غم) بالماء المقطر وتركت لتجف خلال 20 دقيقة بدرجة حرارة 25°م، غمرت بعدها في محلول الجينات الصوديوم المحضر مسبقا لمدة 15 دقيقة وتركت لتجف خلال 20 دقيقة ، غسلت بالماء المقطر ذو pH =7 وهو نفس pH محلول الجينات الصوديوم، بعدها غمرت بمستخلص الدارسين ذو pH = 3.8 كررت العملية مع محلول الجينات الصوديوم ومستخلص الدارسين وفي الظروف السابقة نفسها لإعداد المعاملة T3 المغلفة بغلاف يتألف من خمس طبقات هي الجينات- دارسين - الجينات- دارسين - الجينات، كماً تم إعداد معاملتي مقارنة T1، T2 ، المعاملة T1 استعمل في تغليفها شمع البارافين المجهز الى الشركة العامة لمنتوجات الألبان- أبي غريب – بغداد أذ تم تغطيس قطع الجبن في محلول الشمع الذائب المنصهر في درجة 118ºم لمدة 5 ثواني ثم اخرجت لتجف، اما المعاملة T2 فقد تم تغليفها بالغلاف الجيلاتيني اذ بعد تجفيف قطع الجبن غمرت بمحلول الجيلاتين مع التقليب بين مدة واخرى ، بعد إكتمال عملية التغليف للمعاملات وضعت النماذج بعد وزنها في علب بلاستيكية معقمة محكمة الغلق وحفظت في الثلاجة وبدرجة حرارة 10± 2°م لمدة 6 أشهر لغرض إجراء الفحوص الكيميائية والمايكروبية والحسية اللازمة عليها.

فحوصات المايكروبيولوجية:

لاجراء الفحوصات المايكروبية استعملت الطريقة المذكورة في APHA (1978) وذلك باستخدام طريقة الصب Pour plate، لتقدير العدد الكلي للأحياء المجهرية Total plate count ، وعدد بكتريا القولون Total coliform، وعدد الأعفان Molds، ولتقدير عدد العنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus* استخدمت الطريقة المذكورة في (BBL) Blatimore Biological Laboratory (1973) واستخـدمت الطريـقة المذكـورة فـي Harrigan وMcCence (1976) لتقدير عدد البكتريا المحللة للبروتين Proteolytic bacteria ، وعند تقدير عدد البكتريا المحللة للدهون Lipolytic bacteria استخدمت الطريقة المذكورة في Harrigan and McCence (1976) وقـدر عدد البكتريا المحبة للبرودة Psychrophilic bacteria باتباع الطريـقة المذكـورة فـي APHA (1978).

التحليل الاحصائي: استعمل البرنامج الإحصائي SAS- Statistical Analysis System (2012) في تحليل البيانات لدراسة تأثير العوامل المختلفة في الصفات المدروسة وفق تصميم عشوائي كامل (CRD) ان كان باتجاه واحد او وباتجاهين، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي (Least Significant Difference-LSD) وعلى مستوى احتمالية 0.05 .

النتائج والمناقشة

دراسة فعالية مستخلص الدارسين المضاد للأحياء المجهرية : درس تاثير اضافة مستخلص الدارسين بتركيز 0.2 % (وزن/حجم) بعد اضافته للالجينات المستخدمة في تحضير الغلاف المايكروني متعددة الطبقات في تثبيط نمو نوعين من البكتريا الموجبة لصبغة كرام تمثلت بكل من بكتريا *Staphylococcus aureus* ; *Bacillus subtillis* والبكتريا السالبة لصبغة كرام *E. coli* و *Pseudomonas aeroginosa* و *Enterococcus ssp*، تم الحصول عليها من كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد ، يبين الجدول (1) تاثير مستخلص الدارسين في تثبيط البكتريا ، اذ لوحظ انه ثبط البكتريا السالبة لصغة كرام، اذ كان معدل قطر هالة التثبيط 15 و28 ملم لكل من بكتريا *E. coli* و *Enterococcus*على التوالي، وبلغ قطر هالة التثبيط لبكتريا *Staphylococcus aureus* 25 ملم ولبكتريا *Bacillus subtilis* 9 ملم ولبكتريا *Pseudomonas aeuroginosa* 13 ملم، ويرجع السبب في ذلك الى أحتواء الدارسين (القرفة) على العديد من المركبات الكيميائية الفعالة مثل المركبات الفينولية والفلافونيدية والبروانثوسيانيدين والتي

تجعلها فعالة ضد الأحياء المجهرية وهذا يوافق ما توصل اليه Shan وآخرون (2007) عن الفعالية التثبيطية للبروانثوسيانيدين المستخلص من نبات الدارسين تجاه كل من بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Bacillus* و*E. coli* اذ تميز بأعلى تحسس تجاه بكتريا *Staphylococcus aureus* والذي أظهر أعلى قطر هالة تثبيط 20.8 ملم وكانت عالية تجاه بكتريا *E. coli* ومنخفضة تجاه بكتريا *Bacillus* .

