



وزارة التعليم العالي

جامعة دمشق

كلية الزراعة

قسم علوم الأغذية

إنتاج ثنائي الأسثيل ميكروبياً واستخدامه في تصنيع

بعض منتجات الألبان

Microbial Production of Diacetyl and Use It in The Manufacture of Some Dairy Products

رسالة أُعدَّت لنيل درجة الدكتوراه في علوم الأغذية

إعداد

م . سميرة سليم القطامي

المشرف المشارك

أ. د. صدام يازجي

أستاذ في قسم علوم الأغذية

المشرف العلمي

أ. د. صدام أبو غرة

أستاذ في قسم علوم الأغذية

دمشق 2020م



Ministry of Higher Education

Damascus University

College of Agriculture

Department of Food Science

Microbial Production of Diacetyl and Use It in The Manufacture of Some Dairy Products

A THESIS

Submitted in partial fulfillment of the requirements for the
Ph. D. Degree of Food Science
Section

Prepared by

Samira Salim Al- Kotami

Supervision

Chairman

Dr. Sayah Abou Ghorra

Prof. in Food Science
Faculty of Agriculture
Damascus University

Co-Supervisor

Dr. Sabah Yuzaji

Prof. in Food Science
Faculty of Agriculture
Damascus University

Damascus 2020

تصريح

**أُصرم بأنّ هذا البحث بعنوان: " إنتاج ثنائي الأستيل ميكروبياً
واستخدامه في تصنيع بعض منتجات الألبان " لم يسبق أن قُبِلَ
للحصول على أية شهادة وليس مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.**

المرشحة

سميرة سليم القطامي

DECLARATION

I hereby declare that research entitled: " Microbial Production of Diacetyl and Use It in The Manufacture of Some Dairy Products" has not been accepted for any degree yet, nor submitted concurrently to any other degree.

Candidate

Samira Salim Al- Kotami

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة هو نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة سميرة سليم القطامي بإشراف الدكتور صباح أبو غرة الأستاذ في قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة بجامعة دمشق، والدكتورة صباح يازجي الأستاذ في قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة بجامعة دمشق. وإنّ أية مراجع أخرى ذكرت في هذا العمل موثقة في نص هذه الرسالة.

المشرف المشارك

أ. د. صباح يازجي

المشرف الرئيس

أ. د. صباح أبو غرة

المرشحة

سميرة القطامي

CERTIFICATE

We hereby certify that this work is a result of a scientific research, conducted by the candidate Samira Salim Al- Kotami, under supervision of Dr. Sayah Abou Ghorra, Professor in Food Science department, Faculty of Agriculture, Damascus University, and Dr. Sabah Yuzaji Professor in Food Science department, Faculty of Agriculture, Damascus University. Any other references have been mentioned in this work are documented in the text of the thesis.

Candidate

Samira Al-kotami

Supervisor

Prof. Sayah Abou Ghorra

Co-Supervisor

Prof. Sabah Yaziji

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الدكتوراه في قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة، بجامعة دمشق.

This Thesis has been submitted as a partial fulfillment of the requirements for Ph D Degree in Food Science Department, Faculty of Agriculture, Damascus University.

نوقشت هذه الرسالة بتاريخ 24 / 9 / 2020 م

لجنة الحكم على الرسالة:

الأستاذ الدكتور صياح أبو غرة (مشفراً علمياً)

الأستاذ الدكتور عبد الوهاب مرعي (عضواً)

الأستاذ الدكتور محمد المصري (عضواً)

الأستاذ الدكتور أنور الحاج علي (عضواً)

الأستاذ الدكتور أنطون طيفور (عضواً)

كلمة شكر

في غمرة بحثنا تلوح طيور النورس في الأفق وتستعد الموجة لتستريح على شاطئ الأمل بعد عناء السفر لكنها تبقى تواقّة لذلك البحر الذي طالما حملها في طياته طويلاً وتظل محدقة فيه بجفنين يفيضان حباً وعرفاناً بالجميل، فالشكر كل الشكر والتقدير للأستاذ الدكتور صباح أبو غرة والأستاذة الدكتورة صباح يازجي اللذين أنارا أمامي كل الدروب المظلمة وأعطيانني من العلم والوقت أقصى ما لديهما ليكونا المثال المشرق للعطاء العلمي اللامحدود. كما أتوجه بالشكر لعمادة كلية الزراعة ولرئيس قسم علوم الأغذية الأستاذ الدكتور أحمد هداي ولجميع أعضاء الهيئة التدريسية والمخبرية في قسم علوم الأغذية وأخص بالشكر الأستاذ الدكتور جهاد سمعان الذي ساعدني في إتمام الدراسة الإحصائية بكل نبل وتواضع.

وبفيض من الحب والتقدير أتوجه بجزيل الشكر والامتنان لأعضاء لجنة التحكيم تقديراً لجهودهم الكبيرة التي بذلوها في قراءة وتقييم هذه الأطروحة حتى وصلت إلى هذا المستوى.

كما تقف الكلمات عاجزة عن شكر أيادي بيضاء خيرة كان لها الفضل الكبير في إتمام هذا البحث، فالشكر كل الشكر للهيئة العامة للتقانة الحيوية وأخص بالشكر مخبر الصناعات الغذائية والأستاذ الدكتور بسام العقلة لن أنسى وقفك إلى جانبي فقد كنت أخ حقيقي لي.

وفي النهاية أهدي هذا النجاح إلى العيون التي ترقبت نجاحي بلهفة، مصدر قوتي وفخري أهلي وعائلي الغالية (زوجي وأولادي).

الفهرس

i		Declaration تصريح
ii		Certificate شهادة
iv		كلمة شكر
v		الفهرس
viii		قائمة الجداول
ix		قائمة الأشكال
ix		قائمة المخططات
x		قائمة الاختصارات
xi		الملخص العربي
1		1- المقدمة Introduction
4		1-1- أهمية البحث وأهدافه
6		2- الدراسة المرجعية Literature review
7		1-2- مركبات النكهة Flavor Compound
8		2-2- ثنائي الأسيتيل Diacetyl
8		2-2-1- تعريف ثنائي الأسيتيل
10		2-2-2- إنتاج ثنائي الأسيتيل
13		2-2-3- دور بكتريا حمض اللبن في إنتاج ثنائي الأسيتيل
17		2-2-4- العوامل المؤثرة في إنتاج ثنائي الأسيتيل من قبل بكتريا حمض اللبن
18		2-2-4-1- تأثير درجة الحرارة
20		2-2-4-2- تأثير درجة الحموضة
21		2-2-4-3- تأثير تركيز سكر الجلوكوز
23		2-2-4-4- تأثير تركيز السترات
25		2-2-5- الغريلة
25		2-2-6- التحسين الوراثي لإنتاج ثنائي الأسيتيل باستخدام التطفير
28		2-2-7- فصل وتنقية وتقدير ثنائي الأسيتيل باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء
		HPLC
30		2-3- الزبدة وأنواعها Butter

32	2-3-1- تركيب الزبدة وقيمتها الغذائية
35	2-3-2 طرائق صناعة الزبدة
42	2-3-3 تدعيم نكهة الزبدة باستخدام بادئات من بكتريا حمض اللبن
42	2-3-3-1 أنواع بكتريا حمض اللبن
44	2-3-3-2 تصنيف بكتريا حمض اللبن
47	2-3-3-3 إنتاج مزارع البادئ
49	2-3-3-4 إنتاج الزبدة المسواة بإضافة بكتريا حمض اللبن كبادئ
53	2-3-4 الأهمية الاقتصادية للزبدة والاستعمالات المختلفة
55	3- مواد البحث وطرائقه Materials and Methods
56	3-1- الأجهزة والمواد المستخدمة في الدراسة
56	3-1-1- الأجهزة المستخدمة
58	3-1-2- المواد الكيميائية المستخدمة
58	3-1-3- الأوساط الزرعية المستخدمة
58	3-1-3-1- وسط حليب معقم منزوع الدسم Skim Milk Powder
58	3-1-3-2- وسط M17 السائل M17 Broth
58	3-1-3-3- وسط M17 آغار M17 Agar
58	3-1-3-4- وسط MRS السائل MRS Broth
59	3-2- طرائق العمل
59	3-2-1- تنشيط عزلات بكتريا حمض اللبن
60	3-2-2- تقدير ثنائي الأستيل
63	3-2-3- دراسة بعض الظروف المثلى لإنتاج ثنائي الأستيل باستخدام التصميم الاحصائي RSM
65	3-2-4- تطهير بكتريا حمض اللبن باستخدام الأشعة فوق البنفسجية
65	3-2-5- تنقية ثنائي الأستيل من بكتريا حمض اللبن المطفأة
65	3-2-5-1- المحاليل المستخدمة في عملية التنقية
66	3-2-5-2- مراحل تنقية ثنائي الأستيل
66	3-2-5-2-1- الترسيب بأملاح كبريتات الأمونيوم
66	3-2-5-2-2- التنقية باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بوساطة عمود Dowex 1-x8
69	3-2-5-2-3- تقدير تركيز ثنائي الأستيل باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة

	عالية الأداء (HPLC)
70	3-2-6- التحليل الإحصائي
71	3-2-7- تصنيع الزبدة باستخدام البادئات المنتخبة
71	3-2-7-1- خطوات تصنيع الزبدة.
75	3-2-7-2- التحاليل الكيميائية للعينات المصنّعة.
77	3-2-7-3- التقييم الحسي
78	3-2-7-4- التحليل الإحصائي
79	4- النتائج والمناقشة Results and Discussion
80	4-1- نتائج اختبار قدرة عزلات بكتيريا حمض اللبن على إنتاج ثنائي الأستيل
85	4-2- نتائج دراسة بعض الظروف المثلى لإنتاج ثنائي الأستيل باستخدام التصميم الاحصائي RSM
87	4-2-1- تحليل التجربة
91	4-2-2- أمثلة ظروف إنتاج ثنائي الأستيل
91	4-2-2-1- تأثير درجة الحرارة في إنتاج ثنائي الأستيل.
92	4-2-2-2- تأثير درجة الحموضة pH في إنتاج ثنائي الأستيل.
92	4-2-2-3- تأثير تركيز السترات في إنتاج ثنائي الأستيل.
93	4-2-2-4- تأثير تركيز سكر الجلوكوز في إنتاج ثنائي الأستيل.
94	4-3- نتائج تطهير بكتريا <i>L. lactis ssp lactis</i> باستخدام الأشعة فوق البنفسجية
97	4-4- فصل وتقدير ثنائي الأستيل باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC.
100	4-5- نتائج تدعيم نكهة الزبدة بالبادئات المنتخبة ومقارنتها مع ثنائي الأستيل التجاري
101	4-5-1- نتائج دراسة التركيب الكيميائي لعينات الزبدة المصنعة
105	4-5-2- نتائج التقييم الحسي للزبدة المصنّعة
108	5- الاستنتاجات Conclusion
109	6- التوصيات Recommendations
110	7- المراجع References
133	الملخص الإنكليزي

قائمة الجداول

رقم الصفحة	عنوان الجدول	رقم الجدول
34	التركيب الغذائي للزبدة	1
39	اهمية الدورات الحرارية للإنضاج الفيزيائي	2
46	تصنيف مزارع البادئات وفقاً لدرجات حرارة النمو المفضلة	3
57	أهم الأجهزة المستخدمة في تنفيذ البحث	4
63	المتغيرات المدروسة ومستوياتها	5
64	التصميم الإحصائي للتجربة	6
78	نموذج تقييم الصفات الحسية لعينات الزبدة المصنّعة	7
80	أنواع بكتريا حمض اللبن المعزولة	8
81	متوسطات كمية ثنائي الأستيل المنتجة من قبل عزلات بكتيريا حمض اللبن	9
85	تحليل التباين لتأثير جنس البكتيريا ونوع العزلة في كمية ثنائي الأستيل المنتجة من قبل بكتيريا حمض اللبن المعزولة	10
86	تأثير المتغيرات المدروسة /درجة حرارة التحضين، درجة حموضة الوسط (pH)، تركيز السترات وتركيز سكر الجلوكوز/ في إنتاج ثنائي الأستيل من قبل <i>L. lactis ssp lactis</i>	11
89	التحليل الإحصائي لتأثير المتغيرات المدروسة في إنتاج ثنائي الأستيل من <i>L. lactis ssp lactis</i>	12
90	تحليل التباين للمتغيرات المدروسة التي تؤثر في فعالية إنتاج ثنائي الأستيل	13
94	معدل البقاء لبكتريا حمض اللبن <i>L. lactis ssp lactis</i> بعد تعريضها للأشعة فوق البنفسجية	14
96	كمية ثنائي الأستيل الناتجة عن تعريض بكتريا حمض اللبن لأشعة الـ UV (ملغ/ل)	15
98	تقدير كمية ثنائي الأستيل من البكتريا المطهرة A6 باستخدام HPLC	16
100	البادئات المستخدمة في انتاج الزبدة والسلالات المكونة لها ونسبها	17
101	تقدير ثنائي الأستيل في القشدة المعدة لتصنيع الزبدة	18
102	تقدير الدهن، الرطوبة، الحموضة وثنائي الأستيل في عينات الزبدة المصنّعة	19
106	نتائج التقييم الحسي لعينات الزبدة المصنّعة	20

قائمة الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
1	المنحنى القياسي لتقدير ثنائي الأستيل	61
2	مراحل تقدير ثنائي الأستيل في العزلات البكتيرية المنشطة	62
3	عمود التنقية	68
4	البلورات الملحية المتشكلة من ثنائي الأستيل	68
5	مراحل تصنيع الزبدة	73
6	متوسطات كمية ثنائي الأستيل (ملغ/ل) المنتجة من أربعة أجناس من بكتيريا حمض اللبن المعزولة	84
7	الظروف المثلى لإنتاج ثنائي الأستيل من <i>L. lactis ssp lactis</i> بواسطة البرنامج الإحصائي RSM	93
8	الزمن اللوغاريتمي للقتل	95

قائمة المخططات

رقم المخطط	عنوان المخطط	رقم الصفحة
1	المسار البيوكيميائي لإنتاج ثنائي الأستيل	12
2	خطوات صناعة الزبدة المبسترة	37
3	الخصائص الأساسية المميزة بين بعض أجناس بكتيريا حمض اللبن	45
4	كروماتوغراف المركب القياسي لثنائي الأستيل بجهاز HPLC	99
5	كروماتوغراف ثنائي الأستيل الناتج من البكتيريا المطفّرة <i>L. lactis ssp lactis</i> وذلك بعد تنقيته بجهاز HPLC	99

قائمة الاختصارات

GRAS	Generally Recognized As Safe
α - acetolactate	Alfa- acetolactate
Ldh	lactate dehydrogenase
Als	α - acetolactate synthase
LAB	Lactic Acid Bacteria
<i>NSLAB</i>	<i>Non Starter Lactic Acid Bacteria</i>
<i>SLAB</i>	<i>Starter Lactic Acid Bacteria</i>
UV	Ultra Violet
CFU	Colony Forming Unit
CitP	Citrate permease
NTG	N-methyl-N-nitrose-N-Nitro-guanidine
RSM	Response Surface Methodology
HPLC	High LiquidChromatography
GLC	Gas-liquid chromatography
FID	Flame-ionization detector
FAO	Food and Agriculture Organization
WHO	World Health Organization
pH	Potential Hydrogen
API	Analytical Profile Index
PVC	Poly Vinyl Chloride

الملخص

اختبرت قدرة 36 عزلة من بكتريا حمض اللبن معزولة مسبقاً من مصادر غذائية محلية مختلفة على إنتاج ثنائي الأستيل. شخّصت العزلات إلى الأجناس التالية: جنس *Enterococcus* (21عزلة) وكانت الأنواع السائدة منه *E. faecium*، *E. faecalis* و *E. durum*، جنس *Lactobacillus* (10عزلات) وكانت الأنواع السائدة منه *Lb. plantarum*، *Lb. acidophilus* و *Lb. casei*، *Lb. bulgaricus*، *Lb. paracasi*، جنس *Lactococcus* (3عزلات) تمثّلت بالنوع *L. Lactis* و(عزلتان) تنتمي إلى الجنس *Leuconostoc* تمثّلت بالنوع *Leuco. citrovorum*. تميزت جميع العزلات بقدرتها على إنتاج ثنائي الأستيل بكفاءات مختلفة حيث تفوقت العزلة *L. lactis ssp lactis* بكمية ثنائي الأستيل المنتجة إذ بلغت 65.39 ملغ/ل مقارنة ببقية العزلات الأخرى. عُيّنَت الظروف المثلى لإنتاج ثنائي الأستيل المنتج من بكتريا حمض اللبن *L. lactis ssp lactis* باستخدام البرنامج الإحصائي (RSM). أظهرت النتائج بأن كمية إنتاج ثنائي الأستيل كانت في حدها الأقصى بقيمة 85.60 ملغ/ل عند درجة حرارة 37°م ودرجة الحموضة (pH) 5.5 وتركيز السترات 6 غ/ل وتركيز سكر الغلوكوز 15 غ/ل. وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود ارتباط معنوي لكل من درجة الحرارة ودرجة الحموضة وتركيز السترات عند مستوى ثقة 5%. أجريت على العزلة المتفوقة بالإنتاج عملية تطهير باستخدام الأشعة فوق البنفسجية UV (254 نانو متر) على مسافة 15 سم من الأطباق، فتفوقت الطفرة في الزمن 2 على باقي الطفرات بكمية إنتاج بلغت 162.85 ملغ/ل وأعطيت الرمز A6 حيث أعطت كمية من ثنائي الأستيل أعلى من إنتاجية البكتريا الأصلية بمقدار 2.50 مرة. نقيّ ثنائي الأستيل المنتج من البكتريا المطفرة (*L. lactis ssp lactis* (A6) باستخدام عمود التنقية الزجاجي (Dowex 1-X8) وتمّ

الكشف عن ناتج التتقية باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) على طول موجة 245 نانومتر. استخدمت سلالات مختلفة من الأنواع البكتيرية والتي أعطت أعلى مستويات من ثنائي الأستيل وذلك لقدرتها على إنتاج نكهة الزبدة الجيدة، إضافة إلى قدرتها على إنتاج حمض اللبن وتخمير اللاكتوز منها: *L. lactis ssp lactis*، *Lb. bulgaricus*، *Lb. acidophilus*، *Leuco. citrovorum* و *Lb. Casei*. في تكوين نوعين من البادئات لتصنيع الزبدة، بالمقابل صُنعت عينة ثالثة من الزبدة بإضافة ثنائي الأستيل التجاري بنسبة 1 ملغ/كغ. أجري على العينات المصنّعة تقييم حسي شمل المظهر الخارجي /اللون، الشوائب/، الطعم، الرائحة والقوام. وجد المقومون أنّ أفضل العينات قبولاً تلك المصنّعة من بادئ مكوّن من *L. lactis ssp lactis*، *Lb. bulgaricus*، *Lb. acidophilus* وبدرجة أقل العينات المصنّعة باستخدام البادئات *Leuco. citrovorum*، *Lb. bulgaricus* و *Lb. casei*، في حين تم قبول بدرجة أقل العينات المصنّعة بإضافة ثنائي الأستيل التجاري بنسبة (1 ملغ/كغ).

الكلمات المفتاحية:

بكتيريا حمض اللبن، مركبات النكهة، ثنائي الأستيل، الزبدة.

الفصل الأول

المقدمة والأهداف

INTRODUCTION & AIMS

1- المقدمة: Introduction

يُعد الطعم والرائحة من السمات المهمة جداً لمنتجات الألبان المتخمرة، كما يعتمد اختيار المستهلكين لمنتجاتهم الغذائية بشكل أساسي على خصائص النكهة. إضافة إلى أهمية تطوير تقنيات البادئات التي تؤدي إلى التطور السريع والمستمر لأنواع منتجات الألبان المتخمرة ذات النكهات المميزة المحددة، من خلال سلسلة من العمليات البيوكيميائية، واستعادة الخصائص الفريدة لأصناف الألبان التقليدية، وتقييم سلالات بكتيريا حمض اللبن المعزولة من مصادر عدة من منتجات الألبان.

تُعرف النكهة أنَّها الانطباع الحسي للأغذية أو المواد الأخرى، ويتم تحديدها في المقام الأول عن طريق الحواس الكيميائية للطعم والرائحة التي تُعد ظواهر معقدة في حد ذاتها، وتفاعلها مع الخصائص الحسية الأخرى يزيد من تعقيد الإدراك البشري. علاوة على ذلك، هناك عوامل أخرى، على سبيل المثال، مصادر الحليب والدهون التي تؤثر أيضاً على خصائص النكهة وتتفاعل معها. لا يُعرف الكثير عن مركبات النكهة، ولكن من الواضح أنَّ نواتج استقلاب اللاكتوز وحمض الستريك (حمض اللبن، ثنائي الأسيتيل، وغيرها)، بالإضافة إلى الكازئين (الببتيدات والأحماض الأمينية)، و الليبيدات (الأحماض الدهنية الحرة) ضرورية لتعزيز النكهة. أولاً يتم تحويل اللاكتوز إلى لاكتات ثم يتم تحويل جزء من البيروفات الوسيطة إلى مركبات نكهة مختلفة مثل ثنائي الأسيتيل، أسيتوين، أسيتيل الدهيد. يجب أن يكون هناك توازن كاف بين مختلف مركبات النكهة، حيث تستخدم الاختلافات فيما بينها بالتصنيف الذي يعتمد ليس فقط على الخصائص الفيزيائية أو الخصائص الحسية للمركبات وإنما أيضاً على التركيب الكيميائي للمركبة.

يساهم ثنائي الأستيل وهو من أهم مركبات النكهة في منتجات الألبان المتخمرة، في إعطاء النكهة المميزة وهو ضروري بتركيز منخفضة في العديد من منتجات الألبان، مثل الزبدة واللبن والجبن الطازج. كما أنه يعتبر من أهم مركبات النكهة في عملية التخمير وفي صناعة النبيذ، حيث يُعد ثنائي الأستيل ناتج ثانوي للتخمير بواسطة العديد من الكائنات الحية الدقيقة.

هناك أنواع محددة من بكتيريا حمض اللبن تمتلك قدرة عالية على إنتاج ثنائي الأستيل أهمها بعض أنواع *Leuconostoc spp.* وسلالات محددة من *Lactococcus. lactis spp.* بشكل خاص *L. lactis biovar diacetylactis*. بسبب توازن عمليات الأكسدة والاختزال، يتم تحويل السكريات عبر البيروفات إلى حمض اللبن، في حين يتم تحويل حمض الستريك الركيزة الأكثر أكسدة إلى أسيتولاكتات وبعد ذلك إلى الأستوين وثنائي الأستيل.

يمكن حالياً تحديد مزارع البادئات ذات الخصائص المرغوب فيها وتطبيقها لضمان تقليل وقت المعالجة ورفع جودة المنتج النهائية. إذ أن الاعتماد فقط على التخمير الطبيعي هو عائق رئيسي للمعالجة التجارية واسعة النطاق للمنتجات المتخمرة التقليدية، ويرجع ذلك بشكل رئيسي إلى أن التخمير الطبيعي مرتبط بالتغيرات في جودة المنتج وسلامته. ومع ذلك، يتطلب اختيار مزارع البادئات المناسبة فهم التنوع الميكروبي للمنتجات والأدوار التي تلعبها كائنات محددة أهمها بكتيريا حمض اللبن. لذلك تسعى الشركات التجارية حالياً للحصول على مزيد من التحكم في عملية تشكل النكهة التي تنفذها بكتيريا حمض اللبن، وذلك بهدف توسيع خيارات الابتكار في منتجات الألبان المتخمرة. ومن هنا تكمن أهمية استخدام البادئات وتلقيح الحليب بها للوصول للمنتج النهائي بجودة عالية ومواصفات ثابتة، إلا أن هذه البادئات لا تحضر محلياً لذا يتم

استيرادها من الخارج وبالقسط الأجنبي فهي مكلفة. ومن هنا أصبح من الضروري المحافظة على الأصول الوراثية للبكتيريا المحلية والتي تمتلك صفات هامة.

1-1- أهمية البحث وأهدافه:

نظراً لأهمية مركبات النكهة كونها إضافات لا يمكن الاستغناء عنها في الصناعات الغذائية، وأهمية ثنائي الأستيل بشكل خاص في مجال التصنيع الغذائي، ولضرورة تعزيز البحث عن استراتيجيات بديلة لإنتاج هذا المركب عن طريق الاصطناع الحيوي بواسطة الأحياء الدقيقة، بسبب عدم وجود دراسات في القطر العربي السوري تتعلق بذلك. فقد اتجهت الدراسة الحالية نحو تحقيق الأهداف التالية:

1- تحديد قدرة السلالات المحلية من بكتيريا حمض اللبن المعزولة (مسبقاً) من منتجات لبنية متعددة (جبنة عكاوي، جبنة بلدي، لبننة، حليب بقرى والقشدة) على إنتاج ثنائي الأستيل، وانتخاب السلالة الأفضل و الأكثر كفاءة.

2- أمثلة ظروف النمو لإنتاج ثنائي الأستيل (درجة الحرارة - درجة الحموضة- تركيز السترات و تركيز سكر الغلوكوز) باستخدام التصميم الإحصائي RSM.

3- التحسين الوراثي لبكتيريا حمض اللبن، بهدف زيادة إنتاج ثنائي الأستيل بواسطة التطعيم الوراثي العشوائي باستخدام الأشعة فوق البنفسجية (UV).

4- إجراء عملية فصل وتنقية ثنائي الأستيل وتقدير تركيزه بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC).

5- تدعيم نكهة الزبدة بطريقتين:

✓ إضافة بادئ مكون من سلالات بكتيريا حمض اللبن منتخبة إلى القشدة المعدة لتصنيع الزبدة.

✓ استخدام ثنائي الأستيل تجاري عند تصنيع الزبدة، ومن ثمَّ المقارنة بين العينات المصنَّعة.

6- تقييم حسي للمنتجات المصنَّعة.

الفصل الثاني
الدراسة المرجعية

LITERATURE REVIEW

2 - الدراسة المرجعية Literature Review:

2-1 - مركبات النكهة Flavor Compound:

تُعرّف النكهة أنّها احساس معقد يضم الرائحة والطعم والذوق. كما تعتبر مركبات النكهة ذات أهمية كبيرة، حيث تتميز منتجات الألبان المتخمرة بخصائص نكهة مختلفة تؤدي إلى التمييز بين كل نوع على حدة (Smit وزملاؤه، 2005). وتعد أيضاً من أكثر المنتجات المستخدمة على نطاق واسع في الصناعات الغذائية، حيث يمكن الحصول عليها إما عن طريق الاصطناع الكيميائي، وبالتالي تسمى النكهات الاصطناعية. أو عن طريق التخمير عندئذ تسمى النكهات الطبيعية، التي تعد مرغوبة بشكل أكبر من قبل المستهلك، وبالتالي زيادة الطلب في الحصول عليها (Tomasini -Campocoso وزملاؤه، 1996).

تضم المركبات المسؤولة عن النكهة مجموعات مختلفة من ضمنها الفئات الكيميائية مثل الكحول، الألديدات، الكيتونات، الأحماض الدهنية والسترات (Engels و Visser، 1994؛ Mishra و Routray، 2011)، بالإضافة إلى ذلك، كما هو الحال مع طبيعتها الكيميائية، تعد نواتج التحلل البيولوجية من مركبات النكهة هذه متنوعة، إذ توفر المكونات الثلاثة الرئيسية للمواد الغذائية أي البروتينات، الكربوهيدرات والدهون السلائف لتحويلها إلى مركبات نكهة، لذلك فإنّ نواتج استقلاب اللاكتوز وحمض الستريك (حمض اللبن، ثنائي الأسيتيل وغيرها)، بالإضافة إلى الكازئين (الببتيدات والأحماض الأمينية)، والليبيدات (الأحماض الدهنية الحرة) تعد ضرورية لتعزيز النكهة (Smit وزملاؤه، 2005؛ Bintsis، 2018a).

يعتمد الطعم المميز والنكهة في منتجات الألبان المتخمرة مثل اللبن الرائب والزبدة على تراكيز مكونات النكهة مثل الأسيت ألدهيد، ثنائي الأسيتيل والأستوين التي تنتجها بكتيريا حمض اللبن (Cheng، 2010)، كما تعتبر البكتيريا المنتجة للنكهة هي المسؤولة عن تخمر السترات إلى ثنائي الأسيتيل، الذي يعطي طعم مميز ونكهة الزبدة حتى بتراكيز منخفضة جداً (1-2 ملغ/ل)، إلا أنَّ ثنائي الأسيتيل يتحول عند وجود diacetyl reductase إلى أسيتوين مما يقلل محتوى ثنائي الأسيتيل وبالتالي خسارة كبيرة في الحصول على النكهة المرغوبة (Bakirci وزملاؤه، 2002). وبالتالي يجب أن يكون هناك توازن كاف بين مختلف مركبات النكهة، حيث يسبب تشكل حمض اللبن الطعم الحامضي المرغوب، والذي يمكن ملاحظته بشكل خاص في الجبن الطازج، في حين وجود فائض من حمض اللبن يجعل الجبن حامضي إضافة إلى تأثيره غير المباشر على قوام الجبن (Bosset وGauch، 1993).

2-2- ثنائي الأسيتيل Diacetyl:

2-2-1- تعريف ثنائي الاستيل:

يُعد ثنائي الأسيتيل منتج ذو نوعية جيدة، ويتميز كونه من مركبات النكهة (GRAS)، استناداً إلى قرون من التعرض البشري لثنائي الأسيتيل في الأطعمة المتخمرة، دون أي مخاوف صحية واضحة. كما أنه يساهم في نكهة العديد من الأطعمة المتخمرة (Oliver و Birkenhauer، 2003). إلا أنَّه في الوقت الحالي، لا يتم قبول ثنائي الأسيتيل الذي يتم إنتاجه بشكل أساسي بالطرائق الكيميائية كمواد مضافة للغذاء من قبل معظم البلدان، وذلك لأسباب تتعلق بالسلامة مقارنة بطرائق التحويل المحلية والبيولوجية (Monnet وزملاؤه، 1994).

يتصف ثنائي الأستيل بأنه مركب رباعي الكربون، صيغته الكيميائية $\text{CH}_3\text{COCOCH}_3$ و له تسميات أخرى 2,3-Butanedione و Biacetyl (National Institutes of Health، 2015). وهو سائل ذو لون أخضر مصفر، نقطة الغليان 88 درجة مئوية، نقطة الانصهار -2 درجة مئوية حتى -4 درجة مئوية، الوزن الجزيئي 86.08 غ/مول، الكثافة 0.99 غرام/مل عند 15 درجة مئوية، الذوبانية بالإيثير، الكحول والأستون، الذوبانية في الماء 200 غرام/ل عند 20 درجة مئوية، له رائحة الكينون (فيتامين ك) (Chemical Information Review، 2007).

يرتبط تواجد ثنائي الأستيل بالعديد من منتجات الألبان المتخمرة، من أهمها الزبدة والقشدة الحامضية بالإضافة إلى بعض أنواع الجبن، بما في ذلك الشيدر، غودا، الكاممبر وغيرها (Cheng، 2010؛ Cruz وزملاؤه، 2012). حيث يتم تقييم جودة منتجات الألبان المتخمرة بناءً على محتواها من ثنائي الأستيل (Milesi وزملاؤه، 2010؛ Yvon و Le-Bars، 2007). تمكّن Antinone و زملاؤه (1994)، من تحديد وفصل ثنائي الأستيل عند تركيز منخفض (0.2 ملغ/ل) في جبن الكوتاج، كما بيّنت الدراسة أنّ تركيزه يكون أعلى في جبن الكوتاج قليل الدسم (4 ملغ/ل)، مقارنة مع جبن الكوتاج كامل الدسم (1 ملغ/ل).

كذلك فإنّ محتوى ثنائي الأستيل قد يتزايد في المنتج أو ينقص خلال عملية التخمير تحت تأثير عدة عوامل. ولكنّه يعطي نكهة غير محببة للمنتجات الغذائية إذا تجاوز تركيزه مستوى معين (Mudura وزملاؤه، 2006). ففي دراسة من قبل Attai (2009)، على جبن جاك من حليب الماعز، ارتفع محتوى ثنائي الأستيل حتى الأسبوع الثامن عشر من الإنضاج (بسبب تكوين

ثنائي الأستيل بواسطة بكتيريا حمض اللبن) ثم انخفض حتى الأسبوع الثلاثين (بسبب تحويل ثنائي الأستيل إلى منتجات نهائية أخرى للتخمير) خلال فترة الإنضاج.

