

الملخص العربي

التخليل الحيوي للبكتريوسين و تطبيقاته في منتجات الألبان

تعتبر بكتيريا حمض اللاكتيك من الميكروبات الهامة في التصنيع لقدرتها على التخمر بالإضافة إلى فوائد她的 الغذائية و الصحية كما أنها آمنة. وقدرة الحفظ لبكتيريا حمض اللاكتيك ترجع إلى نواتج العمليات الإيضية التي لها نشاط مضاد للميكروبات أثناء التخمر اللاكتيكي مما يجعلها مفيدة في الحفظ الحيوي للأغذية. تنتج البكتريوسينات من بعض سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك و التي لها تأثير مضاد لنشاط الميكروبات و خاصة الموجبة لجرام و بعض السالبة لجرام. زيادة استهلاك الزبادي يتطلب بالضرورة إيجاد طرق حفظ تقابل الأمان الميكروبيولوجي و خصائص الجودة في المنتج النهائي، حيث أن ظروف التداول أثناء التخزين وكذلك عمليات التوزيع ربما تؤثر في فترة صلاحية الزبادي.

ولذلك كانت خطة الدراسات حاليا هي عزل و إنتاج البكتريوسينات من بعض سلالات بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من عينات اللبن الخام ثم استخدام البكتريوسينات كمواد حافظة طبيعية في صناعة الزبادي.

وعلى ذلك تم تصميم هذا البحث في ثلاثة أجزاء:

الجزء الأول: عزل و تصنيف بكتيريا حمض اللاكتيك.

تم عزل 140 سلالة من 50 عينة لبن خام تم تجميعها من بعض مزارع ومعامل محلية بمحافظة القليوبية والقاهرة انتخب منها 55 عزلة من بكتيريا حمض اللاكتيك حيث تم تصنيف وتعريف عزلاتها كالتالي: 32 عزلة كانت تنتهي إلى جنس *Lactococcus* (تم تعريفها على النحو الآتي: 19 سلالة وجد أنها تنتهي إلى *Lc. lactis* و 13 سلالة وجد أنها تنتهي إلى *Lc. lactis* subsp. *lactis* بالإضافة إلى 23 عزلة كانت تنتهي إلى جنس *subsp. cremoris*)

وتم تعريفها على النحو الآتي :) 15 سلالة وجد أنها تتنتمي إلى *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* إلى *Lactobacillus acidophilus* .(

الجزء الثاني : إنتاج وخصائص البكتريوسينات.

1- إنتاج البكتريوسينات:

تم اختيار 10 سلالات من الـ 55 عزلة لبكتيريا حامض اللاكتيك على النحو الآتي 3 سلالات من *Lc. lactis* subsp. *laclis* و 2 سلالة من *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* و 3 سلالات من *Lb. delbrueckii* subsp. *cremoris* سلالة من *Lb. acidophilus* حيث اختبرت لإنتاج البكتريوسين على البيئات السائلة المختلفة (بيئة بيرميت اللبن المدعمة MPS و M17 و MRS) والتربيتون ومستخلص الخميرة (TY) وجد أن بيئة MPS المدعمة كانت أفضل البيئات لإنتاج البكتريوسين (650 - 750 وحدة نشاط / مل) بليها بيئة M17 (500-350 وحدة نشاط/مل) و MRS (400-250 وحدة نشاط / مل) و TY (450 وحدة نشاط / مل) على التوالي.

2- خصائص البكتريوسين:

أ- التأثير المثبط لمستخلص البكتريوسينات.

تم دراسة التأثير المثبط للبكتريوسينات المستخلصة من بيئات (TSA) على بعض سلالات البكتيريا الموجبة لجرام *Listeria monocytogenes* و *Bacillus subtilis*) و *Escherichia coli* (و البكتيريا السالبة لجرام *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas fluorescens* و *Salmonella typhimurium* و المنماة على بيئة التربيتون صوياً أجار (TSA).