جدول 1. تاثير مستخلص الدارسين في تثبيط بعض انواع البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام عن طريق قياس قطر الهالات المتكونة (ملم)

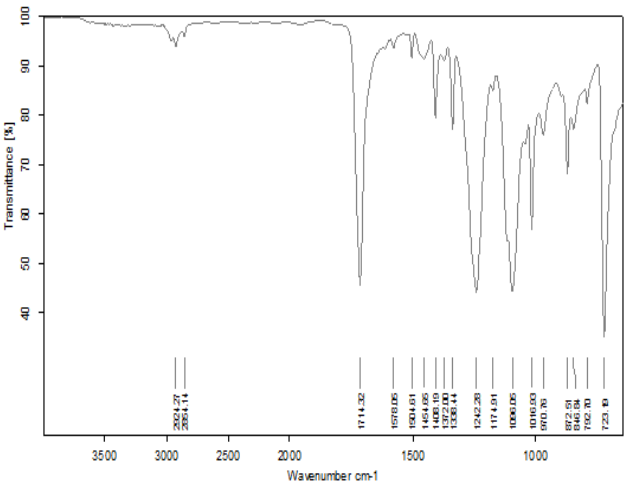
قيمة LSD	*B. subtillis*	*S. aureus*	*Ps. aeuroginosa*	*Ent. Ssp*	*E. coli*
* 6.07	9	25	13	28	15

* اقل فرق معنوي على مستوى احتمال P>0.05

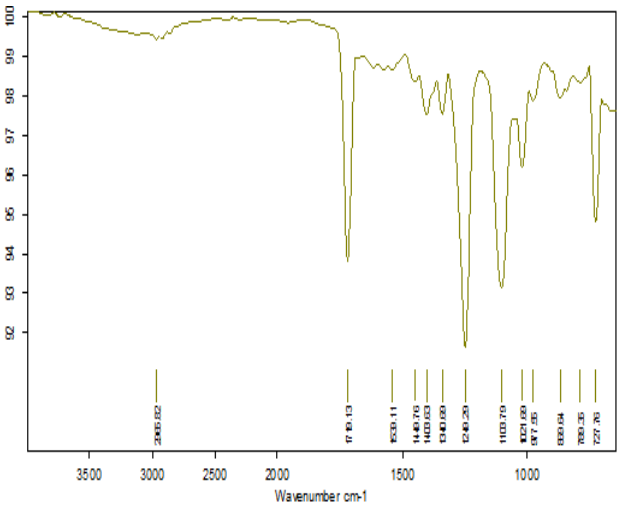
وبناء على ما تقدم استخدم تركيز 0.2% من المستخلص النباتي في تحضير غلاف مايكروني بدمجه مع الالجينات وبنفس التركيز واستخدامه في تغليف جبن التشدر لغرض دراسة أثر ذلك في الحد من نمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام والسالبة لصبغة كرام .

دراسة الخواص الفيزيائية للغلاف والمحاليل البولي الألكتروتية للغلاف

تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء FTIR: استعمل قياس الأشعة تحت الحمراء FTIR للتأكد من وجود المجاميع الفعالة على سطح PET ، اذ يوضح الشكل 1 طيف FTIR لغشاء PET الداعم المشحون فقط وبدون اضافة، وذلك من خلال وجود قمم موقعها على 1719 و1249 سم $^{-1}$ و 1103 والتي لها علاقة بمجاميع الكاربوكسيل الحلقية، اما القمة التي موقعها 727 سم$^{-1}$ فتعود الى الآصرة (C-H) الاروماتية (Fu واخرون ، 2005 و Mederois واخرون، 2012). اما الشكل 2 فيظهر نتائج تحليل FTIR لمستخلص الدارسين اذ يلاحظ ظهور الاتساع في 1096 سم$^{-1}$ الناتجة من الامتطاط المميز لـ C-O-C- ، مع وجود قمتين موقعها على 1715 ،1244 سم$^{-1}$ ، وقمة موقعها سم$^{-1}$ 723، تعد هذه النتائج مطابقة لما ذكره Alhamd (2015) إذ ذكر بأن حزمة IR على 1666.7 سم$^{-1}$ تعود إلى مجموعة O-H وC=O والحزمة على 1000 سم$^{-1}$ تعود إلى C-OH أما الحزمة على 1600 سم$^{-1}$ فتعود إلى مجموعة C=O والحزمة على 1580 سم$^{-1}$ تعود إلى مجموعة amide.



