

الملخص العربي

التخليق الحيوي للبكتريوسين و تطبيقاته في منتجات الألبان

تعتبر بكتريا حمض اللاكتيك من الميكروبات الهامة في التصنيع لقدرتها على التخمر بالإضافة إلى فوائدها الغذائية و الصحية كما أنها آمنة. وقدرة الحفظ لبكتريا حمض اللاكتيك ترجع إلى نواتج العمليات الأيضية التي لها نشاط مضاد للميكروبات أثناء التخمر اللاكتيكي مما يجعلها مفيدة في الحفظ الحيوي للأغذية.

تنتج البكتريوسينات من بعض سلالات بكتريا 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 الدراسة الحالية هي عزل و إنتاج البكتريوسينات من بعض سلالات بكتريا حمض اللاكتيك المعزولة من عينات اللبن الخام ثم استخدام البكتريوسينات كمواد حافظة طبيعية في صناعة الزبادي. وعلى ذلك تم تصميم هذا البحث في ثلاث أجزاء:

الجزء الأول: عزل و تصنيف بكتريا 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 بكتريا حامض اللاكتيك حيث تم تصنيف وتعريف عزلاتها كالأتي: 32 عزلة كانت تنتمي إلى جنس *Lactococcus* (تم تعريفها على النحو الآتي: 19 سلالة وجد انها تنتمي إلى *Lc. lactis* subsp. *lactis* و 13 سلالة وجد انها تنتمي إلى *Lc. lactis* subsp. *cremoris*) بالإضافة إلى 23 عزلة كانت تنتمي إلى جنس

Lactobacillus وتم تعريفها على النحو الاتي : (15 سلالة وجد أنها تنتمي إلى *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis* و 8 سلالات وجد أنها تنتمي إلى *Lb. acidophilus*).

الجزء الثاني : إنتاج وخصائص البكتريوسينات.

1- إنتاج البكتريوسينات:

تم اختيار 10 سلالات من الـ 55 عزلة لبكتريا حامض اللاكتيك علي النحو الآتي 3 سلالات من *Lc. lactis* subsp. *laclis* و 2 سلالة من *Lc. lactis* و 3 سلالات من *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* و 2 سلالة من *Lb. acidophilus* حيث اختبرت لإنتاج البكتريوسين علي البيئات السائلة المختلفة (بيئة بيرميت اللبن المدعمة MPS و M17 و MRS والتربتون ومستخلص الخميرة TY) وجد أن بيئة MPS المدعمة كانت أفضل البيئات لإنتاج البكتريوسين (650 - 750 وحدة نشاط / مل) يليها بيئة M17 (400-550 وحدة نشاط/ مل) و MRS (350-500 وحدة نشاط / مل) و TY (250-450 وحدة نشاط / مل) علي التوالي.

2- خصائص البكتريوسين:

أ - التأثير المثبط لمستخلص البكتريوسينات.

تم دراسة التأثير المثبط للبكتريوسينات المستخلصة من بيئات (MPS و M17 و MRS و TY) علي بعض سلالات البكتريا الموجبة لجرام (*Listeria monocytogenes* و *Bacillus subtilis*) و البكتريا السالبة لجرام (*Escherichia coli*) و (*Staphylococcus aureus*) و (*Salmonella typhimurium* و *Pseudomonas fluorescens*) و النمواة على بيئة التربتون صويا أجار (TSA).

حيث أشارت النتائج إلى :-

- وجد إن البكتريوسينات المستخلصة من البيئات المختلفة كان لها تأثير مثبط لنمو البكتريا الموجبة و السالبة لجرام.
- كما وجد إن البكتريوسينات المستخلص من بيئة MPS كان لها اعلي تأثير مثبط علي البكتريا الموجبة و السالبة لجرام ، يليها بيئة M17 ثم MRS و أخيرا TY .
- كما لوحظ أن التأثير المثبط للبكتريوسينات المستخلصة كان مرتفع ضد البكتريا الموجبة لجرام عن السالبة لجرام.
- لوحظ أن اعلي تأثير مثبط كان للبكتريوسين المستخلص من بيئة MPS لسلالة *Lc . lactis subsp. lactis* ضد *Staphylococcus aureus* بينما كان اقل تأثيرا مثبطا للبكتريوسين المستخلص من بيئة TY لسلالة *Lb. delbrueckii subsp. lactis* ضد *E. coli* .
- ب- حساسية مستخلصات البكتريوسين للمعاملات الحرارية و الـ pH و الأنزيمات والتخزين.

تم اختيار 4 مستخلصات بكتريوسين (لأربع سلالات مختلفة من بيئة MPS) من الـ 10 مستخلصات السابقين والمنتجين من بكتريا حامض اللاكتيك والتي أعطت أعلي تأثير مثبط علي البكتريا الموجبة و السالبة لجرام حيث تم دراسة خصائصها الآتية:-

1- حساسية البكتريوسينات للمعاملات الحرارية :

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

2- حساسية البكتريوسينات لـ pH :

لم يتأثر نشاط مستخلص البكتريوسينات علي مدى واسع من الـ pH (2-6) / 25° م لمدة 24 ساعة بينما لوحظ انخفاض تدريجي حتى pH (10) ثم حدث فقد تام في نشاط البكتريوسينات علي pH (12) .

3- حساسية البكتريوسينات للإنزيمات (الترسين و الببسين):

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

4- تأثير التخزين على البكتريوسين:

- عند التخزين علي - 15° م لم يحدث أي تغير في نشاط مستخلصات البكتريوسين حتى 90 يوم بينما لم يؤدي تخزين مستخلصات البكتريوسين علي 5° م / 30 يوم إلي أي تغير ملحوظ في نشاط المستخلصات ثم حدث انخفاض تدريجي حتى 90 يوم من التخزين.