إضافة إلى ذلك، يتأثر محتوى ثنائي الأستيل في الأطعمة أيضاً بالتخزين. حيث انخفض محتوى ثنائي الأستيل في جبن حليب الماعز الطري المحفوظ تحت التخزين المبرّد والمجمّد (Park وDrake، 2005). وعند إضافته عمداً إلى المثلوجات اللبنية قليل الدسم، انخفض محتوى ثنائي الأستيل من 1 ملغ/ل في اليوم الأول إلى أقل من حدود اكتشاف الاستخراج الدقيق للطور الصلب ($0.08 >$ ملغ/ل) بحلول اليوم الرابع عشر من التخزين المجمد. يفسر هذا النقصان حقيقة أنّ ثنائي الأستيل مركب شديد التطاير وسريع التبخر، حتّى في درجات الحرارة المنخفضة (Chauhan وزملاؤه، 2010).

في الوقت الحالي، تُكرّس الجهود بهدف زيادة كمية ثنائي الأستيل التي تحدث بشكل طبيعي في بعض المنتجات (Macciola وزملاؤه، 2008)، كما يتم اقتراح استراتيجيات استقلابية للحصول على سلالات تنتج كميات أكبر من ثنائي الأستيل أثناء التخمير (Boumerdassi وزملاؤه، 1997a).

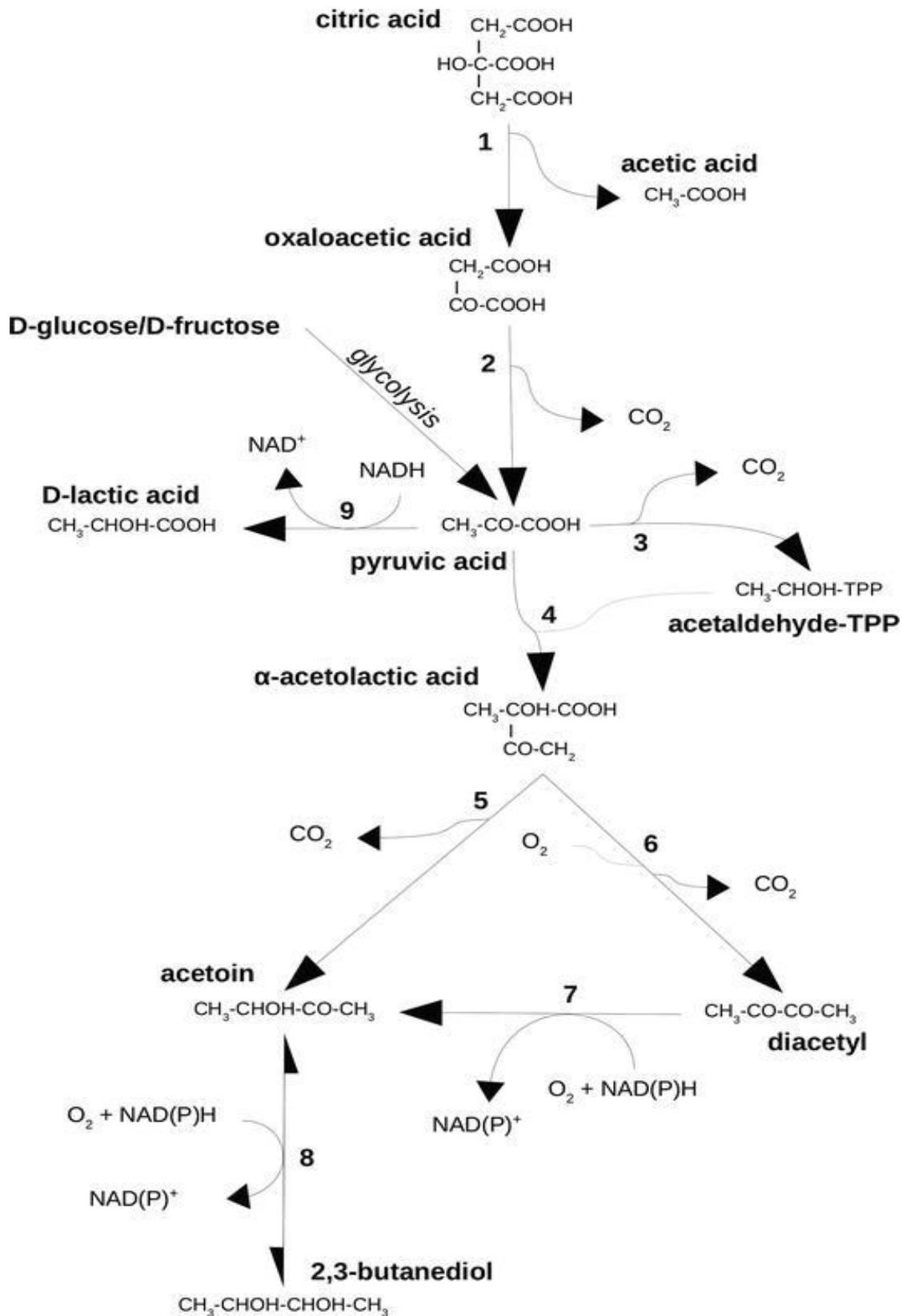
2-2-2- إنتاج ثنائي الأستيل:

جذب إنتاج ثنائي الأستيل مؤخراً اهتماماً خاصاً كونه إحدى العوامل التي تصف و تميز العديد من المنتجات الغذائية (Macciola وزملاؤه، 2008). يُعد ثنائي الأستيل ناتج ثانوي طبيعي

لعملية التخمر، يمكن أن ينتج بطريقتين مختلفتين، إمّا كيميائياً بشكل أساسي من ميثيل ايثيل كيتون أو ينتج حيوياً عن طريق التخمر بواسطة البكتيريا والخمائر، وذلك بشكل طبيعي من خلال طرائق محددة تتضمن وجود حمض α -اسيتولاكتيك كوسيط بواسطة البكتيريا، أو عن طريق اصطناع مركب الفالين في الخمائر (Anunziata و زملاؤه، 2001).

يُعد السبب الفسيولوجي لإنتاج ثنائي الأستيل غير مفهوم بشكل واضح. بيّنت عدة دراسات أنّه يتم تصنيع ثنائي الأستيل بهدف تقليل سمية البيروفات في الخلية (Cogan و زملاؤه، 1989). حيث يتشكل ثنائي الأستيل بالمقدمة من حمض الستريك (يحتوي حليب البقر على حوالي 1750 ملغ سترات للتر الواحد) (Fox و زملاؤه، 1993). وعند درجة حموضة 5.0 - 5.2 يزيح حمض اللبن حمض الستريك من أملاحه، بعد ذلك يتم تحويله من قبل سلالات معينة من بكتيريا حمض اللبن وبوجود اللاكتوز إلى CO_2 ، ثنائي الأستيل، اسيتوين و 2-acetolactate (Fox و McSweeney، 2004).

المسار الحيوي لإنتاج ثنائي الأستيل يوضحه المخطط رقم (1):



المخطط (1): المسار الحيوي لإنتاج ثنائي الأستيل

(2018 ،Falco و Ines)

ينتقل السترات بواسطة citrate permease إلى داخل الخلايا، ثم يتحد مع أكرالوأسيتات بواسطة citrate lyase. فيما بعد يفقد أكرالوأسيتات مجموعة كربوكسيل وينتج البيروفات، ثم يتحول البيروفات عن طريق α -acetolactate synthase إلى أسيتالدهيد تيامين بيروفوسفات وهذا بدوره يرتبط مع جزيئة بيروفات ثانية ويتشكل α -acetolactate عن طريق إزالة مجموعة الكربوكسيل، ثم يتم تحويل α -acetolactate إلى ثنائي الأسيتيل بواسطة α -acetolactate oxidase و يتكون الأسستين مباشرة من خلال نزع الكربوكسيل من α -acetolactate. قد يتم أيضاً إرجاع ثنائي الأسيتيل إلى الأسستين بواسطة diacetyl reductase (Ines و Falco، 2018).

2-2-3 دور بكتيريا حمض اللبن في إنتاج ثنائي الأسيتيل:

في جميع أنحاء العالم، يتزايد إنتاج واستهلاك منتجات الحليب المتخمرة. في الوقت نفسه، يتزايد إنتاج واستخدام بكتيريا حمض اللبن في صناعة منتجات الألبان (Baron وزملاؤه، 2000). حيث يتم تقييم أهمية بكتيريا حمض اللبن من خلال قدرتها على الاستقلاب مع بعض مكونات الحليب، خلال عمليات كيميائية حيوية محددة مثل تحلل السكر، البروتينات، الدهون وإنتاج ثنائي الأسيتيل (Chen وزملاؤه، 2017).

ارتبطت علاقة بكتيريا حمض اللبن بإنتاج ثنائي الأسيتيل منذ زمن بعيد، حيث خلص Hammer (1980)، إلى أن الكائنات الحية الدقيقة في مزارع البادئات ومنها *L. lactis* كانت مسؤولة عن الحموضة، الرائحة ونكهة منتج الألبان المتخمر. كما توصل Hammer و Babel (1993)، إلى أن ثنائي الأسيتيل كان مسؤولاً عن نكهة الزبدة و المكون الرئيسي لمواد النكهة، وأن مزارع البادئات تحتوي على كميات كبيرة من أسيتيل ميثيل كاربينول وثنائي الأسيتيل.

يرتبط تواجد العديد من أنواع بكتيريا حمض اللبن مع المنتجات الغذائية، إمّا ككائنات مسببة للتلف والفساد أو ككائنات ذات أهمية كبيرة في المنتجات الغذائية المتخمرة طبيعياً عن طريق التخمير السريع للمكونات الغذائية، وذلك من خلال التحويل السريع للكربوهيدرات القابلة للتخمر إلى حمض اللبن في الدرجة الأولى، إضافة إلى أحماض عضوية أخرى مثل حمض الخل، حمض الفورميك، الإيثانول وثنائي الأسيتيل (Kleerebezem وHugenholtz، 2003) وبالتالي فإنّ انخفاض الـ pH والتركيز العالي نسبياً من الأحماض العضوية يفسران فترة الصلاحية الطويلة للمنتجات الغذائية المتخمرة، نظراً لأنّ هذه الظروف تمنع نمو مجموعات من الميكروبات المتنافسة. ونتيجة لذلك، أهمية بكتيريا حمض اللبن ليست فقط في إطالة فترة الصلاحية ولكن أيضاً بتحسين السلامة الميكروبية للمنتجات الغذائية المتخمرة عن طريق تخمير وإنتاج المستقلبات المضادة للميكروبات، والتي تخلق البيئة الفيزيائية التي تمنع الفساد المحتمل والكائنات المسببة للأمراض (Sanroman وLongo، 2006). بالإضافة إلى هاتينوظيفتين الأساسيتين، تساهم بكتيريا حمض اللبن في إحداث مختلف الوظائف الثانوية، مثل القوام والطعم والرائحة يعتمد ذلك على النشاط الاستقلابي للميكروبات المخمرة، مما يؤدي إلى تغيير التركيب الكيميائي للمواد الخام الغذائية القابلة للتخمر. وبالتالي تنتج مركبات النكهة الطبيعية كمنتجات تخمر بواسطة الكائنات الحية الدقيقة (Leroy و De-Vuyst، 2004).

يُعد ثنائي الأسيتيل من أهم المركبات المنتجة لنكهة الزبدة والتي يمكن إنتاجها عن طريق بكتيريا حمض اللبن وبعض الكائنات الحية الدقيقة الأخرى، مثل *Achromobacter lipolyticum*، *Propionibacterium shermanii*، *Aerobacter* و *Enterococcus spp.* والخميرة (Lee وزملاؤه، 1995). ينتج ثنائي الأسيتيل بشكل رئيسي بواسطة أجناس مختلفة من بكتيريا

حمض اللبن تتضمن: *Lactococcus*، *Pediococcus*، *Lactobacillus*، *Leuconostoc* (Lanciotti وزملاؤه، 2003). من أهمها سلالات *Lactococcus* spp. التي تستخدم على نطاق واسع في الصناعات الغذائية لقدرتها على تحويل السترات إلى مركبات نكهة وثاني أكسيد الكربون، مما يساهم في تعزيز الخصائص الحسية للمنتجات المتخمرة. حيث تنقسم سلالات *Lactococcus* spp. إلى تحت نوعين *L. lactis* و *L. cremoris* الذي يعرف بـ *diacetylactis* نظراً لقدرته على تحويل السترات إلى ثنائي الأسيتيل (Quintans وزملاؤه، 2008).

نوقشت العديد من الأليات التي تنتج من خلالها بكتيريا حمض اللبن ثنائي الأسيتيل، وقد اقترحت العديد من استراتيجيات الاستقلاب لتحسين إنتاج ثنائي الأسيتيل. كونه يساهم في نكهة الكثير من الأطعمة المتخمرة بتواجده بتركيز 0.5-20 ملغ/ كغ في منتجات الألبان المتخمرة، 44-62.5 ملغ/ كغ في منتجات الخبيز و 2.5-5.2 ملغ/ كغ في بعض الأطعمة المتخمرة الطبيعية (Lanciotti وزملاؤه، 2003). تشكل بكتيريا حمض اللبن ثنائي الأسيتيل كمنتج ثانوي مع حمض اللبن كمنتج رئيسي، عن طريق استخدام السترات بحضور اللاكتوز (*Kopermsub* و Yunchalard، 2010)، فيما بعد أصبحت كفاءة انتاجه من اللاكتوز بدلا من السترات الهدف لعدة استراتيجيات هندسة الاستقلاب (Jay، 1982). يعرف هذا المركب أيضاً بنكهة الزبدة وينتج من خلال عملية تبديل حمض الستريك إلى بيروفات بواسطة بكتيريا حمض لبن خاصة القادرة على الاستفادة من السترات ومن ثم تستخدم البيروفات كمولد لتشكيل ثنائي الأسيتيل (Quintans وزملاؤه، 2008). حيث يعتمد الطعم المميز والنكهة في منتجات الألبان المتخمرة مثل اللبن الرائب والزبدة على تراكيز مكونات النكهة مثل الأسيت الدهيد، ثنائي الأسيتيل

والأسيتوين التي تنتجها بكتيريا حمض اللبن المحبة للحرارة المتوسطة وبكتيريا حمض اللبن المحبة للحرارة المرتفعة. وبشكل خاص ثنائي الأستيل، الذي يعطي طعم مميز ونكهة للزبدة حتى بتركيز منخفضة جداً (1-2 ملغ/كغ) (Bakirci وزملاؤه، 2002).

تعد القدرة على استقلاب السترات إلى CO_2 ، أسيتات، أسيتوين، ثنائي الأستيل وأحياناً 2، 3- بيوتانيدول سمة شائعة للعديد من بكتيريا حمض اللبن، بشكل خاص *Lactococcus* spp. و *Leuconostoc* spp. التي تتواجد في بعض مزارع البادئ، بينما لم يتم توثيق استقلاب حمض الستريك بواسطة *Lactobacillus* spp. بشكل جيد، على الرغم من أنَّ الجوانب المختلفة منه تمَّ تناولها في العديد من الدراسات الحديثة (Hugenholtz، 2014)، حيث بينَّ Anuradha وزملاؤه (1999) أنَّ الجنس *Lb. rhamnosus* أعطى إنتاجية عالية من ثنائي الأستيل بلغت 64 ملغ من ثنائي الأستيل لكل غرام من الغلوكوز المستهلك.

تعد بكتيريا *Enterococcus* من ضمن بكتيريا حمض اللبن غير البادئ (NSLAB) واسعة الانتشار، و تشكل أحد مكونات البكتيريا الأصلية في كل من الحليب الخام والمبستر. كما أنَّها موجودة في أنواع كثيرة من الجبن (Giraffa، 2003). يمكن لبكتيريا *Enterococcus* أن تساهم بشكل إيجابي في تطور النكهة، إضافة إلى أهمية وجودها باستمرار في العديد من منتجات الحليب الخام، لأنَّها تنتج العديد من الإنزيمات التي تتفاعل مع مكونات الحليب، وبالتالي تعزيز التحولات الكيميائية الحيوية الهامة. ففي دراسة أجريت من قبل Battelli وزملاؤه (2011)، لُقِّحت 40 سلالة من *E. faecalis*، جمعت من قرى مختلفة في شمال غرب إيطاليا، من الحليب وعند تحليلها تبين أنَّ المركبات المتطايرة الرئيسية المكتشفة هي: الإيثانول،

ثنائي الأستيل، الأسيتوين، حمض الخل والبنزويك. وكان التباين بين السلالات كبيراً، مما يدل على نشاط إنزيمي مختلف تماماً بين السلالات.

يتم تكييف سلالات *Enterococcus* spp. بشكل كبير مع العديد من النظم الغذائية، كما أنها تشارك في نشاط التخمر في الأجبان المسواة والنفائق الجافة التقليدية، والتي يعتقد أنها تسهم في تطوير الخصائص الحسية لهذه المنتجات (Foulquie- Moreno وزملاؤه، 2006). هدفت دراسة من قبل Durlu-Ozkaya وزملاؤه (2001)، إلى تمييز أنواع بكتيريا حمض اللبن المعزولة من الجبن الأبيض التركي المصنّع من حليب الأغنام غير المعامل حرارياً والذي لم يضاف له بادئ. بيّنت النتائج المبنية على حوالي 77 عزلة أنّ الأنواع التابعة لجنس *Enterococcus* هي الأنواع السائدة في هذا النوع من الجبن. وبالتالي فإنّ وجود *Enterococcus* بأعداد مرتفعة يمكن أن يعزى إلى تحملهم لمجال واسع من الشروط البيئية مثل درجة الحرارة المنخفضة، ونسبة عالية من الملح والحموضة.

2-2-4- العوامل المؤثرة في إنتاج ثنائي الأستيل من قبل بكتيريا حمض اللبن:

تكمّن أهمية بكتيريا حمض اللبن في صناعة الألبان، في قدرتها على تخمير السترات والسكريات وبالتالي إنتاج ثنائي الأستيل، بشكل خاص الذي يُعد من أهم مركبات النكهة في منتجات الألبان المتخمرة. أجريت مجموعة من الدراسات لتوضيح مسارات التمثيل الغذائي ونشاط أنزيم سيترات بيرميز (CitP) الذي يتميز بوجوده في سلالات تنتمي إلى الأجناس التالية *Leuconostoc* و *Lactococcus* بهدف رفع إنتاجية ثنائي الأستيل (Hugenholtz و Starrenburg، 1992). أثناء الاستقلاب المشترك للسكريات مع السترات يتشكل البيروفات كمركب وسيط ثم يتهدم بشكل إضافي عن طريق Ldh و Als. يتأثر تهدم البيروفات عبر هذه المسارات وبالتالي

إنتاج ثنائي الأستيل بظروف النمو التي تتضمن: درجة حرارة وسط الزرع (Pack وزملاؤه، 2003)، توفر مصدر الكربون والطاقة (Cocaign-Bousquet وزملاؤه، 1996)، درجة الـ pH (Kaneko وزملاؤه، 2011) ووجود عوامل مساعدة أخرى (Schmitt و Divies، 1992).

تنتج بكتيريا حمض اللبن متجانسة التخمر ثنائي الأستيل بسهولة أكبر وبكميات أكبر مما تفعل الأنواع غير المتجانسة التخمر، كما أنَّها تكون قادرة على إنتاج مركبات النكهة حتى عندما يكون السترات مصدر وحيد للطاقة (Hugenholtz، 1993). يُعد حمض الستريك ضروري لإنتاج ثنائي الأستيل بواسطة بعض السلالات. وفي جميع الأنواع المدروسة، يتم تعزيز إنتاج ثنائي الأستيل في وسط منخفض السكر بوجود حمض الستريك. بالإضافة إلى ذلك، يتم إنتاج كميات أكبر من ثنائي الأستيل في ظل ظروف أكثر مثالية (Christensen و Pederson، 1985).

2-2-1- تأثير درجة الحرارة Effect of Temperature:

تؤثر درجة الحرارة في مختلف الفعاليات الحيوية للخلية، وكل فعالية حيوية تقوم بها الأحياء الدقيقة تتأثر بدرجة الحرارة، لذلك فإنَّ تكون المنتجات الاستقلابية في الأحياء المجهرية يعتمد بشكل كبير على درجة الحرارة (السواح، 2002). ومن الحقائق المثبتة من قبل الكثير من الباحثين هو أنَّ درجة الحرارة المثلى لنمو الأحياء المجهرية ليس من الضروري أن تكون ذاتها المثلى للتحويلات الاستقلابية لتلك الأحياء، كما يعتمد تأثير درجة الحرارة على نوع الكائن الحي الدقيق وبالتالي تحدث تباينات في إنتاج مركبات النكهة (Pack وزملاؤه، 2003).

تتباين الدراسات حول الدرجات الحرارية المستخدمة لنمو الأحياء الدقيقة وإنتاجها لمركبات النكهة، حيث ازداد إنتاج ثنائي الأستيل ازدياداً ملحوظاً مع زيادة درجة الحرارة ليصل إلى أعلى

إنتاجية عند درجة حرارة 37 °م ثم تناقص الإنتاج عند تجاوزها لهذه الدرجة (Pack، 1996).
أمّا فيما يتعلق بالحفاظ على التوازن ما بين البكتيريا المنتجة لحمض اللبن والبكتيريا المنتجة
للنكهة في مزارع البادئات، توصّل Hammer و Babel (1993)، إلى أنّه للحصول على
إنتاجية أعلى من مركبات النكهة، لابد من التحضين ضمن درجات حرارة من 21 إلى 22 °م،
يعود ذلك إلى إعاقه نشاط diacetyl reductase عند درجات الحرارة هذه، كما يلاحظ حدوث
ارتفاع مفرط في النضج مع ارتفاع درجات الحرارة بشكل ملحوظ، وتكون الظروف أكثر ملائمة
لتطوير الكائنات المقاومة للحرارة التي تبقى على قيد الحياة في بسترة الحليب.

اختبر Medina وزملاؤه (2000)، تأثير درجات حرارة مختلفة (22، 30، 37، 45 °م) على
إنتاج ثنائي الأستيل من قبل *Lb. rhamnosus*. بيّنت الدراسة أنّ إنتاج ثنائي الأستيل وصل
أقصاه عند الدرجة 37 °م، وكان منخفضاً عند الدرجة 45 °م، في حين درجات الحرارة الأخرى
كانت القيم أعلى ولكن لم تظهر أي فروق ذات دلالة إحصائية بين بعضها البعض. ومع ذلك،
تمّ الحصول على أعلى كفاءة لتحويل السترات إلى ثنائي الأستيل عند الدرجة 37 °م. وفي
دراسة أخرى من قبل De- Figueroa وزملاؤه (2001)، لوحظ أنّ إنتاج ثنائي الأستيل من قبل
Lb. rhamnosus يعتمد على درجة الحرارة، وأنّ أعلى كمية إنتاج عند درجة حرارة 37 °م،
يعود ذلك إلى أنّه عند درجة الحرارة هذه لوحظ الحد الأقصى لنشاط أنزيم citrate lyase
وبالتالي زيادة في إنتاج ثنائي الأستيل والأسيتوين. كما توصّل Habil وزملاؤه (1982)، إلى
أنّه عندما ارتفعت درجة حرارة التحضين من 23 إلى 30 °م، تمّ الحصول على حوالي 30 %
زيادة في إنتاج ثنائي الأستيل، حيث يكون نشاط diacetyl reductase بحده الأدنى عند درجة
الحرارة هذه مما يقلل من مستوى تحول ثنائي الأستيل المنتج إلى الأسيتوين.

2-2-4-2- تأثير درجة الحموضة pH: Effect of pH

يؤثر pH الوسط الذي تنمو فيه بكتيريا حمض اللبن على نموها وفعاليتها الحيوية، وكذلك في اتجاه سير عمليات الاستقلاب والتخليق وإنتاج مركبات النكهة، وعلى الرغم من أن محتوى ثنائي الأسيتيل في بادئات الحليب التي تخمر حمض الستريك وبشكل خاص *Leuc. citrovorum* و *Leuc. paracitrovorum* عادة ما يكون منخفضاً للغاية، فإنَّ تعديل الـ pH إلى الدرجة المناسبة يزيد بشكل كبير من تشكّل مركبات النكهة ومن ضمنها ثنائي الأسيتيل. بيّنت الدراسات أنَّ إنتاج ثنائي الأسيتيل قد يتناقص حتى في ظل ظروف النمو المثالية، حيث تنتج بكتيريا حمض اللبن ثنائي الأسيتيل في حالة عدم وجود حمض مضاف ومن ثمَّ يتناقص الإنتاج بسرعة بعد ذلك، بينما في حال ضبط الـ pH عند الدرجات المثالية 5.2-5.5 يكون التحكم في إنتاج ثنائي الأسيتيل بكميات أعلى (Hammer، 1980). كما توصّل Garcia-Quintans وزملاؤه (1998)، إلى أنّه يتم ضبط درجة الحموضة المناسبة لإنتاج ثنائي الأسيتيل في بكتيريا حمض اللبن المختلطة المضافة كبادئات لتصنيع الزبدة من خلال إنتاج حمض اللبن بواسطة *L. lactis*، *L. cremoris* و *L. diacetylactis* التي توجد جنباً إلى جنب مع بكتيريا حمض اللبن ذات القدرة المخمرة لحمض الستريك، كما بيّنت الدراسة أنَّ أنواع *Leuconostoc* spp. المستخدمة في البادئات المختلطة لتصنيع الزبدة لها قدرات ضعيفة لتخمّر اللاكتوز، ونظراً لانخفاض درجة الحموضة المثلى لتراكم السترات، لا يحدث تخمر السترات بواسطة هذه الكائنات إلا بعد انخفاض الـ pH عن 6.0 وذلك عن طريق تواجد الأنواع المنتجة للحمض *L. lactis* و *L. cremoris*.

اختبر Palles وزملاؤه (1998) تأثير درجات pH مختلفة تراوحت بين 4 و 6 على إنتاج ثنائي الأستيل من قبل بكتيريا *Lb. casei* و *Lb. Plantarum*، بيّنت الدراسة أنّ درجة الـ pH المثالية للنمو وإنتاج أعلى كمية من ثنائي الأستيل تساوي 5. بينما توصّل Christensen و Pederson (1985)، إلى أنّ أقصى إنتاج لثنائي الأستيل من قبل بكتيريا حمض اللبن *Lb. brevis* B155 في عصير البرتقال عند درجة pH تساوي 5.5.

2-2 -3- تأثير تركيز سكر الغلوكوز :Effect of Glucose

تعد الكربوهيدرات وبشكل خاص سكر الغلوكوز ذات أهمية بالغة بالنسبة للتركيب الحيوي لكل من حمض اللبن ومركبات النكهة ثنائي الأستيل والأسيتوين. حيث يؤدي الاستقلاب المشترك للجلوكوز والسترات في الحليب بواسطة بكتيريا حمض اللبن إلى إنتاج حمض اللبن بشكل أساسي، وعدد من المنتجات الثانوية المهمة للصفات الحسية والقوام (Law، 1981). يؤمن حمض اللبن الحماية ضد الفساد بواسطة الكائنات غير الحمضية، أمّا بالنسبة للخصائص الحسية، يُعد مركب ثنائي الأستيل ودرجة أقل شكله المخفف جزئياً الأسيتوين من أهم المركبات المنتجة للنكهة. إلّا أنّ العلاقة المتبادلة بين تخمير الغلوكوز والسترات تعد معقّدة، إذ أنّه عند درجة الحموضة المعتدلة أو القلوية قليلاً يستخدم في البداية الغلوكوز، بينما تُستقلب السترات عندما تنخفض درجة الحموضة المتوسطة إلى أقل من 6.5. بعد ذلك، يمكن تجديد مجموعة البيروفات وبالتالي تشكل ثنائي الأستيل والأسيتوين بشكل فعّال من أي من مصادر الكربون المتاحة (Hugenholtz، 1993). كما أشارت دراسة من قبل Goupry وزملاؤه (2000)، إلى أنّ 65 ٪ من مصادر الكربون تستهلك خلال الاستقلاب المشترك للجلوكوز والسترات

بواسطة *L. lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis* لتكوين مركبات منتجة للنكهة تساهم فيها الكربوهيدرات.

أظهرت العديد من الدراسات أن عملية الاستقلاب المشترك للسترات مع الغلوكوز تتغير بشكل ملحوظ خلال التخمير اللاهوائي بواسطة بكتيريا حمض اللبن مقارنة بالتخمير الهوائي. يعود ذلك إلى كون حمض اللبن خلال التخمير اللاهوائي يستمد بشكل أساسي من الغلوكوز، ولكن يتم إنتاج ثنائي الأسيتيل والأسيتوين من السترات. أما بالتخمير الهوائي يتم الاعتماد بشكل أساسي على السترات كمصدر لثنائي الأسيتيل. وتجدر الإشارة إلى أن التخمير الذي يتم إجراؤه في حالة عدم وجود سترات يؤدي إلى إنتاج كميات ضئيلة من مركبات النكهة (Boumerdassi وزملاؤه، 1997 a).

توصل Schmitt و Divies (1990)، إلى أن استخدام السترات والغلوكوز في الوسط عند درجة PH 5.2 ودرجة حرارة 30 °م، زاد من معدل النمو المحدد لسلاسلات *Leuco. mesenteroides subsp. cremoris*، إضافة إلى زيادة في إنتاج ثنائي الأسيتيل والأسيتوين ليتم إنتاجهما بمجرد بدء استهلاك السترات، مما أدى إلى إنتاجية أفضل لثنائي الأسيتيل والأسيتوين مقارنة بالغلوكوز وحده في الوسط. وفي دراسة أخرى من قبل Benito- de Cardenas وزملاؤه (1992)، لوحظ أن مستويات ثنائي الأسيتيل والأسيتوين التي تنتجها *Lb. rhamnosus* مع إضافة السترات انخفض عندما ارتفع تركيز الغلوكوز الأولي في الوسط عن 15 غ/ل. كما بينت دراسة من قبل Jyoti وزملاؤه (2003)، بهدف تعزيز نمو و إنتاج ثنائي الأسيتيل من قبل *Lb. rhamnosus* على وسط يحتوي الغلوكوز، أن أعلى إنتاجية من ثنائي الأسيتيل بلغت 62.3 مغ/ل عندما وصل تركيز الغلوكوز في الوسط إلى 10 غ/ل.

وفي دراسة أخرى من قبل Christensen و Pederson (1985)، لوحظ أنَّ أقصى إنتاج لثنائي الأستيل من قبل بكتيريا حمض اللبن *Lb. brevis* B155 بلغ 51 ملغ/ل عند درجة pH 5.5 وفي وسط يحوي جلوكوز بمقدار 15 غ/ل مع إضافة السترات أيضاً.

2-2 -4 -4 - تأثير تركيز السترات :Effect of Citrate

تتوقف إنتاجية بكتيريا حمض اللبن من مركبات النكهة وبشكل خاص ثنائي الأستيل على معدل وكفاءة استقلاب حمض الستريك، لذلك من الضروري لزيادة معدل الإنتاج توفير كميات كافية من حمض الستريك في وسط الزرع المستخدم عن طريق إضافة حمض الستريك أو حمض البيروفيك كطلائع لإنتاج ثنائي الأستيل (Kaneko وزملاؤه، 1991).

تعتبر السترات الركيزة الأساسية لإنتاج ثنائي الأستيل في منتجات الألبان المتخمرة. حيث يبلغ تركيز السترات في الحليب حوالي 1.7 غ/ل، يتم استقلاب السترات عن طريق بكتيريا حمض اللبن، بشكل خاص *L. lactis* subsp. *Lactis leuconostocs. spp*، تنتقل السترات إلى داخل الخلايا وتتشكل البيروفات بواسطة oxaloacetate decarboxylase. يُعد هذا الإنزيم ذو أهمية كبيرة في إنتاج مركبات النكهة حيث تعتمد الاختلافات بين أجناس بكتيريا حمض اللبن بخصوص استخدام السترات على وجود أو غياب هذا الإنزيم، ففي حال تواجده يقود تمثيل السترات إلى زيادة تجمع البيروفات الذي يؤدي بدوره إلى إنتاج ثنائي الأستيل والأسيتوين، و في حال غياب هذا الإنزيم يكون الطريق البديل هو مسار إنتاج حمض السكسينيك (Wessels وزملاؤه، 2004؛ Boumerdassi وزملاؤه، 1997 a).