شكل 2. تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء FTIR لغلاف PET المشحون والمغلف بالالجينات والدارسين

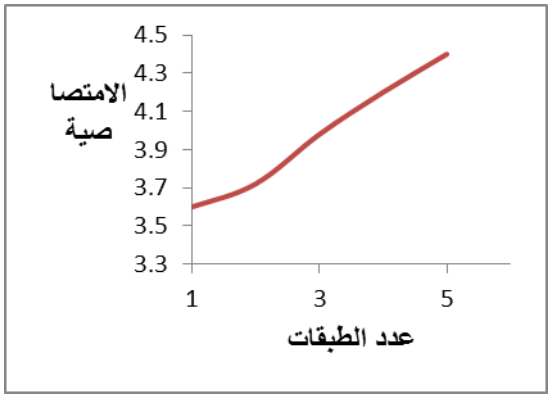


شكل 1. تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء FTIR لغلاف PET المشحون

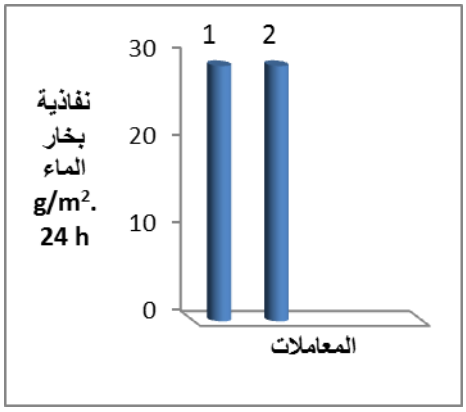
تقدير جهد الزيتا Zeta Potential : لدراسة الخواص الألكتروستاتيكية لمحاليل الألجينات والمستخلص النباتي تم حساب جهد الزيتا والذي اجري اعتماداً على مقارنته مع سطح PET الداعم اذ بلغ جهد الزيتا لمحلول الألجينات 28.49- ملي فولت وعلى pH =7 ولمستخلص الدارسين 28.69 ملي فولت، وتعود قيمة جهد الزيتا السالب من خلال مجاميع الكاربوكسيل الحرة (COOH) الداخلة في تركيبها على pH =7 وتعتمد السطوح المحبة للماء على طبيعة الطبقة الخارجية وليس على غلاف المادة الأساس وعادة فان الترسيب للطبقات يسبب بعض التأثير على بعض الخواص الفيزيائية فضلاً عن التغييرات في pH يمكن أن تؤثر معنوياً على صفات السطح المحبة للماء وهذه التغييرات يمكن بدورها أن تؤثر على تركيب الغشاء نفسه ومثالاً على ذلك فإن الالجينات المحضرة بقيم pH عالية كانت ذات شحنة ضعيفة مقارنة مع تلك التي حضرت بقيم pH منخفضة وهذا يعود الى اسطح الالجينات الناعمة (Wasikiewicz واخرون، 2005) وجاءت هذه النتائج متماشية من حيث الشحنة مع ما وجده Carneiro-da-Cunha وآخرون (2010) ، اذ كانت قيم جهد الزيتا -62.13 ± 4.10 ملي فولت لمحلول الجينات الصوديوم على pH =7 و-58.28± 4.18 ملي فولت لمحلول الكايتوسان على pH =3.8 والتي أظهرت أنه يمكن ان تتداخل مع القوى الألكتروستاتيكية وللايسوزايم كانت 29.27± 3.18 ملي فولت على pH =3.8 بوجود مجاميع الأمين وكذلك مع ما وجده Medeiros وآخرون (2012) اذ كانت قيم جهد الزيتا للألجينات 62.13- ملي فولت على pH =7 وللايسوزايم على 25.67 ± 2.27 ملي فولت على pH =3.8.امتصاص.

امتصاص UV-Vis: لمتابعة تجمع طبقات الغلاف المصنع والمكون من الالجينات مع الدارسين على سطح PET الداعم المشحون اجري فحص تحليل المطياف الضوئي على طول موجي 260 نانومتر بعد كل ترسيب، اذ عندما تزداد قيمة الامتصاص بترسب الطبقات طبقة بعد الاخرى فان هذا يؤكد الترسيب الناجح للطبقات المتعددة، كما يوضح الشكل 3 الامتصاصية الضوئية على الطول الموجي 260 نانوميتر للغلاف متعددة الطبقات والمؤلفة من الالجينات مع مستخلص الدراسين ، اذ يظهر فيها الزيادة الحاصلة في الامتصاصية مع ترسب الطبقات الخمسة المؤلفة لكل غلاف، مما يؤكد الترسيب الناجح لهذه الغلاف المايكروني المصنعة والذي يسمح في توصيف وتشخيص أكثر لهذه المواد، تتماشى هذه النتائج مع ما توصل له Carneiro-da-Cunha وآخرون (2010) والذين وجدوا ايضاً زيادة ملحوظة في قيم الامتصاص

