جامعة دمشــق

كلية الهندسة الزراعية

قسم علوم الأغذية

إنتاج حمض اللبن من سلالات بكتيرية محلية وإمكانية استخدامه في بعض الصناعات الغذائية

أطروحة مقدمة لنيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية
(علوم الأغذية)

إعداد المهندس

عدنان محمد القزح

المشرف العلمي

أ. د. عبد الوهاب مرعي

كلية الزراعة– جامعة دمشق

قسم علوم الأغذية

المشرف المشارك

د. بسام العقلة

الهيئة العامة للتقانة الحيوية

2023 م

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الدكتوراه في قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة –جامعة دمشق، و أجيزت من قبل السادة أعضاء لجنة الحكم.

This thesis has been submitted as partial fulfilment of requirements for the PhD Degree in Food Science, Faculty of Agriculture-Damascus University. Referee committee has approved the thesis

.

نوقشت هذه الرسالة بتاريخ 2023/8/20

أمام لجنة الحكم المؤلفة من السادة

د. عبد الوهاب مرعي	الأستاذ في قسم علوم الأغذية– كلية الزراعة– جامعة دمشق	عضواً مشرفاً
د. عبد الحكيم عزيزية	الأستاذ في قسم علوم الأغذية– كلية الزراعة– جامعة دمشق	عضواً
د. صباح يازجي	الأستاذ في قسم علوم الأغذية– كلية الزراعة– جامعة دمشق	عضواً
د. رأفت اسماعيل	المدرس في قسم علوم الأغذية– كلية الزراعة– جامعة دمشق	عضواً
د. نسرين نقشو	باحثة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية	عضواً

تصريح

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات الحصول على درجة الدكتوراه في علوم الأغذية من كلية الزراعة في جامعة دمشق، وهي بعنوان " **إنتاج حمض اللبن من سلالات بكتيرية محلية وإمكانية استخدامه في بعض الصناعات الغذائية** " وأنّ هذا البحث لم يسبق أن قبل للحصول على أي شهادة ولا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

المرشح

عدنان محمد القزح

Declaration

This study has been submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of PH.D in the Department of Food Sciences at the faculty of Agricultural Engineering, Damascus University. It is hereby declared that this study "**Production of Lactic Acid from Local Bacterial Stains and its Potential Use in some Food Industries**" has not already been accepted for any degree, nor it has been submitted concurrently for any other degree.

Candidate

Adnan Alkazah

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة **(إنتاج حمض اللبن من سلالات بكتيرية محلية وإمكانية استخدامه في بعض الصناعات الغذائية)** هو نتيجة بحث علمي قام به المرشح عدنان محمد القزح، وبأن أي مراجع أخرى ذكرت في هذه الرسالة قد نسبت إلى مصادرها ومؤلفيها بوضوح في النص وفي قائمة المراجع.

المرشح	المشرف العلمي	المشرف المشارك
عدنان القزح	**أ. د. عبد الوهاب مرعي**	**د. بسام عقلة**

Certification

It is hereby certified that the work described in this thesis:(**Production of Lactic Acid from Local Bacterial Stains and its Potential Use in some Food Industries)** is the result of author's own investigation. Any other references mentioned in this work were documented in the text of the treatise.

Candidate	**Scientific Advisor**	**participant Advisor**
Adnan Alkazah	**Prof.Dr. Abdulwahab Merai**	**Dr. Bassam Aloklah**

إهداء

إلى

مثلي الأعلى في العطاء وحب الخير والوفاء والدي المرحوم .....

إلى

مَعين الحب والخير والدتي المرحومة.....

إلى

زوجتي وأولادي أخوتي

أقاربي أصدقائي

وكل من ساعدني وأعانني على إتمام رسالتي

شكر وعرفان

الحمد لله أولاً والشكر له سبحانه الذي أعانني ووفقني لإتمام هذا العمل.

أتقدم بجزيل الشكر وعظيم الامتنان لأستاذي الفاضل: **الأستاذ الدكتور عبد الوهاب مرعي** على ما أفاضه علي من نصح وإرشاد وتوجيه وسعة للصدر وبذل للجهد لإتمام هذا العمل، ومهما انتقيت من عبارات شكر وامتنان فلن أوفيه حقه، كذلك أشكر مشرفي المشارك **الدكتور بسام العقلة** على تعاونه وعلى ما قدمه لي من نصح وإرشاد فكان ينهض بي كلما تعثرت ، فكان كالمصباح الذي أنار دربي لإتمام هذه الرسالة.

والشكر كل الشكر لعمادة كلية الزراعة في جامعة دمشق وجميع أساتذتي في قسم علوم الأغذية وجميع فنيي مخبر مديرية التجارة الداخلية وحماية المستهلك بريف دمشق ومديرية المخبر المركزي . كما أشكر **الدكتور رضوان بدر الدين** على مساعدته الكبيرة لي في إتمام هذه الرسالة

كما أتقدم بالشكر لكل من كان له أية مساهمة صغيرةً كانت أم كبيرة لإنجاح هذا العمل.

عدنان القزح

Acknowledgment

I would like to acknowledge all people who helped me for completing this work. I am also grateful to **Prof. Dr. Abdulwahab Merai** and **Dr.Bassam AlOkla** who closely supervised and encouraged me to peruse this research.

فهرس المحتويات

تصريح خطي I

فهرس المحتويات VI

قائمة الجداول XII

قائمة الأشكال XIV

قائمة المختصرات XVII

الملخص XVIII

المقدمة INTRODUCTION 1

مبررات البحث 3

أهداف البحث 3

1- الدراسة المرجعية LITERATURE REVIEW 6

1-1- الخصائص الفيزيائية والكيميائية لحمض اللبن 6

1-2- خصائص حمض اللبن المستخدم في الأغذية 8

1-3- طرائق إنتاج حمض اللبن 9

1-3-1- التصنيع الكيميائي (Chemical synthesis) 9

1-3-2- التصنيع الحيوي، التخمر (Fermentation) 11

1-4- استعمالات حمض اللبن (التطبيقات) 13

1-4-1- في الصناعات الغذائية Food Industry 13

1-4-2- في الصناعات الكيميائية Chemical Industry 13

1-4-3- في المجالات الطبية والصيدلانية (Pharmaceutical and Cosmetic Industry) 13

1-5- الأنواع التجارية لحمض اللبن 14

1-6- الأحياء الدقيقة المستخدمة في إنتاج حمض اللبن 15

1-7- استخدام مصل الجبن في إنتاج حمض اللبن بالطريقة الحيوية 20

1-8- تأثير ظروف عملية التخمير في إنتاج حمض اللبن بوساطة بكتريا حمض اللبن 22

1-8-1- تأثير درجة حرارة التحضين 22

1-8-2- تأثير فترة التحضين 23

1-8-3- تأثير سرعة التحريك في الحاضنة الهزازة في إنتاج حمض اللبن 24

1-8-4- تأثير درجة الحموضة (pH) في إنتاج حمض اللبن 25

1-9- تأثير إضافة المغذيات إلى وسط التخمير في إنتاج حمض اللبن باستخدام بكتريا حمض اللبن 26

1-10- تقييد الخلايا Cell Immobilization 27

1-11- عمليات فصل حمض اللبن وتنقيته 29

1-12- التقييم الاقتصادي لعملية إنتاج حمض اللبن 31

1-13- دور حمض اللبن في حفظ اللحوم من الفساد 33

2- مواد وطرائق البحث MATERIALS AND METHODS 35

2-1- مواد البحث 36

2-1-1- مكان تنفيذ البحث وزمانه 36

2-1-2- المواد الكيميائية والمعدات المستخدمة في البحث 36

2-1-3- مخطط البحث 38

2-1-4- العينات المستخدمة في البحث 40

2-2- اختبارات مصل الجبن 41

2-2-1- الاختبارات الكيميائية 41

2-2-2- تقدير النسبة المئوية لحمض اللبن واللاكتوز 41

2-3- عزل بكتريا حمض اللبن وتشخيصها 45

2-3-1- عزل بكتريا حمض اللبن 45

2-3-2- حفظ عزلات بكتريا حمض اللبن 45

2-3-3- الاختبارات الشكلية والبيوكيميائية لتشخيص بكتريا حمض اللبن 45

2-3-4- غربلة عزلات بكتريا حمض اللبن لتقييم كفاءتها في إنتاج حمض اللبن 46

2-3-5- تشخيص العزلات الأكثر كفاءة بالطرائق التقليدية 46

2-3-6- التحقق من تصنيف العزلة المتفوقة باستخدام تقنية RT-PCR 46

2-4- أمثلة إنتاج حمض اللبن 48

2-4-1- انتقاء العزلات 48

2-4-2- تحضير اللقاح البكتيري: 48

2-4-3- تحضير وسط التخمير 48

2-4-4- ضبط رقم الحموضة pH 49

2-4-5- دراسة أمثلة ظروف وسط التخمير لإنتاج حمض اللبن 49

2-4-6- دراسة أمثلة إضافة المغذيات إلى وسط التخمير لإنتاج حمض اللبن 49

2-4-7- التحليل الإحصائي 50

2-5- طرائق التحليل المتبعة في التقييد 50

2-5-1- تحضير اللقاح بغرض التقييد 50

2-5-2- تقييد الخلايا الحرة لبكتريا أكثر العزلات إنتاجاً لحمض اللبن في هلام ألجينات الكالسيوم (طريقة الحجز التقليدية) 50

2-5-3- تقدير عدد الخلايا المقيدة في 1 غ خرزات 51

2-5-4- عملية التخمر وإنتاج حمض اللبن بوساطة الخلايا المقيدة بطريقة الوجبات 51

2-5-5- تقدير وزن الكتلة الحيوية 52

2-6- تعريفات شروط تقييم التخمير 52

2-7- طريقة التخمير في المخمر 54

2-7-1- وصف المخمر..... 54

2-7-2- وصف آلية عمل المخمر وضبطه 54

2-8- اختبارات فصل حمض اللبن وتنقيته 55

2-8-1- الترويق (Clarification) 55

2-8-2- فصل حمض اللبن واستعادته من لاكتات الكالسيوم في المستخلص المروق 55

2-8-3- إزالة الصباغ 56

2-8-4- تركيز حمض اللبن 56

2-9- اختبارات حمض اللبن 56

2-10- اختبارات حفظ لحم صدر الدجاج خلال التخزين المبرد 58

2-10-1- المعاملة بحمض اللبن 58

2-10-2- الاختبارات الميكروبيولوجية 59

2-10-3- الاختبارات الكيميائية 60

2-10-4- الاختبارات الحسية 61

2-10-5- التحليل الإحصائي 61

2-11- تحديد نوع المماكب من حمض اللبن المنقى بطريقة (TLC) كروماتوغرفيا الطبقة الرقيقة 62

3- النتائج والمناقشة RESULTS AND DISCUSSION 64

3-1- نتائج تحليل مصل الجبن بعد المعاملة الحرارية وإزالة البروتينات 64

3-2- نتائج عزل بكتريا حمض اللبن والاختبارات البيوكيميائية 65

3-3- نتائج غربلة العزلات لتحديد السلالة الأكثر إنتاجاً لحمض اللبن 67

3-4- تشخيص العزلة المتفوقة Y7 باستخدام نظام API 50 CHL 69

3-5- تشخيص العزلة المتفوقة Y7 باستخدام تقنية RT-PCR 71

3-6- أمثلة ظروف عملية التخمير لإنتاج حمض اللبن 72

3-6-1- التحليل الإحصائي لنتائج أمثلة ظروف عملية التخمير 72

3-6-2- درجة حرارة التحضين المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن 80

3-6-3- درجة الحموضة (pH) المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن 81

2-6-4- فترة التحضين المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن 82

2-6-5- عدد الدورات في الدقيقة المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن 83