تُستخدم السترات بواسطة سلالات مختلفة من بكتيريا حمض اللبن إمّا مباشرة أو عن طريق الاستقلاب المشترك مع مصادر الكربون لإنتاج مركبات النكهة في منتجات الألبان المختلفة (Medina وزملاؤه، 2000). يحدث الاستهلاك الأمثل للسترات من قبل *Leuconostocs* spp. عند قيم الـ pH المنخفضة والتي تتراوح من 4 - 5.5، حتى يصل إلى أعلى إنتاجية لثنائي الأستيل عند تركيز 5 غ/ل (Rea و Cogan، 2003). كما بيّنت دراسة من قبل Starrenburg و Hugenholtz (1991)، أنّ استهلاك السترات بوجود سكر اللاكتوز يعزز نمو *Leuconostoc* spp. و إلى حد أقل نمو *L. lactis* ssp. *lactis*، في المقابل، لا تؤثر السترات على نمو *Lb. casei* و *Lb. plantarum*. توصّل أيضاً Kaneko وزملاؤه (1986)، إلى أنّ إنتاج ثنائي الأستيل من سلالات *L. lactis* ssp. *lactis* 3022، بلغ 17 ملغ/ل في غياب السترات، بينما تمّ زيادة إنتاجية ثنائي الأستيل إلى 42.9 ملغ/ل عند إضافة 2 غ/ل من السترات. وفي دراسة أخرى من قبل Petit وزملاؤه (1989)، لوحظ أنّ إنتاج ثنائي الأستيل من قبل سلالات *L. lactis* ssp. *lactis* CNRZ 124 ازداد من 27.2 ملغ/ل إلى 120.5 ملغ/ل عند زيادة تركيز السترات من 2 غ/ل إلى 6 غ/ل، كما بيّنت هذه الدراسة أيضاً أنّ إنتاج ثنائي الأستيل ازداد بمقدار الضعف عندما تمت إضافة السترات دفعة واحدة للخلايا في نهاية طور النمو مقارنة بإضافة السترات في بداية النمو.

توصّل Belguendouz وزملاؤه (1997)، إلى أنّ تعزيز نمو *Leuconostoc* spp. مع إضافة السترات كان مرتبطاً أيضاً بقلوية الـ pH داخل الخلايا، ولوحظ أقصى نمو عند pH يساوي 6.5، حيث يُعد هذا التوازن ضروري للحفاظ على نشاط التمثيل الغذائي ونمو السلالات البكتيرية. كما بيّنت هذه الدراسة أيضاً أنّ للتهوية بوجود السترات تأثير إيجابي على إنتاج ثنائي

الأسيتيل، بسبب تحفيزه لنشاط α -acetolactate synthase وبالتالي تعزيز أكسدة α -acetolactate إلى ثنائي الأسيتيل، وأنَّ إنتاج ثنائي الأسيتيل من قبل *L. lactis ssp. lactis* CNRZ 483 في وسط مصل اللبن يحتوي على 6 غ/ل سترات و في مجال تهوية يعادل 2 ضغط جوي، ازداد إلى 38.7 غ/ل.

2-2-5- الغرلة Screening:

يقصد بعملية الغرلة إجراء مقارنة بين عدد كبير من عزلات الأحياء الدقيقة في صفة محددة بهدف تحديد أي منها أكثر فعالية وقدرة على التعبير عن تلك الصفة، وذلك من خلال اختبارات معينة لانتقاء العزلة الأكثر إنتاجاً واستكمال الدراسة المخبرية عليها واستخدامها لاحقاً على نطاق تجاري (McKay، 1985).

2-2-6- التحسين الوراثي لإنتاج ثنائي الأسيتيل باستخدام التطفير:

تستخدم بكتيريا حمض اللبن لتخمير العديد من المصادر الطبيعية بهدف الحصول على حمض اللبن بشكل رئيسي. بالإضافة إلى ذلك، فهي قابلة للتعديلات الوراثية التي تحولها إلى مصانع حيّة فعالة لإنتاج مركبات استقلابية مختلفة (De-Vos و Hugenholtz، 2004). لذلك صُممت العديد من استراتيجيات هندسة الاستقلاب لتحسين إنتاج ثنائي الأسيتيل بواسطة بكتيريا حمض اللبن، بناءً على معرفة المسارات المشاركة في إنتاج ثنائي الأسيتيل (Henriksen و Nilsson، 2001). ومن هنا ظهرت أهمية تطبيقات الهندسة الوراثية والتطفير لتشمل الأحياء الدقيقة المنتجة لمركبات النكهة، بهدف الحصول على هذه المواد بكميات كبيرة، علاوةً على

تحسين مواصفاتها ونوعيتها (Snoep وزملاؤه، 1992؛ De-Vos و Hugenholtz ، 2004 ، Law، 2001).

تستخدم الطفرات المستحدثة على نطاق واسع لاختيار الكائنات الحية الدقيقة التي تنتج مواد نشطة بيولوجياً وزيادة تحسين أنشطتها. ومع ذلك، نادراً ما تستخدم تجاه بكتيريا حمض اللبن نظراً لخصائصها الوراثية (Geisen و Holzapfel ، 1996 ؛ Halander ، 1992) وصعوبة تطبيق الطرائق الوراثية التقليدية لانتقاء بكتيريا حمض اللبن المطفرة باستخدام المطفرات الفيزيائية والكيميائية على نطاق واسع، بالإضافة إلى عدم تمكن بكتيريا حمض اللبن من توليف العديد من الأحماض الأمينية والنيوكليوتيدات، وعدم إمكانية تكرار الجينات لمختلف الإنزيمات وناقلات استقلاب السكر والأحماض الأمينية (Pfeiler و Klaenhammer، 2007). كما أن وظائف الإنزيمات الناتجة لا تتسم أحياناً بالثبات أثناء عملها بسبب تغير بعض الظروف المصاحبة للعمل كتغير الرقم الهيدروجيني أو عدم الثبات تجاه تباين درجات الحرارة، إضافة إلى عوامل أخرى مؤثرة في الإنتاج (Goodarzi، 2016).

تسعى الدراسات الحديثة لتدعيم الاختبارات الحيوية الكيميائية مع التقنيات الجزيئية لتحديد أنواع الأحياء الدقيقة، إضافة إلى تحسين الإنتاجية من مركبات النكهة من خلال نهج هندسي استقلابي بالتطعيم، وظروف التطعيم المثالية وطرق الفرز التي تمكن من عزل الطفرات النشطة (Boumerdassi وزملاؤه، 1997b؛ Marino وزملاؤه، 2005؛ Guo وزملاؤه، 2012). تمكن Nadal وزملاؤه (2009)، من اختبار قدرة *Lb. casei* على رفع إنتاجية مركبات النكهة ثنائي الأستيل والأسيتون في مصل اللبن من خلال استخدام الـ UV، بيّنت نتائج الدراسة زيادة القدرة على إنتاج ثنائي الأستيل والأسيتون من اللاكتوز في مصل اللبن بمقدار 1400 ملغ/ل

عند درجة الحموضة 5.5، كما أظهرت النتائج أيضاً أنه يمكن معالجة *Lb. casei* لتوليف مركبات استقلابية ذات قيمة غذائية عالية في منتجات الألبان المتنوعة. وفي دراسة أخرى من قبل Habil وزملاؤه (1982)، عُرِضَت للتطهير باستخدام أشعة الـ UV و مركب nitrosoguanidine كعوامل مطهرة بشكل مستقل أو مرتبطة معاً، العديد من السلالات ذات الأهمية التجارية في إنتاج ثنائي الأستيل بقصد إنتاج مستويات مرتفعة من ثنائي الأستيل، أو لتصبح منتجة له، بيّنت الدراسة أنه باستخدام أشعة الـ UV 254 نانو متر ومن ارتفاع 15 سم والتطهير خلال 7 فترات زمنية هي (0.5، 1، 1.5، 2، 2.5، 3، 3.5) دقيقة، أعطت الطفرات في الزمن 2 دقيقة أعلى إنتاجية وبمقدار 3-4 مرات أعلى من السلالة الأصلية، كما بيّنت نتائج الدراسة أيضاً ازدياد مستوى إنتاج ثنائي الأستيل بنسبة 50% بتطهير *L. lactis* بوساطة NTG.

يُعد التطهير بأشعة الـ UV طريقة بديلة لتحسين قدرة سلالات بكتيريا حمض اللبن على إنتاج ثنائي الأستيل، من خلال ذلك تمّ الحصول على سلالات مستقرة من بكتيريا حمض اللبن *L. lactis* ssp. *Lactis* bv. *diacetylactis* ذات إنتاجية أعلى بـ 2-6 أضعاف من ثنائي الأستيل وحوالي 50 % ارتفع مستوى إنتاج الأسيت الدهيد مقارنة مع العزلة الأصلية (Lopez وHugenholtz، 2001). كما تمكّن Yu وزملاؤه (2006)، من زيادة إنتاجية بكتيريا *L. lactis* ssp. *Lactis* bv. *diacetylactis* من ثنائي الأستيل بمقدار 12.9 مرة مقارنة مع السلالة الأصلية وذلك عند تطهيرها بالـ UV وكانت كمية ثنائي الأستيل المقدرة 72 ملغ/ل. وفي دراسة مماثلة تمّ الحصول على طفرة تم تعيينها على أنها UV-3 من قبل *L. lactis* من خلال استخدام أشعة الـ UV، وزيادة إنتاج ثنائي الأستيل عند تطبيق شروط النمو المثالية درجة الحموضة 7.0 ودرجة حرارة 37°م وسرعة الدوران البالغة 180 دورة/دقيقة، بمقدار 18.7 مرة

مقارنة مع العزلة الأصلية ليصل إلى 0.01 ± 1.05 غ/ل (Hugenholtz و Starrenburg، 1992).

2-2-7 فصل وتنقية وتقدير ثنائي الأستيل باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC:

اجتذب مؤخراً تحديد ثنائي الأستيل وتنقيته الاهتمام أيضاً، لأنه أحد الخصائص التي تتميز بها بكتيريا حمض اللبن وفعاليتها الحيوية المختلفة (Macciola وزملاؤه، 2008). علاوة على عدم وجود طريقة واضحة للفصل الكمي لمركبات النكهة مما يؤدي إلى إعاقة دراسة الآليات التي يتشكل بواسطتها ثنائي الأستيل من البيروفات، والعلاقات الاستقلابية بين مركبات النكهة (Beshkova وزملاؤه، 2003).

يتأثر فصل وتحديد كمية ثنائي الأستيل في منتجات الألبان المتخمرة، بشكل كبير بالطرائق التحليلية المستخدمة لتحديده (Rincon-Delgadillo وزملاؤه، 2012). في الوقت الحاضر، لم يتم التحقق من صحة طريقة محددة وثابتة دولياً لتحديده في الحليب ومنتجات الألبان المتخمرة. سابقاً، اعتمدت الطريقة التحليلية الشائعة خطوة التقطير بالبخار لفصل ثنائي الأستيل عن العينة، متبوعة بتفاعل لوني (Pack وزملاؤه، 2003، Westerfeld، 1945). كان هذا الإجراء شاقاً وغير دقيق. فضلاً عن أن كمية ثنائي الأستيل المقيسة هي فعلياً مجموع ثنائي الأستيل والأسيتوين معاً. علاوة على ذلك، خلال خطوة التقطير بالبخار يمكن تحويل α -acetolactate الموجودة في العينات عن طريق نزع الكربوكسيل إلى ثنائي الأستيل والأسيتوين مما يتسبب في المبالغة في تقدير كلا المركبين (Cronin و Rispin، 1996). توصل Lee و Drucker (1995)، إلى إجراء تحليل مباشر لثنائي الأستيل من الجزء الطافي

من المزارع البكتيرية بواسطة كروماتوغرافيا الغاز - السائلة (GLC). كما تمكّن Macciola وزملاؤه (2008)، من التوصل إلى طريقة أخرى لتحديد وفصل ثنائي الأستيل من الحليب الطازج بتقنية كروماتوغرافيا الغاز إلى جانب كاشف تأين اللهب (GLC - FID)، تمّ استخدام الأسيتون فقط كمذيب و 2،3-pentanedione كمادة كيميائية. بعد الطرد المركزي لمزيج حليب- الأسيتون، تمّ ترشيح الطافي وحقنه مباشرة في جهاز كروماتوغرافيا الغازية، دون إجراء خطوة تنقية إضافية، كان استرداد ثنائي الأستيل من الحليب 87 % والحد الأقصى للكشف بلغ 1 ملغ/ل. يُعد هذا التحليل الكروماتوغرافي أكثر انتقائية، لكن التحليل المباشر في منتجات الألبان صعب للغاية بسبب التداخل مع المكونات الأخرى.

تعتبر تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC من أهم طرائق الفصل المستخدمة للتعرف على مركبات النكهة فهي طريقة حساسة وسريعة حيث لا يستغرق الكشف عن ثنائي الأستيل أكثر من (10- 45 دقيقة) (Wang وزملاؤه، 2017). تمكّن أيضاً Speckman و Collins (1998)، من العثور على كروماتوغرافيا التملح مناسبة لفصل كميات ميكروغرام من ثنائي الأستيل والأسيتون و 2، 3- بيوتيلين جليكول في درجة حرارة الغرفة، من خلال تطبيق 1 مل من محلول يحتوي على 25 إلى 100 ميكروغرام من المركبات المراد فصلها على قمة عمود راتنج التبادل الأيوني Dowex 1-X8 في شكل كبريتات.

في دراسة أخرى من قبل Wang وزملاؤه، (2017)، تمّ تطوير والتحقق من طريقة HPLC - UV لتحديد ثنائي الأستيل باستخدام 4- (2,3- quinoxaliny-6-dimethyl) -1,2-benzenediamine باعتباره كاشف اشتقاق جديد. بعد اشتقاق المادة بالكاشف عند قيمة pH يساوي 4.0 وفي درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق ، تمّ تحليل ثنائي الأستيل على عمود ODS وعند طول موجة 254 نانومتر. أظهرت النتائج أنّ معامل الارتباط للطريقة هو 0.9991

في حدود 8.60 ملغ/ل إلى 36 ملغ/ل ثنائي الأستيل، والحد الأقصى للكشف هو 17.2 ملغ/ل. وأن نسبة استرداد ثنائي الأستيل تتراوح من 70-80 %.

2-3- الزبدة وأنواعها Butter:

تُعرّف الزبدة بأنّها مستحلب جامد من حبيبات الدهن والماء والأملاح المعدنية، تنتج من خض قشدة الحليب الطازج أو المُخمر المفصولة من الحليب. ويُصنّع معظمها من دهن حليب الأبقار، وقليل منها من دهن حليب الضأن أو الماعز أو الجاموس أو غيرها. وقد استخدمت في تغذية الإنسان ولأغراض طبية وتصفيف الشعر من قبل الإغريق والرومان منذ نحو 2000 سنة قبل الميلاد، وكانت تُصنّع في المزارع بطرائق بدائية حتى منتصف القرن السادس عشر. كما بدأت التطورات المهمة في تصنيعها مع اختراع الفراز separator عام 1879، ثم بسترة pasteurization القشدة المعدة لصناعتها في العام التالي، واستخدام البادئات starter cultures عام 1890، وتتالت التحسينات في تصنيعها حتى حلّ الخضاض المصنوع من الفولاذ غير القابل للصدأ محل الخضاض الخشبي عام 1935، وتطورت صناعة الزبدة بعد ذلك بشكل ملموس (Frede و Buchheim، 1994). أكبر الدول المنتجة للزبدة هي الولايات المتحدة وألمانيا وفرنسا ونيوزيلندا وروسيا. وفقاً لهيئة الدستور الغذائي التابعة لبرنامج المواصفات الغذائية المشترك بين منظمة الأغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية، تعتبر الزبدة منتج دهني مشتق من الحليب بشكل حصري، ويجب أن يحتوي 100 غ من الزبدة على 80 غ من الدهون بحد أدنى و16 غ كحد أقصى من الماء والمواد الصلبة غير المحتوية على الحليب (Augustin و Versteeg، 2006).

تبلغ كثافة الزبدة 0.911 غ/سم³، وعادة ما يكون لون الزبدة أصفر باهت، لكنّه يختلف من الأصفر الغامق إلى الأبيض تقريباً. فالزبدة ذات اللون الأبيض تنتج في الشتاء وذلك بسبب تغذية الحيوانات على الأعلاف المركّزة والمالئة مثل النخالة والتبن والعلف المركب. أمّا الزبدة ذات اللون الأصفر تنتج في أيام الربيع والصيف نتيجة غذاء الحيوانات على الأعلاف الخضراء التي تحتوي على نسبة عالية من الكاروتين الذي يكسب الزبدة اللون الأصفر. أمّا في عمليات التصنيع التجارية عادة ما يتم استخدام ملونات الطعام مثل الكاروتين (Glenn، 2018).

تقسم الزبدة بحسب نوع القشدة التي صُنعت منها والاختلافات في عملية التصنيع إلى (Deosarkar وزملاؤه، 2016):

1- زبدة القشدة المبسترة:

- الطازجة: عادة ما تكون مصنوعة من قشدة حلوة، هذه الزبدة لها نكهة أكثر اعتدالاً من تلك المصنوعة من القشدة غير المبسترة.
- المسواة: وهي مصنوعة من قشدة مبسترة ومخمّرة بيولوجياً بإضافة بادئات بكتيرية متخصصة لإنتاج حمض اللبن ومواد النكهة، وهذا النوع من الزبدة ذو نكهة أفضل.

هذا النوع من الزبدة المبسترة يحتفظ به لعدة أشهر مقارنة مع الزبدة المصنّعة من قشدة غير مبسترة التي تعد ذات صلاحية تقارب العشرة أيام.

2- زبدة القشدة غير المبسترة: تعرف في الولايات المتحدة الأميركية باسم زبدة الألبان

هذه الزبدة تُصنّع في المزارع. عادة ما تكون مصنّعة من القشدة الحامضة غير

المبسترة، تحتوي هذه الزبدة عموماً على نكهة حامضية نظراً لوجود نسبة عالية من الحمض في القشدة.

- كما تقسم الزبدة بحسب درجة حموضة القشدة المستخدمة في التصنيع إلى:

1- زبدة القشدة الحلوة: وهذا يشمل الزبدة التي لم تتم إضافة أي بادئات بكتيرية لتعزيز

محتوى النكهة وبالتالي لا تتجاوز حموضة القشدة المصنعة منها الزبدة 0.20 %.

2- زبدة القشدة الحامضة: مصنعة من القشدة المسواة التي تحتوي على أكثر من

0.20 % الحموضة.

- كما تقسم الزبدة بحسب وجود الملح فيها إلى:

1- زبدة غير مملحة: هذا النوع من الزبدة لا يحتوي على الملح، عادة ما يتم إعداده

لتصنيع منتجات أخرى مثل السمن.

2- زبدة مملحة: تحتوي في تركيبها 0.5 - 2 % كلور الصوديوم، يضاف إليها الملح

لتحسين النكهة والحفاظ على جودة الزبدة.

2-3-1- تركيب الزبدة وقيمتها الغذائية:

تحتوي الزبدة أكثر من 82 % مادة دهنية تتجلى أهميتها في كونها مصدر للطاقة والمواد

الغذائية ومكون غذائي مهم يوفر خصائص في القوام والنكهة مرغوبة. تتوزع كما يلي: 70 %

من الأحماض الدهنية المشبعة، و 25 % من الأحماض الدهنية غير المشبعة الاحادية، و 5 %

من الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة (Jensen، 2002)، أما القسم الثاني فيتألف من

الماء والمواد الجافة اللادھنية. 14- 16 % من الماء مصدره من بلازما الحليب، بينما يأتي

قسم آخر من الماء المضاف أثناء غسل وعجن الزبدة. أما الجزء اللادھني فيشكل نسبة

0.4- 1.8 % يأتي من الحليب. يتم التحكم إلى حد كبير في نسبة المكونات الرئيسية في الزبدة بواسطة طريقة التصنيع، وبالتالي تحدث الاختلافات التركيبية اعتماداً على نوع الزبدة، والتي قد تتم تغطيتها في إطار أنظمة التصنيف المختلفة (أبو غرة و هدا، 1998).

تمتلك الزبدة قيمتين عاليتين غذائية وبيولوجية، تعد الزبدة غذاء عالي السعرات الحرارية حيث يوفر 100 غرام من الزبدة حوالي 700 كيلو كالوري، وهي غنية للغاية بالمعادن مثل الكالسيوم والفوسفور والبوتاسيوم، وتحتوي كمية جيدة من الصوديوم وكميات صغيرة من الفلورايد والسيلينيوم والزنك والمغنيسيوم. كما أنَّها غنية بفيتامين A وفيتامين E وريبوفلافين ونياسين وبانتوثنيك. ولديها فيتامين K وفيتامين B12 بكميات صغيرة. وكذلك تحوي على الكوليسترول الذي يلعب دوراً هاماً في تصنيع الحموض الصفراوية والهرمونات الجنسية، وتتميز بمعدل هضم مرتفع يبلغ نحو 97 % للدهن و94 % للجوامد اللادھنية. يرد التكوين الغذائي للزبدة في الجدول رقم (1):

الجدول (1): التركيب الغذائي للزبدة
(Deosarkar وزملاؤه، 2016)

المادة	لكل 100 غرام
السرعات الحرارية (كيلو كالوري)	744
الدهن / غ/	82
الأحماض الدهنية المشبعة	52.1
غير المشبعة الأحادية	20.9
غير المشبعة المتعددة	2.8
الأحماض الدهنية غير المشبعة	2.9
البروتين / غ/	0.6
السكريات / غ/	0.6
فيتامين B12 / ميكروغرام/	0.3
ريبوفلافين / ملغ/	0.07
بانتوثنيك	0.05
كاروتين β / ميكروغرام/	608
فيتامين D / ميكروغرام/	0.9
فيتامين E / ملغ/	1.85
الصوديوم / ملغ/	606*
بوتاسيوم / ملغ/	27
كالسيوم / ملغ/	18
مغنيزيوم / ملغ/	2.0

* تحتوي الزبدة غير المملحة على 9 ملغ من الصوديوم لكل 100 غ

2-3-2- طرائق صناعة الزبدة:

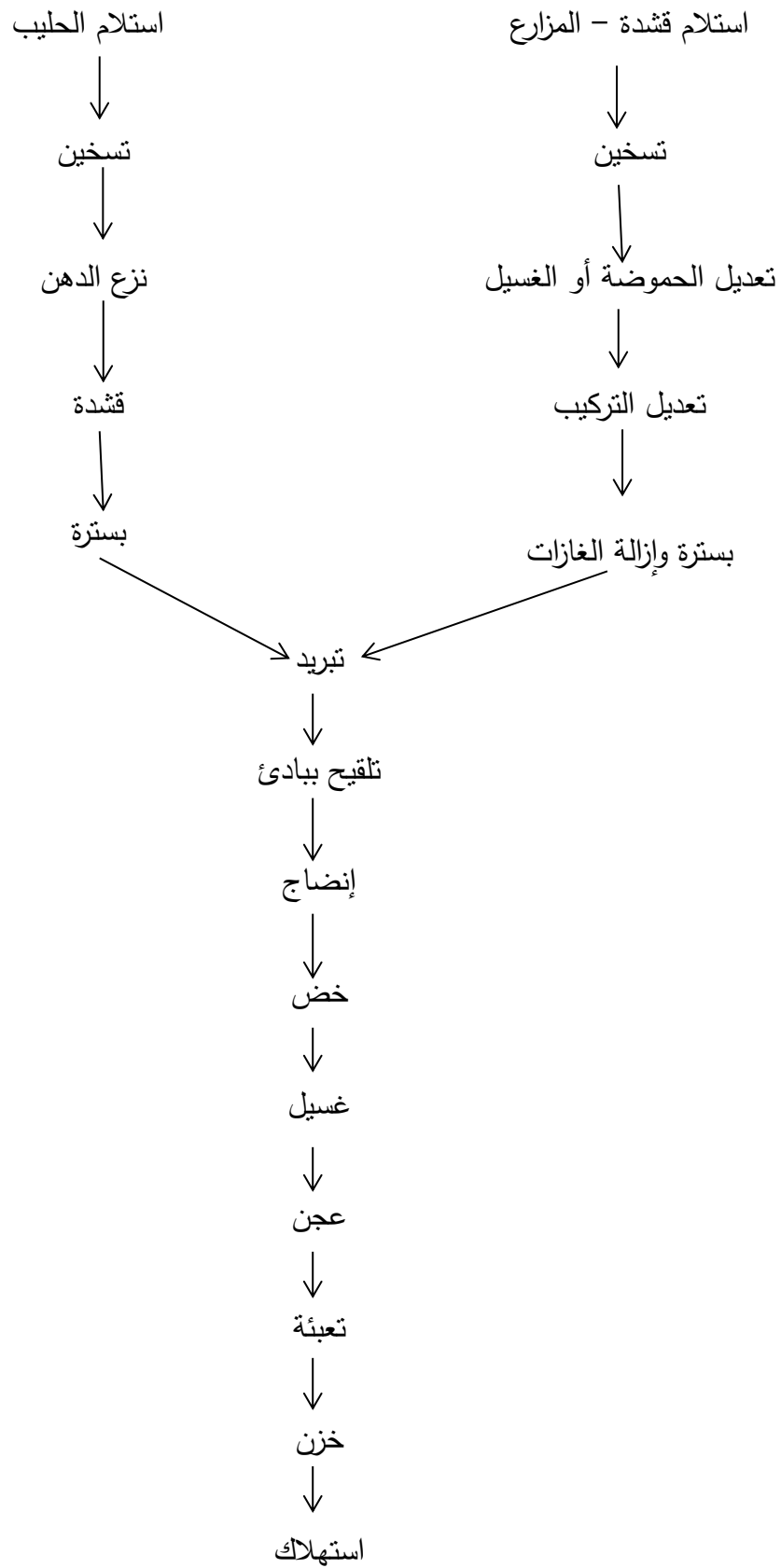
إنَّ حبيبات الدهن الجودة في الحليب تكون على شكل كريات مجهرية، تحاط بأغشية مصنوعة من الفسفوليبيد (مستحلبات الأحماض الدهنية) والبروتينات، مما يمنع حبيبات الدهن من التجمع معاً في كتلة واحدة. يتم إنتاج الزبدة عن طريق المزج بقوة، مما يؤدي إلى إتلاف هذه الأغشية ويسمح لحبيبات الدهن بالتكتل معاً، منفصلة عن الأجزاء الأخرى من الحليب. تؤدي الاختلافات في طريقة الإنتاج إلى الحصول على زبدة بتركيب مختلف، ويرجع ذلك في الغالب إلى تكوين الدهن في المنتج النهائي. تحتوي الزبدة على الدهن بثلاثة أشكال منفصلة: الدهون الحرة، بلورات الدهن، والكريات الدهنية المتماسكة. في المنتج النهائي، تؤدي نسب مختلفة من هذه الأشكال إلى تركيب مختلف من الزبدة، حيث تعد الزبدة التي تحتوي العديد من بلورات الدهن ذات قوام أكثر قساوة من الزبدة التي تسيطر عليها الدهون الحرة (Jost، 2002).

تحتوي الزبدة المصنَّعة تجارياً حوالي 80 ٪ زبدة و 15 ٪ ماء، أما الزبدة المصنَّعة بالطرائق التقليدية تحتوي على نسبة أقل من الدهون تصل إلى 65 ٪ و 30 ٪ من الماء.

حتى الحرب العالمية الثانية، كانت القشدة تجمع عادة من عدة أنواع من الحليب، وبالتالي كان عمرها عدة أيام، ويتم تخميرها إلى حد ما في وقت تصنيعها. حيث تعرف الزبدة المصنَّعة من قشدة مخمره باسم الزبدة المسواة (المنضجة). أثناء التخمير، تفسد القشدة بشكل طبيعي حيث تقوم البكتيريا بتحويل سكريات الحليب إلى حمض اللبن. تنتج عملية التخمير مركبات عطرية إضافية، بما في ذلك ثنائي الأستيل، والذي يكسب الزبدة نكهة أفضل تلبي رغبة وأنواق المستهلك (Deosarkar وزملاؤه، 2016). أمّا في المصانع الحديثة، تصنَّع الزبدة المسواة عادة من قشدة مبسترة بهدف تأمين المادة النهائية بنوعية ميكروبيولوجية وفيزيائية وكيميائية وحسية

ثابتة، وتحويل المادة الأولية ضمن الشروط التكنولوجية والاقتصادية المثلى، ثم تُلَقَّح ببادئ (بكتيريا منتخبة منتجة لحمض اللبن) من أجل إنضاج القشدة وتسويتها. ليس من الضروري بشكل دائم أن تتم عملية الإنضاج، حيث يمكن الحصول على زبدة دون القيام بهذه العملية، وتسمى الزبدة الناتجة في هذه الحالة بالزبدة الحلوة (أبو غرة و هدا، 1998).

تفضل معظم شعوب العالم استهلاك الزبدة المبسترة المسواة، حيث تعتمد صناعتها كما هو موضح في المخطط رقم (2)، على بسترة القشدة الطازجة أو القشدة التي عودلت حموضتها، ثم تبرّد وتُلَقَّح ببادئ بكتيري لإنتاج حمض اللبن ومواد النكهة الأخرى، ثم تجري عملية الخض للقشدة وتفصل الزبدة منها وتغسل وتعجن وتقطع وتعبأ (أبو غرة و هدا، 1998).



المخطط (2): خطوات صناعة الزبدة المبسترة
(أبو غرة و هدا، 1998)

هناك مجموعة من الإجراءات الواجب مراعاتها أثناء تصنيع الزبدة (Parmar وزملاؤه، 2018):

1- تنظيم المحتوى من المادة الدسمة: بين 25- 40 %، تطبق هذه العملية عندما

نستخدم قشدة مختلفة ومتنوعة المصادر.

2- معادلة الحموضة الزائدة: تطبق عندما يراد بسترة القشدة المحفوظة والتي يخشى من

ارتفاع حموضتها، الحموضة المستهدفة 15- 20 °D.

3- غسل القشدة: بهدف التخلص من المواد اللادهنية المتحللة، يتم الغسل بتمديد

بالماء حتى 1- 2 مرة من حجمها، ثم يطبق الطرد المركزي للتخلص من الماء.

4- البسترة في المبادلات الصفائحية:

يجب أن تطبق بأسرع وقت ممكن بعد الفرز للحد من احتمالية تفسخ وتحلل الدهن.

- للقشدة الجيدة : 90 - 95 °م / 15 - 20 ثانية.

- للقشدة الرديئة: 100 - 110 °م، بهدف تنشيط فعالية أنزيم الليباز الميكروبي وتشكيل

مجموعات SH ذات الفعالية المضادة للأكسدة.

5- التخلية وإزالة الغازات: تتم على مرحلتين :

الأولى: مباشرة قبل البسترة (70 - 75 °م) بضغط 70 ملم زئبقي، بهدف التخلص من الغازات

الدائبة في القشدة وخفض الأخطار اللاحقة من اتساخ الأجهزة المسخنة.

الثانية: تطبق بعد الحجز أثناء البسترة holding 90- 100 °م عند ضغط 40 ملم زئبقي، للحد

من احتمال حدوث طعم مطبوخ.

6- الانضاج الفيزيائي:

عند تحويل القشدة إلى زبدة بطريقة الخضاض فإن هذه العملية لا تجري مباشرة بعد البسترة، ومن الضروري الانتظار فترة معينة مما يؤدي إلى تصلب جزئي لحبيبات الدهن مع تبلور جزئي للغليسيريدات الثلاثية. وبالتالي فإن بقاء القشدة على درجة حرارة من 5- 6 °م لمدة ساعتين يهدف إلى تأمين المردود المناسب من الزبدة، تنظيم كمية المادة الأولية المعاملة وخفض معدل الرطوبة للقشدة بغية السماح بمضافات ممكنة (Burke وزملاؤه، 2018).

• تتألف عملية الانضاج الفيزيائي للقشدة من سلسلة من المعاملات الحرارية والتي تهدف

رئيسياً إلى غرضين (أبو غرة و هدا، 1998):

- الحصول على علاقة ملائمة من المكونات الصلبة والسائلة للدهن للحصول على تحول جيد أثناء الخض، حيث يكون الخض سريعاً ونسبة الفقد في الدهن تكون قليلة.

- توجيه تصلب الدهن للحصول على زبدة ذات قوام جيد.

الجدول (2): أهمية الدورات الحرارية للإنضاج الفيزيائي

(Burke وزملاؤه، 2018)

نوع الزبدة	مادة دسمة سائلة	مادة دسمة صلبة
طرية	85 %	15 % بلورات ذات نقطة انصهار مرتفعة
قاسية	55 %	45 % بلورات ذات نقطة انصهار مرتفعة ومنخفضة
امكانية مد جيدة	65-78 %	25-35 %

7- الانضاج الحيوي:

الانضاج الحيوي التقليدي :

الإنضاج الحيوي للقشدة، نوع من التخمرات اللبنية يطبق بإضافة بادئ بكتيريا حمض اللبن منتخبة بنسبة 3- 6 % للسماح بالوصول لرقم حموضة من 4.7 - 4.8 (Deosarkar وزملاؤه، 2016).

من محاسنها: - ارتفاع الحموضة وبالتالي خفض فقد المادة الدسمة مع المخيض.

- وجود مادة ثنائي الأستيل بتركيز يتراوح بين 1 - 1.5 ملغ/ كغ يعطي نتائج جيدة تؤثر

إيجاباً في طعم ونكهة الزبدة. المشكلة في انتاج ثنائي الأستيل وفي بقاءه في الزبدة

تكمن في أنّ هناك بعض الميكروبات الملوثة تعمل على ارجاع هذه المادة.

يعتبر الانضاج الحيوي التقليدي على درجة حرارة تتراوح بين 9 و 15 °م لمدة 12 ساعة، ضروري للحصول على زبدة ذات نكهة جيدة.