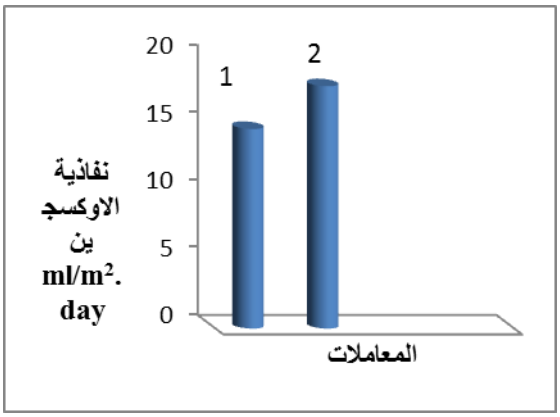
بترسب خمس طبقات من الألجينات والكايتوسان على سطح PET المشحون الداعم وأكدت الصور بجهاز SEM بناء الغلاف على سطح PET المشحون ، كذلك ذكر Wang (2007) ان زيادة عدد طبقات الغلاف سببت زيادة ملحوظة في قيم الامتصاص الضوئي.



شكل 3. الامتصاص الطيفي للاشعة الفوق البنفسجية المرئية لمحلول االدارسين*.



شكل 4. نفاذية بخار الماء للغلاف المايكروني للدارسين (g / m2.24h)*.



شكل 5. نفاذية الأوكسجين للغلاف المايكروني للدارسين (ml/m2.day)*.

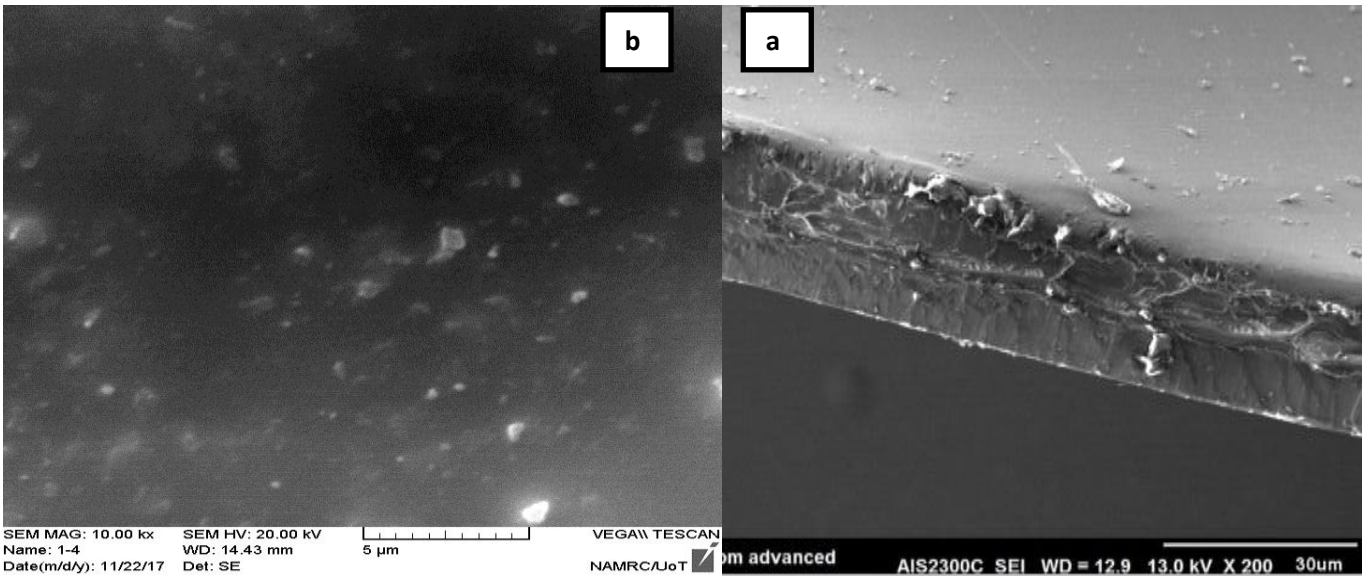
***المعاملة 1 = PET المشحون فقط المعاملة 2 = PET المشحون والمغلف بالالجينات ومستخلص الدارسين**

نفاذية بخار الماء WVTR : إن أهم ما يميز الغلاف من حيث صفاتها الحجزية Barrier properties هو قابليتها على احتجاز الماء أو بخاره وقدرتها على منع نفاذ الغازات مثل ثاني أوكسيد الكاربون والأوكسجين من والى الغذاء لما لذلك من تأثير في نوعية وسلامة الغذاء وقابلية حفظه وزيادة عمره الخزني (Anker واخرون، 2000) ، تشير نتائج الشكل 4 وفيها قيم WVP الى ان نفاذية بخار الماء للـ PET المشحونة فقط (المعاملة 1) هي 29.091 ($g.m^2/24h$) وللـ PET المشحون والمغلف بالالجينات ومستخلص الدارسين (المعاملة 2) 29.091 ($g.m^2/24h$)، تعد هذه النتائج جيدة للغلاف المتعدد الطبقات والتي يمكن ان يعتمد على التداخل الذاتي والذي يكون بين الألجينات وطبقات محاليل العوامل المضادة لنمو الأحياء المجهرية وظهرت نتيجة (المعاملة 2) وهي للـ PET المشحون والمغلف بالالجينات ومستخلص الدارسين مطابقة للمعاملة (1) وهي للـ PET المشحونة فقط وهذا يشير الى ان هذا الغلاف الحاوي على مستخلص الدارسين ذو قيمة حجز جيدة جدا وذلك بسبب التركيب الكيميائي له ومن ملاحظة نتائج FTIR للغلاف الأصلي PET المشحون فقط أنه يحتوي على مجموعة هيدروكسيل واحدة هي في 2965 سم$^{-1}$ وكذ