3-7- أمثلة إضافة المغذيات إلى مصل الجبن لإنتاج حمض اللبن 85

3-7-1- التحليل الإحصائي لنتائج أمثلة إضافة المغذيات إلى مصل الجبن (وسط التخمير) 85

3-7-2- نسبة مستخلص الخميرة المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن 93

3-7-3- نسبة فوسفات ثنائية البوتاسيوم المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن 94

3-7-4- نسبة كبريتات المنغنيز المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن 96

3-7-5- نسبة كبريتات المغنزيوم المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن 97

3-8- مقارنة إنتاجية Lactobacillus paracasei من حمض اللبن بطريقتي الخلايا الحرة والخلايا المقيدة 98

3-9- دراسة ثبوتية الخلايا المقيدة 99

3-10- تقدير الكتلة الحيوية 101

3-11- مقارنة إنتاجية حمض اللبن في المخمر والدوارق الهزازة 103

3-12- نتائج عمليات الفصل والتنقية 104

3-13- مدى مطابقة حمض اللبن المنقى والمركز للمواصفة القياسية السورية 107

3-14- تحديد نوع المماكب من حمض اللبن المنقى بطريقة (TLC) كروماتوغرفيا الطبقة الرقيقة 108

3-15- استخدام تراكيز مختلفة من حمض اللبن في إطالة مدة حفظ لحم صدر الدجاج خلال التخزين المبرد 110

3-15-1- الاختبارات الكيميائية 110

3-15-2- الاختبارات الحسية 113

3-15-3- الاختبارات الميكروبيولوجية 115

3-16- دراسة التقييم الاقتصادي لعملية إنتاج حمض اللبن من مصل الأجبان مخبرياً 119

4- الاستنتاجات CONCLUSIONS 123

5- المقترحات والتوصيات RECOMMENDATIONS 125

6- المراجع العلمية REFERENCES 127

Abstract 146

قائمة الجداول

الجدول-1. الخصائص الترموديناميكية لحمض اللبن. 8

الجدول-2. خصائص حمض اللبن المستخدم في الأغذية. 9

الجدول-3. مواصفات أنواع حمض اللبن التجارية. 14

الجدول-4. تصنيف البكتيريا اللبنية الشائعة بحسب نوع التخمير الذي تقوم به. 18

الجدول-5. تصنيف أهم أنواع البكتيريا بحسب نوع المماكب لحمض اللبن الذي تنتجه. 19

الجدول-6. المواد الكيميائية المستخدمة في البحث ومصدرها. 3636

الجدول-7. الأجهزة المستخدمة في البحث ومصدرها. 38

الجدول-8. خصائص HPLC وظروف التحليل وخصائصه. 43

الجدول-9. المرئسات المستخدمة في تشخيص بكتريا *Lactobacillus paracasei*. 47

الجدول-10. المعاملات المطبقة على صدر الدجاج. 59

الجدول-11. نتائج التركيب الكيميائي لمصل الجبن (بعد المعاملة الحرارية وإزالة البروتينات). 64

الجدول-12. العينات الغذائية المستخدمة في عزل بكتريا حمض اللبن وأعداد ورموز وشكل العزلات إيجابية غرام وسلبية الكتالاز. 66

الجدول-13. متوسط إنتاج حمض اللبن بوساطة عزلات بكتريا حمض اللبن باستخدام مصل الجبن كوسط تخمير. 67

الجدول-14. نتائج اختبارات نظام API 50 CHL لتشخيص العزلة Y7 المتفوقة في إنتاج حمض اللبن. 70

الجدول-15. نتائج اختبار RT-PCR للعزلة Y7. 71

الجدول–16. نتائج تجارب التصميم الإحصائي لأمثلة ظروف عملية التخمير. 72

الجدول–17. التحليل الإحصائي لتأثير المتغيرات المدروسة (ظروف عملية التخمير) في إنتاج حمض اللبن. .74

الجدول–18. تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة (ظروف عملية التخمير) في إنتاج حمض اللبن.....79

الجدول–19. نتائج تجارب التصميم الإحصائي لأمثلة إضافة المغذيات. 85

الجدول–20. التحليل الإحصائي لتأثير المتغيرات المدروسة (المغذيات) في إنتاج حمض اللبن. 87

الجدول–21. تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة (المغذيات) في إنتاج حمض اللبن. 92

الجدول–22. ثبوتية خلايا بكتريا (*Lactobacillus paracasei*) المقيدة بألجينات الصوديوم في إنتاج حمض اللبن من مصل الجبن بطريقة الوجبات (الدفعات). 101

الجدول–23. مقارنة خصائص حمض اللبن المنقى والمركز مع خصائص حمض اللبن المستخدم في الأغذية الواردة في المواصفة القياسية السورية. 107

الجدول–24. تغيرات رقم الـ pH في عينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن. 110

الجدول–25. تغيرات رقم الـ TBA في عينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن. 112

الجدول–26. تغيرات الخصائص الحسية في عينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن.....113

الجدول–27. تغيرات أعداد البكتريا الهوائية المحبة للحرارة المتوسطة في عينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن. 115

الجدول–28. تغيرات تعداد بكتريا *Pseudomonas* في عينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن. 117

الجدول–29. تغيرات تعداد بكتريا الكوليفورم في عينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن.....118

الجدول–30. تغيرات تعداد الخمائر والفطور في عينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن. 119

الجدول–31. تكاليف إنتاج 50 مل من حمض اللبن بتركيز 84% من 1 لتر مصل الجبن. 120

قائمة الأشكال

الشكل-1. متماكبات حمض اللبن. 7

الشكل-2. ملخص لطريقتي تصنيع حمض اللبن، الاصطناع الكيميائي والتخمير الميكروبي. 12

الشكل-3. المسارات الاستقلابية لبكتريا حمض اللبن. 16

الشكل-4. مسارا استقلاب اللاكتوز بوساطة بكتيريا حمض اللبن. 177

الشكل-5. مخطط البحث. 38

الشكل-6. المخطط الكروماتوغرافي لحمض اللبن (+)L القياسي. 42

الشكل-7. المخطط الكروماتوغرافي للاكتوز القياسي. 43

الشكل-8. منحنى المعايرة القياسي للاكتوز المستخدم في HPLC. 44

الشكل-9. منحى المعايرة القياسي لحمض اللبن (+)L المستخدم في HPLC. 44

الشكل-10. المنحنى القياسي للمالون ألديهايد. 61

الشكل-11. نتائج اختبارات API 50 CHL للعزلة Y7 المتفوقة. 69

الشكل-12. منحني التألق لبكتريا *Lb.paracasei* (Ct = 21). 71

الشكل-13. تأثير درجة الحموضة ودرجة حرارة التحضين في إنتاجية حمض اللبن. 75

الشكل-14. تأثير درجة الحموضة وعدد الدورات في الدقيقة في إنتاجية حمض اللبن. 76

الشكل-15. تأثير درجة الحموضة وفترة التحضين في إنتاجية حمض اللبن. 76

الشكل-16. تأثير فترة التحضين وعدد الدورات في الدقيقة في إنتاجية حمض اللبن. 77

الشكل-17. تأثير درجة حرارة التحضين وعدد الدورات في الدقيقة في إنتاجية حمض اللبن. 77

الشكل-18. تأثير درجة حرارة التحضين وفترة التحضين في إنتاجية حمض اللبن. 78

الشكل-19. الظروف المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن بطريقة الخلايا الحرة. 79

الشكل-20. العلاقة بين درجة حرارة التحضين وكمية حمض اللبن المنتجة من مصل الجبن. 80

الشكل-21. العلاقة بين درجة الحموضة وكمية حمض اللبن المنتجة من مصل الجبن. 82

الشكل-22. العلاقة بين فترة التحضين وكمية حمض اللبن المنتجة من مصل الجبن. 83

الشكل-23. العلاقة بين سرعة التحريك وكمية حمض اللبن المنتجة من مصل الجبن. 84

الشكل-24. تأثير مستخلص الخميرة وكبريتات المغنزيوم في إنتاج حمض اللبن. 88

الشكل-25. تأثير مستخلص الخميرة وكبريتات المنغنيز في إنتاج حمض اللبن. 89

الشكل-26. تأثير مستخلص الخميرة وفوسفات ثنائية البوتاسيوم في إنتاج حمض اللبن. 89

الشكل-27. تأثير كبريتات المغنزيوم وكبريتات المنغنيز في إنتاج حمض اللبن. 90

الشكل-28. تأثير كبريتات المغنزيوم وفوسفات ثنائية البوتاسيوم في إنتاج حمض اللبن. 90

الشكل-29. تأثير كبريتات المنغنيز وفوسفات ثنائية البوتاسيوم في إنتاج حمض اللبن. 91

الشكل-30. المغذيات المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن بطريقة الخلايا الحرة. 93

الشكل-31. العلاقة بين مستخلص الخميرة وكمية حمض اللبن المنتجة من مصل الجبن. 94

الشكل-32. العلاقة بين فوسفات ثنائية البوتاسيوم وكمية حمض اللبن المنتجة من مصل الجبن. 95

الشكل-33. العلاقة بين كبريتات المنغنيز وكمية حمض اللبن المنتجة من مصل الجبن. 96

الشكل-34. العلاقة بين كبريتات المغنزيوم وكمية حمض اللبن المنتجة من مصل الجبن. 97

الشكل-35. إنتاجية حمض اللبن من بكتريا (*Lactobacillus paracasei*) الحرة والمقيدة. 99

الشكل-36. شكل خرزات ألجينات الكالسيوم. 99

الشكل–37. تراكيز اللاكتوز وحمض اللبن والكتلة الحيوية الجافة لخلايا بكتريا *L. paracasei* الحرة المنماة في وسط مصل الجبن. 102

الشكل–38. مقارنة إنتاج حمض اللبن في المخمر والدوارق الهزازة. 104

الشكل–39. فصل حمض اللبن واستعادته من لاكتات الكالسيوم في المستخلص المروق بإضافة حمض الكبريت. 105

الشكل–40. تأثير الكربون المنشط في إزالة الصبغة (اللون) من مرق التخمير. 106

الشكل–42. تحديد نوع المماكب من حمض اللبن المنقى بطريقة (TLC) كروماتوغرفيا الطبقة الرقيقة 109

قائمة المختصرات

الاختصار	معنى الاختصار بالإنكليزي	معنى الاختصار بالعربي
API	Analytical profile index	مؤشر الملف التحليلي
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists	رابطة الكيميائيين الزراعيين الرسمية
CFU	Colony Forming Unit	مستعمرة جرثومية
FAO	Food and Agriculture Organization	منظمة الأغذية والزراعة
FDA	Food and Drug Administration	إدارة الغذاء والدواء
GRAS	Generally Recognized As Safe	المعترف بها عموما على أنها آمنة
LAB	lactic acid bacteria	بكتيريا حمض اللبن
MOM	Minitab Optimization Method	برنامج إحصائي
PLA	poly lactic acid	حمض اللبن المتعدد
pH	Power of Hydrogen	الرقم الهيدروجيني
RSM	Response Surface Methodology	منهجية استجابة السطح
RT-PCR	reverse transcription–polymerase chain reaction	النسخ العكسي – تفاعل البلمرة المتسلسل
FCC	the Food Chemicals Codex	الدستور الغذائي للمواد الكيميائية الغذائية
USP	the United States Pharmacopeial	دستور الأدوية الأمريكي
TBA	Theobarbituric acid	حمض الثيوباربيتوريك
TLC	Thin Layer Chromatography	كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة
WHO	World Health Organization	منظمة الصحة العالمية