من مساوئها : مخاطر أكسدة للزبدة الناتجة وانتشار طعم معدني وانخفاض مدة حفظها.

الانضاج الحيوي المُحسّن:

تضاف بكتيريا حمض اللبن بعد التبلور المعتدل نسبياً والمكمل بإعادة الحقن خلال العجن

بمساعدة البكتيريا الغنية بالمادة الصلبة أو خليط بكتيريا اللبن وهذا ما يسمح بتلبية المتطلبات

التالية (Marino وزملاؤه، 2005):

1- تنظيم المحتوى من المواد الصلبة اللادھنية وفق المواصفات والتشريعات.

2- خفض رقم الحموضة (الدور في حماية المنتج خلال فترة الحفظ).

3- تطور وانتشار النكهة الخاصة بالزبدة بحقن البكتيريا الغنية في مادة ثنائي الأسثيل. من

سلالات بكتيريا حمض اللبن الأكثر استخداماً: *L. lactis*، *L. cremois*،

Leuc. lactis و *L. cremoris*، *L. diacetylatis*

7- آلية الخض:

- كلما كانت عملية الخض سريعة وقوية كان زمن الخض قصيراً. تكون سرعة الخضاض عادة حوالي 20-30 دورة في الدقيقة حسب كمية السائل داخل الجهاز، إضافة إلى درجة ملء الخضاض التي يجب أن لا تتعدى 40-50 % من الحجم.
- درجة الحرارة حسب الفصل في الصيف بحدود 8-10 °م وفي الشتاء 12-13 °م، حيث يتم ارتفاع تلقائي لدرجة حرارة القشدة أثناء عملية الخض.
- محتوى القشدة من المادة الدسمة (وسطياً 35-40 % دسم).
- تأثير الحموضة في طبيعة سلوك الحبيبات الدهنية حيث يحصل خض القشدة الحامضية بسرعة أكبر من القشدة الحلوة ضمن الشروط نفسها (أبو غرة و هـدال، 1998).

8- التعبئة والتخزين:

تُعبأ الزبدة في عبوات مختلفة الأحجام والأشكال وفقاً لاستعمالها التجاري:

- الزبدة المعدة للاستهلاك المباشر: تُعبأ في عبوات متفاوتة الأحجام تراوح بين 10 و 200 غ.
- الزبدة المعدة للتخزين المديد: تُعبأ بعبوات كبيرة الحجم تراوح بين 5 و 25 كغ.

تستخدم مواد متعددة لتغليف الزبدة من أهمها ورق الألمنيوم والورق البرافيني، كما يمكن استخدام المواد البلاستيكية مثل بولي فينيل كلورايد PVC والبولي إيثيلين polyethylene. يشترط في المواد المستخدمة للتغليف أن تكون غير نفاذة للماء أو الدهن أو الأوكسجين أو الضوء، ولا تتفاعل مع مكونات الزبدة، وذات قدرة توصيلية حرارية جيدة تسمح بالتبريد السريع للزبدة (Sun وزملاؤه، 2011؛ أبو غرة و هدا، 1998).

2-3-3- تدعيم نكهة الزبدة باستخدام بادئات من بكتيريا حمض اللبن:

2-3-3-1- أنواع بكتيريا حمض اللبن:

اعتماداً على دراسة Tailliez (2001)، حول تطور بكتيريا حمض اللبن، افترض أن بكتيريا حمض اللبن قد ظهرت قبل السيانوبكتيريا (cyanobacteria) التي تقوم بعملية التركيب الضوئي، والتي وجدت في رواسب تعود إلى 2.75 بليون سنة. بينما بكتيريا حمض اللبن ظهرت من قبل بـ 3 بليون سنة ، أي عندما كان الجو لا يحتوي على كمية معتبرة من الأكسجين، ومن هنا اقترح التأقلم الضعيف لبكتيريا حمض اللبن للظروف الهوائية (Teuber و Geism، 2006).

تضم بكتيريا حمض اللبن مجموعة متباينة من الأنواع البكتيرية التي تشترك في العديد من الخصائص الفسيولوجية (Hernandez وزملاؤه، 2005)، فهي بكتيريا موجبة الغرام، هوائية – لا هوائية اختياريًا، غير متحركة باستثناء *Lactobacillus agilis* والنوعين المصنفين مؤخراً *Lactobacillus ghanensis* (Nielsen وزملاؤه، 2007) و *Lactobacillus capillatus* (Chao وزملاؤه، 2008)، غير متبوعة، لا تنتج أنزيم الكاتلاز (يعمل هذا الأنزيم على تفكيك الماء الأوكسجيني إلى ماء وأوكسجين)، كما تتميز بانخفاض محتوى الغوانين +

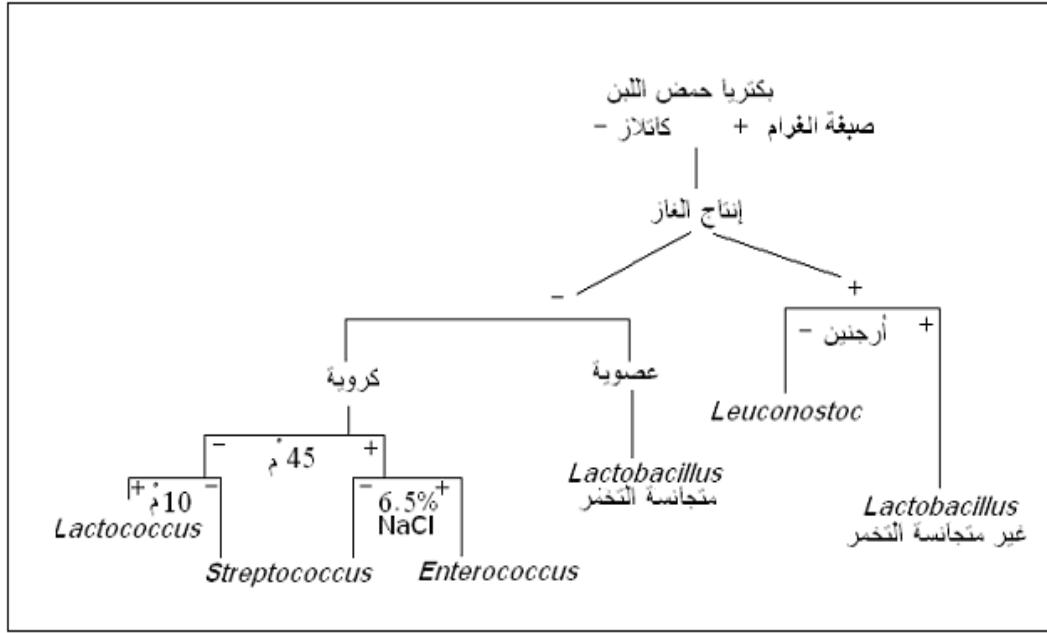
السيتوزين، ومن الناحية الشكلية فهي توجد بشكل مكورات أو عصويات، مفردة أو مزدوجة وبشكل سلاسل قصيرة أو طويلة (Kandler و Weiss، 1986). إضافة إلى أنها تعمل على تخمير السكريات ضمن ظروف لا هوائية (Salminen و Von-Wright، 1998). تشارك بعض الأنواع في عملية التخمير، إذ تعمل على تخمير سكر اللاكتوز منتجة حمض اللبن بتراكيز عالية، وبالتالي تندرج هذه الأنواع تحت اسم بكتيريا حمض اللبن البادئ (SLAB)، في حين تساهم أنواع أخرى في عملية الإنضاج، و يشار إليها باسم بكتيريا حمض اللبن غير البادئ (NSLAB) (Antonsson وزملاؤه، 2003).

تتواجد بكتيريا حمض اللبن في أوساط طبيعية متنوعة مثل: أسطح النباتات، الأغشية المخاطية للثدييات، الأمعاء، الفم، سطح الجلد، الأنبوب الهضمي، الحليب ومشتقاته، اللحم والسمك (Eneroth وزملاؤه، 1998؛ Mc Phee و Griffiths، 2002). كما ظهرت استعمالاتها منذ آلاف السنين، في صناعة الأغذية مثل الأجبان، المشروبات المخمرة، الخبز المخمر، الخضر المخمرة. تطورت صناعة الحليب بصفة معتبرة بانتخاب سلالات بكتيريا حمض اللبن، التي تشارك في ثلاث مسارات استقلابية رئيسية في تصنيع الأطعمة المخمرة وتطوير نكهتها، هي تحلل السكر، الدهون والبروتين (Hayek و Ibrahim، 2013). وعلى الرغم من أن الإجراء الاستقلابي الرئيسي هو إنتاج حمض اللبن من تخمير الكربوهيدرات، فإن بكتيريا حمض اللبن تشارك أيضاً في إنتاج العديد من المركبات المفيدة مثل الأحماض العضوية، مركبات النكهة والمركبات المضادة للميكروبات وغيرها، وبالتالي لديها عدد كبير من التطبيقات في صناعة الأغذية (مثل مزارع البادئات) (Bintsis، 2018 b). مع التقدم في علم الوراثة والبيولوجيا الجزيئية وعلم وظائف الأعضاء والكيمياء الحيوية وكشف ونشر تسلسل الجينوم الكامل لعدد كبير من بكتيريا حمض اللبن، ظهرت تطبيقات جديدة لهذه البكتيريا تضم مجموعة متنوعة من

البادئات التجارية والوظيفية والحيوية تمّ تسويقها مع خصائصها المرغوبة (Wedajo، 2015). لذلك سعى العلماء خلال السنوات الأخيرة إلى دراسات عدة لأنواع بكتيريا حمض اللبن الموجودة في الفلورا الطبيعية للمنتجات التقليدية من أجل الاستفادة منها في الحصول على منتجات الألبان التي توافّق ذوق المستهلك المحلي (Donnelly، 2004؛ Bintsis و Athanasoulas، 2015). تبين من خلالها أنّ العديد من أنواع بكتيريا حمض اللبن المعزولة من الحليب الخام تنتمي إلى الأجناس التالية: *Enterococcus*، *Lactobacillus*، *Lactococcus*، *Leuconostoc* و *Pediococcus* (Franciosi وزملاؤه، 2009). علاوة على ذلك، فإنّ بعض مزارع البروبيوتيك هي في الغالب أعضاء في جنس *Bifidobacterium*، الذي ينتج أيضاً حمض اللبن كواحد من منتجات التخمير النهائية الرئيسية، ومع ذلك، من وجهة النظر التصنيفية، فهي أعضاء في *Actinobacteria*. بالإضافة إلى ذلك، بكتيريا *Enterococcus* spp. تبين أنّها جزء من العديد من الكائنات الحية الدقيقة المخمرة للغذاء، ولكن نظراً لأنّها قد تسبب عدداً من العدوى وقد تكتسب آليات مقاومة للمضادات الحيوية، لا يتم استخدامها بشكل شائع كمزارع بادئات (Broadbent وزملاؤه، 2003).

2-3-2- تصنيف بكتيريا حمض اللبن:

تقليدياً وضع العالم Orla-Jensen أسس التصنيف في عام 1919، استناداً إلى الخصائص الشكلية والمورفولوجية المميزة لبعض أجناس بكتيريا حمض اللبن، كما هو مبين في المخطط (3)، ومازالت هذه الأسس مستخدمة حتى الآن (رغم إدخال بعض التعديلات).



المخطط (3): الخصائص الأساسية المميزة بين بعض أجناس بكتيريا حمض اللبن

(Herbin و Revol، 1999)

إلا أن الطبقات الأحدث لدليل بيرجي تفصل العالم البكتيري إلى 35 مجموعة. بكتيريا حمض اللبن توجد في المجموعة 17 (شكل كروي، غرام موجب)، في المجموعة 19 (عصيات منتظمة، غرام موجب، غير متبوعة) و في المجموعة 20 (عصيات غير منتظمة، غرام موجب، غير متبوعة) (Vignola، 2002).

تجمع بكتيريا حمض اللبن 13 جنس بكتيري مختلف حسب Labioui وزملاؤه (2005)؛ Thonart و Dortu (2009) هي: *Lactobacillus*، *Bifidobacterium*، *Leuconostoc*، *Lactococcus*، *Enterococcus*، *Pediococcus*، *Streptococcus*، *Carnobacterium*، *Oenococcus*، *Aerococcus*، *Weissella*، *Vagococcus* و *Tetragenococcus*.

الأجناس الأكثر دراسة هي: *Lactobacillus*، *Leuconostoc*، *Lactococcus*، *Streptococcus*، *Pediococcus*، *Enterococcus* (Drouault و Corthier، 2001).

بينما تعتمد الطرائق الحديثة لتصنيف بكتيريا حمض اللبن على محتواها من المادة الوراثية والأحماض النووية DNA، تعد هذه الطرائق ذات دقة أكبر في تحديد الأنواع وتحت الأنواع التي تمتلك تنوعاً واختلافاً كبيرين في المادة الوراثية يساعدان في تمييزها عن بعضها (Bae وزملاؤه، 2005).

تتميز منتجات الألبان والأجبان المتخمرة بخصائص مختلفة، وبالتالي يتم استخدام مزارع بادئات مختلفة في تصنيعها. يمكن تصنيف مزارع البادئات وفقاً لدرجات حرارة النمو المفضلة لديهم: الأحياء الدقيقة المحبة للحرارة المتوسطة (Mesophilic) وهي التي تنمو في درجات حرارة من 20-30 م°، والأحياء الدقيقة المحبة للحرارة المرتفعة (Thermophilic) وهي التي تنمو في درجات حرارة 40-45 م°، موضحة في الجدول رقم (3):

الجدول (3): تصنيف مزارع البادئات وفقاً لدرجات حرارة النمو المفضلة

(Bakirci وزملاؤه، 2002)

الأحياء الدقيقة المحبة للحرارة المتوسطة	الأحياء الدقيقة المحبة للحرارة المرتفعة
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp.
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	<i>Lactobacillus delbriickii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>diacetylactis</i>	<i>Lactobacillus delbriickii</i> ssp. <i>lactis</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>lactis</i>	
<i>Leuconostoc cremoris</i>	
تستخدم في صناعة الزبدة وجبن الكوتاج	تستخدم في صناعة اللبن

2-3-3- إنتاج مزارع البادئ:

يضمن استخدام مزارع البكتيريا، المعروفة باسم "البادئات"، الحصول على طعم وجودة موثوق بهما، كما تعتمد عملية تخمر أي نوع من منتجات الألبان المتخمرة بصورة رئيسية على نقاوة ونشاط مزرعة البادئ، وذلك إذا كان الحليب أو بيئة النمو خالية من العوامل المثبطة مثل المضادات الحيوية أو الفاج (شحاتة، 1997).

أجريت دراسات عدة حالياً، بهدف تطوير مزارع بادئات جديدة لإنتاج الأطعمة المتخمرة، التي يمكن أن تلبي طلبات المستهلكين المتغيرة وتوقعاتهم للمنتجات الآمنة ذات الخصائص المحددة، من خلال تكوين مزارع بادئات معزولة من مصادر عدة طبيعية أو عن طريق الهندسة الوراثية للعلزلات الموجودة (Borner وزملاؤه، 2019). تتوفر مجموعة متنوعة من التقنيات التي تتضمن الانتقاء الطبيعي والتطوير لتعزيز أداء السلالات الموجودة، بما في ذلك عزل الطفرات مع الخصائص المطلوبة، التطور المخبري الكيفي، تعديل الجينوم وتحرير الجينوم. ومع ذلك، بالنسبة للتطبيقات الغذائية، فإن تقنية الحمض النووي مقيدة بشدة بالقوانين، ومنظور المستهلك سلبي تجاه الكائنات المعدلة وراثياً (Borner وزملاؤه، 2019؛ Derkx وزملاؤه، 2014). وبالتالي، يعتمد هذا المجال بشكل أساسي على الطرائق الكلاسيكية والشاقة القائمة على الانتقاء والتطور الطبيعي والتي تعتبر غير معدلة وراثياً (Johansen، 2018؛ Zeidan وزملاؤه، 2017).

تنقسم البادئات المستخدمة إلى مزارع بادئات من سلالة محددة ومختلطة. البادئات ذات السلالة المحددة هي بادئات نقية ذات خصائص فسيولوجية وتكنولوجية معروفة، تتكون من 2-6 سلالات، تستخدم في التناوب كسلالات مفردة مقترنة أو كسلالات متعددة وتمكن من الإنتاج الصناعي لمنتجات عالية الجودة. بينما تحتوي مزارع السلالات المختلطة على عدد غير

معروف من السلالات من نفس النوع وقد تحتوي أيضاً على بكتيريا من أنواع أو أجناس مختلفة (Bintsis و Athanasoulas، 2015). الغرض من وجود مزيج من سلالات البادئات هو إعطاء أفضل نتيجة مرجوة من التعايش معاً، وليس التنافس مع بعضها البعض، لذلك يجب أن تكون خصائصها مكملية لبعضها البعض (Fanous، 2011).

تُستخدم مزارع البادئات، في صناعة اللبن والكفير ومنتجات الألبان المخمرة الأخرى وكذلك في صناعة الزبدة والجبن. يضاف البادئ إلى المنتج ويسمح له بالنمو هناك في ظل ظروف خاضعة للرقابة. في أثناء فترة التخمير، تنتج بكتيريا البادئ مواد تكسب المنتج المخمر خصائصه المميزة مثل الحموضة (pH) والنكهة والرائحة والقوام. انخفاض درجة الحموضة، والذي يحدث عندما تخمر بكتيريا البادئ اللاكتوز إلى حمض اللبن، له تأثير أيضاً في إطالة فترة حفظ المنتج، وفي نفس الوقت يتم تحسين القيمة الغذائية والهضم. في البداية كانت تجهز المزارع في الحليب المضاف إليه كربونات الكالسيوم ليتعادل جزئياً مع الحمض المتكون، هذه المزارع السائلة يكون لها فترة حفظ قصيرة (أقل من أسبوع)، واستبدلت تدريجياً بواسطة المزارع المجففة تحت تفريغ والتي تتميز بفترة حفظ أطول ولكن تحتاج إلى عدة تنشيطات لتحضير الكميات الضرورية والمطلوبة لإنتاج بادئات الإضافة (الصناعة). وعادة تستخدم المزارع بمعدل 1-2 % (Robinson، 2002). وفي منتصف الستينيات استبدلت المزارع المجففة تحت تفريغ vacuum dried culture بالمزارع المجمدة المركزة frozen concentrated culture حيث تحتفظ هذه المزارع بنشاطها لفترة طويلة تصل إلى عدة شهور بالتخزين تحت ظروف التجميد و لا تحتاج عملية تنشيط sub culturing وإنما تستخدم مباشرة لتلقيح بيئة بادئ الإضافة. وفي خلال العشر سنوات الماضية وجد أن التجفيد freeze drying له تأثير مماثل للتخزين المجمد في المحافظة على أعداد كبيرة من الخلايا مع قدرات جيدة لإنتاج الحموضة، ولكن لسوء الحظ

فإن جميع المزارع ليست مقاومة للتجفيد وعادة تضاف المواد الواقية من التجميد cryoprotective agent إلى المزارع قبل التجفيد (Fanous، 2011).

كما أمكن إنتاج مزارع فائقة التركيز super concentrated cultures لاستخدامها في التلقيح المباشر للحليب المعد لصناعة الجبن بطريقة مماثلة، هذه المزارع مرتفعة التكاليف ولكنها تستخدم بكثرة في المصانع الصغيرة حيث لا تحتاج إلى وسائل إنتاج بادئات الإضافة. يحتوي بادئ الإضافة على أعداد من البكتيريا حوالي 10^9 /مل حيث أن المزارع المركزة والفائقة التركيز تحتوي على حوالي 10^{10} خلية/غ، 10^{13} خلية/غ على التوالي (شحاتة، 1997).

2-3-3-4- إنتاج الزبدة المسواة بإضافة بكتيريا حمض اللبن كبادئ:

تساهم مزارع البادئات المستخدمة في إنتاج منتجات الألبان المتخمرة دوراً رئيسياً في جودة المنتج النهائي فيما يتعلق بالحفظ والجودة الحسية والقيمة الغذائية (Picon، 2018). يعتمد التأثير على جودة المنتج بشكل كبير على السلالة والاختلافات بين السلالات فيما يتعلق بوجود ونشاط المسارات الاستقلابية (Van Hylckama وHugenholtz، 2007).

يُعد تخمر منتجات الألبان إحدى التقنيات القديمة التي تُسخر الأحياء الدقيقة وإنزيماتها لتحسين الغذاء، فالأطعمة المتخمرة تبقى محفوظة بشكل أفضل، وذات نكهة وقوام وروائح محسنة وقد تمتلك منافع صحيّة محددة تشمل قابلية الهضم (Ljungh وWadstrom، 2009). إلا أن عيب النكهة الرئيسي في العديد من منتجات الألبان المنضجة هو عدم وجود ثنائي أستيل كافي. لذلك عادة ما يتطلب تصنيع الزبدة عالية الجودة نمواً كافياً لمزارع بادئات السلالات المختلطة التي تحتوي بشكل خاص على بكتيريا *Leuco. cremoris*، وبكتيريا *lactococcus spp.* وغيرها من الأنواع المنتجة لحمض اللبن (Vedamutha، 1985).

يجب أن يتم إنتاج الزبدة المسواة ضمن ظروف خاضعة للرقابة لأنَّ العملية معقدة وبالتالي هناك حاجة للاهتمام الكبير. تقليدياً، حافظت الشركات المُصنَّعة لمنتجات الألبان المتخمرة على مخزونها من مزارع البادئات، وانتجت اللقاحات البكتيرية، إلا أنَّ هذه الإجراءات قد تؤدي إلى مخاطر التلوث. لذلك، تمَّ إضافة مزارع البادئات مباشرة إلى القشدة المعدة لصناعة الزبدة، مما ساهم في السيطرة على المزارع البكتيرية وضمان الوصول إلى الحموضة المثالية وإعطاء المنتج النكهة المميزة (Sun وزملاؤه، 2011).

مكونات النكهة ذات الأهمية الكبيرة في منتجات الألبان المتخمرة هي حمض اللبن وثنائي الأستيل. حمض اللبن يضيف الطعم الحامضي اللطيف، بينما تنسب النكهة المميزة إلى ثنائي الأستيل. يتكون ثنائي الأستيل في منتجات الألبان من خلال تخمير سترات الحليب بواسطة بعض أنواع بكتيريا حمض اللبن، أهمها *L. cremoris*، *Leuco. mesenteroides*، *Leuco. cremoris* و *L. lactis subsp. diacetylactis* (Gajjar وزملاؤه، 2015).

كثيراً ماستخدم بكتيريا *Leuconostoc spp.* في مزارع البادئات المحبة لدرجة الحرارة المتوسطة (حرارة من 20 - 30 م°) لإنتاج النكهة خلال تخمير الحليب أثناء صناعة الزبدة، نظراً لقدرتها على إنتاج CO_2 الذي يوفر النعومة والقوام الأملس للزبدة المصنَّعة (Vedamuthu، 1994) وإنتاج مركبات النكهة ثنائي الأستيل والأسيتوين، عن طريق التخمير غير المتجانس للاكتوز واستقلاب السترات. حيث تخمر السكريات عبر مسار الفسفوكيتولاز (Cogan وزملاؤه، 1981)، و تستقلب السترات إلى CO_2 ، خلات، ثنائي الأستيل، أسيتوين و 2،3- بوتيلين جليكول (Schmitt و Divies، 1990). إلا أنَّ أنواع *Leuconostoc spp.* المستخدمة في مزارع البادئات لها قدرة ضعيفة على تخمر اللاكتوز (Sandine وزملاؤه، 1992)، ونظراً

لإنخفاض درجة الحموضة المثلى لتخمير السترات، لا يحدث إنتاج ثنائي الأسيتيل بواسطة هذه البكتيريا إلا بعد خفض درجة الـ pH إلى أقل من 6.0، لذلك لابد أن يترافق وجودها مع الأنواع البكتيرية المنتجة لحمض اللبن وأهمها (*Lb. bulgaricus*، *L. lactis*، *L. cremoris* و *L. diacetylactis*). يتميز *L. diacetylactis* بشكل خاص، أنه قادر على إنتاج ثنائي الأسيتيل من سترات الحليب حتى في غياب الأنواع المنتجة للحمض، بسبب قدرته المرتفعة على تخمير اللاكتوز (Vedamuthu وزملاؤه، 1986؛ Ayad وزملاؤه، 2001). هذا التعاون المشترك بين السلالات يوفر إمكانيات جديدة لبناء مزارع بادئات مصممة خصيصاً لتعزيز خصائص النكهة، لأنه يوضح أن أنشطة الإنزيم المطلوبة في مسار نكهة معينة والتي تؤدي إلى النكهة ليس من الضروري أن تكون موجودة في سلالة واحدة (Smit وزملاؤه، 2005).

كما تمتلك بكتيريا *Lactococcus* spp. بشكل خاص *L. lactis* ssp. *lactis* (المعروف سابقاً باسم *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*) قدرة عالية على إنتاج ثنائي الأسيتيل والأسيتوين من السترات، مما يؤدي إلى استخدامها على نطاق واسع كمنتج مميز للنكهة في العديد من مزارع البادئات المستخدمة في صناعة منتجات الألبان المتخمرة. لتعزيز هذه القدرة على إنتاج مركبات النكهة، أجريت العديد من الدراسات بهدف عزل طفرات من *L. lactis* ssp. *lactis* ودراسة العوامل المختلفة التي تؤثر على إنتاج ثنائي الأسيتيل (Marino وزملاؤه، 2005؛ Obermann وزملاؤه، 1982؛ Kuila و Ranganathan، 1998).

في دراسة من قبل Levata - Jovanovic و Sandine (1997)، تم اختيار بكتيريا *Leuc. mesenteroides* ssp. *cremoris* 91404 كمنتج للنكهة في إنتاج الزبدة التجريبية، بالاعتماد على أساس النشاط المنخفض من diacetyl reductase، واستخدام السترات وإنتاج ثنائي

الأسيتيل العالي تحت الظروف الحمضية وخصائص النمو، وبالاشتراك مع سلالات *L. lactis* spp. بيّنت الدراسة زيادة كبيرة في إنتاج الأسيتيل والأسيتوين أثناء تخزين الزبدة (5 °م لمدة 2 أسبوع)، حيث ساهم تدعيم حليب الزبدة المسواة مع سترات الصوديوم وتخزين الزبدة على درجة الحرارة المنخفضة في تسهيل عملية استقلاب السترات نحو إنتاج وحفظ النكهة خلال 2 أسبوع من التخزين، كما بيّنت الدراسة أنّ دمج *L. lactis* spp مع *Leuc. mesenteroides* ssp *cremoris* 91404 في مزارع البادئ حسن بشكل كبير الملمس ومظهر الزبدة المصنّعة التجريبية.

بيّن أيضاً Monnet وزملاؤه (1994)، أنّ تواجد *L. lactis* ssp. *lactis* بمفردها في مزارع البادئات أثناء إنتاج الزبدة، كمنتج للنكهة مرتبط بكميات زائدة من الأسيتيل الدهيد، وبالتالي أدى إلى انتاج النكهات القاسية.

كذلك كان لبكتيريا حمض اللبن غير البادئ *Lb. paracasei* و *Lb. plantarum* تفاعل تآزري مع *Lactococcus* spp. (Ortigosa وزملاؤه، 2006)، وبالتالي يمكن القول بأنّ التأثير المتغير لبكتيريا حمض اللبن غير البادئ يعتمد على نوع البادئ المستخدم (Skeie وزملاؤه، 2008).

أجريت دراسة من قبل Bakirci وزملاؤه (2002)، بهدف مقارنة تأثير أربعة سلالات مختلفة من بكتيريا *L. lactis* ssp. *cremoris*، *L. lactis* ssp. *lactis*، *Leuconostoc* spp. و *L. lactis* ssp. *lactis biovar diacetylactis* استخدمت في تكوين ثلاثة بادئات، على إنتاج ثنائي الأسيتيل في الزبدة خلال فترة 4 أشهر. قدرت الحموضة، الدهن، الرطوبة ومحتوى ثنائي الأسيتيل من العينات المأخوذة. بيّنت الدراسة أنّ جميع العينات المأخوذة من الزبدة التجريبية

احتوت على نسبة دهن تراوحت بين 82 و 83 % ومحتوى رطوبة تراوح بين 14 و 15 %. كانت القيم ضمن المعايير القياسية للزبدة، ولم تكن هناك فروق ذات دلالة إحصائية بين محتويات الدهن والرطوبة في العينات المأخوذة. ولم يكن لنوع البادئ تأثير على إنتاج الحمض، قد يكون السبب هو أنَّ جميع مزارع البادئات المستخدمة لديها خصائص نمو مماثلة. أمّا فيما يتعلق بإنتاج ثنائي الأستيل كان هناك فروق ذات دلالة إحصائية بين العينات المختبرة يعود ذلك إلى اختلاف قدرة السلالات البكتيرية المستخدمة على تخمير اللاكتوز واستقلاب السترات وبالتالي إنتاج ثنائي الأستيل.

2-3-4- الأهمية الاقتصادية للزبدة والاستعمالات المختلفة:

لصناعة الألبان، ومن بينها صناعة الزبدة، دور مهم في اقتصاديات كثير من بلدان العالم مثل هولندا ونيوزيلندا وفرنسا وغيرها. ومما يزيد من أهمية الزبدة تعدد مجالات استخدامها، فهي إضافة للاستخدام المباشر في التغذية اليومية، تستخدم في أغراض الطبخ المنزلي وفي صناعة الحلويات والمعجنات والمثلجات، إذ تُضيف إلى هذه المنتجات نكهات غنية ومميزة (Kawanari، 1992). وعلى الرغم من أنَّ الزبدة تمَّ إنتاجها بنجاح في المصانع التجارية على نطاق واسع، إلا أنَّ المنتجات الصغيرة الحجم لا تزال موجودة في المجتمعات الصغيرة واستخدامها في المنتجات المتخصصة (Shi، 2015).

من حيث القيمة الاقتصادية وكذلك من حيث التغذية، تعتبر الزبدة من منتجات الألبان المهمة. بخلاف الدهون والزيوت الأخرى، تتكون الزبدة من أحماض دهنية أحادية و متعددة غير مشبعة وعدد كبير من الأيزومرات، بالإضافة إلى أحماض دهنية جزيئية منخفضة وعالية. إضافة إلى ذلك، فإنَّ الأحماض الدهنية المشبعة مع جزيئات الكربون 4 و 6 و 8 مثل أحماض الزبدة

butyric، caproic وcaprylic، والأحماض غير المشبعة في بنية الزبدة مثل الأحماض الزيتية واللينوليك في شكل سائل والأحماض الدهنية الأخرى في درجة حرارة الغرفة. وبالتالي، فإنَّ وجود الأحماض الدهنية الأساسية التي لا يمكن تصنيعها عند البشر يزيد من أهمية الزبدة. علاوة على ذلك، فإنَّ حقيقة أنَّ الزبدة تحتوي على أحماض دهنية مثل حمض الزبدة غير موجود في أي من المنتجات الدهنية الأخرى، تمكِّن الزبدة من الحصول على نكهة فريدة (Burke وزملاؤه، 2018؛ Shi، 2015).

الفصل الثالث

مواد البحث وطرائقه

MATERIALS & METHODS

3- مواد البحث وطرائقه: Materials and Methods

3- 1- الأجهزة والمواد المستخدمة في الدراسة:

نُفِّذَ هذا البحث في مخابر قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة ومخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية في جامعة دمشق.

3- 1- 1- الأجهزة المستخدمة:

يُبيِّن الجدول (4) أهم الأجهزة المستخدمة عند إجراء البحث ومنشأ كل جهاز من هذه الأجهزة:

الجدول (4): أهم الأجهزة المستخدمة في تنفيذ البحث

الشركة المصنعة	الجهاز المستخدم
Bio Air - Italy	غرفة زرع جرثومي Laminar flow
Mettler Toledo – Taiwan	ميزان حساس Sensitive balance
Mettler Toledo – Taiwan	ميزان Balance
Heraeus – Germany	جهاز تثقيب مبرد Cooling centrifuge
Hanna – Romania	مقياس الرقم الهيدروجيني pH-meter
Biochrom Libra S12	مقياس الضوء الطيفي Spectrophotometer
Hanna – Romania	لمبة أشعة UV
New Brunswick Scientific – U.S.A	حاضنة هزازة Rotary shaker
Lab Tech – Koria	حاضنة Incubator
Shenan LDZX -50 FB- China	جهاز المؤصدة (المعقم) Autoclave
Boeco – Germany	مسخن مع محرك مغناطيسي
G F L – Germany	جهاز تقطير الماء
Shimadzu – Japan	كروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء HPLC
Memmert- Germany	حمام مائي Water bath
Stuart- China	مازج أنابيب Vortex
Grad- Russian	فرن كهربائي Oven
LABOY– Germany	جهاز تقطير البخار Steam Distillation Apparatus
ALFA- LAVAL	جهاز الفراز
Memmert- Germany	جهاز الخض الآلي

3-1-2- المواد الكيميائية المستخدمة:

استخدمت العديد من المواد الكيميائية في البحث ومن أهم هذه المواد: سترات الصوديوم، المركب القياسي من ثنائي الأستيل (Sigma-Aldrich)، أرجينين، ماءات الصوديوم NaOH، α -نفتول 5 %، غلوكوز D-Glucose، حمض الكبريت H_2SO_4 ، حمض كلور الماء HCL، سلفات الأمونيوم، سلفات الصوديوم، أسيتونيتريل، ماءات الصوديوم.