الحال للمعاملة 2 التي تبين انها تحتوي أيضاً على مجموعة هيدروكسيل واحدة في 2965 سم$^{-1}$ مما يدل على انها متقاربة من حيث التركيب مع معاملة المقارنة مما يدل على مكونات الغلاف التي لا تسمح بنفاذ جزيئات بخار الماء .

معدل انتقال الأوكسجين OTR :تم الحصول على قيمة OTR للغلاف المايكروني المصنع كما في الشكل 5 اذ كانت للـ PET المشحونة (المعاملة1) هي 14.78 (ml/m^2.day) وللـ PET المشحون والمغلف بالالجينات ومستخلص الدارسين (المعاملة 2) 17.95 (ml/m^2.day) وان نتائج المعاملتين كانتا ذات نتائج متقاربة، بسبب طبيعة التركيب الكيميائي للدارسين مما يحجز كمية الأوكسجين التي تنفذ الى داخل الغشاء كون الأوكسجين هو المسبب الأول لتلف الأغذية مما يساعد على حفظها وزيادة العمر الإفتراضي للأغذية.

المسح الألكتروني المايكروسكوبي SEM : يظهر الشكل 6 صور المسح الألكتروني المايكروسكوبي (SEM) لأطياف مختلفة من الغلاف المايكروني متعدد الطبقات المترسبة على سطح PET المشحون بطريقة (Layer By Layer -LBL)، اذ كان الغلاف الأول مكون من خمس طبقات هي الجينات الصوديوم والدارسين بالتناوب، اذ يلاحظ ان طبقة الالجينات والتي تمثل الطبقة السطحية العلوية كانت ناعمة وبلورية كما هو مبين في الاشكال (a وb)، كذلك يلاحظ من الشكل نفسه ظـهور طبقات متعددة وبأحـجـام مـختلفة لهذه الغلاف ففي الغلاف الأول أظهر الشكل ان سمك الطبقات الكلي للغلاف المكون من الألجينات والدارسين كانت 22.47 مايكرون، تتفق النتائج مع ما وجده Hul Li وآخرون (2017) عند استعمالهم لورق السليلوز المحضر المضاد للبكتريا باستخدام طبقة فوق طبقة في تلميع لحم البقر المطبوخ والحفاظ على درجة الحرارة المحيطة به وأمكن ملاحظة أن الورقة الأصلية التي تتكون من ألياف السليلوز لها سطح أكثر مرونة ومسامية ومع ما وجده Wu وFarnood (2014) عند تعزيزهما للشبكة المكونة من الألياف السليلوزية مع الطبقات المكونة من كاربوكسي مثيل سيليلوز /الكايتوسان بطريقة طبقة فوق طبقة Layer By Layer.



شكل 6. صور المجهر الألكتروني الماسح (SEM) لنماذج PET المشحونة والمغلفة بالالجينات والمستخلص النباتي الدارسين (a– صورة لطبقات الغلاف المايكروني المكون من الالجينات والدارسين و b - للسطح)