الملخص

أُجرِيَ في هذا البحث عزل البكتريا المنتجة لحمض اللبن من أغذية متنوعة، وبينت النتائج أنَّ العزلة Y7 تفوقت على العزلات الأخرى في إنتاج حمض اللبن، إذ أنتجت(28.12 غ/ل)، وبينت نتائج التشخيص بوساطة شريط API 50 CHL وكذلك نتائج اختبار RT-PCR أنَّ هذه العزلة تنتمي للنوع *Lactobacillus paracasei*. استخدم مصل الجبن بسبب احتوائه على اللاكتوز بنسبة 4.5% كوسط تخمير لإنتاج حمض اللبن، واستخدم برنامج Minitab Optimization Method لأمثلة ظروف عملية التخمير لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن بوساطة بكتريا *Lactobacillus paracasei* ، فكانت النتائج كالآتي: درجة حرارة التحضين 37 °م، درجة الحموضة(pH) 5.5، فترة التحضين 50 ساعة، وسرعة التدوير المثالية في الحاضنة الهزازة 150 دورة في الدقيقة، وأظهرت النتائج إنتاج (32.59 غ/ل) من حمض اللبن. كما تم أمثلة إضافة المغذيات إلى وسط التخمير لإنتاج حمض اللبن، فكانت النتائج كالآتي: مستخلص الخميرة 10 غ/ل، فوسفات ثنائية البوتاسيوم 0.5 غ/ل، كبريتات المغنزيوم 0.2 غ/ل وكبريتات المنغنيز 0.04 غ/ل، وأظهرت النتائج إنتاج (37.6 غ/ل) من حمض اللبن. تبين أنَّ إنتاج حمض اللبن من بكتريا *Lactobacillus paracasei* الحرة كان (37.9غ/ل)، وعندما قيدت في مادة ألجينات الصوديوم كان إنتاجها (42 غ/ل)، أي زادت إنتاجية حمض اللبن عند تثبيت تلك الخلايا بمقدار 10.82%. بيَّنت الاختبارات الكيميائية والحسية والميكروبيولوجية لمعاملات لحم صدر الدجاج بحمض اللبن وبعد التخزين مدة 15 يوماً في درجة الحرارة 4±1°م، أنَّ المعاملة 3 (تركيز حمض لبن 3%) حافظت على صفات حسية جيدة ومحتوى مكروبي مسموح به وقللت من درجة أكسدة الليبيدات خلال التخزين المبرد مدة 15 يوماً.

الكلمات المفتاحية: حمض اللبن، مصل الجبن، *Lactobacillus paracasei*، ألجينات الصوديوم، لحم صدر الدجاج.

المقدمة INTRODUCTION:

حمض اللبن هو الحمض الأكثر انتشاراً من بين أحماض هيدروكسي كاربوليك، وهو حمض عضوي طبيعي يستخدم منذ زمن طويل في الصناعات الغذائية والصيدلانية والنسيجية والكيميائية. ازداد الاهتمام حالياً بحمض اللبن بشكل كبير نظراً لاستخدامه في تحضير متعدد حمض اللبن (PLA) وهو البوليمر القابل للتفكك الحيوي وغير الضار بالأنسجة الحية الذي يمكن أن يستخدم في العديد من التطبيقات. يمكن إنتاج حمض اللبن بالتخمير الميكروبي أو الاصطناع الكيميائي، وجذب الإنتاج بالتخمير الميكروبي الاهتمام بسبب ميزاته المتمثلة في إنتاج المتماكبات النقية L(+) أو D(−)حمض اللبن، وإمكانية استخدام مواد أولية رخيصة الثمن وقابلة للتجدد في إنتاجه، والاستهلاك المنخفض للطاقة، والشروط المتوسطة التي تحتاجها عملية إنتاجه. ازداد إنتاج حمض اللبن في العقود القليلة الماضية بشكل ملحوظ، بسبب تطوير استخدامات ومنتجات جديدة بشكل رئيسي. بلغت القيمة السوقية العالمية لحمض اللبن 3.7 مليار دولارًا أمريكيًا في عام 2020، مع توقع زيادة الإيرادات في عام 2025 إلى8.7 مليار دولار. في الوقت الحاضر، بلغ الطلب في السوق العالمية لـ PLA هو ما يقارب 100000 طن سنويًا ومن المتوقع أن يرتفع بنسبة 28% في عام 2025، وذلك بسبب تطبيق PLA كسلعة بديل للبولي إيثيلين. نشر قسم الطاقة في الولايات المتحدة في عام 2010 تقريراً حول المواد الكيماوية التي تعدُّ لبنات مهمة في المستقبل، وكان حمض اللبن أحدها. أدرج هذا الحمض كمادة مأمونة الاستعمال من الناحية الصحية (GRAS) من قبل منظمة الغذاء والدواء (FDA). عموماً، فإن الخصائص المرغوب فيها في إنتاج حمض اللبن هي القدرة على سرعة وإكمال تحويل المواد الخام الرخيصة إلى حمض اللبن مع الحد الأدنى للاحتياجات الغذائية وتوفير عوائد مرتفعة من المنتج. يعد استعمال مخلفات معامل الأغذية كمواد أولية في التقانة الحيوية ذا أهمية كبيرة، بالإضافة إلى إنتاج مواد مفيدة وذات أهمية اقتصادية فإن هذه العملية تسهم في علاج مشكلة التلوث البيئي بهذه

المخلفات، ومن أهم هذه المخلفات مصل الجبن المتخلف من صناعة الأجبان والذي يعد غنياً بالمواد العضوية التي تجعله من أهم الملوثات البيئية، إذ تبلغ متطلبات الأوكسجين الحيوي (BOD) له تقريباً (30000–50000) جزء من المليون ومتطلبات الأوكسجين الكيميائي (COD) تقريباً (60000–80000) جزء من المليون. ومن جهة أخرى فإن احتواءه على كثير من المواد الغذائية، مثل اللاكتوز والبروتين والدهون والفيتامينات والأملاح المعدنية، يجعله وسطاً جيداً لتنمية الأحياء المجهرية وإنتاج كثير من المواد المفيدة مثل الأحماض العضوية والأنزيمات والأحماض الأمينية والفيتامينات وبروتين وحيد الخلية وغيرها. تقدر كمية مصل الجبن المُصنَّع عالمياً بحوالي 180 إلى 190 مليون طنٍّ سنوياً، ويستخدم منه فقط (50٪) في التغذية أو تصنيع الأعلاف. بلغت كميات الحليب المنتجة في سورية تقريباً مليون و800 ألف طن سنوياً وفق إحصائيات العام 2005، يصنع منها حوالي 900 ألف طن بشكل أجبان، وينتج بالتالي عنها ما يقارب 800 ألف طن من المصل، والتي تحتوي على 36 ألف طن تقريباً من سكر اللاكتوز تعطي أكثر من 32 ألف طن من حمض اللبن، وهو رقم كبير بالمعايير الاقتصادية ، وتحتاج السوق المحلية لهذه الكميات من الحمض بدلاً من أن ترمى كميات المصل الناتجة في الأراضي والأنهار دون معالجة تذكر. نظراً لأهمية حمض اللبن في الصناعات الغذائية والصيدلانية والنسيجية والكيميائية، وللتقليل من تلوث البيئة الذي يحدثه مصل الجبن الذي يتم التخلص منه كمنتج ثانوي لصناعة الجبن، وللاستفادة من العناصر الغذائية المتوفرة فيه وتحويلها إلى حمض لبن يمكن الاستفادة منه في التطبيقات المختلفة. جاءت هذه الدراسة ليتم فيها إنتاج حمض اللبن من سلالات بكتيرية محلية وإمكانية استخدامه في بعض الصناعات الغذائية، إذ تمّ فيها أمثلة ظروف عملية التخمير وأمثلة المغذيات لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن بوساطة بكتريا *Lactobacillus paracasei* المعزولة محلياً، واستخدام تراكيز مختلفة من حمض اللبن في إطالة مدة حفظ لحم صدر الدجاج خلال التخزين المبرد.

مبررات البحث

نظراً لأهمية استخدام حمض اللبن في الصناعات الغذائية كمادة تحميض أو كمادة حافظة، وفي الصناعات الصيدلانية، ولإنتاج البلاستيك العضوي القابل للتحلل من ناحية أولى. ومن ناحية ثانية استخدام مصل الجبن كوسط تخمير وذلك لتحقيق غايتين: الأولى التقليل من تلوث البيئة الذي يحدثه مصل الجبن الذي يتم التخلص منه كمنتج ثانوي لصناعة الجبن وما تزال أغلب المعامل تعتمد على التخلص من مصل الجبن في مياه الصرف الصحي أو في الأنهار المجاورة والثانية الاستفادة من العناصر الغذائية المتوفرة في مصل الجبن وتحويلها إلى حمض لبن يمكن الاستفادة منه في التطبيقات المختلفة.

أهداف البحث

1. عزل بكتيريا حمض اللبن من أغذية متنوعة.
2. غربلة العزلات المنتجة لحمض اللبن باستخدام مصل الجبن وتصنيف العزلة الأكثر إنتاجاً لحمض اللبن بتقانة API وPCR.
3. أمثلة ظروف عملية التخمير لإنتاج حمض اللبن (درجة حرارة، درجة حموضة(pH)، فترة التحضين، وسرعة التحريك (عدد الدورات بالدقيقة) في الحاضنة الهزازة.
4. أمثلة إضافة المغذيات إلى وسط التخمير لإنتاج حمض اللبن (مستخلص الخميرة، كبريتات المنغنيز، كبريتات المغنزيوم وفوسفات ثنائية البوتاسيوم).
5. مقارنة إنتاج حمض اللبن بطريقتي الخلايا الحرة والخلايا المقيدة.
6. دراسة التقييم الاقتصادي لعملية إنتاج حمض اللبن من مصل الأجبان.
7. تنقية حمض اللبن الناتج وتحديد مدى مطابقته للمواصفة القياسية السورية.

8. استخدام حمض اللبن الناتج في إطالة مدة حفظ لحم صدر الدجاج خلال التخزين المبرد.

الفصل الأول

الدراسة المرجعية

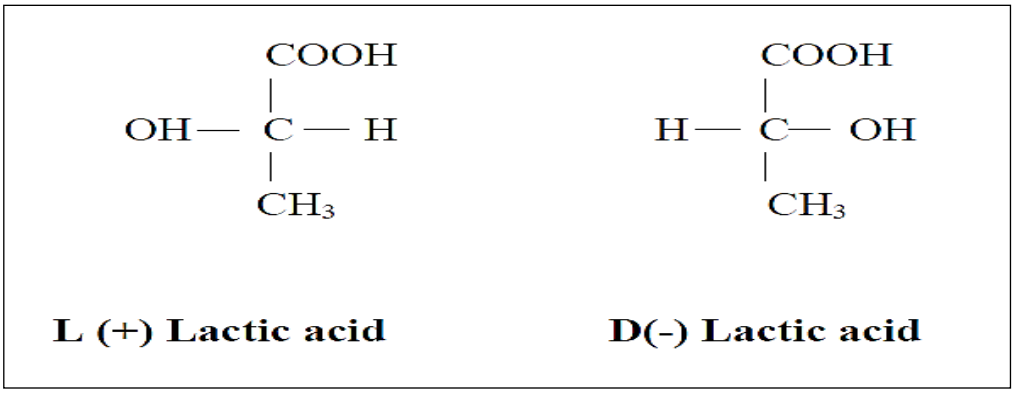
Literature Review

1- الدراسة المرجعية LITERATURE REVIEW:

1-1- الخصائص الفيزيائية والكيميائية لحمض اللبن:

يعدُّ حمض اللبن (2-هيدروكسي حمض بروبيونيك) الحمض الأكثر انتشاراً من بين أحماض هيدروكسي كاربوليك (Datta and Henry, 2006)، وهو حمض عضوي طبيعي يستخدم منذ زمن طويل في الصناعات الغذائية والصيدلانية والنسيجية والكيميائية (Ouyang *et al.*, 2013). اكتشف حمض اللبن لأول مرة في اللبن الرائب من قبل العالم Scheele في عام 1780، إذ عدَّه في البداية من مكونات الحليب. وفي عام 1789م سمى لافوازييه هذا المكون في الحليب باسم حمض اللبن وأصبحت هذه التسمية مصدراً للمصطلحات الحالية لحمض اللبن. ومن ناحية أخرى اكتشف باستور أنه لم يكن أحد مكونات الحليب، وإنما أحد منتجات عملية التخمر التي تمت بوساطة بعض الكائنات الحية الدقيقة (Romani *et al.*, 2008).