حيث أشارت النتائج إلى :-

- وجد إن البكتريوسينات المستخلصة من البيئات المختلفة كان لها تأثير مثبط لنمو البكتيريا الموجبة و السالبة لجرام.
- كما وجد إن البكتريوسينات المستخلص من بيئة MPS كان لها أعلى تأثير مثبط على البكتيريا الموجبة و السالبة لجرام ، يليها بيئة M17 ثم MRS و أخيرا TY .
- كما لوحظ أن التأثير المثبط للبكتريوسينات المستخلصة كان مرتفع ضد البكتيريا الموجبة لجرام عن السالبة لجرام.
- لوحظ أن أعلى تأثير مثبط كان للبكتريوسين المستخلص من بيئة MPS لسلالة *Staphylococcus aureus* ضد *Lc. lactis* subsp. *lactis* بينما كان أقل تأثيرا مثبطا للبكتريوسين المستخلص من بيئة *Lb. TY* لسلالة *E. coli* *delbrueckii* subsp. *lactis*

ب- حساسية مستخلصات البكتريوسين للمعاملات الحرارية و الأنزيمات والتخزين.

تم اختيار 4 مستخلصات بكتريوسين (الأربع سلالات مختلفة من بيئة MPS) من الـ 10 مستخلصات السابقين والمنتجين من بكتيريا حامض اللاكتيك والتي أعطت أعلى تأثير مثبط على البكتيريا الموجبة و السالبة لجرام حيث تم دراسة خصائصها الآتية:-

1- حساسية البكتريوسينات للمعاملات الحرارية :

لم تؤدي المعاملات الحرارية لمستخلصات البكتريوسين أي تأثير ملحوظ على ثبات البكتريوسين حتى 80°C / 30 دقيقة ثم لوحظ انخفاض طفيف عند المعاملة الحرارية على 100°C / 30 دقيقة بينما حدث فقد تام في نشاط البكتريوسينات عند المعاملة الحرارية على 121°C / 15 دقيقة .

2- حساسية البكتريوسينات لـ pH :

pH لم يتأثر نشاط مستخلص البكتريوسينات على مدى واسع من الـ (10-12) pH 25 ° م لمنا لوحظ انخفاض تدريجي حتى pH 12 .

3- حساسية البكتريوسينات للإنزيمات (التربيسين و الببسين):

لوحظ عند معاملة البكتريوسينات بالببسين والتربيسين حدوث فقد تام في نشاط البكتريوسينات المستخلصة من *Lactococcus lactis* subsp. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* و *cremoris* No. 56 و *Lactobacillus acidophilus* No. 87 و No. 94 بالمقارنة بالكتنرول الغير معامل ، بينما لم يتأثر نشاط البكتريوسين المستخلص من سلالة *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* No. 8

4- تأثير التخزين على البكتريوسين:

- عند التخزين على 15 ° لم يحدث أي تغير في نشاط مستخلصات البكتريوسين حتى 90 يوم بينما لم يؤدي تخزين مستخلصات البكتريوسين على 5~50 ° م إلى أي تغير ملحوظ في نشاط المستخلصات ثم حدث انخفاض تدريجي حتى 90 يوم من التخزين.

- وأوضحت النتائج أن التخزين على درجة حرارة الغرفة أدى إلى انخفاض تدريجي في نشاط مستخلصات البكتريوسين حتى 60 يوم ثم حدث فقد تام في النشاط عند 90 يوم من التخزين.

- بصفه عامه كان تأثير درجات حرارة التخزين المختلفة أقل على مستخلص *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* No. 8 يليه مستخلص البكتريوسين الناتج من سلالة *Lactococcus lactis* 8

Lactobacillus delbrueckii subsp. subsp. *cremoris* No. 56 ثم *Lactobacillus acidophilus* No. 87 ثم *lactis* No.94 على التوالي.