3-1-3- الأوساط الزرعية المستخدمة:

حُضِرَت جميع الأوساط الزرعية مخبرياً أو حسب تعليمات الشركة المصنعة وعُقِّمَت هذه الأوساط بالصاد الموصد (Autoclave) ومن أهمها:

3-1-3-1- وسط حليب معقم منزوع الدسم Skim Milk Powder:

حضر هذا الوسط بهدف تنمية العزلات البكتيرية المنتخبة أثناء اختبار قدرتها على إنتاج ثنائي الأستيل كونه غني بمصادر الكربون (40-52 %)، البروتين < 30 %. وذلك من خلال حل 10 غ من الحليب المجفف في ورق مخروطي مع كمية من الماء المقطر، ثم النقل إلى أنبوب مدرج وأكمل الحجم النهائي إلى 100 مل بواسطة إضافة ماء مقطر، عُقِّم الوسط عند 121 °م لمدة 15 دقيقة (Terzic وزملاؤه، 2009).

3-1-3-2- وسط M17 السائل (MERCK - Germany):

وسط جاهز استخدم لتنمية وإكثار بكتيريا حمض اللبن الكروية.

3-1-3-3- وسط M17 آغار (MERCK - Germany):

وسط جاهز يحتوي بصفة عامة على غلوكوفوسفات، والمضاف لها سكر اللاكتوز والمدعمة بفيتامين B12، استخدم لتنمية بكتيريا حمض اللبن الكروية.

3-1-3-4- وسط MRS السائل (MERCK - Germany):

وسط جاهز استخدم لتنمية وإكثار بكتيريا حمض اللبن العصوية.

3-2- طرائق العمل:

3-2-1- تنشيط عزلات بكتيريا حمض اللبن:

شملت الدراسة 36 عزلة من بكتيريا حمض اللبن بهدف اختبار قدرتها على إنتاج ثنائي الأسيتيل، عُزلت مسبقاً في مخابر كلية الزراعة/ قسم علوم الأغذية خلال عامي 2011-2012، وصُنِفَتْ اعتماداً على تقنية *API 20 Strep* للتمييز بين أنواع المكورات اللبنية المعزولة من بيئة M17، و *API 50 CHL* للتمييز بين أنواع العصيات اللبنية المعزولة من بيئة Rogosa، كما حُفِظَتْ في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية في المجمدة عند درجة حرارة - 80 °م.

(21) من العزلات المدروسة تنتمي إلى جنس *Enterococcus* وكانت الأنواع السائدة منه

E. avium، *E. faecium*، *E. faecalis* و *E. durum*.

(10) عزلات تنتمي إلى جنس *Lactobacillus* وكانت الأنواع السائدة منه *L. plantarum*

L. paracasi، *Lb. bulgaricus*، *Lb. casei* و *Lb. acidophilus*.

(3) عزلات تنتمي إلى جنس *Lactococcus* تمثلت بالنوع *L. Lactis*.

وعزلتان تنتمي إلى الجنس *Leuconostoc* تمثلت بالنوع *Leuco. citrovorum*، موضحة

في الجدول رقم (10). نُشِطَت العزلات المختبرة بزراعتها ضمن وسط (MRS) سائل ووسط

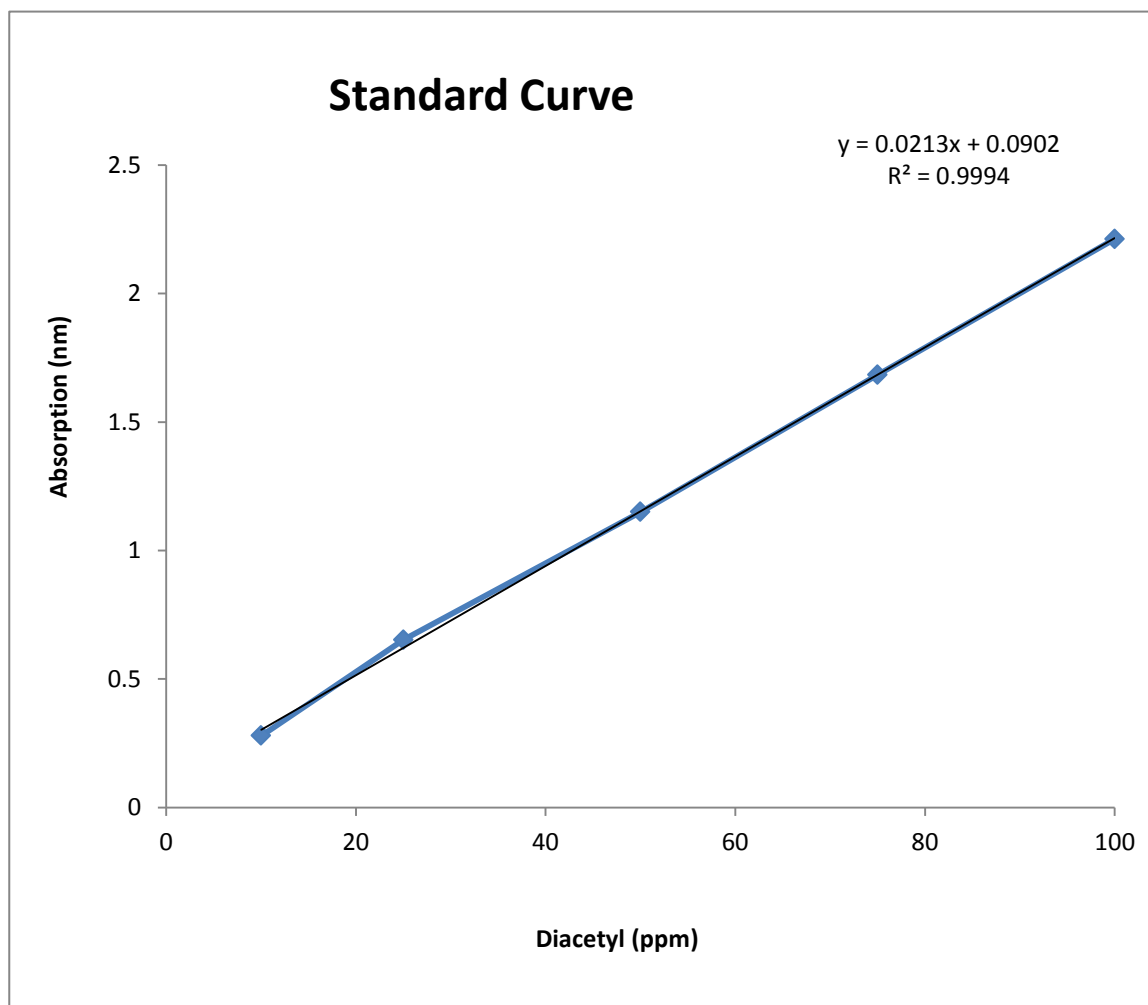
(M17) سائل. ثم حُصِنَتْ عند درجات الحرارة 37°م و 45°م لمدة 72 ساعة في ظروف النمو

الهوائية واللاهوائية (Martin وزملاؤه، 2011)، كما هو مبين في الشكل (2).

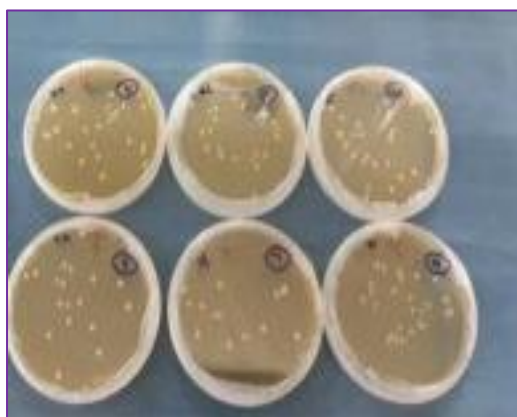
3-2-2- تقدير ثنائي الأستيل:

نُميت العزلات المختبرة من بكتيريا حمض اللبن بهدف قياس قدرتها على إنتاج ثنائي الأستيل حسب (Macciola وزملاؤه، 2008)، من خلال التخمير هوائياً في دوارق مخروطية سعة 250 مل تحتوي على 50 مل من وسط حليب منزوع الدسم المعقم مضافاً إليه 0.1 % سترات صوديوم و 1% (حجم/حجم) لقاح بكتيري نشيط بعمر 16-18 ساعة (ما يعادل 10^8 CFU/مل) حيث تصل بعض اللقاحات إلى هذا التعداد خلال 16 ساعة وبعضها خلال 18 ساعة). ثم قيس كمية ثنائي الأستيل المنتجة من قبل كل سلالة بكتيرية مختبرة باستخدام جهاز المطياف الضوئي على طول موجة 535 نانومتر، حيث مزج 5 مل من الجزء الطافي الناتج عن عملية التنفيل 9000 دورة/ دقيقة لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 4 °م، في أنبوب اختبار مع 1 مل من محلول 0.5 % أرجينين، تتبع بإضافة 1 مل من 5 % α - نفتول محلول ضمن NaOH 2.5 نظامي محضر آنياً، ثم تركت العينة لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة الغرفة 22 °م، حيث تتحد مجموعة غوانيدينو من الأرجينين خلال هذه الفترة الزمنية مع ثنائي الأستيل في وجود الكاشف، حيث يعطي لون أحمر أرجواني. بعد ذلك قُدِّر ثنائي الأستيل المنتج في عينات الطافي المختبرة بوساطة جهاز المطياف الضوئي وذلك بالاستعانة و بشكل متزامن برسم منحنى قياسي من تخفيف ثنائي الأستيل (10، 25، 50، 75 و 100 مغ/ل ماء مقطر)، قدرت كمية ثنائي الأستيل الناتج بـ ملغ/ل (Nadal وزملاؤه، 2009).

حُسب مقدار ثنائي الأستيل الناتج في العينات المدروسة في الجدول رقم (10) من خلال المعادلة ($y = 0.0213x + 0.0902$, $R^2 = 0.9994$) الناتجة عن رسم منحنى قياسي لثنائي الأستيل، الشكل (1).



الشكل (1): المنحنى القياسي لتقدير ثنائي الأستيل



الشكل (2): مراحل تقدير ثنائي الأستيل في العزلات البكتيرية المنشطة

3-2-3- دراسة بعض الظروف المثلى لإنتاج ثنائي الأستيل باستخدام التصميم الإحصائي RSM:

دُرست بعض الظروف المثلى لإنتاج ثنائي الأستيل (درجة الحرارة، درجة الحموضة، تركيز السترات و تركيز الغلوكوز) باستخدام برنامج Minitab والتصميم الإحصائي RSM. حيث درس تأثير كل متغير عند ثلاثة مستويات (+1، 0، -1) لكل من درجات الحرارة (31,34,37) درجة مئوية، درجات الحموضة (pH) (5, 5.5, 6) مع استخدام المحاليل الموقية، تركيز السترات (4, 6, 8) غ/ل وتركيز سكر الغلوكوز (5, 10, 15) غ/ل. وبعدد 30 معاملة لكافة التصميم. قيم المتغيرات المدروسة ومستوياتها موضحة في الجدول رقم (5). كما يبين الجدول رقم (6) طريقة التصميم المعتمدة في هذه الدراسة.

الجدول (5): المتغيرات المدروسة ومستوياتها

المتغيرات				مستويات المتغيرات بصورة رمز
تركيز سكر الغلوكوز (غ/ل)	تركيز السترات (غ/ل)	درجة الحموضة	درجة الحرارة (م°)	
5	4	5	31	-1
10	6	5.5	34	0
15	8	6	37	+1

الجدول (6): التصميم الإحصائي للتجربة

العدد	المتغيرات			
	تركيز سكر الغلوكوز (غ/ل)	تركيز السترات (غ/ل)	درجة الحموضة	درجة الحرارة (م°)
1	-1	-1	-1	1
2	-1	-1	1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	-1	1	1	1
5	1	-1	-1	-1
6	1	-1	1	1
7	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	-1	-1	-1	-1
12	-1	-1	1	1
13	-1	1	-1	1
14	-1	1	1	-1
15	1	-1	-1	1
16	1	-1	1	-1
17	1	1	-1	-1
18	1	1	1	1
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	-1
22	0	0	0	1
23	0	0	-1	0
24	0	0	1	0
25	0	-1	0	0
26	0	1	0	0
27	-1	0	0	0
28	1	0	0	0
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0

3-2-4- تطهير بكتيريا حمض اللبن باستخدام الأشعة فوق البنفسجية:

اختيرت أفضل عزلة في إنتاج ثنائي الأستيل وأجريت عليها عملية تطهير باستخدام الأشعة فوق البنفسجية UV. حيث نُميت العزلة البكتيرية المنتخبة في 100 مل من وسط الزرع M17 السائل. ثم أُخذ 90 مل من التخفيف الثامن للعزلة المختارة، ورَّع باستخدام الماسح الزجاجي إلى 9 أطباق بتري بمعدل 10 مل في كل طبق، ثم أجريت عملية التطهير من خلال تعريض الأطباق لأشعة فوق بنفسجية (254 نانومتر) وعلى ارتفاع 15 سم و ذلك لمدة (0.5، 1، 1.5، 2، 2.5، 3، 3.5، 4) دقائق، مع ترك طبق كشاهد لم يعرض للأشعة. ومن ثم حُفظت الأطباق في الظلام لمدة ساعة. أُخذ 0.1 مل من المعلق الخلوي في أوقات التعريض المختلفة وزرع على أطباق بتري تحوي وسط M17 أغار وحضنت على درجة حرارة 37 °م لمدة 48 ساعة و ذلك للحصول على الخلايا المطفرة (Monnet وزملاؤه، 1994). أُجريت عملية عد للمستعمرات المطفرة على كل طبق، ثم اختبرت قدرة كل مستعمرة مطفرة على حدة على إنتاج ثنائي الأستيل.

3-2-5- تنقية ثنائي الأستيل من بكتيريا حمض اللبن المطفرة:

3-2-5-1- المحاليل المستخدمة في عملية التنقية:

- ✓ ماءات الصوديوم 1 ن: حضرت بوزن 10 غ بدورق معياري 250 مل.
- ✓ حمض كلور الماء 1 ن: حضر بوزن 9 مل بدورق معياري 250 مل.
- ✓ كبريتات الأمونيوم 0.5 مول: حضرت بوزن 16.52 غ بدورق معياري 250 مل.

3- 2- 5- 2- مراحل تنقية ثنائي الأستيل:

3- 2- 5- 2- 1- الترسيب بأملاح كبريتات الأمونيوم:

نُمِيتَ المستعمرة المطفرة من *L. lactis ssp lactis* الأعلى إنتاجية (A6) في الزمن 2 دقيقة) حسب (Macciola وزملاؤه، 2008)، من خلال التخمير هوائياً في دوارق مخروطية سعة 1000 مل تحتوي على 500 مل من وسط حليب منزوع الدسم المعقم و 1 غ من سترات الصوديوم و 10 مل لقاح بكتيري نشيط بعمر 16-18 ساعة (تحضين 37 °م لمدة 24 ساعة). ثم أجريت عملية التقطير لفصل ثنائي الأستيل باستخدام جهاز التقطير (Xanthopoulos وزملاؤه، 1994) حيث أضيف كامل كمية العزلة المنشطة مع ضعف الكمية من الماء المقطر الثلاثي إلى حوالة جهاز التقطير الموضوعة ضمن حمام مائي 88 °م، وفي الجانب المقابل أضيف إلى أنبوب الاستقبال 2 مل من كبريتات الأمونيوم تركيزه 0.5 مول. وبعد التقطير لمدة نصف ساعة اخذ 100 مل من ناتج التقطير (Bassit وزملاؤه، 1993)، لإتمام عملية التنقية بعمود التبادل الأيوني Dowex 1-x8.

3- 2- 5- 2- 2- التنقية باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بوساطة عمود Dowex

1-x8:

استخدم راتنج التبادل الأيوني Dowex 1-X8 في عملية تنقية ثنائي الأستيل من بكتيريا حمض اللبن ضمن عمود زجاجي ارتفاعه 27 سم وقطره 1.9 سم حسب (Collins و Speckman، 1998) الشكل (3). وذلك بإغلاق أسفل العمود المدبب باستخدام الصوف الزجاجي. أضيفت حشوة العمود (Dowex 1-X8) بهدوء وتحت التفريغ مع إجراء عملية كبس لها باستخدام مكبس

مصنّع يدوياً، واستمرت عملية الإضافة والكبس حتى الوصول إلى ارتفاع 27 سم، تم تسوية سطح الحشوة بشكل جيد ومن ثم أضيفت مادة سلفات الصوديوم اللامائية الماصة للرطوبة على شكل طبقة سماكتها لا تتجاوز 1 سم لضمان التخلص التام من الرطوبة ضمن العمود. ثم أضيفت ماءات الصوديوم 1 ن إلى العمود بهدوء و الاستمرار بالإضافة حتى نصل إلى 0.5 مل في الدقيقة من خلال التحكم بسرعة ضغط التفريغ ثم أضيف حمض كلور الماء 1 ن إلى العمود بهدوء والاستمرار بالإضافة حتى نصل إلى 0.5 مل في الدقيقة. أضيف 20 مل من المحلول المستخلص من بكتيريا حمض اللبن بالتقطير مع 10 مل من محلول 2،3- بيوتيلين جليكول إلى العمود بهدوء، وبعد مرور المحلول بشكل كامل عبر العمود، أضيف 5 مل من محلول كبريتات الأمونيوم 0.5 مول إلى العمود لفصل ثنائي الأستيل و استقبله من أسفل العمود بأنبوب زجاجي. أخذت الأنابيب الحاوية على ثنائي الأستيل الملحي لإتمام عملية التعرف عليها وفصلها وتقدير كميتها. من خلال التجفيف ضمن فرن التجفيف حرارة 105 °م، أخذت البلورات المتشكلة من ثنائي الأستيل وقدر تركيز المادة الجافة باستخدام جهاز HPLC موضحة في الشكل (4).



الشكل (3): عمود التنقية



الشكل (4): البلورات الملحية المتشكلة من ثنائي الأسيتيل

3- 2- 5- 2- 3- تقدير تركيز ثنائي الأستيل باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC):

استخدم جهاز الكروماتوغرافيا (HPLC) ماركة Shimadzu من اليابان يتألف من مضخة واحدة طراز LC-20AT وحجرة حقن Injection loop حجمها 20 ميكروليتر وفرن طراز CTO-20A مزود الجهاز بكاشف الأشعة فوق البنفسجية UV-PDA (- Ultra Violet Photo Diode Array) طراز SPD –M20A ويتصل الكاشف مع حاسوب لتخزين النتائج المتحصل عليها من الكاشف ومعالجتها وفق نظام LC-Solution بالإضافة إلى وجود طابعة ليزيرية ماركة LBP 5000-Cannon متصلة مع الحاسوب. وفقا لشروط التشغيل بعمود من نوع ODS (25cm- 4.5cm S) صنع شركة تكنوكروما الإسبانية، وبطور متحرك (ماء منزوع الشوارد: اسيتونتريل) بنسبة (50:50 ح / ح). وبطول موجة كشف UV 254 نانومتر، ومعدل التدفق: 1.2 مل/ دقيقة مع حرارة الفرن: 35 °م.

حضر المحلول القياسي: بوزن 0.1 غ من المركب القياسي ثنائي الأستيل (Sigma-Aldrich) ضمن دورق معياري سعة 100 مل وتمت إذابته بالماء المنزوع الشوارد حتى العلامة فنحصل على محلول تركيزه 1000 ppm. حضر محلول العمل اليومي بأخذ 10 مل من المحلول الأم ضمن دورق معياري سعة 100 مل وإذابته بالماء المنزوع الشوارد حتى العلامة فنحصل على محلول تركيزه 100 ppm.

حضرت العينة: بخلط 2 ملغ من ثنائي الأستيل الجاف مع 50 مل من الميثانول ومن ثم أجري طرد مركزي (2000 دورة/ الدقيقة لمدة 5 دقائق) وأخذ الطافي للتحليل، حضر خليط التفاعل عن طريق خلط 70 مل من الميثانول و 10 مل من حمض الهيدروكلوريك و 50 ملغ من DNPH (4,2 دينيتروفييل هيدرازين) و 20 مل من الأنيلين. أضيف 1 مل من محلول العينة إلى 1 مل من كاشف التفاعل وترك الخليط لمدة 60 دقيقة عند 27 °م لتكوين مشتقات DA-DNPH.

طريقة العمل: حقن 20 ميكرو لتر من المادة المتفاعلة في عمود الطور الحامل بإضافة محلول مائي من الأسيتونيتريل (ماء: أسيتونيتريل = 50:50). تم فصل DA-DNPH تماماً في الدقيقة 15، بواسطة HPLC عند طول موجة 245 نانومتر (Wang وزملاؤه، 2017).

3-2-6- التحليل الإحصائي:

حسبت المتوسطات الحسابية وانحرافاتها المعيارية بواقع ثلاثة مكررات بيولوجية لكل عزلة مع حساب فروقها المعنوية وذلك على مستوى ثقة 5 % باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS الإصدار 17 (SPSS Statistics for Windows, Version 17.0) .

في حين استخدم البرنامج الإحصائي Minitab والتصميم الإحصائي RSM في أمثلة ظروف إنتاج ثنائي الأستيل (Pardeep و Satyanarayana، 2006).

3-2-7- تصنيع الزبدة باستخدام البادئات المنتخبة:

تمّ تدعيم نكهة الزبدة بطريقتين: الأولى من خلال تصنيع الزبدة من السلالات البكتيرية المنتخبة والثانية من خلال استخدام ثنائي الأسثيل التجاري بنسبة 1 ملغ/ كغ، ومن ثمّ المقارنة بين العينات المصنّعة.

صُنعت عينتان من الزبدة بإضافة بادئات من بكتيريا حمض اللبن المختبرة في هذه الدراسة كبادئات مختلطة يحتوي كل بادئ منها على عدة سلالات، صُنعت العينة الأولى من البادئ الأول المكون من خليط من بكتيريا *Lb. bulgaricus* ، *Leuco. citrovorum* و *Lb. casei*، والعينة الثانية من البادئ الثاني المكون من خليط من بكتيريا *L. lactis ssp* و *Lb. bulgaricus* و *Lb. acidophilus*، بينما صُنعت عينة ثالثة من الزبدة بإضافة ثنائي الأسثيل تجاري بنسبة 1 ملغ/ كغ. وذلك بهدف إمكانية الحصول على منتج ذو نكهة مقبولة لدى المواطن العربي السوري، والمحافظة على الأصول الوراثية للبكتيريا المحلية والاستعاضة بهذه البادئات عن تلك المستوردة، وبالتالي لنتمكن من توفير القطع الأجنبي المستخدم في استيراد البادئات.

3-2-7-1- خطوات تصنيع الزبدة:

صُنعت الزبدة الملقحة ببكتيريا البادئ المنتخبة كما هو مبين في الشكل (5): وفقاً للخطوات التالية (أبو غرة و هدا، 1998):

1. استخدم حليب أبقار ذي صفات جيدة، خالٍ من الروائح والمواد غير المرغوبة

والشوائب، نسبة الدهن فيه 3 %.

2. أجريت بسترة للحليب على درجة حرارة 73 °م لمدة 15 ثانية، وبرد إلى حوالي 4 °م لمدة 24 ساعة.

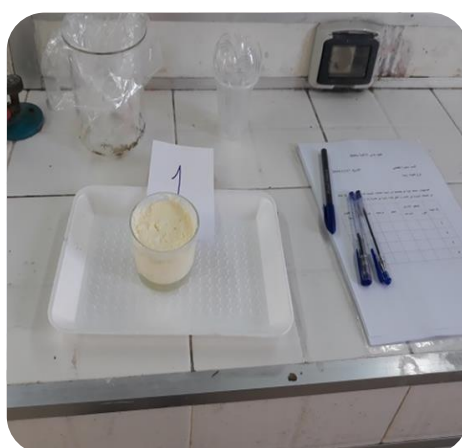
3. تحضير القشدة: تم الحصول على القشدة بشكل فوري وسريع باستخدام الفراز الآلي، حيث سخن الحليب المراد فرزه إلى 40 °م، ومن ثم أجريت عملية الفرز، مما أدى إلى الحصول على قشدة ذات نسبة دسم 38 %.

4. إنتاج بادئ التلقيح: استخدم حليب معقم خالي الدسم 10 % (عُقم 121 °م لمدة 15 دقيقة وُبُرِد) أُضيف إليه 0.1 % سترات الصوديوم، لَفَّح الحليب بالبكتيريا المنتخبة وحُضِن على درجة حرارة 25 °م لمدة 16 ساعة.

5. أُضيف البادئ البكتيري بنسبة 3 % من كمية القشدة 38 % دسم، وحضن المزيج على درجة حرارة 25 °م لمدة 16 ساعة.

6. بعد انتهاء فترة التحضين، بُرِد المزيج إلى الدرجة 7 °م لمدة 3-4 ساعات، ثم وضع بدرجة حرارة الغرفة لمدة 16 ساعة (خلال هذه المرحلة قُدِّر تركيز ثنائي الأسثيل بالقشدة).

7. أجريت عملية خض وغسيل وعجن للزبدة، ومن ثم حُفِظَت العينات المصنَّعة بدرجة حرارة 5 °م لإجراء الاختبارات المطلوبة.



الشكل (5): مراحل تصنيع الزبدة

بينما صُنعت الزبدة المضاف إليها ثنائي الأستيل التجاري وفقاً للخطوات التالية (Chauhan وزملاؤه، 2010):

1. استخدم حليب أبقار ذي صفات جيدة، خالٍ من الروائح والمواد غير المرغوبة والشوائب، نسبة الدهن فيه 3.5 %.

2. أجريت بسترة للحليب على درجة حرارة 73 °م لمدة 15 ثانية، وبرد إلى حوالي 4 °م لمدة 24 ساعة.

3. تحضير القشدة: تم الحصول على القشدة بشكل فوري وسريع باستخدام الفراز الآلي، حيث سخن الحليب المراد فرزه إلى 40 °م، ومن ثم أجريت عملية الفرز، مما أدى إلى الحصول على قشدة ذات نسبة دسم 34 %.

4. بعد انتهاء فترة التحضين، بُرد المزيج إلى الدرجة 7 °م لمدة 3-4 ساعات، ثم وضع بدرجة حرارة الغرفة لمدة 16 ساعة (خلال هذه المرحلة قُدِّر تركيز ثنائي الأستيل بالقشدة).

5. أجريت عملية خض وغسيل وعجن للزبدة، بعد ذلك أضيف إليها ثنائي الأستيل التجاري بنسبة 1 ملغ/ كغ . ومن ثم حُفظت العينات المصنَّعة بدرجة حرارة 5 °م لإجراء الاختبارات المطلوبة.

3-2-7-2- التحاليل الكيميائية للعينات المصنّعة:

بداية حضرت العينة للتحليل، وذلك من خلال صهرها على حمام مائي لا تزيد درجة حرارته عن 39 °م. مع مراعاة تجنب الحرارة العالية لأنها تسبب انفصال كتل مرئية من الخثرة. رافق ذلك رج العينة بين وقت وآخر وذلك لدمج الجزء المنصهر مع الكتلة مع ملاحظة درجة السيولة التي وصلت إليها العينة. بعد ذلك أُخرجت العينة من الحمام المائي ومزجت بشدة باستخدام الزجاج الميكانيكي، حتى تبرد ويتحول قوامها إلى القشدي السميك بعد ذلك أُجريت مجموعة من التحاليل الكيميائية خلال الأيام الأولى من التصنيع تضمنت الاختبارات التالية (حداد ودمر، 1992).

• تقدير نسبة الرطوبة الطريقة الرسمية لـ (FAO / WHO):

قدرت الرطوبة بأخذ 2-6 غ من الزبدة في طبق تجفيف معروف الوزن، جففت في فرن تجفيف عند درجة حرارة ثابتة 103°م خلال عدة ساعات حتى ثبات الوزن، حسب النسبة المئوية للرطوبة باستخدام المعادلة التالية:

$$\% \text{ للمادة الصلبة الكلية} = (\text{وزن العينة بعد التجفيف} / \text{وزن العينة قبل التجفيف}) \times 100.$$

$$\% \text{ للرطوبة} = 100 - \% \text{ للمادة الصلبة الكلية}.$$

• تقدير نسبة الدهن (طريقة جرير):

قدرت نسبة الدهن وذلك بوزن 5 غ من عينة الزبدة المراد اختبارها بالكأس الخاص بأنبوبة جرير 90 %، ثم أُضيف 18 مل من حمض الكبريت الممدد (10 مل حمض كبريت مركز كثافته 1.825 + 8 مل ماء) حيث يشكل طبقة فوق العينة، بعدها أُضيف 1 مل كحول أميلي، و كمية من الماء المقطر الدافئ حتى يصل مستوى محتويات الأنبوبة إلى منتصف الساق المدرجة تقريباً. بعد ذلك نقلت الأنبوبة إلى حمام مائي حرارته 65 °م حتى تنصهر الزبدة مع ترك فوهة

الأنبوبة العليا مفتوحة، ثم أغلقت الفوهة العليا بالسداد المطاطية ورجت عدة مرات ومن ثم أعيدت إلى الحمام المائي وتركت ترقد لبضع دقائق. تمّ الهضم ثم التثفيل (1000-1200 دورة/ دقيقة) لمدة لا تقل عن 5 دقائق، ثم أخذت قراءة العمود والتي تمثل النسبة المئوية للدهن في العينة.

• تقدير نسبة الحموضة:

أضيف إلى 10 غ من عينة الزبدة المتجانسة والموضوعة في دورق مخروطي ماء مقطر درجة حرارته 40 °م حتى حجم 100 مل، ثم رشحت محتويات الدورق واستقبل الراشح في دورق آخر، بعدها أخذ 25 مل من الرشاحة والتي تمثل 2.5 غ من عينة الزبدة وعيرت بمحلول من ماءات الصوديوم العشر نظامي وبوجود دليل (مشعر) من الفينول فتالئين 1% حتى تحول اللون إلى اللون الوردي. عبّر عن الحموضة مقدرة كحمض لبن بالمعادلة التالية:

$$\% \text{ حموضة} = \text{عدد مل ماءات الصوديوم } 0.1 \times 0.9 / \text{وزن العينة } 2.5 \text{ غ.}$$

(يعبر عن النتيجة كحمض لبن إذ أن كل 1 مل من ماءات الصوديوم 0.1 ن تعادل مع 0.009 غ حمض لبن).

• تقدير محتوى ثنائي الأستيل في عينات الزبدة المصنّعة:

قُدّر محتوى ثنائي الأستيل وفقاً لطريقة Cogan وزملاؤه (1989) و طريقة Xanthopoulos وزملاؤه (1994)، حيث نُقل 40 غ من عينة الزبدة إلى دورق ذو حواف دائرية، تمّ صهرها لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة 40 °م. أجريت عملية تقطير البخار، بعد إضافة 40 مل من محلول

كلوريد الحديد الثلاثي لأكسدة أستيل ميثيل كاربينول إلى ثنائي أستيل. بعد الحصول على 10 مل من نواتج التقطير. نقل 5 مل من نواتج التقطير إلى أنبوب اختبار أضيف إليه 1.5 مل من hydroxylamine، مزجت محتويات أنابيب الاختبار بشكل جيد ضمن حمام مائي عند 75 °م لمدة 20 دقيقة. ثم أضيف 0.5 مل من الأسيتون متبوعاً بالخلط. تركت الأنابيب لتبرد في درجة حرارة الغرفة. بعد التبريد أضيف 0.1 مل من محلول كبريتات الحديد ومزجت مرة أخرى. عُدّل الحجم إلى 10 مل بمحلول فوسفات الهيدروجين ثنائي البوتاسيوم بنسبة 33 % وبعد مرور 15 دقيقة، قيست الامتصاصية بواسطة جهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 530 نانومتر و ذلك بالاستعانة و بشكل متزامن برسم منحني قياسي من تخافيف ثنائي الأستيل (10، 25، 50، 75 و 100 مغ/ل ماء مقطر).

3-2-7-3- التقييم الحسي:

أجري التقييم الحسي بعد انتهاء عملية تصنيع الزبدة، تناول [المظهر الخارجي /اللون، الشوائب/، الرائحة، القوام والطعم] موضحة في الجدول رقم (7)، وذلك بواسطة مجموعة من الأفراد المتدربين وباستخدام طريقة Hedonic Scale حيث أعطيت كل صفة 5 درجات / 5 = ممتاز، 4 = جيد جداً، 3= جيد، 2 = وسط، 1 = مقبول/ (Lawless و Heymann، 1999).