حمض اللبن هو حمض عضوي يمتلك الصيغة الكيميائية (CH3 CHOH COOH) إذ يحوي ثلاث ذرات كربون، ذرة كربون طرفية تمثل جزءاً من حمض أو مجموعة كربوكسيل وذرة كربون طرفية أخرى تمثل جزءاً من مجموعة مثيل أو هيدروكربون، في حين تمتلك ذرة الكربون الوسطية مجموعة كربون كحولية، وبذلك يمكنه أن يخضع لتفاعلات كيميائية عدَّة ويتحول إلى مركبات كيميائية مفيدة في مجالات مختلفة مثل (أكسيد البروبيلين) عن طريق الهدرجة، (أسيت ألدهيد) عن طريق نزع مجموعة الكربوكسيل، (حمض الأكريليك) عن طريق نزع جزيئة ماء، (حمض البروبانوئيك) عن طريق الإرجاع، (2,3-بينتانيدوئين)عن طريق التكثيف، (ديلاكتيد) عن طريق الأسترة (Wee *et al.* 2006). يوجد بالطبيعة على شكلين بحسب زاوية الدوران الضوئي (Optically active isomeric) كما في الشكل(1) (حمض اللبن+L) و (حمض اللبن-D) .



الشكل–1. متماكبات حمض اللبن.

أو بشكل مزيج راسيمي من L(+) حمض اللبن وD(–) حمض اللبن. يمتلك المتماكبان الخصائص الفيزيائية ذاتها (درجة الانصهار، الذوبانية، ثابت الانحلال، الكثافة، الخ) والخصائص الكيميائية ذاتها، باستثناء التفاعلات التي توجد فيها مركبات أخرى ذات فاعلية ضوئية. إحدى عقبات هذه التفاعلات هي صعوبة فصل المركبات من خلال التقنيات التقليدية (الاستشراب، التقطير، والبلورة التجزيئية). لذلك، من الضروري انتقاء تقنية الفصل عند استخدام المواد ذات الفاعلية الضوئية. تمتلك المتماكبات النقية قيمة أعلى من المزائج الراسيمية لأنها تستخدم في تطبيقات صناعية مخصصة، فمثلاً يستخدم L(+) حمض اللبن في تصنيع L(+) متعدد حمض اللبن، وهو بوليمر عضوي قابل للتفكك نصف متبلور ومقاوم للحرارة. هناك تطبيق آخر هو إنتاج D(–) متعدد حمض اللبن، إذ يستخدم متماكب D(–) حمض اللبن(Vijayakumar *et al.*,2008).

بالإضافة إلى ذلك، تسلك المتماكبات سلوكاً مختلفاً في الأنسجة الحية، إذ يوجد L(+) حمض اللبن غالباً أكثر من D(–) حمض اللبن. في جسم الإنسان، يُنتج L(+) حمض اللبن فقط في أثناء تقلص العضلات. يُفضل استخدام L(+) حمض اللبن من أجل التطبيقات الغذائية والدوائية لأن التحول الاستقلابي لـ L(+) حمض اللبن في الجسم أسرع من D(–) حمض اللبن. أعطت الطرائق المختلفة للإنتاج كميات مختلفة من المتماكبات، ففي

حمض اللبن المنتج بالاصطناع الكيميائي تم الحصول على المزيج الراسيمي فقط، إذ تكون تراكيز المتماكبات متساوية، في حين يسمح التخمير بإنتاج أحد المتماكبات بكميات أكبر (Trindade, 2002).

ينحل حمض اللبن بالماء والمحاليل العضوية القابلة للامتزاج مع الماء ولكنه لا ينحل في المحاليل العضوية الأخرى، ويملك مقارنة مع الحموض الغذائية الأخرى طعماً حمضياً خفيفاً، وهو عديم الرائحة وذو مقدرة ضعيفة على التطاير (Narayanan *et al.*, 2004). ويظهر الجدول (1) تفاصيل الخصائص الترموديناميكية لحمض اللبن.

الجدول-1. الخصائص الترموديناميكية لحمض اللبن.

الخصائص	القيمة
الكثافة بدرجة حرارة 20°م (غ/ل)	52.8 (D)؛ 53.0 (L)؛ 16.8 (DL)
درجة الانصهار (°م)	82.0 عند ضغط 0.5 ملم زئبقي (D)؛ 122.0 عند ضغط 15 ملم زئبقي (L)؛ 103.0 عند ضغط 15 ملم زئبقي (DL)
ثابت الانحلال بدرجة حرارة 25°م	3.83 (D)؛ 3.79 (L)
السعة الحرارية (جول/مول.°م) بحرارة 20°م	190 (DL)
حرارة الذوبان (كيلو جول/مول) بحرارة 25°م	7.79 (L)
حرارة الانصهار (كيلو جول/مول)	16.86 (L)؛ 11.33 (DL)

(Holten *et al.*, 1971)

1-2- خصائص حمض اللبن المستخدم في الأغذية:

تبين المواصفة القياسية السورية رقم 2715 لعام 2002 الخصائص الواجب توافرها في حمض اللبن عند استخدامه في الأغذية موضحة في الجدول (2).

الجدول–2. خصائص حمض اللبن المستخدم في الأغذية.

خصائص حمض اللبن	الاشتراطات
اللون	عديم اللون إلى أصفر قليلاً
الرائحة	عديم الرائحة
القدرة على الامتزاج في الماء	يجتاز الاختبار
القدرة على الامتزاج في الكحول	يجتاز الاختبار
النقاوة	95–105%
الزرنيخ ملغ/كغ حد أقصى	3
الكلوريد (% بالكتلة، حد أقصى)	0.2
حمض الليمون أو الأوكزاليك أو الفوسفور أو الطرطير	يجتاز الاختبار
المعادن الثقيلة محسوبة كـ pb (ملغ/كغ، حد أقصى)	10
الحديد (ملغ/كغ، حد أقصى)	10
البقايا بعد الحرق % بالكتلة، حد أقصى	0.1
السكريات(%، حد أقصى)	0.1
الكبريت (%، حد أقصى)	0.25

1–3– طرائق إنتاج حمض اللبن:

1–3–1– التصنيع الكيميائي (Chemical synthesis):

اكتشف إنتاج حمض اللبن بالاصطناع الكيميائي باستخدام مسار لاكتونتريل، وهو المنتج الثانوي لتقنية أكريلونتريل، في عام 1863 من قبل ويسلينوس (Benninga, 1990). والتفاعلات المشمولة بهذا المسار مذكورة في المعادلات من 1 إلى 4.

$$CH_3CHO+HCN \rightarrow CH_3CHOHCN \quad (1)$$

$$CH_3CHOHCN+2H_2O+\frac{1}{2}\,H_2SO4 \rightarrow CH_3CHOHCOOH+\frac{1}{2}(NH_4)_2SO_4 \quad (2)$$

$$CH_3CHOHCOOH+CH_3OH \leftrightarrow CH_3CHOHCOOCH_3+H_2O \quad (3)$$

$$CH_3CHOHCOOCH_3+H_2O \leftrightarrow CH_3CHOHCOOH+CH_3OH \quad (4)$$

في المعادلة (1) يُضاف سيانيد الهيدروجين (HCN) إلى الأسيت ألديهايد السائل (CH_3CHO) بوجود حفاز قاعدي تحت ضغط مرتفع إذ يُنتج اللاكتونتريل (Pal *et al.*, 2009). في المعادلة2، يُسترجع اللاكتونتريل ويُنقى بالتقطير، ويُحلمأ باستخدام حمض الكبريت (H_2SO_4) للحصول على حمض اللبن ($CH_3CHOHCOOH$) وملح الأمونيوم ($(NH_4)_2SO_4$)). في المعادلة 3، يؤستر حمض اللبن بالميثانول (CH_3OH)، ويُسترجع ميثيل لاكتات ($CH_3CHOHCOOCH_3$) المتكون، ويُنقى بالتقطير. في المعادلة 4، تحلمأ ميثيل لاكتات بالماء المحمض لإنتاج حمض اللبن والميثانول. يُفصل الميثانول بالتقطير ويُعاد استخدامه في المعادلة 3.

هناك طرائق أخرى لتركيب حمض اللبن كيميائياً،على سبيل المثال: أكسدة البروبيلين غليكول؛ تفاعل الأسيتالديهيد مع أول أكسيد الكربون والماء عند درجات حرارة وضغط مرتفعة؛ التحلل المائي لحمض كلوروبوبرونيك وأكسدة حمض النيتريك من البروبيلين. ومع ذلك، لا يتم تسويق أي من هذه العمليات (Gao *et al.*, 2011). إن اصطناع حمض اللبن بأحد المسارات الكيميائية مرتفع التكلفة ويعتمد على المنتجات الثانوية من الصناعات الأخرى، التي تُشتق من الوقود الأحفوري (Datta and Henry, 2006). علاوةً على ذلك، بسبب الطلب المتزايد على حمض اللبن للتلدن الحراري القابل للتحلل الحيوي، هناك حاجة لأشكال لولبية نقية، D– أو L– حمض اللبن، في حين ينتج التركيب الكيميائي خليطاً راسيمياً من حمض اللبن، والأشكال D و L (Abdel–Rahman *et al.*, 2011; Pal *et al.*, 2009).

1-3-2- التصنيع الحيوي، التخمر (Fermentation):

لاقى إنتاج حمض اللبن باستخدام التقانة الحيوية قدراً كبيراً من الاهتمام في الآونة الأخيرة، لأنه يقدم بديلاً لتلوث البيئة الناجم عن صناعة البتروكيماويات والكمية المحدودة من الموارد البتروكيماوية (Wee *et al.*, 2006). وقد جذب الانتباه بسبب ميزاته العديدة مقارنة بالاصطناع الكيميائي، مثل إنتاج المتماكبات النقية واستخدام المصادر المتجددة ركازات للتخمير. يمثل إنتاج حمض اللبن من التخمير الميكروبي نحو 90% من إجمالي إنتاج حمض اللبن حول العالم (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal, 2000). تتميز عمليات التخمير بالتحلل البيولوجي للمادة المتفاعلة (الجلوكوز) من قبل مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة (الكتلة الحيوية) إلى نواتج أيضية مثل الإيثانول وحمض الستريك وحمض اللبن (Maher et al., 1995). يتم إنتاج حمض اللبن من السكريات الأحادية أو الثنائية عن طريق تحلل Embden Mayerhof. في ظروف لاهوائية، يتم اختزال حمض البيروفيك إلى حمض اللبن بوساطة أنزيم نازع الهيدروجين. يمكن تلخيص إنتاج و تنقية حمض اللبن بالمعادلات الآتية:

1. التخمير والتعادل (Fermentation and neutralization):

$$C_6H_{12}O_6 + Ca(OH)_2 \xrightarrow{\textbf{fermentation}} 2(CH_3CHOHCOO^-)Ca^{2+} + 2H_20$$