الجزء الثالث: استخدام البكتريوسينات كمادة حافظة طبيعية في اليogurt. أجريت بعض محاولات لمعرفة انساب تركيز من سلالات البكتيريا المنتجة للبكتريوسين (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454) و (*Lactobacillus acidophilus* JCM 1229) يضاف مع بادئ اليogurt لكي يعطى ~100 وحدة نشاط /مل من نشاط البكتريوسين في اليogurt الطازج. وقد وجد أن أفضل نسبة لكل سلالة (10^6 - 10^7 خلية/مل) هي 1%. ولذلك تم إضافة مستخلصات البكتريوسين وكذلك النسرين بتركيز 100 وحدة نشاط / مل مع بادئ اليogurt.

في هذه الجزء تم دراسة تصنيع اليogurt من اللبن الخام الخليط (3% دهن) والمضاف إليه بادئ اليogurt (Lactobacillus *delbrueckii* *salivarius* subsp. *thermophilus* subsp. *bulgaricus*) مع أضافه البكتريوسينات على النحو التالي :-

$C1 = 2\% \text{ بادئ اليogurt (كتنرول 1).}$

$C2 = 2\% \text{ بادئ اليogurt} + 100 \text{ وحدة نشاط / مل من النسرين (كتنرول 2).}$

$T1 = 1\% \text{ بادئ اليogurt} + \% 1 \text{ Lactococcus lactis subsp. lactis}$ ATCC 11454 المنتجة للبكتريوسين (~ 100 وحدة نشاط / مل).

$T2 = 1\% \text{ بادئ اليogurt} + \% 1 \text{ Lactobacillus acidophilus JCM 1229}$ المنتجة للبكتريوسين (~ 100 وحدة نشاط / مل).

$T3 = 1\% \text{ بادئ اليogurt} + \% 0.5 \text{ Lactococcus lactis subsp. lactis}$ ATCC 11454

المنتجين للبكتريوسين (~ 100 وحدة نشاط / مل).

Lactococcus = 2 % بادئ اليوغرت + مستخلص البكتريوسين لسلالة **T4**

(يحتوى على 100 وحدة نشاط / مل).

Lactobacillus = 2 % بادئ اليوغرت + مستخلص البكتريوسين لسلالة **T5**

(يحتوى على 100 وحدة نشاط / مل).

Lactococcus = 2 % بادئ اليوغرت + مستخلص البكتريوسين لسلالة **T6**

+ *lactis* subsp. *lactis* No. 8 (يحتوى على 50 وحدة نشاط / مل)

) *Lactobacillus acidophilus* No. 87 (مستخلص البكتريوسين لسلالة

يحتوى على 50 وحدة نشاط / مل).

كل المعاملات السابقة تم تحضيرها على 42 °م حتى وصول الـ PH إلى ~

4.6 ثم حفظها في الثلاجة على ~ 5 °م وتم اختبار اليوغرت الناتج بعد التصنيع

وبعد 7 ، 14 ، 21 و 28 يوم من التخزين وكانت النتائج المتحصل عليها كالتالي

-:

1- وجد أن إضافة النيسين أو مستخلصات البكتريوسين أو البكتيريا المنتجة

للبكتريوسين لليوغرت أدي إلى تأخير مدة التجبن بالمقارنة بالكتنرول

(C1).

2- قوة شد الخثرة في اليوغرت الناتج من المعاملات المختلفة كانت متقاربة جدا

مع الكنترول وكانت الفروق غير معنوية بينما أدت المعاملات بالنيسين أو

البكتريوسينات إلى انخفاض كمية الشرش المنفصل وذلك بالمقارنة بالكتنرول

(C1) وكانت الفروق بين المعاملات معنوية .

3- لم توجد فروق معنوية ملحوظة بين يوغرت الكنترول وبقية المعاملات في

الجوامد الكلية والدهن والبروتين والرماد سواء وهي طازجة أو خلال فترة

التخزين .

4- وجد نقص في نسبة الحموضة في اليوغرت الطازج المعامل بالنيسين يليه

اليوغرت المعامل بمستخلصات البكتريوسين ثم اليوغرت المعامل بالبكتيريا

المنتجة للبكتريوسين مقارنة بالكنترول (C1)، وأخذت % للاكتوز اتجاه عكسي لزيادة النسبة المئوية للحموضة في كل المعاملات وكانت الفروق معنوية بين المعاملات.