الفحوص المايكروبايولوجية

يظهر من الجدول 2 انخفاض في الاعداد الكلية للاحياء المجهرية في معاملات جبن التشدر المغلفة بالعوامل المضادة لنمو الأحياء المجهرية بعد مدة الخزن البالغة 6 أشهر. ومن قراءة هذه النتائج الموضحة نستنتج أن أعداد البكتريا الكلية في المعاملة T3 قد انخفضت بما يعادل دورتين لوغارتيمية تقريبا و.م.م/غم مقارنة مع معاملتي المقارنة للجبن المغلف بالشمع البرافيني والمغلف بالغلاف الجيلاتيني، وعند متابعة اعداد بكتريا القولون السالبة لصبغة كرام، أظهرت النتائج خلو المعاملات التي استخدمت فيها الغلاف الحاوية على العوامل المضادة للاحياء المجهرية من هذه البكتريا ، في حين كانت أعدادها 1.21×10^2 و 9.92×10^1 و.م.م/غم في المعاملات T1 و T2 على التوالي عند عمر 6 اشهر. إن سبب انخفاض الأعداد الكلية للبكتريا وأعداد بكتريا القولون قد يعود إلى التأثير المشترك لكل من العوامل المضادة للاحياء المجهرية من جهة وعملية التغليف بالغلاف من جهة اخرى سواء بتأثيرها كعامل مضاد للاحياء المجهرية تجاه البكتريا الموجبة لصبغة كرام أو التأثير المشترك ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام. وقد يعود سبب ارتفاع مستوى التلوث في المعاملة (T1) الى حدوث تشققات في الغلاف الشمعي علاوة على عدم احتواء هذه المعاملة على العوامل المضادة للاحياء المجهرية اذ إن عملية التغليف وحدها تسهم في منع التكاثر للاحياء الهوائية عن طريق منع دخول الأوكسجين الذي يعتبر أساسيا لنمو الإحياء الهوائية مما أدى إلى تقليل أعدادها أو إطالـــة طور التأقلم لها (Lag phase) وبالتالي خفض معدلات نمو البكتريا، كما إن للأوكسجين دورا مهما في السيطرة على نمو الاحياء الهوائية من خلال الدور الكبير الذي يلعبه في النشاط المائي (a_w) الضروري لنشاط هذه الأحياء المجهرية . أما تأثير العوامل المضادة للأحياء المجهرية فيكون من خلال فعالية هذه العوامل في تثبيط نمو هذه الاحياء أو منعه ، أشارت الأبحاث الى ان اللايسوزايم يعد عاملا مضادا قويا لنمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام ، ولكن ليس له أية فعالية تحللية مباشرة للبكتريا السالبة لصبغة كرام ، وقد ذكر (Ibrahim 1997) من ان الحساسية المختلفة لهاتين المجموعتين من البكتريا يرجع سببها إلى اختلاف تركيب وبناء الجدران الخلوية لهما، إذ ان الجدار الخلوي للبكتريا السالبة لصبغة كرام يتكون من طبقة الببتيدوكلايكان التي تمثل 30– 95% من الوزن الجاف للجدار والى الخارج منها توجد طبقتان الأولى طبقة البروتينات الدهنية (Lipoproteins) والثانية طبقة من السكريات المتحدة مع الدهون(Lipopolysaccharides) والتي تقع ضمن الغشاء الخارجي (outer) membrane لجدار البكتريا وبالتالي فان اللايسوزايم لا يستطيع تحت هذه الظروف الوصول إلى موقع التأثير في طبقة الببتيدوكلايكان إذ تؤدي الطبقات الدهنية والبروتينية الموجودة ضمن الغلاف الخارجي للبكتريا السالبة لصبغة كرام دور الحماية لهذه البكتريا ضد تأثير اللايسوزايم (Jalilzadeh واخرون، 2015). أما البكتريا المحللة للدهون والبروتينات وبضمنها بكتريا البادئ ، فلم تتأثر بالفعالية التثبيطية، قد يعود السبب الى دور الغلاف الحاوي على الدارسين المضاد للاحياء المجهرية (Quintavalla وVicini، 2002) مما يجعله غير قادر على الهجرة الى داخل قالب الجبن ويبقى دوره محصورا على الاحياء المتواجدة على سطح قالب الجبن .فيما يخص بكتريا العنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus* فقد لوحظ انخفاض معدل الزيادة في الأعداد الميكروبية لهذه الأحياء في المعاملة T3 بالمقارنة مع المعاملات التي لم تستخدم فيها العوامل المضادة للاحياء المجهرية، وقد يعود انخفاض معدل أعداد هذه البكتريا إلى الظروف البيئية الجديدة التي تكونت بفعل عملية التغليف بحد ذاتها وذلك من خلال حجزها للغازات وبالأخص الأوكسجين ذو التأثير الكبير في عملية التنفس من جهة وفي النشاط المائي المناسب لهذه الأحياء من جهة أخرى، أو قد يعود سبب التثبيط إلى دور بكتريا البادئ المنتجة لأنواع من البكتريوسينات القادرة على التأثير في نمو ونشاط بكتريا *S. aureus* (Chen و Hoover ، 2003) أو قد تشترك كل هذه الأسباب المذكورة في إيقاف أو تثبيط نمو البكتريا العنقودية .

أما الأعفان فلم يلاحظ اي نمو لها خلال مراحل الأنضاج في معاملة T3 (جدول2) مما يشير إلى ان استخدام العوامل المضادة للاحياء المجهرية مع تلك الغلاف ساهم في الحد من نمو الأعفان مقارنة بالمعاملات التي لم تستخدم معها تلك العوامل حيث ان وجود المركبات الفعالة في المستخلص النباتي الدارسين في هذه الغلاف المايكروني المصنع أدى دورا مهما لذلك يستخدم بشكل واسع في حفظ الأغذية وخاصة في صناعة الأجبان لكونه ذي قدرة على تثبيـــط او تحطيم كل من الهايفـات والسبـــورات للأعفـان (Danila و Milena، 2010) .