2. الحلمهة بوساطة حمض الكبريت (Hydrolysis by H2SO):

$$2(CH_3CHOHCOO^-)Ca^{2+} + H_2SO_4 \longrightarrow 2CH_3CHOHCOOH + CaSO_4$$

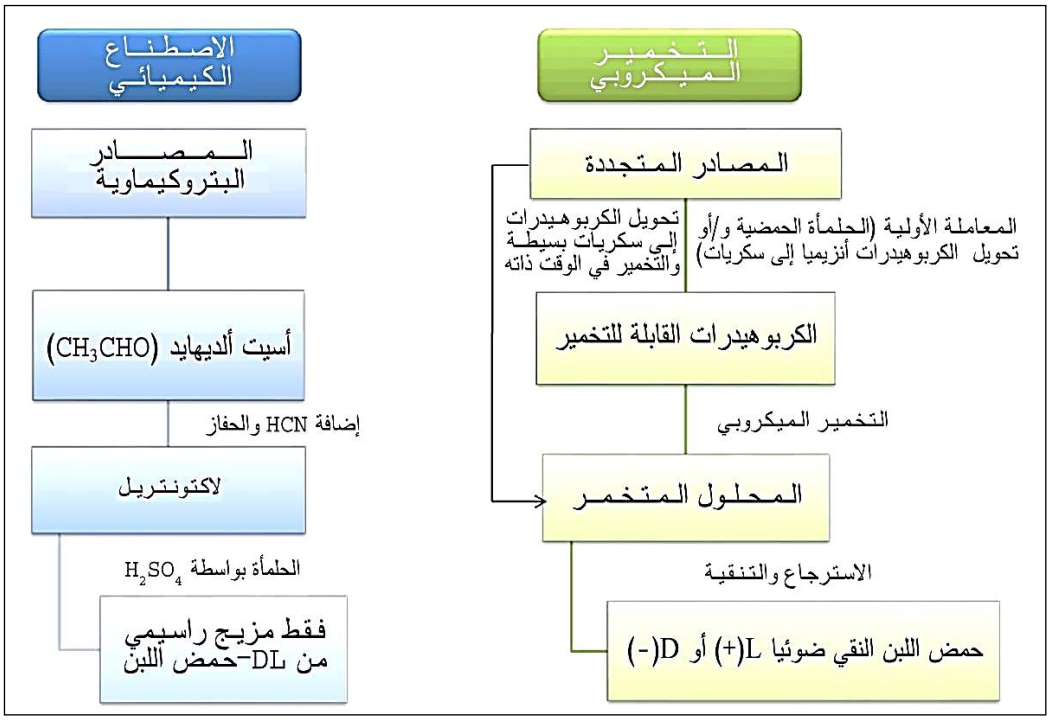
3. الأسترة (Esterification):

$$CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \longrightarrow CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O$$

4. الحلمهة بالماء (Hydrolysis by H_2O):

$$CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH$$

يتم التخلص من الخلايا بعملية الترشيح ويكون وسط التخمير حاوياً على لاكتات الكالسيوم، التي تعامل بحمض الكبريت للحصول على حمض اللبن وكبريتات الكالسيوم، وبعملية الترشيح يتم التخلص من كبريتات الكالسيوم غير الذائبة، وبعمليات متعاقبة تشمل الأسترة بالميتانول والحلمهة بالماء والتقطير يتم الحصول على حمض اللبن (Narayanan et al., 2004) . ويمثل الشكل (2) ملخصاً لطريقتي تصنيع حمض اللبن، الاصطناع الكيميائي والتخمير الميكروبي (Wee *et al.*, 2006).



الشكل-2. ملخص لطريقتي تصنيع حمض اللبن، الاصطناع الكيميائي والتخمير الميكروبي.

1-4- استعمالات حمض اللبن (التطبيقات):

1-4-1- في الصناعات الغذائية Food Industry:

يمثل جزءاً كبيراً من الطلب (35%)، فهو يستخدم كمادة تحميض لأن طعمه الحامضي معتدل عند المقارنة بالأحماض الأخرى المستخدمة في الغذاء، وكمادة حافظة للزيتون والخضار المخللة، وكذلك يستخدم عامل نكهة ومنظماً للحموضة ومثبطاً للبكتريا المتبقية في عمليات تصنيع الأغذية، مثل الحلويات والخبز والمشروبات الغازية وغيرها من المنتجات. وهو كذلك مكون أساسي في الأطعمة المتخمرة، مثل اللبن الرائب، الزبدة، والخضار المعلبة (Wee *et al*., 2006).

1-4-2- في الصناعات الكيميائية Chemical Industry:

لحمض اللبن تطبيقات في صناعة دباغة الجلود، وعمليات إزالة الترسبات، وصناعة النسيج كمثبت للصبغات، ويمكن أن يستبدل الإيثيلين غليكول كمضاد للتجمد، وهذا يؤدي إلى كفاءة أعلى وكلفة أقل. في الصناعات الكيماوية، يمكن أن يُحول حمض اللبن إلى إيثانول، بولي غليكول، وبوليمرات الأكريليك. تستخدم مشتقات وأملاح وإسترات حمض اللبن كمذيبات ومستحلبات وملدنات (Trindade, 2002).

1-4-3- في المجالات الطبية والصيدلانية (Pharmaceutical and Cosmetic Industry):

يستخدم حمض اللبن في زرع الأنسجة، أقراص الدواء، الخيوط الجراحية، وأنظمة التحكم في تحرير العقاقير. في بعض الصناعات التجميلية، يستخدم حمض اللبن في تصنيع المنتجات الصحية والتجميلية بسبب تأثيراته المرطبة والمضادة للميكروبات، والمجددة على الجلد. ويستخدم كذلك في منتجات صحية تعطى عن طريق الفم (Castillo Martinez *et al*., 2013). طُوِّرت استخدامات جديدة لحمض اللبن، مثل إنتاج عديدات حمض اللبن PLA القابلة للتفكك الحيوي وغير الضارة بالأنسجة الحية (Abdel-Rahman *et al*., 2013)، يمثل

إنتاج البوليمر الجزء الأكبر من استخدامات حمض اللبن (39%)، وهناك طلب متزايد على مشتقات PLA لتعويض المواد البلاستيكية التقليدية، وكذلك للاستخدام في الأجهزة الطبية (Gao *et al*., 2011).

1-5- الأنواع التجارية لحمض اللبن:

للحمض الناتج درجات مختلفة من النقاوة بحسب الغرض من إنتاجه: الحمض الخام (Crude) أو ما يسمى (Technical grade) يكون ملوناً ويصنع للاستخدامات التجارية ويحضر بسهولة بإضافة حمض الكبريتيك لإزالة الكالسيوم عن اللاكتات من وسط التخمر المسخن المرشح ثم يركز الحمض، ويستخدم في الصناعات التي لا تحتاج الى درجات عالية من النقاوة كالصناعات الجلدية. والنوع الغذائي (Edible grade) ذو لون ثلجي بتركيز (50-80)% يتطلب خطوة تنقية إضافية عن النوع السابق. والنوع البلاستيكي (Plastic grade) وهو أكثر نقاوة من النوعين السابقين ويكون عديم اللون وذا تركيز (50-80)% والنوع الأنقى (USP) ذو تركيز 90% يستخدم في الصناعات الصيدلانية (Vijayakumar *et al*., 2008). قام مجلس الأبحاث الوطنية ودستور الصيادلة في الولايات المتحدة الأمريكية عام 2003 بتصنيف حمض اللبن إلى أربع مجموعات (الجدول 4) وذلك بحسب التركيب والنقاوة (Gonzalez *et al* ., 2007).

الجدول-3. مواصفات أنواع حمض اللبن التجارية.

المؤشر	حمض اللبن			
	FCC88	FCC80	FCC50	88% USP/FCC
طريقة التصنيع	تخميرية	تخميرية	تخميرية	كيميائية
حمض اللبن (%)	88.5-87.5	80.5-79.5	50.5-49.5	90-88
الكثافة (غ/مل)	1.22-1.2	1.20-1.18	1.14-1.12	1.22-1.20
الرماد الكبريتاتي (%)	0.1 كحد أعلى	0.1 كحد أعلى	0.06 كحد أعلى	0.05 كحد أعلى
المعادن الثقيلة (ppm)	10 كحد أعلى	10 كحد أعلى	6 كحد أعلى	0.001 كحد أعلى
الحديد (ppm)	10 كحد أعلى	10 كحد أعلى	كحد أعلى	0.001 كحد أعلى
الزرنيخ (ppm)	1 كحد أعلى	1 كحد أعلى	1 كحد أعلى	0.003 كحد أعلى

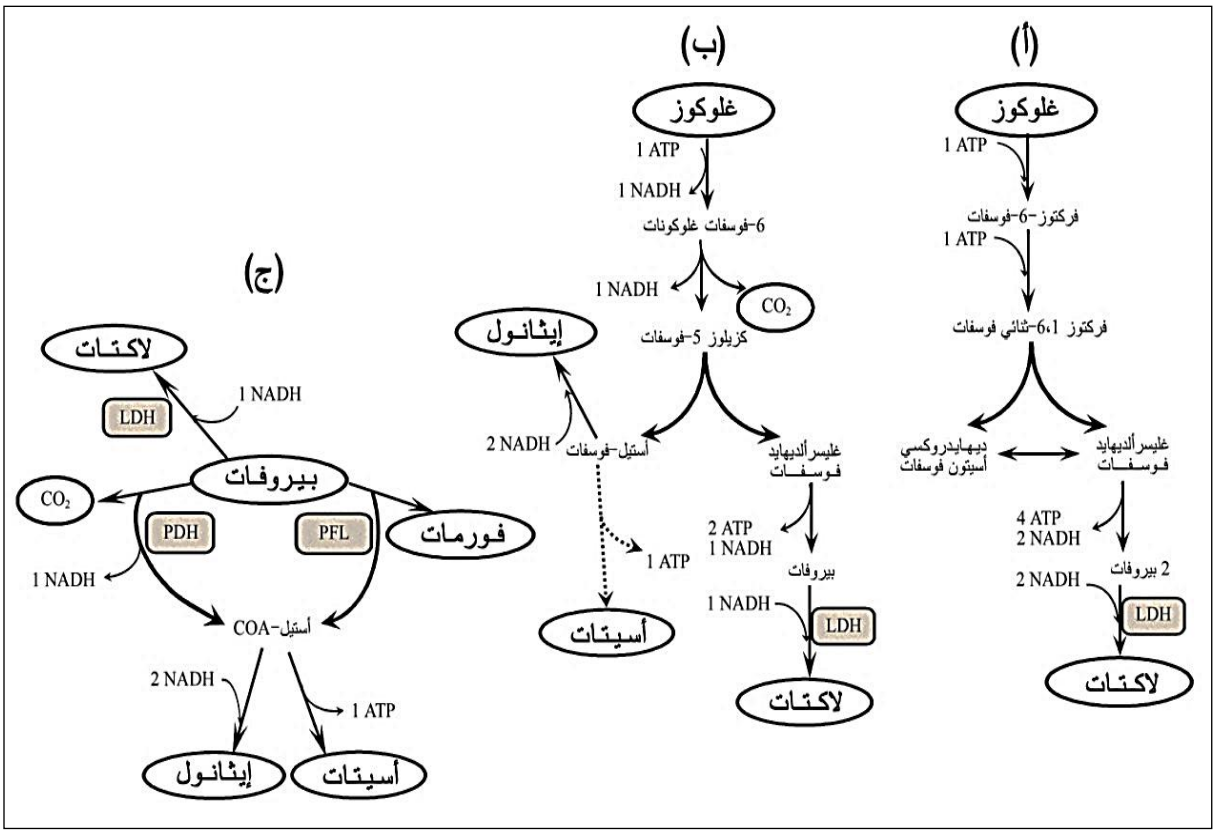
الكالسيوم (ppm)	20 كحد أعلى	20 كحد أعلى	20 كحد أعلى	–
الكلوريد (ppm)	10 كحد أعلى	10 كحد أعلى	10 كحد أعلى	–
الكبريتات (ppm)	20 كحد أعلى	20 كحد أعلى	20 كحد أعلى	–

FCC: the Food Chemicals Codex , USP: the United States Pharmacopeial

1-6- الأحياء الدقيقة المستخدمة في إنتاج حمض اللبن:

يمكن تقسيم الأحياء الدقيقة المستخدمة في التخمير إلى مجموعتين: البكتريا والفطريات (Wee *et al*., 2006). يعتمد اختيار نمط الكائن الحي الدقيق الذي سيستخدم بشكل أساسي على نوع الكربوهيدرات التي يجب أن تُخمر بما أن استقلاب الكائن الحي الدقيق يختلف باختلاف مصدر الكربون (Lunelli *et al*., 2010). إن معظم بكتريا حمض اللبن (LAB) هي مكورات، باستثناء *Lactobacillus* و*Carnobacterium*، وهي عصيات. إنّ LAB غير قادرة على اصطناع ATP بوساطة التنفس، والمنتج النهائي من تخمير السكريات الحافظ للطاقة هو حمض اللبن. ومعظم LAB لاهوائية اختيارياً، سلبية الكتالاز، غير متحركة، وغير مكونة للأبواغ. وهي تمتلك عادة تحملاً عالياً للحمض ويمكن أن تبقى على قيد الحياة بدرجة حموضة (pH) 5 أو أقل، وتمنحها قدرتها العالية على تحمل الحمض ميزة تنافسية على البكتريا الأخرى. وتختلف درجة الحرارة المثالية للنمو بين 20 و45°م (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal, 2000). يمكن تصنيف LAB إلى مجموعتين وفقاً لمنتج التخمير النهائي، وهما المجموعة متجانسة التخمير والمجموعة غير متجانسة التخمير. وهناك نوعان من LAB غير متجانسة التخمير، وهي الإجبارية والاختيارية، ويظهر الشكل (3) المسارات الاستقلابية لـ LAB. تحول LAB متجانسة التخمير الغلوكوز في الغالب إلى حمض لبن حصرياً، في حين تستقلب LAB غير متجانسة التخمير الغلوكوز إلى إيثانول، CO_2، حمض الخل و حمض اللبن. تستقلب LAB متجانسة التخمير الغلوكوز عادة بوساطة مسار إمبدن-مايرهوف-بارناس (تحليل الغلوكوز). ينتج تحليل الغلوكوز حمض اللبن فقط كمنتج نهائي لاستقلاب الغلوكوز. تُنْتَج جزيئتا حمض اللبن لكل جزيئة غلوكوز،

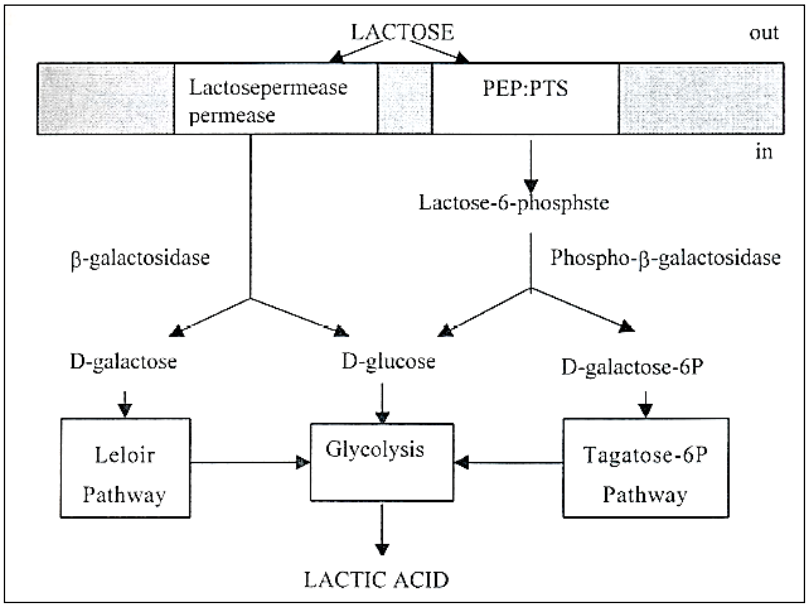
وهذا ينتج مردوداً أعلى من 0.90 غ/غ. إن البكتريا التابعة للأنواع *Lactobacillus acidophilus*، *Lactobacillus amylophilus*، *Lactobacillus bulgaricus*، *Lactobacillus helveticus*، و *L. salivarius* هي جمعياً LAB متجانسة التخمير (Castillo Martinez *et al.*, 2013). تخمر LAB غير متجانسة التخمير إجبارياً السكريات بوساطة مسار 6–فوسفوغلوكونات/فوسفوكيتولاز، في حين تستخدم LAB غير متجانسة التخمير اختيارياً كلا مساري التخمير.



الشكل–3. المسارات الاستقلابية لبكتريا حمض اللبن.

(أ) التخمير المتجانس، (ب) التخمير غير المتجانس، (ج) التخمير المختلط للحمض. LDH = لاكتات ديهايدروجيناز، PFL = بيروفات فورمات لياز، PDH = بيروفات ديهادروجيناز (Hofvendahl and Hahn–Hägerdal, 2000).

كما يظهر الشكل (4) مساري استقلاب اللاكتوز بوساطة بكتيريا حمض اللبن، إذ تملك *Lactobacillus* أنزيمين فعالين في تخمير اللاكتوز وهما ß-galactosidase وphospho-ß-galactosidase (Arihara and Luchansky 1995).



الشكل-4. مسارا استقلاب اللاكتوز بوساطة بكتيريا حمض اللبن.

إنّ الأنواع *Lactobacillus brevis*، *L. fermentum*، *L. parabuchneri* و*L. Reuteri* هي LAB غير متجانسة التخمير إجبارياً. وأنواع LAB غير متجانسة التخمير اختيارياً هي *L. alimentarius*، *Lactobacillus plantarum*، *L.rhamnosus*، *Lactobacillus pentosus* و *Lactobacillus xylosus* (Castillo Martinez *et al.*, 2013). ويمثل الجدول (4) تصنيف البكتيريا اللبنية الشائعة بحسب نوع التخمير الذي تقوم به. تمتلك LAB متطلبات غذائية معقدة بسبب قدرتها المحدودة على اصطناع فيتامينات B والأحماض الأمينية (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal, 2000) وبذلك تحتاج إلى وسط غني بالمغذيات للنمو.

الجدول-4. تصنيف البكتيريا اللبنية الشائعة بحسب نوع التخمير الذي تقوم به.

التخمر المتجانس	التخمر غير المتجانس	
	إجباري	اختياري
L.acidophilus	*L.brevis*	*L.plantarum*
L. helveticus	*L.buchneri*	*L.rhamnosus*
L.delbueckii	*L.fermentum*	*L.coryneformis*
L.lactis	*L.kefir*	*L.curvatus*
L.bulgaricus	*L.reuteri*	*L. pentosus*
	Leuconostoc sp	*L.casei*
		L.paracasei

(Curry and Crow , 2003b)

ينتج العديد من LAB متماكباً واحداً لحمض اللبن، ولكن أحياناً يمكن أن تُنتج كميات قليلة من كلا المتماكبين اعتماداً على شروط العملية. تمتلك الأحياء التي تنتج متماكبات D(−) أو L(+) أنزيمي لاكتات ديهايدروجيناز (LDH)، اللذين يختلفان في خصائصهما الفراغية. تنتج بعض أنواع *Lactobacilus* المتماكب L(+)، وعندما تتراكم هذه المتماكبات، يتحول حمض اللبن إلى المتماكب D(−) حتى الوصول إلى التوازن وتكوين المزيج الراسيمي (Narayanan *et al*., 2004). ينتج النوعان *Lactobacillus helveticus* و *Lactobacillus plantarum* مزيجاً راسيمياً (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal, 2000). ويمثل الجدول (5) تصنيف أهم أنواع البكتيريا بحسب إيزومير (متماكب) حمض اللبن الذي تنتجه.

الجدول-5. تصنيف أهم أنواع البكتيريا بحسب نوع التماكب لحمض اللبن الذي تنتجه.

البكتيريا	D(-) Lactic acid	L(+) Lactic acid	DL(±) Lactic acid
L. acidophilus	No	No	Yes
L. delbrueckii subsp. lactis	Yes	No	No
L. delbrueckii subsp. Bulgaricus	Yes	No	No
L. helveticus	No	No	Yes
L. casei	No	Yes	No
L. paracasei subsp.Tolerans	No	Yes	No
L. paracasei subsp.paracasei	No	Yes	No
L. rhamnosus	No	Yes	No
L. plantarum	No	No	Yes
Lc. lactis	No	Yes	No
S. thermophilus	No	Yes	No
Leuconostoc sp	Yes	No	No

(Curry and Crow , 2003a)

على الرغم من أن الأغلبية العظمى من عمليات إنتاج حمض اللبن تُجرى بوساطة LAB، إلا أن هناك الفطريات الخيطية، مثل Rhizopus، التي يمكن أن تستخدم الغلوكوز هوائياً لإنتاج حمض اللبن. وتمتلك أنواع مثل *R. oryzae* و*R. arrhizus* الفاعلية الأنزيمية المحللة للأميلوز، التي تمكنهما من تحويل النشاء مباشرة إلى L(+)-حمض اللبن. سجلت العديد من الدراسات حول استخدام Rhizopus لإنتاج حمض اللبن استخداماً هوائياً لإنتاج حمض اللبن المتماكب من كلا (Guo *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2012)

المتماكبين اعتماداً على شروط التشغيل. يمتلك التخمير بالفطريات بعض الميزات، على سبيل المثال، يتطلب *R. oryzae* وسطاً بسيطاً فقط وينتج L(+)–حمض اللبن، ولكنه يتطلب أيضاً التهوية الشديدة لأن *R. oryzae* هوائي إجبارياً.

الأكثر احتمالاً أن يكون معدل الإنتاج المنخفض في التخمير الفطري، وهو أقل من 3/غ/ل/ساعة، ناتجاً عن معدل التفاعل المنخفض الناتج عن قيود انتقال الكتلة. يرتبط كذلك مردود الإنتاج المنخفض في الفطريات جزئياً بتكوين المنتجات الثانوية، مثل حمض فوماريك والإيثانول (Wee *et al.*, 2006).

1-7- استخدام مصل الجبن في إنتاج حمض اللبن بالطريقة الحيوية:

يعد استعمال مخلفات معامل الأغذية كمواد أولية في التقنية الحيوية ذا أهمية كبيرة، فبالإضافة إلى إنتاج مواد مفيدة وذات أهمية اقتصادية فإنّ هذه العملية تسهم في علاج مشكلة التلوث البيئي بهذه المخلفات. ومن أهم هذه المخلفات مصل الجبن المتخلف من صناعة الجبن والذي يعد غنياً بالمواد العضوية التي تجعله من أهم الملوثات البيئية، إذ تبلغ متطلبات الأوكسجين الحيوي (BOD) له تقريباً (30000–50000) جزء من المليون ومتطلبات الأوكسجين الكيميائي (COD) تقريباً (60000–80000) جزء من المليون، وذكر أنّ مزرعة ألبان طاقتها الإنتاجية 100 طن في اليوم تنتج كمية من المنتجات العضوية في مخلفاتها تعادل كمية ما تنتجه قرية عدد سكانها 55000 مواطن. ومن جهة أخرى فإن احتواءه على كثير من المواد الغذائية، مثل اللاكتوز والبروتين والدهون والفيتامينات والأملاح المعدنية، يجعله وسطاً جيداً لتنمية الأحياء المجهرية وإنتاج كثير من المواد المفيدة مثل الأحماض العضوية والأنزيمات والأحماض الأمينية والفيتامينات وبروتين وحيد الخلية (Vidra and Nemeth, 2017). كقاعدة عامة، يتم الحصول على 9 لترات من المصل لكل كغ واحد من الجبن المنتج، ولذلك فإن كمية المصل الناتجة عن منشأة كبيرة واحدة فقط لصناعة الجبن يمكن أن تزيد عن (1×6^{10} لتر/يوم) (Jelen, 2003). مصل الجبن له لون بين الأصفر والأخضر بسبب وجود

الريبوفلافين ويحتوي تقريباً على 65 غ من إجمالي المواد الصلبة لكل لتر. يمثل مصل الجبن 85-95% من حجم الحليب، ويحتفظ بما يقارب 55% من مغذيات الحليب وما يقارب 20٪ من إجمالي محتوى البروتين (Ryan and Walsh, 2016).