5- لوحظ اختلافات معنوية في نسبة الأحماض الدهنية الطيارة والاستالدھيد بين المعاملات وكان اليوغورت المعامل بالنسيين أكثر تأثراً بليه اليوغورت المعامل بمستخلصات البكتريوسين ثم اليوغورت المعامل بالبكتيريا المنتجة للبكتريوسين مقارنة بالكنترول ، خلال فترة التخزين و بصفة عامة كان المحتوي من الاستالدھيد في بداية التخزين مرتفع وحدث انخفاض بزيادة مدة التخزين وعلى عكس من ذلك اتجاه T.F.V.A .

6- لوحظ أن معاملة اليوغورت بالنسيين أو البكتريوسينات أدى إلى انخفاض أعداد بكتيريا حامض اللاكتيك و *delbrueckii* subsp. *bulgaricus* أو *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* و *Lb.* خلال فترة التخزين وكان اليوغورت المعامل بالنسيين أكثر تأثير على أعداد البكتيريا بليه اليوغورت المعامل بمستخلصات البكتريوسين وأخيراً اليوغورت المعامل بالسلالات المنتجة للبكتريوسين مقارنة بالكنترول.

- لوحظ ارتفاع أعداد بكتيريا حامض اللاكتيك و *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* حتى اليوم السابع من التخزين ثم حدث انخفاض حتى نهاية فترة التخزين بينما انخفضت أعداد *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* من بداية فترة التخزين حتى نهايتها.

7- حدث زيادة في أعداد بكتيريا *Lb. acidophilus* JCM 1229 في بداية التخزين حتى نهاية الأسبوع الأول بلي ذلك انخفاض في أعدادها حتى نهاية فترة التخزين بينما *Lc. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 حدث لها انخفاض من بداية فترة التخزين حتى نهايتها.

8- لوحظ أن نشاط البكتريوسين يقل من بداية التخزين حتى نهايته في كل المعاملات ماعدا (T3 ، T2) المعاملات المحتوية على سلالة *Lb. acidophilus* JCM 1229 حيث زاد نشاط البكتريوسين حتى نهاية الأسبوع الأول نتيجة لزيادة أعداد هذه السلالة ثم حدث انخفاض بعد ذلك حتى نهاية فترة التخزين وكانت هناك فروق معنوية بين جميع المعاملات.

9- حصل يوغرورت الكنترول على أقل درجات التحكيم الحسى بعد 14 يوم من التخزين نتيجة لزيادة الحموضة (نهاية فترة لتخزين). بينما اخذ اليوغرورت المصنوع بالبكتيريا المنتجة للبكتريوسين نفس الاتجاه يوغرورت الكنترول ولكن بعد 21 يوم من التخزين (نهاية فترة لتخزين). و على الجانب الآخر حصل اليوغرورت المعامل بمستخلص البكتريوسين الناتج من سلالة *Lc. lactis* subsp. *lactis* No. 8 بالنيسين (C2) ثم اليوغرورت المعامل بمستخلص البكتريوسين الناتج من سلالتين *Lb. acidophilus* و *Lc. lactis* subsp. *lactis* No. 87 (T6) وأخيرا اليوغرورت المعامل بمستخلص البكتريوسين الناتج من سلالة *Lb. acidophilus* No. 87 (T5) وذلك بعد 28 يوم من التخزين (نهاية فترة التخزين).

من النتائج السابقة ينصح بإضافة 100 وحدة نشاط / مل من البكتريوسينات وبالأخص مستخلص البكتريوسين الناتج من سلالة *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* إلى لبن اليوغرورت لكي نحصل على يوغرورت له خصائص حسية وريولوجية جيدة مع إطالة مدة حفظ اليوغرورت في الثلاجة حتى 28 يوم .