الجدول (7): نموذج تقييم الصفات الحسية لعينات الزبدة المصنّعة

رقم العينة	المظهر الخارجي		الطعم	الرائحة	القوام	درجة القبول النهائية
	اللون	الشوائب				
1						
2						
3						

3- 2- 7- 4- التحليل الإحصائي:

أجري التحليل الإحصائي بالاستعانة ببرنامج SPSS إصدار 17 لنتائج التقييم الحسي، باستخدام

عاملين وثلاثة مكررات، العامل الأول هو الصفات الحسية [المظهر الخارجي / اللون، الشوائب/،

الرائحة، القوام والطعم]، والعامل الثاني هو نوعية البادئ المستخدم في التصنيع، أمّا المتغيرات

المدرّسة فهي آراء المقيمين التي عبر عنها بأرقام بحسب ما أورده Lawless و Heymann

(1999).

الفصل الرابع
النتائج والمناقشة

RESULTS & DISCUSSION

4- النتائج والمناقشة: Results and Discussion

4-1- نتائج اختبار قدرة عزلات بكتيريا حمض اللبن على إنتاج ثنائي الأستيل:

اختبرت قدرة 36 عزلة من بكتيريا حمض اللبن على إنتاج ثنائي الأستيل، عزلت مسبقاً من مصادر غذائية محلية مختلفة /حليب بقري، قشدة، لبنة، جبنة عكاوي و جبنة بلدي/ وصُنِفَت اعتماداً على نظام تعريف *API 50 CHL* و *API 20 Strep* ، أظهرت النتائج أنَّ العزلات المتحصل عليها هي بكتيريا حمض لبن تابعة للأجناس التالية: *Enterococcus*، *Lactobacillus*، *Lactococcus* و *Leuconostoc*، موضحة في الجدول رقم (8):

الجدول (8): أنواع بكتيريا حمض اللبن المعزولة

رقم العزلة	التصنيف	المصدر الغذائي	رقم العزلة	التصنيف	المصدر الغذائي
1	<i>Lactococcus</i>	حليب بقري	19	<i>Enterococcus</i>	جبنة عكاوي
2	<i>Lactococcus</i>	جبنة عكاوي	20	<i>Enterococcus</i>	جبنة عكاوي
3	<i>Lactococcus</i>	حليب بقري	21	<i>Enterococcus</i>	جبنة بلدي
4	<i>Leuconostoc</i>	حليب بقري	22	<i>Enterococcus</i>	لبنة
5	<i>Leuconostoc</i>	حليب بقري	23	<i>Enterococcus</i>	حليب بقري
6	<i>Lactobacillus</i>	قشدة	24	<i>Enterococcus</i>	حليب بقري
7	<i>Lactobacillus</i>	قشدة	25	<i>Enterococcus</i>	لبنة
8	<i>Lactobacillus</i>	حليب بقري	26	<i>Enterococcus</i>	حليب بقري
9	<i>Lactobacillus</i>	حليب بقري	27	<i>Enterococcus</i>	جبنة عكاوي
10	<i>Lactobacillus</i>	جبنة عكاوي	28	<i>Enterococcus</i>	حليب بقري
11	<i>Lactobacillus</i>	حليب بقري	29	<i>Enterococcus</i>	جبنة بلدي
12	<i>Lactobacillus</i>	جبنة بلدي	30	<i>Enterococcus</i>	حليب بقري
13	<i>Lactobacillus</i>	لبنة	31	<i>Enterococcus</i>	حليب بقري
14	<i>Lactobacillus</i>	جبنة عكاوي	32	<i>Enterococcus</i>	جبنة بلدي
15	<i>Lactobacillus</i>	جبنة عكاوي	33	<i>Enterococcus</i>	جبنة عكاوي
16	<i>Enterococcus</i>	جبنة عكاوي	34	<i>Enterococcus</i>	حليب بقري
17	<i>Enterococcus</i>	جبنة عكاوي	35	<i>Enterococcus</i>	جبنة عكاوي
18	<i>Enterococcus</i>	جبنة عكاوي	36	<i>Enterococcus</i>	جبنة عكاوي

أظهرت كافة العزلات قدرة على الانتاج، كما بيّنت النتائج أنَّ أعلى إنتاجية من ثنائي الأستيل كانت لبكتيريا *L. lactis ssp lactis* تابعة لجنس *Lactococcus* معزولة من الحليب البقري وبكمية إنتاج بلغت 65.39 ملغ/ل، وأنَّ أقل إنتاجية كانت لبكتيريا *Lb. paracasei* تابعة لجنس *Lactobacillus* معزولة من الحليب البقري و بكمية إنتاج بلغت 4.63 ملغ/ل، بينما توسطت عزلات جنس *Enterococcus* في الإنتاج ما بين (11.57 ملغ/ل و 55.04 ملغ/ل)، كما أظهرت عزلتان من الجنس *Leuconostoc* قدرة على إنتاج ثنائي الأستيل بمقدار (58.61 ملغ/ل و 62.13 ملغ/ل)، كما هو موضح في الجدول رقم (9).

الجدول (9): متوسطات كمية ثنائي الأستيل المنتجة من قبل عزلات بكتيريا حمض اللبن:

التصنيف	المصدر الغذائي	متوسط كمية ثنائي الأستيل (ملغ/ل)	التصنيف	المصدر الغذائي	متوسط كمية ثنائي الأستيل (ملغ/ل)
<i>L. lactis ssp lactis</i>	حليب بقري	40.21± 0.22	<i>E. durum</i>	جبنة عكاوي	41.74± 0.06
<i>L. lactis ssp lactis</i>	جبنة عكاوي	52.16± 0.04	<i>E. faecalis</i>	جبنة عكاوي	11.57± 0.01
<i>L. lactis ssp lactis</i>	حليب بقري	65.39± 0.03	<i>E. faecalis</i>	جبنة بلدي	28.58± 0.02
<i>Leuco. citrovorum</i>	حليب بقري	58.61± 0.04	<i>E. faecalis</i>	لبنة	30.26± 0.06
<i>Leuco. citrovorum</i>	حليب بقري	62.13± 0.02	<i>E. faecalis</i>	حليب بقري	31.89± 0.01
<i>Lb. plantarum</i>	قشدة	17.54± 0.33	<i>E. faecalis</i>	حليب بقري	32.81± 0.23
<i>Lb. plantarum</i>	قشدة	20.24± 0.21	<i>E. faecalis</i>	لبنة	34.73± 0.21
<i>Lb. plantarum</i>	حليب بقري	22.9± 0.07	<i>E. faecalis</i>	حليب بقري	38.18± 0.01
<i>Lb. plantarum</i>	حليب بقري	32.61± 0.01	<i>E. faecalis</i>	جبنة عكاوي	44.03± 0.07
<i>Lb. bulgaricus</i>	جبنة عكاوي	35.41± 0.03	<i>E. faecalis</i>	حليب بقري	45.95± 0.03
<i>Lb.paracasei</i>	حليب بقري	4.63± 0.22	<i>E. faecalis</i>	جبنة بلدي	46.36± 0.06
<i>Lb.paracasei</i>	جبنة بلدي	22.15± 0.34	<i>E. faecium</i>	حليب بقري	21.85± 0.02
<i>Lb.paracasei</i>	لبنة	31.18± 0.06	<i>E. faecium</i>	حليب بقري	24.31± 0.32
<i>Lb. casei</i>	جبنة عكاوي	40.23± 0.06	<i>E. faecium</i>	جبنة بلدي	29.57± 0.02
<i>Lb. acidophilus</i>	جبنة عكاوي	39.48± 0.01	<i>E. faecium</i>	جبنة عكاوي	30.13± 0.61
<i>E. avium</i>	جبنة عكاوي	48.39± 0.02	<i>E. faecium</i>	حليب بقري	33.82± 0.02
<i>E. avium</i>	جبنة عكاوي	55.04± 0.06	<i>E. faecium</i>	جبنة عكاوي	40.66± 0.07
<i>E. durum</i>	جبنة عكاوي	40.37± 0.04	<i>E. faecium</i>	جبنة عكاوي	43.09± 0.19

يُبيّن الجدول رقم (9) أيضاً، أنّ 21 عزلة تابعة لجنس *Enterococcus* أظهرت قدرة على إنتاج ثنائي الأستيل، وهذا يعود إلى أنّ سلالات *Enterococcus*، وخاصة *E. faecium* و *E. faecalis* لديها قدرة استقلابية على تمثيل السترات و بالتالي تساهم وبشكل فعّال في تطوير نكهة منتجات الألبان المتخمرة، وهذا يتوافق مع نتائج Sarantinopoulous وزملاؤه (2001) و حاج مصطفى و زملاؤه (2015). كما أنّه في العديد من منتجات الألبان يوجد عدد كبير من بكتيريا *Enterococcus*، حيث تشكل هذه البكتيريا جزء كبير من الكائنات الحية الدقيقة في منتجات الألبان الطازجة، وفي بعض الحالات تكون هي الكائنات الحية الدقيقة السائدة في المنتج الكامل أثناء فترة الإنضاج (Zarate وزملاؤه، 1997).

ذكرت أيضاً بعض التقارير أنّ بكتيريا *Enterococcus* قد يكون لها دور مهم في إنضاج وجودة منتجات الألبان المتخمرة. علاوة على ذلك، اقترح بعض الباحثين أنّها تساهم بشكل كبير في تطور رائحة ونكهة العديد من الأجبان، وربما يرجع ذلك إلى خاصية تمثيل السترات (Foulquie- Moreno وزملاؤه، 2006).

كما لوحظ في دراسة لأبي يونس وزملائه (2007)، على بكتيريا حمض اللبن الموجودة في الجبن الأبيض البلدي، سيادة للمكورات اللبنية التابعة لجنس *Enterococcus* في حين انخفضت نسبة العصيات اللبنية المعزولة، يعزى وجود بكتيريا *Enterococcus* بأعداد مرتفعة إلى تحملها لمجال واسع من الشروط البيئية مثل: درجة الحرارة المنخفضة، النسبة العالية للملح

والحموضة. لذلك تعد المكورات من أهم مجموعات الأحياء الدقيقة التي قد تؤثر في عملية الإنضاج بسبب نشاطها المحلل للبروتين وقدرتها على تحفيز إنتاج حمض اللبن.

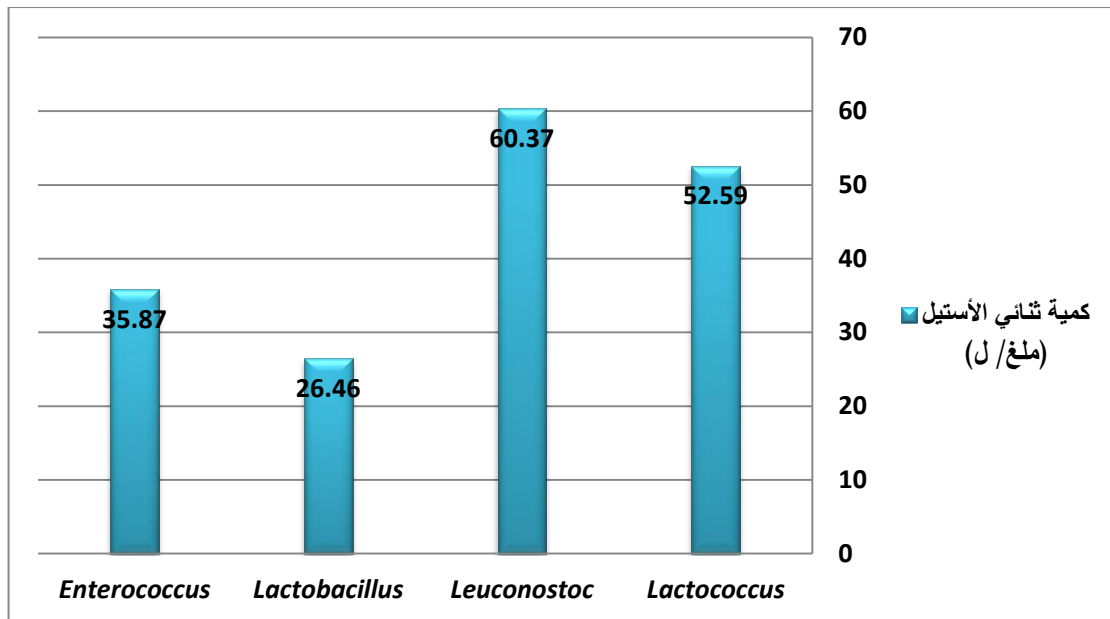
أما بالنسبة لجنس *Lactobacillus* أظهرت 10 عزلات قدرة على إنتاج ثنائي الأستيل، تراوح متوسط كمية ثنائي الأستيل المنتجة بواسطة النوع *L. plantarum* بين (17.54 ملغ/ل) و(32.61 ملغ/ل)، وبالنسبة للنوع *Lb. paracasi* تراوح متوسط كمية ثنائي الأستيل المنتجة بين (4.63 ملغ/ل) و(31.18 ملغ/ل)، بينما بلغت كمية ثنائي الأستيل المنتجة من قبل *Lb. bulgaricus* (35.41 ملغ/ل)، كما بلغت كمية ثنائي الأستيل المنتجة من قبل *Lb. casei* و *Lb. acidophilus* (40.23 ملغ/ل) و (39.48 ملغ/ل) على التوالي.

في الجنس *Lactococcus* أظهرت 3 عزلات من النوع *L. lactis* قدرة على إنتاج ثنائي الأستيل تراوحت بين (40.21 ملغ/ل) و(65.39 ملغ/ل).

هذه الاختلافات في كمية ثنائي الأستيل المنتجة تعود إلى اختلاف قدرة العزلات على استقلاب

السترات، وبالتالي اختلاف في كمية ثنائي الأستيل المنتجة وهذا يتوافق مع نتائج Hugenholtz

(2014).



الشكل (6): متوسطات كمية ثنائي الأسيتيل (ملغ/ل) المنتجة من أربعة أجناس من بكتيريا حمض اللبن المعزولة

يبين الشكل (6) متوسطات كمية ثنائي الأسيتيل المنتجة من أربعة أجناس من بكتيريا حمض اللبن المعزولة. نلاحظ من الشكل وجود اختلافات بين أجناس بكتيريا حمض اللبن، وأنَّ عزلات الجنس *Leuconostoc* كانت أعلى بمتوسط كمية ثنائي الأسيتيل المنتجة (60.37 ملغ/ل)، تلاها عزلات الجنس *Lactococcus* (52.59 ملغ/ل)، ومن ثمَّ عزلات الجنس *Enterococcus* (35.87 ملغ/ل)، بينما أقل إنتاجية كانت لعزلات الجنس *Lactobacillus* (26.46 ملغ/ل)، وهذا يعود إلى أنَّ القدرة على استقلاب السترات إلى أسيتوين، ثنائي الأسيتيل وأحياناً 2،3- بيوتانديول سمة شائعة للعديد من بكتيريا حمض اللبن، بشكل خاص *Lactococcus* spp. و *Leuconostoc* spp. التي تتواجد في بعض مزارع البادئ، بينما لم يتم توثيق استقلاب حمض الستريك بواسطة *Lactobacillus* spp. بشكل جيد، على الرغم من أنَّ الجوانب المختلفة منه تمَّ تناولها في العديد من الدراسات الحديثة، وهذا يتوافق مع نتائج (Hugenoltz, 2014).

الجدول (10): تحليل التباين لتأثير جنس البكتيريا ونوع العزلة في كمية ثنائي الأستيل المنتجة من قبل بكتيريا حمض اللبن المعزولة

مصادر التباين	DF	SS	MS	F	P
المكررات	2	0.110	0.055	0.004	0.154
الجنس	3	282.435	94.145	7.008	0.010
العزلة	35	1281.035	36.601	4.734	0.003
الخطأ التجريبي	68	913.58	13.435		
الكلية	108	2477.16			

يبين الجدول رقم (10) وجود فروق معنوية بين المعاملات في قيمة ثنائي الأستيل المنتج، وتعود هذه الفروق المعنوية بين الأجناس وبين أنواع الجنس الواحد إلى اختلاف معدل وكفاءة استقلاب حمض الستريك من قبل بكتيريا حمض اللبن، حيث يعتبر السترات طليعة لإنتاج ثنائي الأستيل، وهذا يتوافق مع نتائج Kaneko و زملاؤه (1991).

4-2- نتائج دراسة بعض الظروف المثلى لإنتاج ثنائي الأستيل باستخدام التصميم

الإحصائي RSM:

من أجل أمثلة ظروف إنتاج ثنائي الأستيل درس تأثير خمسة متغيرات (درجة حرارة التحضين، درجة حموضة الوسط (pH)، تركيز السترات وتركيز سكر الغلوكوز) على نمو بكتيريا حمض اللبن *L. lactis ssp lactis* التي تفوقت على باقي العزلات بكمية ثنائي الأستيل المنتجة التي بلغت (65.39 ملغ/ل)، وبالا اعتماد على التصميم الإحصائي المعتمد في الجدول (6) أجريت 30 تجربة، وحسبت إنتاجية ثنائي الأستيل كما هو موضح في الجدول (11) الذي يبين نتائج كمية ثنائي الأستيل المنتجة من بكتيريا حمض اللبن *L. lactis ssp lactis*.

الجدول (11): تأثير المتغيرات المدروسة /درجة حرارة التحضين، درجة حموضة الوسط (pH)، تركيز

السترات وتركيز سكر الغلوكوز/ في إنتاج ثنائي الأستيل من قبل *L. lactis ssp lactis*

رقم المعاملة	درجة الحرارة (م°)	درجة الحموضة	تركيز السترات (غ/ل)	تركيز سكر الغلوكوز (غ/ل)	ثنائي الأستيل (ملغ/ل)
1	37	5	5	4	20.57
2	31	6	5	4	29.39
3	31	5	5	8	29.32
4	37	6	5	8	16.09
5	31	5	15	4	30.79
6	37	6	15	4	33.86
7	37	5	15	8	20.22
8	31	6	15	8	42.66
9	34	5.5	10	6	30.38
10	34	5.5	10	6	30.52
11	31	6	5	4	10.85
12	37	6	5	4	14.48
13	37	5	5	8	20.44
14	31	6	5	8	35.38
15	37	5	15	4	43.60
16	31	6	15	4	28.28
17	31	5	15	8	21.16
18	37	5.5	15	8	85.60
19	34	5.5	10	6	31.24
20	34	5.5	10	6	30.6
21	31	5.5	10	6	28.88
22	37	5.5	10	6	67.91
23	34	5	10	6	34.87
24	34	6	10	6	20.60
25	34	5.5	10	4	31.88
26	34	5.5	10	8	24.26
27	34	5.5	5	6	30.56
28	34	5.5	15	6	33.62
29	34	5.5	10	6	31.4
30	34	5.5	10	6	41.73

يلاحظ من الجدول (11) تفاوت وتباين في كمية ثنائي الأستيل المنتجة في كافة المعاملات بلغت في الحد الأقصى بالمعاملة رقم 18 وبكمية إنتاج بلغت (85.60 ملغ/ل)، عندما كان تركيز سكر الغلوكوز وتركيز السترات ودرجة الحموضة ودرجة الحرارة المثوية 15 غ/ل، 8 غ/ل، 5.5 و 37 °م على التوالي، بينما كانت في حدها الأدنى بالمعاملة رقم 11 وبكمية إنتاج بلغت (10.85 ملغ/ل)، عندما كان تركيز سكر الغلوكوز وتركيز السترات ودرجة الحموضة ودرجة الحرارة المثوية 5 غ/ل، 4 غ/ل، 6 و 31 °م على التوالي. يعود الانخفاض الشديد في المعاملة السابقة إلى انخفاض تركيز السترات إلى 4 غ/ل وبالتالي انخفاض كمية ثنائي الأستيل المنتجة وهذا يتوافق مع نتائج Kaneko و زملاؤه (2011).

4-2-1- تحليل التجربة:

يبين الجدول (12) تأثير العوامل المدروسة (كل عامل على حدة، مربع العوامل والعلاقة بين العوامل) في كمية ثنائي الأستيل المنتجة كما يلي:

1- Linear effect وتعني تأثير كل عامل لوحده في كمية ثنائي الأستيل المنتجة:

تحتوي المعادلة على 4 متغيرات (درجة الحرارة - pH - تركيز السترات - تركيز سكر الغلوكوز)، نلاحظ من الجدول أن قيمة P لكل المتغيرات الأربعة أقل من 0.05 ($P < 0.05$) وبالتالي هناك تأثير خطي معنوي لكل من هذه المتغيرات في كمية ثنائي الأستيل المنتجة وهذا يتوافق مع نتائج Kaneko و زملاؤه (2011).

2- Squares effect وتعني تأثير العوامل مربعة في كمية ثنائي الأستيل المنتجة:

تحتوي المعادلة على 4 متغيرات مربعة ونلاحظ من الجدول أنَّ قيمة P لكل من درجة المتغيرات الأربعة مربعة كانت أقل من 0.05 ($P < 0.05$) وهذا يعني أنَّ هناك تأثير معنوي لهذه العوامل الأربعة في كمية ثنائي الأستيل المنتجة، و العلاقة بين العوامل المربعة الأربعة و كمية ثنائي الأستيل المنتجة على شكل منحنى (قطع مكافئ).

3- Interaction effect وتعني تأثير العوامل المترابطة (المتداخلة) في كمية ثنائي الأستيل المنتجة:

يبين الجدول (12) أنَّ علاقة درجة الحرارة كانت معنوية مع درجة الحموضة pH، وعلاقة درجة الحموضة pH مع تركيز السترات ($P < 0.05$) بينما كانت العلاقات الأخرى غير معنوية.

معامل التحديد $R^2 = 88.95\%$ وهذا يدل على أنَّ معادلة الانحدار للعوامل المتغيرة تؤثر بنسبة 88.95 % على مقدار التغير في كمية ثنائي الأستيل المنتجة .

واعتماداً على الجدول (13) يمكن كتابة المعادلة كما يلي :

$$Y = 86.006 + 1.992X_1 + 3.017X_2 + 1.734X_3 + 6.250X_4 + 10.028X_1^2 - 5.632X_2^2 - 5.297X_3^2 - 1.277X_4^2 - 1.163X_1X_2 - 1.224X_1X_3 + 4.596X_1X_4 + 4.261X_2X_3 + 2.516X_2X_4 - 0.815X_3X_4$$

الجدول (12): التحليل الإحصائي لتأثير المتغيرات المدروسة في إنتاج ثنائي الأستيل من *L. lactis*

ssp lactis

المتغير	معامل التغير	الخطأ المعياري للمعامل (T)	الاحتمالية (P)
الثابت	32.006	7.608	0.000
درجة الحرارة	1.992	0.758	0.022
درجة الحموضة	3.017	1.148	0.015
تركيز السترات	1.734	0.660	0.001
تركيز الغلوكوز	6.250	2.379	0.033
(درجة الحرارة) ²	10.028	1.433	0.005
(درجة الحموضة) ²	-5.632	-0.805	0.012
(تركيز السترات) ²	-5.297	-0.757	0.002
(تركيز الغلوكوز) ²	-1.277	-0.183	0.048
درجة الحرارة × درجة الحموضة	-1.163	-0.417	0.023
درجة الحرارة × تركيز السترات	-1.224	-0.439	0.668
درجة الحرارة × تركيز الغلوكوز	4.596	1.649	0.123
درجة الحموضة × تركيز السترات	4.261	1.529	0.050
درجة الحموضة × تركيز الغلوكوز	2.516	0.903	0.383
تركيز السترات × تركيز الغلوكوز	-0.815	-0.292	0.775

يبين الجدول (13) وجود متغير واحد (Linear) على الأقل من المتغيرات المفردة الأربعة معنوي لأن $(P < 0.05)$ ، كما يوجد متغير مربع واحد (Square) على الأقل من المتغيرات المربعة الأربعة معنوي $(P < 0.05)$ ، ويوجد علاقة ترابط واحدة (Interaction) على الأقل من علاقات الترابط الستة معنوية حيث $(P < 0.05)$.

4- Lack-of-Fit: نلاحظ من الجدول أن $(P < 0.05)$ وبالتالي فهي معنوية التأثير وهذا دليل على أن المعادلة تشرح بشكل جيد التغير في كمية ثنائي الأستيل المنتجة.

الجدول (13): تحليل التباين للمتغيرات المدروسة التي تؤثر في فعالية إنتاج ثنائي الأستيل

P	F	MS	SS	DF	Source
0.005	1.220	151.130	2115.840	14	Regression
0.014	2.000	248.140	992.540	4	Linear
0.009	0.680	84.310	337.250	4	Square
0.026	1.050	131.010	786.060	6	Interaction
		124.260	1615.400	13	Residual Error
0.040	8.750	156.180	1561.830	10	Lack-of-Fit
		17.860	53.570	3	Pure Error
			3870.600	29	Total

4- 2- 2- أمثلة ظروف إنتاج ثنائي الأستيل:

يبين الشكل (7) أنَّ كمية ثنائي الأستيل المثالية المنتجة من قبل بكتيريا حمض اللبن *L. lactis ssp lactis* بواسطة البرنامج الإحصائي RSM كانت في حدها الأقصى بقيمة (85.60 ملغ/ل) عند درجة حرارة 37 °م، درجة الحموضة (pH) 5.5، تركيز السترات 6 غ/ل و تركيز سكر الغلوكوز 15 غ/ل موضحة كما يلي:

4- 2- 2- 1- تأثير درجة الحرارة في إنتاج ثنائي الأستيل:

يوضح الشكل (7) العلاقة بين النمو والانتاج الحيوي لثنائي الأستيل عند 3 درجات حرارة (31، 34، 37 °م). تبين أنَّ إنتاج ثنائي الأستيل وصل أقصاه عند الدرجة 37 °م، وكان منخفضاً عند الدرجة 34 °م. في حين درجات الحرارة الأخرى لم تظهر أي فروق ذات دلالة إحصائية بين بعضها البعض. ومع ذلك، تمَّ الحصول على أعلى كفاءة لتحويل السترات إلى ثنائي الأستيل عند الدرجة 37 °م. وهذا توافق مع ما توصل إليه (Medina وزملاؤه، 2000)، في دراسة تأثير درجة الحرارة على إنتاج مركبات النكهة من السترات بواسطة *Lb. rhamnosus*، فتبين أنَّ الانتاج الحيوي للأستيل ازداد بشكل متزامن مع النمو عند 30 °م و 37 °م، بينما كان الانتاج منخفضاً عندما كانت درجة الحرارة 45 °م. يعود ذلك، إلى أنَّه عند درجة الحرارة هذه لوحظ الحد الأقصى لنشاط أنزيم citrate lyase الذي يساهم في انتقال السترات إلى داخل الخلايا واتحاده مع أكرالوأسيتات وبالتالي تشكل البيروفات التي تعد الركيزة الأساسية في إنتاج ثنائي الأستيل والأسيتوين (Wang وزملاؤه، 2017). كما توصَّل Habil وزملاؤه (1982)، إلى أنَّه عندما ارتفعت درجة حرارة التحضين من 23 إلى 30 °م، تمَّ الحصول على حوالي 30 % زيادة في إنتاج ثنائي الأستيل، حيث يكون نشاط diacetyl

reductase بحدده الأدنى عند درجة الحرارة هذه مما يقلل من مستوى تحول ثنائي الأستيل المنتج إلى الأسيتوين.

4-2-2- تأثير درجة الحموضة pH في إنتاج ثنائي الأستيل:

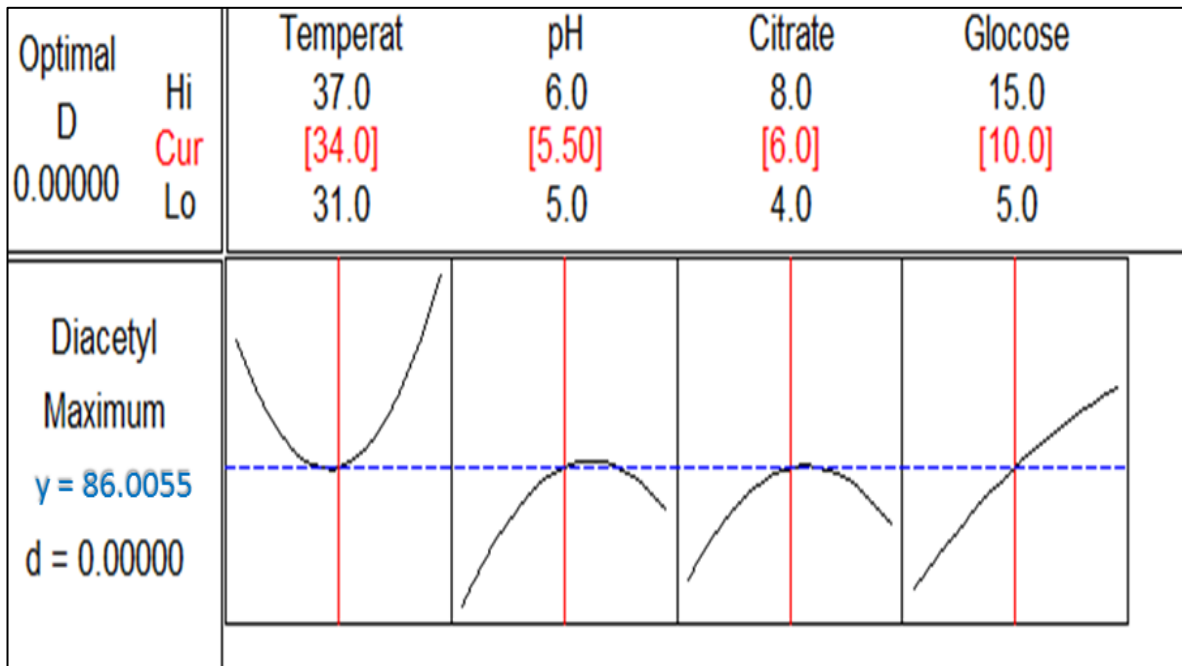
تحققت أعلى إنتاجية من ثنائي الأستيل المنتج من بكتيريا *L. lactis ssp lactis* المتحصل عليها في الدراسة الحالية عند درجة حموضة (pH) تساوي 5.5 كما هو موضح في الشكل (7)، وهذا يتوافق مع ما توصّل إليه Palles وزملاؤه (1998) في دراسة تأثير درجات pH مختلفة تراوحت بين 4 و 6 على إنتاج ثنائي الأستيل من قبل بكتيريا *Lb. casei* و *Lb. plantarum*، فكانت 5.5 هي درجة الـ pH المثالية للنمو وإنتاج أعلى كمية من ثنائي الأستيل. يعود ذلك، إلى أنّ الاستهلاك الأمثل للسترات ومصادر الكربون من قبل بكتيريا حمض اللبن وبالتالي تراكم ثنائي الأستيل في الوسط لا يتم إلّا عند قيم الـ pH المنخفضة والتي تتراوح من 4-5.5 (Cogan و Rea، 2003).

4-2-3- تأثير تركيز السترات في إنتاج ثنائي الأستيل:

يُبيّن الشكل (7) أيضاً العلاقة بين النمو والإنتاج الحيوي لثنائي الأستيل عند 3 مستويات من تركيز السترات (4، 6، 8 غ/ل). تبين من خلال ذلك أنّ إنتاج ثنائي الأستيل وصل أقصاه عندما بلغ تركيز السترات 6 غ/ل، وهذا يتوافق مع نتائج Petit وزملاؤه (1989)، حيث ازدادت إنتاجية ثنائي الأستيل من 27.2 إلى 120.5 ملغ/ل عند زيادة تركيز السترات من 2 غ/ل إلى 6 غ/ل. كما توافقت نتائجنا مع ما توصّل إليه Belguendouz وزملاؤه (1997). بينما تخالفت نتائجنا مع نتائج Cogan و Rea (2003)، إذ أنّ أعلى إنتاجية لثنائي الأستيل تحققت عند تركيز السترات 5 غ/ل.

4-2-2-1- تأثير تركيز سكر الغلوكوز في إنتاج ثنائي الأستيل:

بلغ إنتاج ثنائي الأستيل أقصاه عند استخدام الغلوكوز بتركيز 15 غ/ل، كما هو موضح في الشكل (7)، وذلك يعود إلى أن الكربوهيدرات وبشكل خاص سكر الغلوكوز ذات أهمية بالغة بالنسبة للتركيب الحيوي لكل من حمض اللبن ومركبات النكهة ثنائي الأستيل والأسيتوين (Inesm و Falco، 2018). حيث يؤدي الاستقلاب المشترك للجلوكوز والسترات في الوسط إلى تحفيز معدل نمو سلالات *L. lactis ssp lactis subsp. lactis* وبالتالي إنتاجية أفضل لثنائي الأستيل مقارنة بالغلوكوز وحده في الوسط وهذا يتوافق مع Schmitt و Divies (1992). كما أشار Gouptry وزملاؤه (2000)، إلى أن وجود الكربوهيدرات ساهم بنسبة 65 % من مصدر الكربون لتشكيل مركبات منتجة للنكهات.