يعتمد تركيب مصل الجبن على أصل الحليب وأنواع الجبن المصنعة (التخثر بالمنفحة أو التخثر الحمضي)، وعموماً، على العوامل التي تؤثر في تكوين الحليب مثل السلالة ، الدورات الموسمية، والأعلاف، ومرحلة الإرضاع. يمكن تقسيم هذا المنتج الثانوي إلى نوعين: مصل الجبن الحلو والحامض وذلك بحسب المعالجة التقنية المستخدمة في إنتاج الجبن. يحتوي مصل الجبن البقري الحلو على درجة حموضة(pH) حوالي6-7 (Argenta and Scheer,2019) 6-10 غ /ل بروتين، 5-6 غ/ل دهن، 46-52 غ /ل لاكتوز و2.5-4 غ /ل معادن (Ryan and Walsh, 2016; Guo and Wang, 2019). الخطوة الأولى في صناعة الجبن (الذي ينتج عنه مصل الجبن الحلو) هي إضافة المنفحة إلى الحليب، إذ تعمل المنفحة على تخثير الكازئين الموجود في الحليب وهذا يؤدي إلى تكوين الخثرة، ثم تصفَّى الخثرة والسائل المتبقي هو (مصل الجبن الحلو). تسبب المنفحة في تخثر الكازئين عند درجة حموضة(pH) 6.0-6.5 (Argenta and Scheer, 2019). يحتوي مصل الجبن الحمضي على درجة حموضة 4.5-5.8 (Argenta and Scheer, 2019)، 6-8 غ /ل بروتين، 5-6 غ /ل دهن، 44-46 غ/ل لاكتوز و4.3-7.2 غ/ل معادن Guo and Wang, (2019). وينتج هذا المصل من نشاط العصيات اللبنية أو عن طريق إضافة حمض اللبن أو الأحماض المعدنية المستخدمة لتخثر الكازئين. محتوى اللاكتوز عامة أقل في مصل الجبن الحمضي، ولكن المحتوى المعدني يتجاوز عادة محتوى مصل الجبن الحلو (Pintado *et al.*, 2001). يعرّض مصل الجبن البقري إلى معالجة حرارية حوالي 85-90 °C مدة 20-30 دقيقة بهدف ترسيب بروتينات مصل الجبن ويسمى المصل الناتج بمصل الجبن الثاني (Maragkoudakis *et al.*, 2016). ويحتوي مصل الجبن البقري الثاني على 0.15-0.22% بروتينات، وعلى 4.8-5% لاكتوز، و1-1.13% معادن (Sommella *et al.*, 2016).

اللاكتوز هو المكون الرئيسي لمصل الجبن، والذي يمثل 70–75% من إجمالي المواد الصلبة، وهو المسؤول عن القيم العالية لـ BOD وCOD (Carvalho *et al.*, 2013). قدّر الإنتاج العالمي من مصل الجبن البقري بحوالي160 مليون طنٍّ سنوياً (Vincenzi *et al.*, 2014). ومن المتوقع أنّ يصل الإنتاج العالمي للجبن إلى 21 مليون طنٍّ في عام 2020، وهذا يتوافق مع تقديرات الإنتاج العالمي لمصل الجبن وهي 168 مليون طنٍّ سنوياً. يذهب حوالي 50% من مصل الجبن نفايات، تستخدم كعلف للحيوانات، أو سماد حيوي في أنظمة الري، أو يتم تفريغها من دون علاج (Cassano *et al.*, 2019). الحلول التقليدية لعلاج مصل الجبن تشمل إنتاج منتجات مصل الجبن المجففة مثل مسحوق مصل الجبن ومركزات البروتين، ومسحوق اللاكتوز (Kotoulas *et al.*, 2019).

1-8- تأثير ظروف عملية التخمير في إنتاج حمض اللبن بوساطة بكتريا حمض اللبن:

1-8-1- تأثير درجة حرارة التحضين:

تؤدي درجة الحرارة دوراً مباشراً في التأثير في عملية إنتاج حمض اللبن، وتتباين درجات الحرارة المستخدمة في إنتاج حمض اللبن من الأحياء الدقيقة المجهرية، وفقاً لـ Ha وآخرين (2003). تتراوح درجة الحرارة المثالية لنمو بكتريا حمض اللبن بين 20 إلى 45°C ومن الواضح أنها تختلف من نوع لآخر. سجل Ilmen وآخرون (2007) إنتاجاً أعظمياً من إنتاج حمض اللبن مقداره 33.72 غ/ل بدرجة حرارة 37°C بوساطة *L. casei*. لإيجاد درجة الحرارة المثالية لإنتاج حمض اللبن، قام Sarkar وPaul (2019) بتحضين وسط مصل الجبن بعد إضافة اللقاح بدرجة حرارة تراوحت بين 25–50°م. ازداد إنتاج حمض اللبن بسرعة مع ارتفاع درجة الحرارة من 25°م حتى 37°م؛ وكان الإنتاج الأعظمي بدرجة حرارة 37°م (43.6 غ/ل) ولكن، حدث انخفاض عند درجة حرارة 45°م (34.2 غ/ل) ووجد انخفاض أكبر في إنتاج حمض اللبن بدرجة حرارة 50°م (20.2 غ/ل). ودرجة الحرارة كذلك أحد العوامل المهمة، التي تؤثر في فاعلية أنزيمات الخلية الاستقلابية وكل أنزيم

يكون أكثر فاعلية بدرجة الحرارة المثالية. تبدي التفاعلات الأنزيمية سرعة التفاعلات الأعظمية بدرجة الحرارة المثالية. لكن عندما ترتفع درجة الحرارة أعلى من الدرجة المثالية، ينخفض معدل التفاعل، وهذا يمكن أن يؤثر في عملية الاستقلاب الخلوية. من الواضح أن درجة الحرارة التي تتراوح بين 37–40°C تعدُّ مثالية لتحويل اللاكتوز إلى حمض لبن باستخدام بكتريا *Lactobacillus sp* (Sarkar and Paul, 2019). درس Ostlie وآخرون (2005) قابلية خمس سلالات تابعة للجنس *Lactobacillus* في انتاج حمض اللبن تحت درجات حرارة مختلفة (20، 30، 37، 45°م)، ولوحظ أعلى إنتاج لحمض اللبن عند 37°م. في حين أنتج Busairi (2010) حمض اللبن عند 40 °م من السلالة *L. delbrueckii* subsp. delbrueckii ATCC 9649.

1-8-2- تأثير فترة التحضين:

تباينت فترات التحضين المستخدمة في إنتاج حمض اللبن من بكتريا حمض اللبن، فقد أشار Ostlie وآخرون (2005) إلى قابلية ست عزلات تابعة للجنس *Lactobacillus* في إنتاج حمض اللبن، ووصل أقصى إنتاج له بعد مدة حضن مقدارها 48 ساعة. سجل العديد من الباحثين أن فترة تحضين 48 ساعة قد استخدمت عموماً لإنتاج حمض اللبن باستخدام مزارع مختلفة بكتريا *Lactobacillus* مع أن اختصار وقت التخمير أكثر فائدة من الناحية الاقتصادية (Ilmen *et al.*,2007). سجلَ Dumbrepatil وآخرون (2008) أنَ أفضل فترة تحضين كانت بعد 40 ساعة لإنتاج حمض اللبن من السلالة *L. delbrueckii* subsp. delbrueckii UC-3. وتم الحصول على أقصى إنتاج من حمض اللبن من العزلتين *L. delbrueckii* و*L.* gasseri باستخدام فترتي حضن 96 و72 ساعة على التوالي (EL-Hawary *et al.*,2009). لوحظ أنَ الإنتاج الأعظمي من حمض اللبن وهو 41.7 غ/ل بعد 120 ساعة من التحضين، عند إنتاج حمض اللبن من مصل الجبن باستخدام بكتريا *Lactobacillus sp* وعدَّت هذه الفترة هي الأمثل لإنتاج حمض اللبن (Sarkar and Paul, 2019).

1-8-3- تأثير سرعة التحريك في الحاضنة الهزازة في إنتاج حمض اللبن:

من أجل إيجاد سرعة التحريك المثالية في الحاضنة الهزازة، وذلك من أجل الحد الأقصى لاستخدام اللاكتوز وإنتاج حمض اللبن، قام Sarkar و Paul (2019) بتحضين الوسط الملقح بمزرعة البكتريا بسرعات مختلفة تراوحت بين 50-200 دورة/دقيقة، ووجدا أنَ الإنتاج الأعظمي من حمض اللبن كان بسرعة 150 دورة/دقيقة عندما تمت المحافظة على الشروط المثالية الأخرى. عندما ارتفعت سرعة الدوران إلى 200 دورة/دقيقة، انخفضت الكمية المنتجة. ذكر Senthuran وآخرون (1999) أن زيادة سرعة التحريك في الحاضنة الهزازة تؤدي إلى زيادة التجانس ومن ثم زيادة الاتصال بين الخلايا ومكونات الوسط. وقد تؤدي السرعة الأقل إلى تجانس غير كافٍ ولن يتم استخدام الركيزة بالكامل عند استخدام 50 دورة في الدقيقة و75 دورة في الدقيقة . كما أنّ سرعة التحريك في الحاضنة الهزازة مهمة لانتقال الكتلة والحرارة . تباينت الظروف المستخدمة في إنتاج حمض اللبن، فقد أشار deLima وآخرون (2010) إلى إنتاج الحمض من بكتريا *L. rhamnosus* B103 تحت ظروف لاهوائية باستخدام الحاضنة الهزازة وبسرعة تحريك 200 دورة في الدقيقة، واستخدم (Adthalungrong and Temviriyanukul ,2010) الحاضنة الساكنة في إنتاج حمض اللبن من بكتريا *L.casei* TISTR 453، وأجرى Ray وآخرون (2009) مقارنة بين إنتاج حمض اللبن من بكتريا *L. plantarum* MTC1407 تحت ظروف لاهوائية ساكنة وأخرى هزازة ولاحظ أنَ أعلى إنتاج للحمض تحقق تحت الظروف اللاهوائية الهزازة، في حين تمكن Altaf وآخرون (2007) من إنتاج حمض اللبن من بكتريا *L. amylophilus* GV6 تحت ظروف لاهوائية باستخدام الحاضنة الهزازة وبسرعة تحريك 150 دورة في الدقيقة وكان إنتاجها لحمض اللبن في هذه الظروف أعلى من الكمية المنتجة في الظروف اللاهوائية الساكنة.

1-8-4- تأثير درجة الحموضة (pH) في إنتاج حمض اللبن:

تعد درجة الحموضة (pH) أحد أهم العوامل المؤثرة في عملية إنتاج حمض اللبن. وتبلغ القيمة المثلى لإنتاج الحمض من الأحياء المجهرية (5-6) (Huang *et al.*, 2003). تعدل درجة الحموضة (pH) لوسط التخمر إلى الوسط المثالي لنمو بكتريا حمض اللبن وعندما يحصل انخفاض في هذه الدرجة بسبب تراكم الحمض تعدل في أثناء التخمير بإضافة مواد معدلة للحموضة مثل هيدروكسيد الصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم والأمونيوم وكربونات الكالسيوم (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal, 2000). ذكر Busairi (2002) أنّ درجة الحموضة (pH) المثلى لإنتاج حمض اللبن هي6، وكان الإنتاج 54.97 غ/لتر وقيمة العائد 79%. وعندما زادت درجة الحموضة (pH) المتحكم فيه إلى 6.5 انخفض إنتاج حمض اللبن وقيمة العائد إلى 21.88 غ/لتر و31.25% على التوالي. وانخفض إنتاج حمض اللبن وقيمة العائد إلى 11.59 غ/لتر و16.55% على التوالي مع انخفاض درجة الحموضة (pH) إلى5.5. في جميع الحالات، أدت المعايرة المستمرة للرقم الهيدروجيني إلى أعلى تركيز وإنتاجية من حمض اللبن، بالمقارنة مع عدم وجود تحكم في الرقم الهيدروجيني.