- و أوضحت النتائج أن التخزين علي درجة حرارة الغرفة أدى إلي 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 اقل علي مستخلص البكتريوسين الناتج من سلالة *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* No. 8 يليه مستخلص البكتريوسين الناتج من سلالة *Lactococcus lactis*

Lactobacillus delbrueckii subsp. ثم *subsp. cremoris* No. 56

Lactobacillus acidophilus No. 87 ثم *lactis* No.94 علي التوالي.

الجزء الثالث: استخدام البكتريوسينات كمادة حافظة طبيعية في اليوغورت.

أجريت بعض محاولات لمعرفة انسب تركيز من سلالات البكتريا المنتجة للبكتريوسين (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454) و *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229 يضاف مع بادئ اليوغورت لكي يعطى ~100 وحدة نشاط /مل من نشاط البكتريوسين في اليوغورت الطازج. وقد وجد أن أفضل نسبة لكل سلالة ($10^6 - 10^7$ خلية/مل) هي 1%. ولذلك تم إضافة مستخلصات البكتريوسين وكذلك النسين بتركيز 100 وحدة نشاط / مل مع بادئ اليوغورت.

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

C1 = 2 % بادئ اليوغورت (كنترول 1).

C2 = 2 % بادئ اليوغورت + 100 وحدة نشاط / مل من النيسين (كنترول 2).

T1 = 1 % بادئ اليوغورت + 1 % *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 المنتجة للبكتريوسين (~ 100 وحدة نشاط / مل).

T2 = 1 % بادئ اليوغورت + 1 % *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229 المنتجة للبكتريوسين (~ 100 وحدة نشاط / مل).

T3 = 1 % بادئ اليوغورت + 0.5 % *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 + 0.5 % *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229 المنتجين للبكتريوسين (~ 100 وحدة نشاط / مل).

T4 = 2 ٪ بادئ اليوغورت + مستخلص البكتريوسين لسلالة *Lactococcus*

lactis subsp. lactis No.8 (يحتوى على 100 وحدة نشاط / مل).

T5 = 2 ٪ بادئ اليوغورت + مستخلص البكتريوسين لسلالة *Lactobacillus*

acidophilus No.87 (يحتوى على 100 وحدة نشاط / مل).

T6 = 2 ٪ بادئ اليوغورت + مستخلص البكتريوسين لسلالة *Lactococcus*

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

مستخلص البكتريوسين لسلالة *Lactobacillus acidophilus* No. 87)

يحتوى على 50 وحدة نشاط / مل).

كل المعاملات السابقة تم تحصينها علي 42 °م حتى وصول الـ PH إلي ~

4.6 ثم حفظها في الثلاجة علي ~ 5 °م وتم اختبار اليوغورت الناتج بعد التصنيع

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

:-

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

للـبكتريوسين لليوغورت أدى إلى تأخير مدة التجبن بالمقارنة بالـكنترول

(C1).

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

مع الكنترول وكانت الفروق غير معنوية بينما أدت المعاملات بالنيسين أو

البكتريوسينات إلي انخفاض كمية الشرش المنفصل وذلك بالمقارنة بالـكنترول

(C1) وكانت الفروق بين المعاملات معنوية .

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

الجوامد الكلية والدهن والبروتين والرماد سواء وهي طازجة أو خلال فترة

التخزين .

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

اليوغورت المعامل بمستخلصات البكتريوسين ثم اليوغورت المعامل بالبكتريا

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

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

6- لوحظ أن معاملة اليوغورت بالنيسين أو البكتريوسينات أدى إلى انخفاض أعداد بكتريا حامض اللاكتيك و *delbrueckii* subsp. *bulgaricus* و *Lb. delbrueckii* subsp. *thermophilus* في اليوغورت الطازج وخلال فترة التخزين وكان اليوغورت المعامل بالنيسين أكثر تأثير علي أعداد البكتريا يليه اليوغورت المعامل بمستخلصات البكتريوسين وأخيرا اليوغورت المعامل بالسلالات المنتجة للبكتريوسين مقارنة بالكنترول.

- لوحظ ارتفاع أعداد بكتريا 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 بكتريا *Lb. acidophilus* JCM 1229 في بداية التخزين حتى نهاية الأسبوع الأول يلي 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 (T2 ، T3) المعاملات المحتوية علي 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 يوغورت الكنترول على اقل درجات التحكيم الحسى بعد 14 يوم من تخزين نتيجة لزيادة الحموضة (نهاية فترة لتخزين). بينما اخذ اليوغورت المصنع بالبكتريا المنتجة للبكتريوسين نفس الاتجاه يوغورت الكنترول ولكن بعد 21 يوم من التخزين (نهاية فترة لتخزين). و على الجانب الاخر حصل اليوغورت المعامل بمستخلص البكتريوسين الناتج من سلالة *Lc. lactis* subsp. *lactis* No. 8 (T4) علي اعلي الدرجات يليه اليوغورت المعامل بالنيسين (C2) ثم اليوغورت المعامل بمستخلص البكتريوسين الناتج من السلالتين *Lb. acidophilus* و *Lc. lactis* subsp. *lactis* No. 8 (T6)No.87 وأخيرا اليوغورت 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* إلي لبن اليوغورت لكي نحصل على يوغورت له خصائص حسية وريولوجية جيدة مع إطالة مدة حفظ اليوغورت في الثلاجة حتى 28 يوم .