الشكل (7): الظروف المثلى لإنتاج ثنائي الأستيل من *L. lactis ssp lactis* بواسطة

البرنامج الإحصائي RSM

4-3- نتائج تطهير بكتيريا *L. lactis ssp lactis* باستخدام الأشعة فوق

البنفسجية:

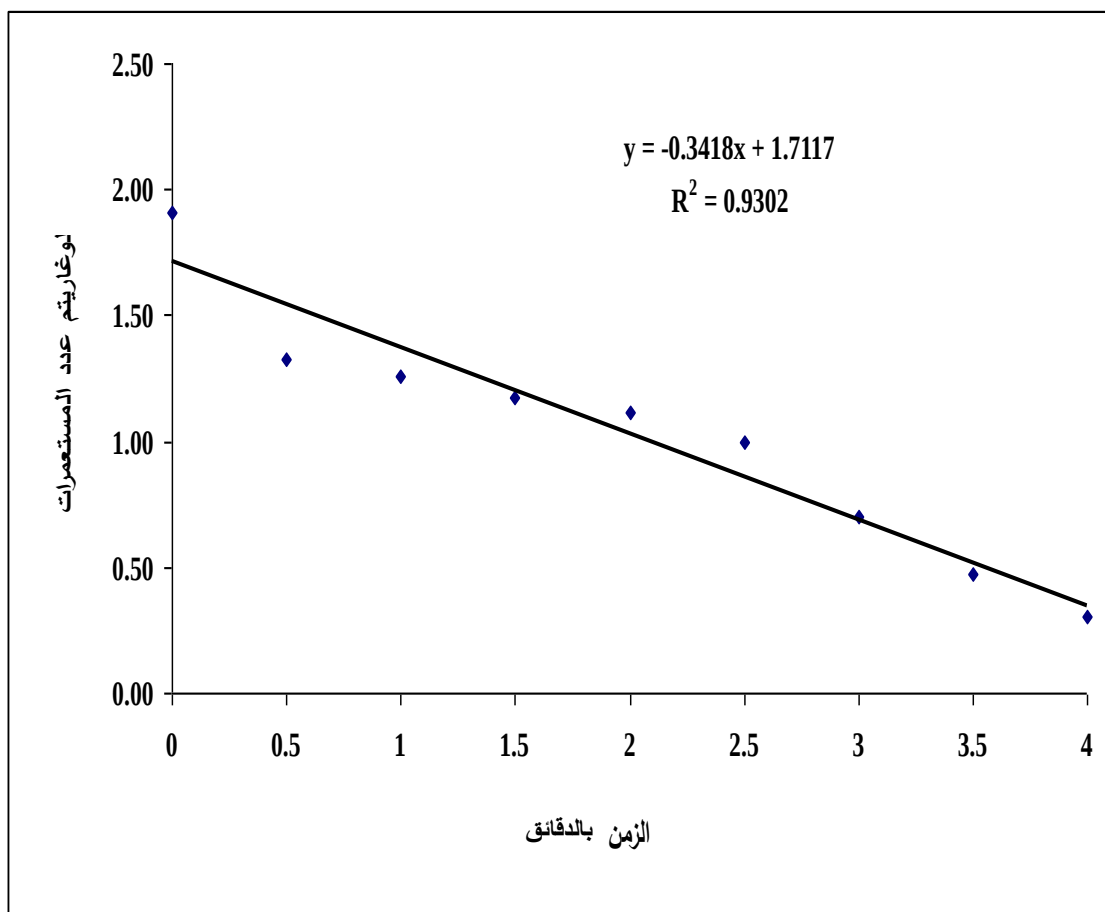
يبين الجدول (14) معدل البقاء لبكتيريا حمض اللبن *L. lactis ssp lactis* بعد تعريضها للأشعة فوق البنفسجية لمدة 4 دقائق، نلاحظ من الجدول انخفاض معدل البقاء بشكل تدريجي مع زيادة فترة التعرض للإشعاع بـ UV، بسبب تأثير الأشعة فوق البنفسجية على DNA البكتيريا، وبالتالي تؤدي إلى تثبيط إنتاج البروتينات الضرورية لحياة الخلية وهذا يتوافق مع نتائج Halander (1992)، حيث كان معدل البقاء 25.92 % عند الزمن 0.5 دقيقة، انخفض هذا المعدل بشكل تدريجي عند فترات التشعيع 1 و 1.5 و 2 و 2.5 و 3 و 3.5 و 4 دقائق، ليصبح 22.22 و 18.52 و 16.05 و 12.34 و 6.71 و 3.70 و 2.47 % على التوالي.

جدول (14): معدل البقاء لبكتيريا حمض اللبن *L. lactis ssp lactis* بعد تعريضها للأشعة فوق البنفسجية

معدل البقاء Survival		زمن التعرض للأشعة /دقيقة/
%	عدد المستعمرات	
100	81	0
25.92	21	0.5
22.22	18	1
18.52	15	1.5
16.05	13	2
12.34	10	2.5
6.71	5	3
3.70	3	3.5
2.47	2	4

كما يبين الشكل (8) الزمن اللوغاريتمي للقتل اعتماداً على عدد مستعمرات بكتيريا حمض اللبن *L. lactis ssp lactis* المتبقية بعد التطهير للأزمنة المدروسة، والمعادلة الناتجة عن الخط

المستقيم هي: $Y = -0.3418X + 1.7117$



الشكل (8): الزمن اللوغاريتمي للقتل

يوضح الجدول (15) نتائج تطهير بكتيريا حمض اللبن *L. lactis ssp lactis* باستخدام أشعة UV لمدة 4 دقائق وتأثيرها في إنتاجية ثنائي الأستيل من كل مستعمرة مطفأة على حدا لمقارنتها مع العزلة الشاهد غير المعرضة للتطهير والتي أعطت كمية إنتاج (65.39 ملغ/ل). نلاحظ من الجدول وجود اثنتا عشرة طفرة أعطت إنتاجية أعلى من العزلة الأصلية التي جرى عليها التطهير، كما تفوقت الطفرة A6 في الزمن 2 دقيقة على باقي الطفرات بمتوسط بلغ (162.85 ملغ/ل)، وبالتالي حققت هذه الطفرة الأفضل زيادة في إنتاج ثنائي الأستيل بمقدار

2.50 مرة مقارنة مع العزلة الأصلية. تلتها الطفرة رقم 5 في الزمن 1.5 دقيقة، بمتوسط بلغ

(140.56 ملغ/ل)، و بالتالي حققت هذه الطفرة زيادة في إنتاج ثنائي الأستيل بمقدار

2.16 مرة مقارنة مع العزلة الأصلية وهذا يتوافق مع نتائج Lopez و Hugenholtz (2001).

كذلك تفوقت الطفرات في الزمن 2 دقيقة بمتوسطاتها على باقي الأزمنة الأخرى في كمية ثنائي

الأستيل المنتجة بمتوسط بلغ (60.98 ملغ/ل) وهذا يتوافق مع نتائج Habil وزملاؤه (1982).

الجدول(15): كمية ثنائي الأستيل الناتجة عن تعريض بكتيريا حمض اللبن لأشعة الـ UV (ملغ/ل)

كمية ثنائي الأستيل الناتجة بعد التطهير بالدقيقة (ملغ/ل)								رقم الطفرة
4	3.5	3	2.5	2	1.5	1	0.5	
39.08	26.74	27.13	33.32	58.25	35.15	30.35	41.21	A1
46.27	65.66	39.15	37.27	50.62	47.27	66.02	40.46	A2
	28.23	40.32	48.25	117.05	56.14	49.54	110.12	A3
		63.54	92.36	49.01	44.63	48.22	29.56	A4
		42.22	71.23	39.10	140.56	32.25	20.06	A5
			52.36	162.58	59.56	23.56	39.21	A6
			48.69	55.36	26.36	35.48	85.26	A7
			33.41	45.28	50.15	36.28	45.21	A8
			35.62	38.56	49.35	47.65	48.58	A9
			44.21	39.59	113.56	44.36	44.61	A10
				45.41	52.36	58.69	39.24	A11
				55.61	48.36	39.69	33.02	A12
				36.31	44.23	33.56	39.21	A13
					25.36	105.36	44.25	A14
					75.69	22.55	26.47	A15
						36.99	48.65	A16
						52.06	44.25	A17
						40.13	36.89	A18
							33.26	A19
							48.64	A20
							25.78	A21
42.68 ± 5.08 ^e	40.21 ± 22.05 ^f	42.47 ± 13.18 ^e	49.67 ± 18.89 ^c	60.98 ± 36.88 ^a	57.92 ± 31.12 ^b	44.60 ± 18.96 ^d	44.00 ± 19.92 ^d	المتوسط العام

يشير اختلاف الأحرف بين المتوسطات إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات (الطفرات) عند مستوى ثقة 0.05

4-4 نتائج فصل وتقدير ثنائي الأستيل باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية

الأداء HPLC:

قُدرت كمية ثنائي الأستيل الناتجة من البكتيريا المطفّرة A6 باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC، من خلال مقارنة المخطط (4) الذي يبين مساحة قمة وتركيز المركب القياسي مع المخطط (5) الذي أعطى مساحة قمة عينة ثنائي الأستيل، حسب تركيز ثنائي الأستيل المستخلص كما يلي (Macciola وزملاؤه، 2008):

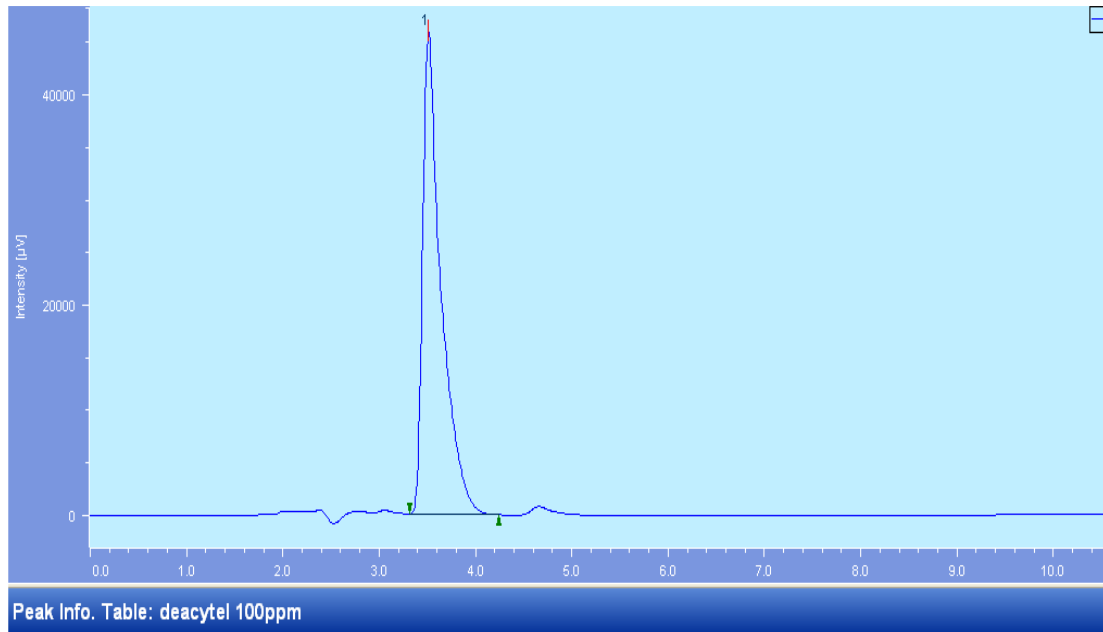
تركيز ثنائي الأستيل (ملغ/ل) = (مساحة قمة العينة / مساحة قمة المركب القياسي) x تركيز المركب القياسي x عامل التمديد.

تركيز ثنائي الأستيل (ملغ/ل) = $(611337/3345) \times 100 \times 100 = 1.23 \pm 54.7$ ملغ/ل

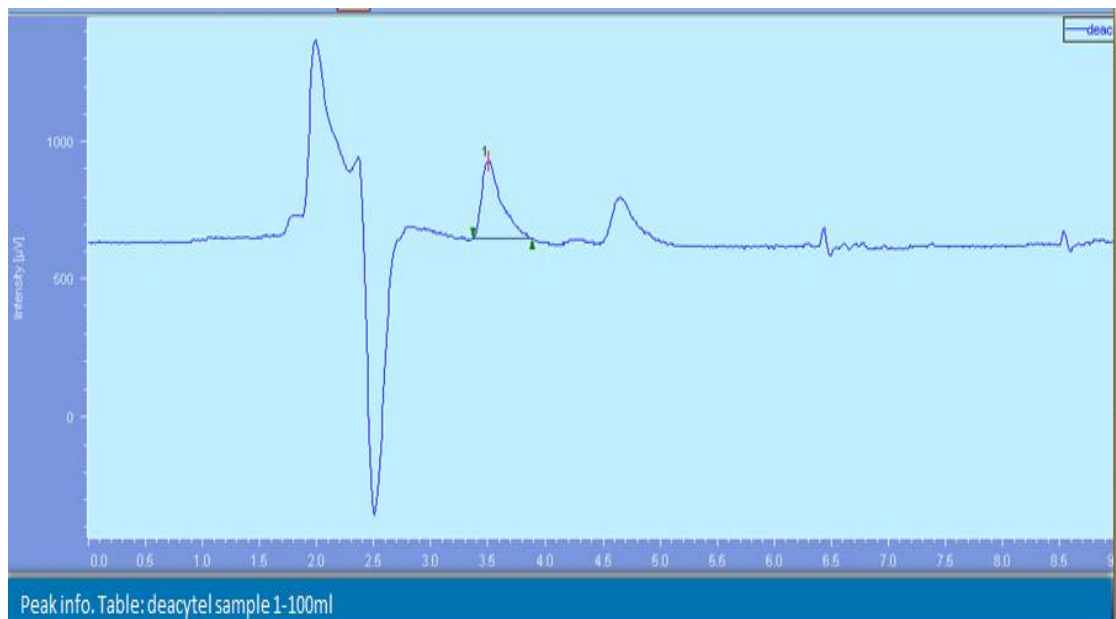
يبين الجدول (16) كمية ثنائي الأستيل المستخلصة والمنقاة من البكتيريا المطفّرة A6، من خلال تحليل ثنائي الأستيل المستخلص من البكتيريا المطفّرة A6 باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC. بيّنت النتائج انخفاض تركيز ثنائي الأستيل الناتج من البكتيريا المطفّرة من 162.58 ملغ/ل إلى 50.47 ملغ/ل وهو ما يعادل تقريباً لإنتاجية ثنائي الأستيل من العزلة الأصلية. وبالتالي يمكن تفسير هذا الانخفاض في عدم تمكن البكتيريا المطفّرة من الحفاظ على خصائصها الإنتاجية خلال مراحل الفصل والتقدير نظراً لتكرار ظروف تنشيط زراعتها وتزايدها، إضافة إلى تأثير بعض الظروف المصاحبة لعملية الفصل والتقدير وهذا يتوافق مع نتائج (Goodarzi، 2016).

الجدول (16): تقدير كمية ثنائي الأستيل من البكتيريا المطفرة A6 باستخدام HPLC

مكررات الحقن	ملغ / 100 مل
N1	5.66
N2	5.68
N3	5.33
N4	5.26
N5	5.43
المتوسط العام	5.47



المخطط (4): كروماتوغراف المركب القياسي لثنائي الأستيل بجهاز HPLC



المخطط (5): كروماتوغراف ثنائي الأستيل الناتج من البكتيريا المطفرة *L. lactis* ssp وذلك بعد تنقيته بجهاز HPLC

4-5- نتائج تدعيم نكهة الزبدة بالبائنات المنتخبة ومقارنتها مع ثنائي الأستيل

التجاري:

استخدمت سلالات مختلفة من الأنواع البكتيرية التالية: *L. lactis ssp lactis*، *Lb. bulgaricus*، *Lb. acidophilus*، *Leuco. citrovorum* و *Lb. Casei*. في تكوين نوعين من البائنات لتصنيع الزبدة. حضر البادئ الأول من خلال تنمية كل سلالة مكونة له على حدة، بعد ذلك خلطت السلالات الثلاث مع بعضها بنسبة 1:1:1 لتكون البادئ الأول، كذلك الأمر بالنسبة للبادئ الثاني، موضحة في الجدول (17). اختيرت السلالات التي أعطت أعلى مستويات من ثنائي الأستيل وذلك لقدرتها على إنتاج نكهة الزبدة الجيدة، إضافة إلى قدرتها على إنتاج حمض اللبن وتخدير اللاكتوز (Gajjar وزملاؤه، 2015؛ Jovanovic - Levata و Sandine، 1997؛ Vedamuthu وزملاؤه، 1986).

الجدول (17): البائنات المستخدمة في إنتاج الزبدة والسلالات المكونة لها ونسبها

البادئ	السلالات المكونة له	نسبة السلالات
الأول	<i>Leuco. citrovorum</i>	1
	<i>Lb. bulgaricus</i>	1
	<i>Lb. casei</i>	1
الثاني	<i>L. lactis ssp lactis</i>	1
	<i>Lb. acidophilus</i>	1
	<i>Lb. bulgaricus</i>	1

استخدمت البادئات الموضحة في الجدول (17) في تصنيع عينتان من الزبدة، العينة الأولى صُنعت بإضافة البادئ الأول، العينة الثانية صُنعت بإضافة البادئ الثاني، بالمقابل صُنعت عينة ثالثة من الزبدة بإضافة ثنائي الأستيل التجاري بنسبة 1 ملغ/ كغ للمقارنة. خلال الأيام الأولى من التصنيع والحفظ في درجة حرارة 5 °م، أجريت مجموعة من التحاليل الكيميائية بواقع ثلاثة مكررات لكل عامل مدروس، موضحة في الجدول (18).

4-5-1- نتائج دراسة التركيب الكيميائي لعينات الزبدة المصنعة:

يظهر الجدول (18) نتائج كمية ثنائي الأستيل المنتجة في القشدة المعدة لتصنيع الزبدة:

الجدول (18) تقدير ثنائي الأستيل في القشدة المعدة لتصنيع الزبدة

العينة	ثنائي الأستيل ملغ/ ل
القشدة المستخدمة في تصنيع عينة الزبدة الأولى (البادئ الأول)	4.50 ± 0.02^b
القشدة المستخدمة في تصنيع عينة الزبدة الثانية (البادئ الثاني)	6.40 ± 0.01^a
القشدة المستخدمة في تصنيع عينة الزبدة المضاف إليها ثنائي الأستيل التجاري (بنسبة 1 ملغ/ كغ)	3.31 ± 0.02^c

القراءة تمثل متوسط ثلاثة مكررات، كما يشير اختلاف الأحرف في العمود الواحد إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات عند مستوى ثقة 0.05

بيّنت النتائج وجود فروق معنوية بين عينات القشدة الثلاث في كمية ثنائي الأستيل المنتجة، وأنّ القشدة المستخدمة في تصنيع عينة الزبدة الثانية أعطت أعلى كمية من ثنائي الأستيل المنتج بلغت (6.4 ملغ/ ل)، يعود ذلك إلى فعالية ونشاط بكتيريا البادئ وخاصة وجود بكتيريا *L. lactis ssp lactis* التي تتميز بقدرة عالية على استقلاب السترات وبالتالي إنتاج مركبات

النكهة وبشكل خاص ثنائي الأسثيل وهذا يتوافق مع نتائج (Ranganathan و Kuila، 1998؛ Hugenholtz، 2014).

كما يظهر الجدول (19) نتائج تحليل كل من الدهن، الرطوبة، الحموضة (% حمض اللبن) وثنائي الأسثيل لعينات الزبدة المصنعة.

الجدول (19): تقدير الدهن، الرطوبة، الحموضة وثنائي الأسثيل في عينات الزبدة المصنعة

العينة	الدهن (%)	الرطوبة (%)	الحموضة (% حمض اللبن)	ثنائي الأسثيل (ملغ/ كغ)
العينة المصنعة من البادئ الأول	80.1 ± 0.03 ^a	17.15 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.01 ^a	1.98 ± 0.01 ^b
العينة المصنعة من البادئ الثاني	81 ± 0.02 ^a	17.10 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	2.53 ± 0.01 ^a
العينة المصنعة من ثنائي الأسثيل التجاري	80.8 ± 0.02 ^a	17.12 ± 0.01 ^a	0.06 ± 0.02 ^b	1.15 ± 0.01 ^c

القراءة تمثل متوسط ثلاثة مكررات، كما يشير اختلاف الأحرف في العمود الواحد إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات (العينات) عند مستوى ثقة 0.05

تراوحت النسبة المئوية للرطوبة في العينات المختبرة بين 17.10 - 17.5 % وبالمعدل 17.12 %. لم تكن هناك فروق معنوية بين العينات الثلاث المصنعة في المحتوى الرطوبي، بسبب اتباع مراحل تصنيع واحدة وهذا يتوافق مع نتائج (Yasar وزملاؤه، 2018)، بينما تخالفت نتائجنا مع (Bakirci وزملاؤه، 2002) حيث تراوحت نسبة الرطوبة في عينات الزبدة المختبرة بين 14 و 15 %. على الرغم من أن محتوى الرطوبة في العينات الثلاث المصنعة من الزبدة كان أعلى قليلاً من المعايير القياسية للزبدة البالغة (14 - 16 %)، إلا أنه كان ضمن النطاق المتوقع، كون عملية الغسل اليدوية لحبيبات الزبدة قد تكون في بعض الأحيان غير فعالة

بشكل جيد لإزالة قطرات الماء الموجودة على سطح الزبدة وهذا يتوافق مع نتائج (Shi، 2015).

لم تكن هناك أيضاً فروق معنوية بين العينات الثلاث المصنّعة في محتوى الدهن. كما تراوحت النسبة المئوية للدهن في العينات المدروسة من الزبدة بين 80.1-81 %، وبالمتوسط 80.8 %، وهي نسبة أقل قليلاً من المعايير القياسية للزبدة البالغة (82-84 %). ومع ذلك، كانت النتائج معقولة، مع الأخذ في الاعتبار ارتفاع نسبة الرطوبة في الزبدة وهذا يتوافق مع نتائج (Shi، 2015). بينما تخالفت نتائجنا مع (Yasar وزملاؤه، 2018)، إذ حددت محتويات الدهن بنسبة 85 % في العينات المختبرة.

تراوحت النسبة المئوية للحموضة في العينات المختبرة بين 0.06-0.10 %، وبالمتوسط 0.11 %. بيّنت النتائج وجود فروق معنوية بين العينات الثلاث، وأنّ العينات المصنّعة بإضافة البادئ الأول والبادئ الثاني أعطت نسبة حموضة مرتفعة، يعود ذلك إلى خصائص بكتيريا البادئ المستخدمة، إضافة إلى أنّ جميع مزارع البادئات المستخدمة لديها خصائص نمو مماثلة، وبالتالي لم يكن لنوع البادئ تأثير على إنتاج الحمض وهذا يتوافق مع نتائج (Bakirci وزملاؤه، 2002). بينما العينة المصنّعة بإضافة ثنائي الأستيل التجاري أعطت أقل نسبة حموضة يعود ذلك، إلى أنّ الزبدة المسواة كان لها نشاط ميكروبي بسبب التلقيح بمزارع البادئ، حيث استخدمت بكتيريا البادئ اللاكتوز لإنتاج حمض اللبن وبالتالي اعطاء نسبة حموضة أعلى وهذا يتوافق مع نتائج (Yasar وزملاؤه، 2018).

في حين تراوحت كمية ثنائي الأستيل المنتجة في العينات المختبرة بين 1-2.53 ملغ/ كغ وبالمتوسط بلغت 0.98 ملغ/ كغ. بيّنت النتائج وجود فروق معنوية بين العينات الثلاث، وأنّ

العينة المصنّعة من البادئ الثاني أعطت أعلى كمية من ثنائي الأستيل المنتج بلغت (2.53 ملغ/ كغ)، يعود ذلك كما ذكرنا سابقاً إلى وجود بكتيريا *L. lactis ssp lactis*، التي تمتلك قدرة عالية على إنتاج ثنائي الأستيل والأسيتوين من السترات. وبالتالي يتم استخدامها على نطاق واسع كمنتج مميز للنكهة في العديد من مزارع البادئات المستخدمة في صناعة منتجات الألبان المتخمرة، وهذا يتوافق مع نتائج (Kuila و Ranganathan ، 1998 ، Hugenholtz، 2014). تلاها العينة المصنّعة من البادئ الأول، التي أعطت ثنائي الأستيل بكمية بلغت (1.98 ملغ/ كغ)، يفسر ذلك بوجود بكتيريا *Leuco. citrovorum* التي تتميز بقدرة عالية على استقلاب السترات وبالتالي إنتاج مركبات النكهة وبشكل خاص ثنائي الأستيل تحت الظروف الحمضية التي يؤمنها وجود بكتيريا حمض اللبن المنتجة للحمض والتي بسبب تنوعها الاستقلابي النسبي في الحليب ، تنتج مواد تحفيزية ضرورية لنمو *Leuco. citrovorum*. وهذا يتوافق مع نتائج (Hugenholtz، 2014، Schmitt و Divies، 1990، Van Hylckama و Hugenholtz، 2007). بينما بلغت كمية ثنائي الأستيل المنتجة في العينة الثالثة (1.15 ملغ/ كغ)، وهي نسبة أقل مقارنة مع العينة الأولى والثانية. يعزى ذلك إلى أنّ الحليب الخام المعد لتصنيع الزبدة يحتوي على مجموعة متنوعة من بكتيريا حمض اللبن والتي تتميز بنشاط استقلابي عالي، إلا أنّ المايكروفلورا الطبيعية قد تضعف أثناء عملية التصنيع، وبالتالي عدم تطور خصائص النكهة بشكل ملحوظ، وهذا يتوافق مع نتائج (Sarantinopoulos وزملاؤه، 2001؛ Farahani وزملاؤه، 2017).

4-5-2- نتائج التقييم الحسي للزبدة المصنّعة:

دُرست الخواص الحسية لعينات الزبدة المصنّعة التي تضمنت المظهر الخارجي (اللون، الشوائب)، الطعم، الرائحة والقوام، وذلك بهدف تقييم فيما إذا كان استعمال البادئ المحلي المنتخب سيساهم في تحسين الجودة الحسية للمنتج، يُبيّن الجدول (20) نتائج التقييم الحسي لعينات الزبدة المصنّعة باستخدام بكتيريا حمض اللبن المنتخبة كبادئات ومقارنتها مع ثنائي الأستيل التجاري.

بيّنت النتائج عدم وجود فروق معنوية بين العينات الثلاث المصنّعة من حيث اللون، الشوائب والقوام، وهذا طبيعي لكون مصدر الحليب واحد، تصفية الحليب قبل التصنيع واتباع مراحل تصنيع واحدة. بينما ظهرت فروق معنوية بين العينات الثلاث بالنسبة للطعم والرائحة، حيث أعطت العينة المصنّعة باستخدام البادئات التالية: *L. lactis ssp lactis*، *Lb. bulgaricus*، *Lb. acidophilus*، أفضل الصفات الحسية من قبل جميع المقيمين، وبدرجة أقل العينات المصنّعة باستخدام البادئات *Leuco. citrovorum*، *Lb. bulgaricus* و *Lb. casei*، في حين تم قبول بدرجة أقل العينات المصنّعة بإضافة ثنائي الأستيل التجاري بنسبة (1 ملغ/ كغ).

الجدول (20): نتائج التقييم الحسي لعينات الزبدة المصنّعة

القبول العام	القوام	الرائحة	الطعم	المظهر الخارجي		العينة
				الشوائب	اللون	
20.35 ^b	3.99±0.82 ^a	3.94 ±0.36 ^b	3.90 ±0.52 ^b	3.71±0.56 ^a	4.81±0.31 ^a	1
21.38 ^a	4.14±0.93 ^a	4.12±0.33 ^a	4.43±0.44 ^a	3.79±0.40 ^a	4.90 ±0.22 ^a	2
17.22 ^c	4.10±0.80 ^a	2.14 ±0.23 ^c	2.66±0.53 ^c	3.61±0.61 ^a	4.75±0.46 ^a	3

يشير اختلاف الأحرف في العمود الواحد إلى وجود فروق معنوية بين المعاملات (العينات) عند مستوى ثقة 0.05

مما سبق نجد أنّ العينات المصنّعة من البادئ الثاني هي الأكثر قبول كمنتج نهائي، حيث تتميز هذه العينات بتواجد بكتيريا *L. lactis ssp lactis* ذات القدرة المرتفعة على تحويل السترات إلى مركبات نكهة وثاني أكسيد الكربون، مما يساهم في تعزيز الخصائص الحسية للمنتجات المتخمرة. وهذا يتوافق مع نتائج (Quintans وزملاؤه، 2008؛ Longo وSanroman، 2006). وبدرجة أقل العينات المصنّعة من البادئ الأول، يعود ذلك إلى تواجد بكتيريا *Leuco. citrovorum* نظراً لقدرتها على إنتاج CO2 الذي يوفر النعومة والقوام الأملس للزبدة المصنّعة وإنتاج مركبات النكهة ثنائي الأستيل والأسيتوين، عن طريق التخمر غير المتجانس للاكتوز واستقلاب السترات. وهذا يتوافق مع نتائج (Vedamuthu، 1994؛ Cogan وزملاؤه، 1981).

الفصل الخامس

الاستنتاجات و التوصيات

CONCLUSION & RECOMMENDATIONS

5- الاستنتاجات: Conclusion

1- شُخصت البكتيريا المعزولة إلى الأجناس التالية: *Enterococcus* (21 عزلة)،

جنس *Lactobacillus* (10 عزلات)، جنس *Lactococcus* (3 عزلات) و (عزلتان)

تنتمي إلى الجنس *Leuconostoc*.

2- تمتعت العزلة *L. lactis ssp lactis* بإنتاجية عالية من ثنائي الأستيل مقارنة

ببقية العزلات الأخرى.

3- بيّنت نتائج الأمثلة لبكتيريا *L. lactis ssp lactis* أنّ الظروف المثلى لإنتاج

ثنائي الأستيل حددت عند درجة حرارة 37°م، درجة الحموضة (pH) 5.5، تركيز

السترات 6 غ/ل و تركيز سكر الغلوكوز 15 غ/ل.

4- أدّت عملية التطهير بالأشعة فوق البنفسجية إلى رفع نسبة إنتاج ثنائي الأستيل

مقارنة مع العزلة الأصلية.

5- تبيّن أن بكتيريا حمض اللبن *L. lactis ssp lactis*، تقوم بإنتاج ثنائي الأستيل

نقي بمعدل 54.7 ملغ/ل.

6- تميّزت الزبدة المصنّعة من البادئ المكون من خليط من بكتيريا *L. lactis ssp*

lactis، *Lb. bulgaricus* و *Lb. acidophilus*، أنّها تمتعت بأفضل الصفات

الحسية، وأعطت أعلى كمية من ثنائي الأستيل المنتج مقارنة بالعينات المصنّعة

الأخرى.

6- التوصيات : Recommendations

- استخدام الطفرة المنتجة بهدف رفع إنتاجية ثنائي الأستيل والتأكد من ثبات الطفرة.
- اعتماد البادئ المكون من بكتيريا *L. lactis ssp lactis*، *Lb. bulgaricus* و *Lb. acidophilus*، لإدخاله في صناعة الزبدة لإكسابها النكهة المميزة.
- اعتماد الطرائق البيولوجية الجزيئية في تحديد الطفرة وإمكانية نقلها بعملية Cloning.

الفصل الخامس

المراجع

References

7- المراجع: References

المراجع العربية:

- أبو غرة، صياح وهдал، أحمد. (1998). تكنولوجيا الألبان - مشتقات الحليب الدهنية. مديرية الكتب الجامعية. جامعة دمشق. كلية الزراعة.
- أبو يونس، عهد؛ أبو غرة، صياح وسليق، سمير. (2007). الكشف عن بكتيريا حمض اللبن المعزولة من بعض منتجات الألبان السورية مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. المجلد/23/ العدد/2/. الصفحات 317-334 .
- السواح، محمود محمد عوض الله. (2002). الأنزيمات الميكروبية. دار النيل للطباعة. الطبعة الأولى، مصر.
- حاج مصطفى، مهند؛ يازجي، صباح والأمير، لينا. (2015). تعريف وتوصيف عزلات محلية من بكتيريا حمض اللبن و اختبار قدرتها على إنتاج ثنائي الأسيتيل. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. المجلد/31/ العدد/3/. الصفحات 193 - 209.
- حداد، غانم ودمر، انطون. (1992). الاختبارات الكيميائية والمكروبيولوجية للحليب. مديرية الكتب الجامعية. جامعة دمشق. كلية الزراعة.
- شحاتة، عبده السيد. 1997. تكنولوجيا الجبن. المكتبة الأكاديمية، مصر.