كما اظهر الجدول نفسه ان الاحياء المجهرية المحبة للبرودة ارتفعت اعدادها في الجبن المغلف بالشمع و في الجبن المغلف بالغلاف الجيلاتيني، في حين لوحظ أن أعداد هذه البكتريا انخفضت في الجبن المغلف بالالجينات والدارسين، ان انخفاض الاعداد الكلية للاحياء المجهرية المحبة في البرودة في الأجبان المغلفة بالعوامل المضادة لنمو الأحياء المجهرية له علاقة بالفعل التضادي البكتيري والذي يسمح بتحلل الببتيدوكلايكان مسببة تحلل جدار الخلية وخواص تحمل غاز O_2 للجبن المغلف مما سبب خفض معدل انتقال O_2 وتصنيعه مما قلل نمو الفطريات (Cerqueira وآخرون، 2010) وكانت هذه النتائج تتفق مع ماوجده Mediros وآخرون (2013) .

تشير النتائج جدول 2 إلى أن أعداد الأحياء المهجرية بين نماذج جبن التشدر المغلف بالغلاف المايكروني كانت ضمن الحدود المسموح بها في هذا النوع من الأجبان مما يشير إلى إمكانية استخدام هذه الغلاف في صناعة جبن مقبول من الناحية التغذوية والصحية .

جدول (2) نتائج الفحوص المايكروبية و.م.م/غم في معاملات جبن التشدر المنضج المغلف بالغلاف المايكروني للدارسين اثناء مدة الانضاج البالغة 6 أشهر وبدرجة 10°م ±2 في بداية ونهاية الانضاج *

Psychrophilic	Protolytic	Lipolytic	*Staphylococcu aureus*	Molds	*E. coli*	Total Count	المعاملة	
10^1 ×6.8	10^2 ×1.2	10^2 ×0.4	10^1 ×3.84	Nill	Nill	10^4 ×6.3	1	T1
10^1×7.7	10^2 ×3.0	10^2 ×1.0	10^2 ×5.0	Nill	×5.70 10^1	10^5 ×4.8	3	
10^2 ×1.3	10^3 ×1.2	10^2 ×2.0	10^2 ×7.0	×3.0 10^2	×1.21 10^2	10^7 ×3.2	6	
10^1 ×6.6	10^2 ×5.0	10^2 ×4.6	10^2 ×2.0	Nill	Nill	10^3 ×4.1	1	T2
10^1 ×7.5	10^2 ×8.1	10^2 ×7.5	10^2 ×2.43	Nill	×4.4 10^1	10^5 ×5.12	3	
10^2 ×1.3	10^3 ×1.5	10^3 ×1.4	10^2 ×3.44	×2.0 10^2	×9.92 10^1	10^6 ×5.41	6	
10^1 ×6.5	10^2 ×9.7	10^2 ×4.5	10^2 ×2.21	Nill	Nill	10^5 ×4.57	1	T3
10^1 ×6.30	10^2 ×7.6	10^2 ×4.2	10^2 ×2.19	Nill	Nill	10^5 ×6.57	3	
10^1 ×5.5	10^2 ×4.6	10^2 ×3.4	10^2 ×1.34	Nill	Nill	10^3 ×8.30	6	
10^1 ×5.5	10^2 ×4.1	10^2 ×3.9	10^2 ×1.13	Nill	Nill	10^3 ×7.62	6	
* 12.63	* 19.61	* 3.77	* 18.57	36.91 *	22.64 *	* 87.31	قيمة LSD	
(P<0.05) *								

***الارقام في الجدول تمثل معدلاً لمكررين**

المصادر

الجنابي، ليلى احمد فتاح. 2008. تحضير اغشية قابلة للاكل من الجيلاتين وهريس التفاح واستعمالها في تغليف بعض المواد الغذائية. رسالة ماجستير– كلية الزراعة – جامعة بغداد .

الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية .2000. المواصفة القياسية العراقية رقم (5/3725) (UDC:663). الجزء الخامس :الحدود المايكروبية للحليب ومنتجاتة. بغداد . العراق.

الدهان، عامر حميد .1983. صناعة الجبن وانواعه في العالم. مطبعة دار الحكمة. الموصل. العراق .

Alhamd, A.K. 2015. Improvement extraction of crude compounds from Iraqi olive leaves by appling water-base and alcoholic – base extraction and their biological application.World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Volume 4, Issue 1.183- 200.

American Public Health Association (APHA). 1978. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 14th ed. Marth. E.H. (ed). American Public Health Association. Washington. D.C. and applications. J Food Sci 70:1–10.

Anker, M.; M., Standing and A ., Hermansson. 2000. Relationship between the microstructure and the mechanical and barrier properties of whey proteins. J. Agir .Food Chem. 48:3806-3816.