المراجع الأجنبية:

- Antinone M.J., Lawless H.T., Ledford R.A. and Johnston, M. (1994). Diacetyl as a Flavor Component in Full Fat Cottage Cheese. *Journal of Food Science*. Vol **59**(1): 38-42.
- Antonsson, M., Molin, G. and Ardo, Y. (2003). *Lactobacillus* strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. *International Journal of Food Microbiology*. Vol **85**: 159–169.
- Anuradha, R., Suresh, A.K. and Venkatesh, K.V. (1999). Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. *Process Biochemistry*. Vol **35**: 367–375.
- Anunziata, O. A., Pierella, L. B. and Beltramone, A. R. (2001). Kinetic studies on diacetyl synthesis over V-containing zeolites. *Catalysis Letters*. Vol **75**(1): 87-91.
- Attai, R. (2009). Quantification of volatile compounds in goat milk Jack cheese using static headspace gas chromatography. *Journal of Dairy Science*. Vol **92**: 2435– 2443.
- Augustin, M.A. and Versteeg, C. (2006). Milk fat: physical, chemical and enzymatic modification. In: Fox PF and McSweeney PLH (Eds.) *Advanced dairy chemistry- lipids*. Vol **2**: 293–332.
- Ayad, E.H.E., Verheul, A., Engels, W.J.M., Wouters, J.T.M. and Smit, G. (2001). Enhanced flavour formation by combination of selected lactococci from industrial and artisanal origin with focus on completion of a metabolic pathway. *Journal of Applied Microbiology*. Vol **90**(1): 59–67.
- Bae, J. W., Rhee, S. K., Park, J. R., Chung, W.H., Nam, Y.D. and Lee, I. (2005) . Development and Evaluation of Genome-Probing

Microarrays for Monitoring Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol **71**(12): 8825–8835

- Bakirci, I., Celik, S. and Ozdemir, C. (2002). The effects of commercial starter culture and storage temperature on the oxidative stability and diacetyl production in butter. *International Journal of Dairy Technology*. Vol **55**(4): 177-181.
- Baron, M., Roy, D. and Vuillemand, J. C. (2000). Biochemical characteristics of fermented milk produced by mixed-cultures of lactic starters and bifido bacteria. *Dairy Science and Technology*. Vol **80**: 465– 478.
- Bassit, N., Boquein, C,Y., Picque, D. and Corrieu, G. (1993). Effect of initial oxygen concentration on diacetyl and acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol **59**: 1893- 1897.
- Battelli, G., Silvetti, T., Decimo, M. and Brasca, M. (2011). Volatile organic compounds produced in milk by *Enterococcus faecalis*. Institute of Sciences of Food Production. National Research Council (ISPA-CNR).
- Belguendouz, T., Cachon, R., Divies, E. (1997). pH homeostasis and citric acid utilization: differences between *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactococcus lactis*. *Curro Microbiology*. Vol **35**: 233-236.
- Benito- de Cardenas, I. L., Medina, R. and Oliver, G. (1992). Effect of glucose and lactose on the utilization of citrate by *Lactobacillus casei* subsp. *rahnosus* ATCC 7469. *Revista Argentina de Microbiologia*. Vol **24**: 136–144.
- Beshkova, D. M., Simova, E. D., Frengova, G. I., Simov, Z. I. and Dimitrov, Zh., P. (2003). Production of volatile aroma compounds

by kefir starter cultures. *International Dairy Journal*. Vol **13**: 529–535.

- Bintsis, T. (2018a). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*. Vol **4**(4): 665–684.
- Bintsis, T. (2018b). Lactic acid bacteria: their applications in foods. *Journal of Bacteriology and Mycology*. Vol **6**(2): 89-49.
- Bintsis, T. and Athanasoulas, A. (2015). Dairy starter cultures. In: Papademas P, editor. *Dairy Microbiology, A Practical Approach*. Boca Raton: CRC Press. 114–154.
- Birkenhauer, J. M. and Oliver, J. D. (2003). Use of diacetyl to reduce the load of *Vibrio vulnificus* in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Food Protect*. Vol **66**(1): 38–43.
- Borner, R.A., Kandasamy, V., Axelsen, A.M., Nielsen ,A.T. and Bosma, E.F. (2019). Genome editing of lactic acid bacteria: opportunities for food, feed, pharma and biotech. *FEMS Microbiology Letters*. Vol **366**(1): 291- 301 .
- Bosset, J.O. and Gauch, R. (1993). Comparison of the volatile flavor compounds of six European AOC cheeses by using a new dynamic headspace GC–MS method. *International Dairy Journal*. Vol **3**: 359– 377.
- Boumerdassi, H., Monnet, C., Desmazeaud, M. and Corrieu, G. (1997a). Effect of citrate on production of diacetyl and acetoin by of *Lactococcus lactis* ssp .*lactis* CNRZ 483 cultivated in the presence of oxygen. *Journal of Dairy Research*. Vol **80**: 634–639.
- Boumerdassi, H., Monnet, C., Desmazeaud, M. and Corrieu, G. (1997b). Isolation and properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CNRZ 483 mutants producing diacetyl and

acetoin from glucose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol **63**(6): 2293–2299.

- Broadbent, J.R., McMahon, D.J. and Welker, D.L. (2003). Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: A review. *Journal of Dairy Science*. Vol **86**: 407–423.
- Burke, N., Zacharski, K. A., Southern, M., Hogan, P., Ryan, M. P. and Adley, C.C. (2018). The Dairy Industry: Process, Monitoring, Standards, and Quality. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80398>
- Chao, S. H., Tomii, Y., Sasamoto, M., Fujimoto, J., Tsai, Y. C. and Watanabe, K. (2008). *Lactobacillus capillatus* sp. nov., a motile *Lactobacillus* species isolated from stinky tofu brine. *Int. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol **58**: 2555–2559.
- Chauhan, J.M., Lim, S.Y., Powers, J.R., Ross, C.F. and Clark, S. (2010). Low fat ice cream flavor not modified by high hydrostatic pressure treatment of WPC. *Journal of Dairy Science*. Vol **93**(4): 1452– 1458.
- Chemical Information Review Document for Artificial Butter Flavoring and Constituents Diacetyl and Acetoin. (2007). Supporting Nomination for Toxicological Evaluation by the National Toxicology Program.
- Cheng, H. (2010). Volatile flavor compounds in yogurt: a review. *Food Science and Nutrition*. Vol **50**(10): 938–50.
- Chen, C., Zhao, S., Hao, G., Yu, H., Tian, H. and Zhao, G. (2017). Role of lactic acid bacteria on the yogurt flavor. *International journal of food properties*. Vol **20**: 316 – 330.

- Christensen, M. D. and Pederson, C. S. (1985). Factors Affecting Diacetyl Production by Lactic Acid Bacteria. New York State Agricultural Experiment Station, Cornell University, Geneva.
- Cocaigh-Bousquet, M., Garrigues, C., Loubiere, P. and Lindley, N. D. (1996). Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol **70**: 253_267.
- Cogan, T.M., O'Dowd, M. and Mellerick, D. (1981). Effects of sugar on acetoin production from citrate by *Leuconostoc lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol **41**: 1–8.
- Cogan, T. M., Walsh, D. and Condon, S. (1989). Impact of aeration on the metabolic end-products formed from glucose and galactose by *Streptococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology*. Vol **66**: 77–84.
- Cronin, D. A. and Rispin, E. (1996). The determination of diacetyl in cultured buttermilk in the presence of the unstable precursor a acetolactic acid. In A. J. Taylor & D. S. Mottram (Eds.). *Flavour science*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 118–121.
- Cruz, A.G., Castro, W.F., Faria, J.A.F., Lollo, P.C.B., Amaya-Farfan, J., Freitas, M.Q., Rodrigues, D., Oliveira, C.A.F. and Godoy, H.T. (2012). Probiotic yogurts manufactured with increased glucose oxidase levels: post acidification, proteolytic patterns, survival of probiotic microorganisms, production of organic acid and aroma compounds. *Journal of Dairy Science*. Vol **95**: 2261–2269.
- De- Figueroa, R. M., Oliver, G. and Benito, L. (2001). Influence of temperature on flavor compound production from citrate by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, *Journal of Dairy Science*. Vol **155**(4): 257-262.

- Deosarkar, S.S., Khedkar, C.D. and Kalyankar, S.D. (2016). Butter Manufacture. *The Encyclopedia of Food and Health*. Vol **1**: 529-534.
- Derkx, P.M., Janzen, T., Sorensen, K.I., Christensen, J.E., Stuer-Lauridsen, B. and Johansen, E. (2014). The art of strain improvement of industrial lactic acid bacteria without the use of recombinant DNA technology. *Microbial Cell Factories*. Vol **13**(1): 1-5.
- De-Vos, W.M. and Hugenholtz, J. (2004). Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria, *Trends in Biotechnology Journal*. Vol **22**: 72-79.
- Donnelly, C. W. (2004). Growth and survival of microbial pathogens in cheese. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 3rd ed. Vol 1. Elsevier Applied Science, London.
- Dortu, C. and Thonart, P. (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, Vol **13**(1):143-154.
- Drouault, S. and Corthier, G. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. *Vet.Res.* **32**:101- 117.
- Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. (2001). Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*. Vol **91**: 861– 870.
- Eneroth, A., Christiansson, A., Brendehaug, J. and Molin, G. (1998). Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *International of Dairy Journal*. Vol **8**: 829– 834.

- Engels, W. J. M. and Visser, S. (1994). Isolation and comparative characterization of components that contribute to the flavor of different types of cheese. *Neth. Milk Dairy Journal*. Vol **48**: 127–140.
- Fanous, A. S. (2011). Growth Media for Enzymes and Starter Culture in Halal Prespective. The First Gulf Conferenceon Halal Industry and its Services.
- Farahani, Z., Rasooli, I. and Owlia, P. (2017). Isolation, identification and characterization of indigenous lactic acid bacteria for flavour improvement. *International Food Research Journal*. Vol **24**(1): 428-436.
- Foulquie- Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidoum, E. and De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. Vol **106**: 1 – 24
- Fox, P. F., Law, J., McSweeney, P. L. H. and Wallace, J. (1993). Biochemistry of cheese ripening. In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (2nd ed.. In P. F. Fox (Ed.). General aspects,. London: Chapman and Hall. 1, 389–438)
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A. and Poznanski, E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*. Vol **19**: 3-11.
- Frede, E. and Buchheim, W. (1994). Butter making and the churning of blended oil emulsions. *Journal of the Society of Dairy Technology*. Vol **47**: 17–27.
- Gajjar, H., Shridhar, J. and Hasmukh, M. (2015). Probiotic assessment of fermented milk product buttermilk made from

different milk samples with special reference to lactic acid bacteria. *Horizons of Holistic Education*. Vol **22**: 149-158.

- Garcia-Quintans, N., Magni, C., de Mendoza, D. and Lopez, P. (1998). The citrate transport system of *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* is induced by acid stress. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol **64**(3): 850-857.
- Geisen, R. and Holzapfel, W.H. (1996). Genetically modified starter and protective cultures. *International Journal of Food Microbiology*. Vol **30**(3): 315 -324.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. Vol **88**: 215-222.
- Glenn, E. (2018). Density. *The Physics Hypertextbook*. 59- 120.
- Goodarzi , A. (2016). UV - Induced Mutagenesis in Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Genetics and Genomics*. Vol **4**(1): 1-4.
- Goupry, S., Croguennec, T., Gentil, E. and Robins, R.J., (2000). Metabolic flux in glucose/citrate co-fermentation by lactic acid bacteria as measured by isotopic ratio analysis. *FEMS Microbiology Letters*. Vol **182**: 207– 211.
- Guo, T., Kong, J., Zhang, L., Zhang, C. and Hu, S. (2012). Fine Tuning of the Lactate and Diacetyl Production through Promoter Engineering in *Lactococcus lactis*. Vol **7**(4): 36- 46.
- Habił, H., Oberman, A., Piątkiewicz,k. and Z. Libudzisz. (1982). Production of diacetyl and acetoin by lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol **26**: 615–623.
- Hammer, B. W. (1980). Volatile acid production of *Streptococcus lacticus* and the organisms associated with it in starters.

Agricultural Experiment Station, Iowa State College of Agriculture and Mechanic Arts. Vol **63**: 61-79.

- Hammer, B. W. and Babel, F. J. (1993). Bacteriology of butter culture: A review. *Journal of Dairy Science*. Vol **26**: 83-168.
- Henriksen, C.M. and Nilsson, D. (2001). Redirection of pyruvate catabolism in *Lactococcus lactis* by selection of mutants with additional growth requirements, *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol **56**: 767–775.
- Halander, S. K. (1992). Genetics improvement of microbial starter culture, *Application of Biotechnology to Traditional Fermented Foods*. Vol **44**: 20-26.
- Hayek, S.A. and Ibrahim, S.A. (2013). Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Journal of Food and Nutrition Sciences*. Vol **4**: 73–87
- Hernandez, D., Cardell, E. and Zarate, V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Food Microbiology*. Vol **99**: 77-84.
- Hugenholtz, J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol **12**: 165–178.
- Hugenholtz, J. (2014). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol **12**: 165–178.
- Hugenholtz, J. and Starrenburg, M. (1992). Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* and *Leuconostoc* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol **38**: 17-22.

- Ines, A., and Falco, V. (2018). Lactic Acid Bacteria Contribution to Wine Quality and Safety. In Generation of Aromas and Flavors. Vilela, A.
- Jay, J.M. (1982). Antimicrobial Properties of Diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol **44**: 525–532.
- Jensen, R. G. (2002). Invited review: The composition of bovine milk lipids. *Journal of Dairy Science*. Vol **85**: 295–350.
- Johansen, E. (2018). Use of natural selection and evolution to develop new starter cultures for fermented foods. *Annual Review of Food Science and Technology*. Vol **9**:411–428.
- Jost, J. (2002). Milk and Dairy Products. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Jyoti, B.D., Suresh A.K. and Venkatesh, K.V. (2003). Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol **19**(5):509-514.
- Kandler, O. and Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901. Sneath, P.H.A., Mair, N.S. and Sharpe, M.E. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, MD. 1209–1234.
- Kaneko, T., Suzuki, H. and Takahashi, M. (1986). Diacetyl formation and degradation by *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis* 3022. *Agricultural and Biological Chemistry*. Vol **50**: 2639 - 2641.
- Kaneko, T., Watanabe, Y. and Suzuki, H. (1991). Differences between *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2206 and Citrate-Positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 in the Characteristics of

Diacetyl Production. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 57(10): 3040–3042.

- Kaneko, S., Kumazawa, K. and Nishimura, O. (2011). Studies on the key aroma compounds in soy milk made from three different soybean cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 59: 12204-12220.
- Kawanari, M. (1992). Study on the continuous manufacturing of butter from high fat cream. Reports of Research Laboratory. *Technical Research Institute*. Vol 98: 35–110.
- Kleerebezem, M. and Hugenholtz, J. (2003). Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol 14: 232–237.
- Kopermsub, P. and Yunchalard, S. (2010). Identification of lactic acid bacteria associated with the production of plaasom, a traditional fermented fish product of Thailand. *International Journal of Food Microbiology*. Vol 138(3): 200 –204.
- Kuila. R. K., and Ranganathan. B. (1998). Ultraviolet light-induced mutants of *Streptococcus lactis* subspecies *diacetylactis* with enhanced acid- or flavor-producing abilities. *Journal of Dairy Science*. Vol 61 :379- 383.
- Labioui, H ., Elmoualdi, L. E.l., Yachoui M., Ouhssine, M. (2005). Sélection de souches de .bactéries lactiques antibactériennes. *Bull.Soc.Pharm.Bordeaux*. Vol 144: 237 – 250.
- Lanciotti, R., Patrignani, F., Bagnolini. F., Guerzoni, M. E. and Gardini, F. (2003). Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*. Vol 20: 537–543.

- Law, B. A. (1981). The formation of aroma and flavour compounds in the fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*. Vol **43**: 143–154.
- Law, B. A. (2001). Controlled and accelerated cheese ripening: The research base for new technologies, *International Dairy Journal*. Vol **11**: 383–398.
- Lawless, H. T. and Heymann, H. (1999). The Sensory evaluation of food principle and practice. ANASDN publication, Gaithersburg-Maryland.
- Le-Bars, D. and Yvon, M. (2007). Formation of diacetyl and acetoin by *Lactococcus lactis* via aspartate catabolism. *Journal of Applied Microbiology*. Vol **7**: 104–171.
- Lee, S. M. and Drucker, D. B. (1995). Analysis of acetoin and diacetyl in bacterial culture supernatants by gas–liquid chromatography. *Journal Clinical Microbiology*. Vol **2**: 162–164.
- Lee, K. D., Lo, C. G., Richter, R. L. and Dill, C. W. (1995). Effect of milk composition on the partition coefficients of diacetyl, acetaldehyde, and ethanol in acidified milk products. *Journal of Dairy Science*. Vol **78**: 2666–2674.
- Leroy, F. and De-Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*. **15**: 67–78.
- Levata - Jovanovic, M. and Sandine, W. E. (1997). A Method to Use *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* 91404 to Improve Milk Fermentations1. *Journal of Dairy Science*. Vol **30**:11–18.
- Ljungh, A. and Wadstrom. T. (2009). *Lactobacillus* Molecular Biology: From Genomics to Probiotics. *Biotechnology Journal*. Vol **4**(2): 283-288.

- Longo, M. A. and Sanroman, M. A. (2006). Production of Food Aroma Compounds: Microbial and Enzymatic Methodologies. *Food Technology and Biotechnology*. Vol **44** (3): 335–353.
- Lopez De- Felipe, L. and Hugenholtz, J. (2001). Pyruvate flux distribution in NADH-oxidase-overproducing *Lactococcus lactis* strain as a function of culture conditions, *FEMS Microbiology Letters*. Rev. Vol **179**: 461– 466.
- Macciola, V., Candela, G. and De Leonardis, A. (2008). Rapid gas-chromatographic method for the determination of diacetyl in milk, fermented milk and butter. *Food Control*. Vol **19**: 873– 878.
- Marino, C., Giorda, R., Luisa, L. M., Vanzin, L., Salandi, N., Nobile, M., Citterio, A., Ber, I. S., Crespi, V., Battaglia, M. and Molteni, M. (2005). A family-based association study does not support DYX1C1 on 15q21.3 as a candidate gene in developmental dyslexia, *European Journal of Human Genetics*. Vol **13**(4): 491-499.
- McKay, L.L. (1985). Roles of plasmids in starter cultures. In: Gilliland SE, editor. *Bacterial Starter Cultures for Food*. Boca Raton: CRC Press. 159–174.
- Martin, F., Cachon, R., Pernin, K., Coninck, J. D., Gervais, P., Guichard, E. and Cayot, N. (2011). Effect of oxidoreduction potential on aroma biosynthesis by lactic acid bacteria in nonfat yogurt. *Journal of Dairy Science*. Vol **94**: 614–622.
- Mc Phee, J. D. and Griffiths, M. W. (2002). Psychrotrophic bacteria, *Pseudomonas* spp. Roginsky, H., Fuquay, J. W. Fox P. F. Eds, *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Academic Press, New York, USA. **32**: 2340–2351.

- McSweeney, P. L. H. and Fox, P. F. (2004). Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. In *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (3rd ed.. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, & T. P. Guinee (Eds.). General aspects, London: Chapman and Hall. 1, 361–372).
- Medina de Figueroa, R., Alvarez, F., Pesce de Ruiz Holgado, A., Oliver, G. and Sesma, F. (2000). Citrate utilization by homo- and hetero-fermentative lactobacilli. *Microbiological Research*. Vol **154**: 313–320.
- Milesi, M.M., Wolf, I.V., Bergamini, C.V. and Hynes, E.R. (2010). Two strains of nonstarter lactobacilli increased the production of flavor compounds in soft cheeses. *Journal of Dairy Science*. Vol **93**: 5020–31.
- Monnet, C., Schmitt, P. and Divies, C. (1994). Diacetyl production in milk by an α -acetolactic acid- accumulating strain of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetyl lactis*. *Journal of Dairy Science*. Vol **77**: 2916–2924.
- Mudura, E., Muste, S., Tofana, M. and Muresan, C. (2006). Risk management of beer fermentation diacetyl control. *Food Science and Technology*. Vol **62**: 156-170.
- Nadal, I., Rico, J., Perez-Martinez, G., Yebra, M, J. and Monedero, V. (2009). Diacetyl and acetoin production from whey permeate using engineered *Lactobacillus casei*. *Industrial Microbiology*. Vol **36**:1233–1237.
- National Institutes of Health. (2015). 2,3-Butanedione. U.S. National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, PubChem Open Chemistry Database.

- Nielsen, D.S., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P., Bresciani, J., Amoa-Awua, W., Holzapfel, W.H. and Jakobsen, M. (2007). *Lactobacillus ghanensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from Ghanaian cocoa fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Vol **57**: 1468–1472.
- Obermann, H. Piatkiewicz, A. and Libudzisz. Z. (1982). Production of diacetyl and acetoin by lactic acid bacteria. *Die Nahrung*. Vol **26**:615- 623.
- Orla – Jensen, S. (1919). the Lactic acid bacteria. Host–Copenhagen. 15- 35.
- Ortigosa, M., Arizcun, C., Irigoyen, A., Oneca, M. and Torre, P. (2006). Effect of *lactobacillus* adjunct cultures on the microbiological and physicochemical characteristics of Roncal-type ewes’-milk cheese. *Food Microbiology*. Vol **23**: 591-598.
- Pack, M. Y. (1996). Flavor Control in Dairy Products and Beer with Special Reference to Diacety. Ph. D. thesis, Oregon State University, Corvallis.
- Pack, M. Y., Vedamuthu, E. R., Sandine, W. E. and Elliker, P. R. (2003). Effect of Temperature on Growth and Diacetyl Production by Aroma Bacteria in Single- and Mixed-Strain Lactic Cultures. *Journal of Dairy Science*. Vol **51**(3): 339 –344.
- Palles, T., Beresford, T., Condon, S. and Cogan, T. M. (1998). Citrate metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*. Vol **85**: 147–154.
- Pardeep, K., and Satyanarayana, T. (2006). Optimization of culture variables for improving glucoamylase production by alginate-entrapped *Thermomucorindicae-seudaticae* using statistical methods. *Bioresource Technology Journal*. Vol **98**:1252–1259.

- Park, Y.W. and Drake, M.A. (2005). Effect of 3 months frozen-storage on organic acid contents and sensory properties, and their correlations in soft goat milk cheese. *Small Ruminant Research*. Vol **58**: 291– 298.
- Parmar, p., O'Mahony, S., Tobin, J. and Shalloo , L. (2018). Evaluation of butter manufacture process – Mass balance approach to assess fat conversion process in a dairy processing unit.
- Petit, C., Vilchez, F. and Marczak, R. (1989). Influence of citrate on the diacetyl and acetoin production by fully grown cells of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Current Microbiology*. Vol **19**: 319- 323.
- Pfeiler, E. A. and Klaenhammer, T. R. (2007). The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*. Vol **15**: 546-553.
- Picon, A. (2018). Cheese Microbial Ecology and Safety. In: Papademas P, Bintsis T, editors. *Global Cheesemaking Technology, Cheese Quality and Characteristics*. Chichester: John Wiley and Sons Ltd.
- Quintans, N. G., Blancato, V., Repizo, G., Magni, C. and Lopez, P. (2008). Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. *Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria. Research for Traditional and New Applications*. 65- 88.
- Rea, M. C. and Cogan, T. M. (2003). Glucose prevents citrate metabolism by enterococci. *International Journal of Food Microbiology*. Vol **88**:201- 206.
- Revol, A. M. and Herbin, S. (1999). Taxonomie des principaux gener de bacteries Lactiques. 3eme annee IA, Lait et produits Laitiers. **20**: 78- 92.

- Rincon-Delgadillo, M.I., Lopez-Hernandez, A., Wijaya, I. and Rankin, S.A. (2012). Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. *Journal of Dairy Science*. Vol **95**(3): 1128- 1139.
- Robinson, R.K. (2002). Dairy Microbiology – Handbook – third edition. John Wiley – New York. 39 – 85.
- Routray, W., Mishra, H. N. (2011). Scientific and Technical Aspects of Yogurt Aroma and Taste: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol **10**: 208– 220.
- Salminen, S. and Von-Wright, A. (1998). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, Eds, Marcel Dekker Inc, New York.
- Sandine, W. E., Elliker, P. R. and Hays, H. (1992). Cultural Studies on *Streptococcus diacetilactis* and Other Members of the Lactic *Streptococcus* Group. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol **8**: 160- 171.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G. and Tsakalidou, E. (2001). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*. Vol **11**(8): 621– 647.
- Schmitt, P. and Divies, C. (1990). Co-metabolism of citrate and lactose by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. Vol **71**: 72–74.
- Schmitt, P. and Divies, C. (1992). Effect of varying citrate levels on C4 compound formation and on enzyme levels in *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* grown in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol **37**:426 – 430.

- Shi, J. (2015). Standardisation of cultured butter processing for small scale production. M.Sc. Thesis. M.Sc. Thesis. The University of Massey, Albany, New Zealand.
- Skeie, S., Kieronczyk, A., Eidet, S., Reitan, M., Olsen, K. and ostlie, H. (2008). Interaction between starter bacteria and adjunct *Lactobacillus plantarum* INF15D on the degradation of citrate, asparagine and aspartate in a washed-curd cheese. *International Dairy Journal*. Vol **18**: 169–177.
- Smit, G., Smit, A. B. and Engelsc. W. J. M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol **29**(3): 591– 610.
- Snoep, J. L., Teixeira De- Mattos, M. J., Starrenburg, M. J. C. and Hugenholtz, J. (1992). Isolation, characterization, and physiological role of the pyruvate dehydrogenase complex and a-acetolactate synthase of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *Diacetylactis*. *Journal of Bacteriology*. Vol **174**: 4838– 4841.
- Speckman, R, A. and Collins, E, B. (1998). Separation of Diacetyl, Acetoin, and 2,3-Butylene Glycol by Salting-Out Chromatography. *Dairy Science and Technology*. Vol **22**: 154-160.
- Starrenburg, M. J. C., and J. Hugenholtz. (1991). Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. *Appl. Environmental Microbiology*. Vol **57**: 3535- 3540.
- Sun, Z., Chen, X., Wang, J., Zhao, W., Shao, Y., Wu, L., Zhou, Z., Sun, T., Wang, L., Meng, H., Zhang, H and Chen, W. (2011). Complete Genome Sequence of *Streptococcus thermophilus* Strain ND03. *Journal of Bacteriology*. Vol **193**(3): 793-794.

- Tailliez, P. (2001). Lactic acid bacteria: Living organisms that emerged 3 billion years ago. *Journal of Dairy Science and Technology*. Vol **81**(1):1-11.
- Terzic-Vidojevic¹, A., Tolinacki¹, M., Nikolic, M., Lozo, J. and Begovic, J. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Azerbaijani traditional dairy products. *African Journal of Biotechnology*. Vol **8** (11): 2576-2588.
- Tomasini-Campocosio, A., Escamilla-Hurtado.M.L., Valdés-Martínez, S. and Soriano-Santos, J. (1996). Diacetyl formation by lactic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. Vol **38**(2): 37-129.
- Teuber, M. and Geism, A. (2006). The Genus *Lactococcus* *Prokaryotes*. *Journal of Dairy Science and Technology*. Vol **4**: 205–228.
- Van Hylckama- Vlieg, J.E. and Hugenholtz, J. (2007). Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. *International Dairy Journal*. Vol **17**(11):1290-1297.
- Vedamutha, E. (1985). What's wrong with cultured buttermilk today? *Dairy Food Sanit.* 5-8.
- Vedamuthu, E. R., Hauser, B. A., Henning, D. R., Sandine, W. E., Elliker, P. R. and Day, E. A. (1986). Competitive Growth of *S. diacetylactis* in Mixed Strain Lactic Cultures and Cheese. *Proc. 17th Intern. Dairy Congress*. Vol **2**: 277- 291.
- Vedamuthu, E. R. (1994). The dairy *Leuconostoc*: use in dairy products. *Journal of Dairy Science*. Vol **77**:17-25.
- Vignola, C.L. (2002). Science et technologie du lait, transformation du lait. Ecole polytechnique, Montréal, 600p.

- Wang, J, Y., Wang, X, J., Hui, X., Hua, SH, H., Li, H. and. Gao, W, Y. (2017). Determination of Diacetyl in Beer by a Precolumn Derivatization-HPLC-UV Method Using 4-(2,3-Dimethyl-6-quinoxaliny)-1,2-benzenediamine as a Derivatizing Reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol **65**(12): 2635-2641.
- Wedajo, B. (2015). Lactic acid bacteria: benefits, selection criteria and probiotic potential in fermented food. *Journal of Probiotics and Health*. Vol **3**(2): 100-129.
- Wessels, S., Axelsson, L., Hansen. E. B., De Vuyst, L., Laulund, S., Lahteenmaki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S., and Wright, A. V. (2004). The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science and Technology*. Vol **15**: 498–505.
- Westerfeld, W.W. (1945). A colorimetric determination of blood acetoin. *Journal of Biological Chemistry*. Vol **161**: 495–502.
- Xanthopoulos. V., Picque. D., Bassit. N., Boquien. C.Y. and Corrieu. G. (1994) Methods for the determination of aroma compounds in dairy products: a comparative study. *Journal of Dairy Research*. Vol **61**: 289-297.
- Yasar. K. Y., Gun, I., Seydim, A, C. and Guzel-Seydim, Z, B. (2018). Production and quality of kefir cultured butter, *Mljekarstvo*. Vol **68** (1): 64-72.
- Yu, P., Zhang, L.W., Xu, Q. and Han, X. (2006). Screening mutagenized *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* strains overproducing diacetyl. *Dairy Science and Technology*. Vol **120**: 218– 220.

- Zarate, V., Belda, F., Perez, C. and Cardell E. (1997). Changes in the microbial flora of Tenerife goats' milk cheese during ripening. *International Dairy Journal*. Vol 7: 635-641.
- Zeidan, A.A., Poulsen V.K., Janzen, T., Buldo, P., Derkx, P.M.F., oregaard, G. and Neves, A.R. (2017). Polysaccharide production by lactic acid bacteria: From genes to industrial applications. *FEMS Microbiology Review*. Vol **41**: 168– 200.

ABSTRACT

36 isolated samples from Lactic acid bacteria (pre-isolated from various local food sources) were tested for efficiency to produce diacetyl. The isolates were diagnosed to the following genres: *Enterococcus* (21 isolates) and the predominant species were *E. avium*, *E. faecium*, *E. faecalis* and *E. durum*. *Lactobacillus* (10 isolates) the predominant species were *Lb. plantarum*, *Lb. paracasi*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei* and *Lb. acidophilus*. *Lactococcus* (3 isolates) represented by species *L. Lactis* and two isolates belonging to the genus *Leuconostoc* represented by the species *Leuco. citrovorum*. All isolates were able to produce diacetyl but their productions were varied in their efficiency. The isolate *L. lactis* ssp *lactis* was distinguished by its high level of production which reached 65.39 mg/ L compared with the other isolates. Optimum conditions for diacetyl production were determined for Lactic acid bacteria *L. lactis* ssp *lactis* by using the statistical program of Response Surface Methodology (RSM) . Results of RSM revealed that the highest production of diacetyl reached up to 85.60 mg/ L with a temperature of 37C°, pH value of 5.5, citrate concentration was 6 g/ L and the glucose concentration was 15g/L. Statistics of RSM showed that there were a significant correlation among the effect of temperature, pH value and the concentration of citrate by a 5% probability. The wild strain of *L. lactis* ssp *lactis* was subjected to mutagenesis using UV irradiation at a wavelength of 254 nm at a distance of 15 cm from dishes, Highest diacetyl production within isolated mutants was reached up to 162.85 mg/ L after 2 minutes of irradiation and it was given a code of (A6). The A6 sample gave a higher amount of diacetyl than the original isolate by 2.5 times. Diacetyl produced by mutant bacteria *L. lactis* ssp *lactis* (A6) was purified using a glass filter column (Dowex 1-X8). The purified diacetyl was analyzed by high performance liquid technology chromatography HPLC at a

wavelength of 245 nm. Different strains of *L. lactis* ssp *lactis*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Leuco. citrovorum* and *Lb. casei* that showed the highest levels of diacetyl were used to produce the good flavor of butter and their ability to produce lactic acid and ferment lactose to form two starters for butter production. While the third sample of butter was manufactured by adding a commercial diacetyl of 1 mg/ kg for comparison. A sensory evaluation was carried out on the samples including physical appearance (color and impurities) taste, smell and texture. The evaluators found that the best samples that were accepted were those of starters made from *L. lactis* ssp *lactis*, *Lb. bulgaricus* and *Lb. acidophilus*, followed by *Leuco. citrovorum*, *Lb. bulgaricus* and *Lb. casei* . The samples manufactured using a commercial diacetyl of 1 mg/ kg was less accepted.

Keywords:

Lactic Acid bacteria, flavor compounds, Diacetyl, Butter.