ASTM, E-96. 2010. Standarad test method for Water Vapour Transmission of materials .Volum:08 .01.

Bajelan, E.; A., Haeri; A.M.. Vali,; S.N., Ostad and S., Dadshzadeh. 2012. Co-delivery of doxorubicin and PCS833 (Valspodar) by stealth micrliposomes for efficient overcoming of multidrug resistance .Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences. 15(4): 568-582.

Baron, E.J. and S.E ., Finegold . 1994. Diagnostic Microbiology 9th ed . The C.V. Mosby Company. USA.

BBL. 1973. Mannual of products and laboratory procedures.5th ed. Division of Becton , Dickinson and company.

Bertuzzi, M.A. and A.M., Salvutsky. 2017. Improvement of water barrier properties of starch films by lipid micrlamination . Food Packaging and Shelf Life. Volume 7.

Carneiro-da-Cunha, M. G.; M. A., Cerqueira, B. W. S., Souza; S., Carvalho; M. A. C., Quintas; J. A., Teixeira and A. A., Vicente. 2010. Physical and thermal properties of a chitosan/alginate micrlayered PET film. Carbohydrate Polymers, 82, 153–159.

Cerqueira, M.A.; M.J., Sousa-Gallagher; I., Macedo; R., Rodriguez-Aguilera; B.W.S., Souza and J.A., Teixeira. 2010. Use of galactomannan edible coating applicatuion and storage temperature for prolonging shelf –life of "Regional" cheese.Journal of Food Engineering. 97: 87-94.

Chen, H. and D.G., Hoover. 2003. Bacteriocins and their food applications CRFSFS 2: 82- 100.

Danila, D. and S., Milena. 2010. Antimicrobial agentsof microbial origin: Nisin. Dep.of Food Science, Faculty of Agriculutral Science.University of Foggia, Italy.

Fu, J, Ji,J.; W.,Yana, and J., Shen .2005. Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer by layer assembly of heparin and chitosan .Biomaterials . 26: 6684-6692.

Hammer , A.; H., Detlev; H., Carsten ; K., Rolf ; L., Elke; M., Richard and G.B., Hans . 2003. Solar energy assessment using remote sensing technologies. Remote sensing of Enviornment. 86: 423-432.

Harborne,J.B. 1973. Phytochemical methods.Champman and Hall, London, Champan and Hall, Ltd .pp.49-188.

Harrigan ,W.F., and M.E., McCance . 1976. Laboratory method in food and dairy microbiology.Acadmic press INC.New York.U.S.A.

Hui Li 1 , Rongqi Cui 1 , Lincai Peng 2 , Shengbao Cai 1 , Pan Li 1 and Tianqing Lan 1. 2017. Preparation of Antibacterial Cellulose Paper Using Layer-by-Layer Assembly for Cooked Beef Preservation at Ambient Temperature. Polymers — Open Access Journal of Polymer Science.

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.

Jalilzadeh, A.; Y., Tuncturk and J ., Hesari. 2015. Extension Shelf Life of Cheese: A Review. International Journal of Dairy Science. 10: 44-60.

Medeiros, B. G. d. S. ; A.C., Pinheiro; J.A., Teixeria; A.A., Vicente and M.G., Carneiro-da-Cunha. 2012. Polysacchride /protein micrmultilayer coatings: construction , characterization and evalution of their effect on "Rocha" pear (Pyrus communis L.) shelf –life .Food and Bioprocess Technology. 5: 2435-2445.

Medeiros ,B. G. de S. ; M. P. , Souza; A. C. , Pinheiro; A.I. , Bourbon ; M. A. , Cerqueira; A. A., Vicente and M. G., Carneiro-da-Cunha. 2013. Physical Characterisation of an Alginate/Lysozyme Micr-Laminate Coating and Its Evaluation on ‘Coalho’ Cheese Shelf Life Food and bioprocess technology. 7(4) 1088-1098.

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

SAS. 2012. Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.

Shan, B.; Y.Z., Cai ; J.D. , Brooks and H., Corke . 2007. Antibacterial properties and major bioactive components of Cinnamon stick (cinnamomum burmannii) : activity against foodborne pathogenic bacteria .J.Agri.Food Chem., 55:5484-5490. Sinkowska, A. 2006. Effect of solar radiation on collagen and chitosan films.Journal of Photochemsitry and photobiology B: Biology. 8: 9-15.

Wasikiewicz, J.M.; F., Yoshii ; N., Nagassawa ; R.A., Wach and H., Mitomo . 2005. Degragation of Chitosan and Alginate by gamma radiation ,

sonochemical and ultraviolet methods . Raduation Physics and Chemistry. 73. 287-295

Wu, T. and R., Farnood . 2014. Cellulose fibre networks reinforced with carboxymethyl cellulose/chitosan complex layer-by-layer. Carbohydr. Polym. 114: 500–505.