أشارت العديد من الدراسات إلى استخدام درجة الحموضة (pH) 6.5 في إنتاج حمض اللبن. فقد استُخدم في إنتاجه من بكتريا *L. amylophilus* GV6 (Naveena *et al.*, 2004). وكذلك كانت درجة الحموضة (pH) المثلى لإنتاجه من بكتريا *L. plantarum* MTCC 1407 بحسب ما ذكره (Ray *et al.*, 2009)، في حين استُخدمت درجة الحموضة (pH) 6.7 في إنتاج المتماكب الضوئي لحمض اللبن (+) L من بكتريا *L. rhamnosus* B 103 (deLima *et al.*,2010). درس Sarkar و Paul (2019) تأثيرات درجة الحموضة (pH) في إنتاج حمض اللبن باستخدام وسط المصل ضمن المجال 4.0-9.0، ووجدا أن الإنتاج الأعظمي من حمض اللبن (42.8 غ/ل) قد تم الحصول عليه عند درجة الحموضة (pH) 6.5 بعد 24 ساعة من التحضين، وقد ازداد منتج التخمير بسرعة من درجة pH 4.0 إلى 6.5، في حين انخفض إنتاج حمض اللبن بشدة بعد درجة الحموضة (pH) المثالية (6.5). سجل Krischke وآخرون (1991) أنه باستخدام

سلالة *L. casei* كان مجال درجة الحموضة (pH) بين 6.0 و6.5 مثالياً لإنتاج حمض اللبن. بشكل مشابه سجل Hofvendahl و Hahn–Hägerdal (2000) أكثر من 95% من تحويل اللاكتوز المقابل لإنتاج 33.48 غ/ل حمض لبن قد حدث في درجة الحموضة (pH) 6.5. تحتاج بكتريا *Leuconostoc* وسطاً أكثر قلوية (pH ≤ 4.5)، من *Lactobacillus* و*Pediococcus*، الأكثر تحملاً للحموضة والتي تستطيع البقاء على قيد الحياة بدرجات حموضة (pH) 3.6 إلى 4.0 (Dellaglio *et al.*, 1995). ذكر Hofvendahl و Hahn–Hägerdal (2000) أنّ درجة الحموضة (pH) الأقل من 5.7 هي مثالية فقط لسلالات*Lactobacillus*، المعروفة بتحملها لدرجات الـ pH المنخفضة أكثر من *Lactococcus*. أنتج Reddy وآخرون (1976) حمض اللبن من مصل الجبن باستخدام بكتيريا *Lactobacillus bulgaricus* وقد بين أن الإنتاج الأمثل لحمض اللبن يتم بدرجة الحموضة (pH) 5.5. ذكر Ha وآخرون (2003) أن درجة الحموضة (pH) 5.5 كانت مثالية لإنتاج حمض اللبن باستخدام سلالة *L. helveticus*. تم الحصول على أعلى إنتاجية من حمض اللبن عند تخمير مصل الجبن باستخدام *Lactobacillus casei* عند درجة حرارة 37°C ودرجة حموضة 5.5 إذ بلغت الإنتاجية 3.97غ/ل/سا (Büyükkileci and Harsa, 2004).

1-9- تأثير إضافة المغذيات إلى وسط التخمير في إنتاج حمض اللبن باستخدام بكتريا حمض اللبن:

أشار Sayed وآخرون (2020) إلى أنّ إضافة مستخلص الخميرة لم يحسن فقط العائد البكتيري ولكن أيضاً ضغط الزمن اللازم لتحقيق التخمير. قد يكون هذا بسبب بعض المكونات الموجودة في مستخلص الخميرة مثل الأحماض الأمينية والببتيدات والفيتامينات وبعض الأحماض العضوية مثل حمض البيروفيك والجلسرين (Arasaratnam *et al.*, 1996; Gamal *et al.*, 2017). يمكن أن يكون التأثير المعزز لمستخلص الخميرة في التخمير ناتجاً عن محتواه العالي من فيتامين B (Nancib *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2014). في دراسة قام بها Dumbrepatil وآخرون (2008) استخدمت تراكيز عدة للمصدر النيتروجيني

ولوحظ ازدياد كمية الحمض المنتج من قبل بكتريا *L. delbrueckii* subs. delbrueckii بازدياد تركيز المصدر النيتروجيني وبلغ أعلى إنتاج للحمض باستخدام 10 غ/لتر من مستخلص الخميرة.

وذكر Kitouni وOulmi (2013) أنّ استخدام المنغنيز، المغنزيوم وسلفات الحديد يعمل كعمل الأنزيمات المساعدة المشاركة في تخمير حمض اللبن. وأظهر Fitzpatrick وآخرون (2001) التأثير المفيد لـ Mn^{+2} لإنتاج حمض اللبن بوساطة *L. casei*، نظراً لدوره كمكون من مكونات اللاكتات ديهيدروجيناز (lactate dehydrogenase). وبين Coelho وآخرون (2011) أنّ لـ K_2HPO_4 تأثير إيجابي في إنتاج حمض اللبن، حيث أنَّ إضافة الفوسفات إلى الوسط يزيد من نمو الكائنات الحية الدقيقة ويعزز إنتاج حمض اللبن، ويحافظ هذا المكون على درجة الحموضة (pH) بالقرب من النمو الأمثل، ومن ثم السماح بوصول التخمير لمدة أطول.

1-10- تقييد الخلايا Cell Immobilization:

يشير مصطلح تقييد الخلية الى حفظ الخلية في مكان واحد، إذ تقتنص الخلايا أو ربما تلصق إلى سطوح لزجة تبقى عائمة في أوساط مغذية سائلة (Mahmoud and Helmy,2009). نالت تقنية تقييد الخلايا والأنزيمات اهتماماً كبيراً في العقود الأخيرة وذلك لفوائدها التكنولوجية والبيئية والاقتصادية، فهي تعمل على زيادة سرعة التفاعلات بسبب الكثافة العالية للعامل الحيوي المقيد وتساعد في استعمال معدلات جريان عالية في عمليات التخمر المستمرة (Continuous fermentations) من دون حصول غسل (Washout) أو إزالة للخلايا من وسط التخمر، كما تقلل من احتمال التلوث الميكروبي بالإضافة إلى تحسين قدرة الخلايا على التكيف لتغير الظروف البيئية. إن هذه العوامل وغيرها تساعد في خفض تكاليف تصميم المخمر والسيطرة عليه مقارنةً بتقنيات التخمر التقليدية باستعمال الخلايا الحرة (El-Gendy *et al.*, 2015)، وتعد طريقة التقييد في هلام ألجينات الكالسيوم من الطرائق المفضلة في التقييد بسبب بساطتها وعدم سميتها (Ghorbani *et al.*, 2011).

استخدمت طرائق متنوعة لتقييد خلايا بكتريا حمض اللبن وإنتاج الحمض منها، ففي دراسة قام بها Mirdamadi وآخرون (2008) تضمنت استخدام مساند مختلفة لتثبيت بكتريا *L. casei* subs. casei ATCC 39392 شملت الجينات الباريوم بتركيز 4% والآغار–آغار بتركيز 2% والبولي يوريثان، وأظهرت الدراسة أن أعلى إنتاج من الحمض تحقق باستخدام الخلايا المثبتة بمادة الجينات الباريوم إذ بلغت كمية الحامض المنتجة 60 غ/لتر بعد مدة حضن مقدارها 96 ساعة. وكذلك درس Gunduz (2005) تأثير تركيز المادة الساندة في إنتاج حمض اللبن من بكتريا *L.casei* NRRL B–441 إذ استخدم تراكيز متدرجة من ألجينات الصوديوم (1، 2 و3%) ولوحظ أن أعلى إنتاج للحامض تحقق عند التركيز 1% من المادة الساندة إذ بلغت كمية الحامض المنتجة 127.8 غ/لتر.

أنتج Boyaval وGoulet (1988) حمض اللبن من المصل بوساطة بكتريا *Lactobacillus helveticus* ووجدا معدلات تخمير أعلى بوساطة الخلايا المحتجزة في ألجينات الكالسيوم مقارنة بالخلايا الحرة. ووجد Roukas وKotzekidou (1998) أن التثبيت المشترك لخلايا النوعين *L. casei* و*L. lactis* قد أعطى تركيزاً أعلى من حمض اللبن مقارنةً بمزيج الخلايا الحرة بسبب تثبيت النشاط الخلوي. سجل Cachon وDiviès (1993) التثبيت كوسيلة لتثبيت نشاط السلالات بمنع فقد البلاسميد.

درس Göksungur وآخرون (2005) بكتريا *L.casei* المثبتة على خرزات ألجينات الكيتوزان بتراكيز مختلفة من ألجينات الصوديوم (1.0، 2.0 و3.0% و/ح) وإنتاج حمض اللبن في وسط المصل الحاوي 145.5 غ/ل من اللاكتوز الأولي، وأجروا التخمير لمدة 72 ساعة، وقد حصلوا على تراكيز متشابهة من حمض اللبن بالنسبة لتراكيز 1.0 و2.0% (127.8 و125.6% غ/ل، على التوالي)، وانخفض إنتاج حمض اللبن عندما ازداد تركيز ألجينات الصوديوم عن 2.0% (113.5 غ/دسم^3) نتيجة لكفاءة الانتشار الأقل للخرزات، كما حصلوا على أعلى إنتاج لحمض اللبن (127.8 غ/دسم^3) وأعلى كفاءة مردود (87.8%) وأعلى مردود تحويل (93.0%) من الخرزات المحضرة من ألجينات الصوديوم بتركيز 1%، لكنهم وجدوا أن الخرزات المحضرة من

ألجينات الصوديوم 1.0% كانت طرية وحساسة جداً للضغط والتمزق في أثناء إنتاج حمض اللبن وأن معظمها قد تحطم في الوسط عند نهاية التخمير. وكانت هذه النتائج متوافقة مع ما توصل إليه Göksungur وآخرون (1999) الذين أنتجوا حمض اللبن من مولاس الشوندر بوساطة بكتريا *Lactobacillus delbrueckii* المثبتة على خرزات ألجينات الكالسيوم ووجدوا أن الخرزات المحضرة من 1.0% و1.5% ألجينات الصوديوم قد تحطمت في الوسط نتيجة بنيتها الطرية. درس Abdel-Naby وآخرون (1992) إنتاج حمض اللبن بوساطة بكتريا *L. lactis* المثبتة على ألجينات الكالسيوم ووجدوا أن الإنتاج الأعظمي لحمض اللبن كان مع الخرزات الحاوية 3% ألجينات الكالسيوم، وبسبب مشاكل الانتشار، حصلوا على مردود أقل بوساطة الخرزات الحاوية 4 و5% ألجينات.

الألجينات هي عائلة من البوليمرات المشتركة (Copolymers) المزدوجة غير المتفرعة المكونة من حمض β-D-مانورونيك وحمض α-L-غولورونيك المرتبطة بروابط (1←4)، وهي تمتلك تركيباً شديد التنوع وتركيباً تسلسلياً. وهلام الألجينات ذو المحتوى العالي من حمض غولورنيك أقوى ميكانيكياً ويبدي مسامية أعلى وانكماشاً أقل في أثناء تشكيل الهلام. بزيادة محتوى حمض مانورونيك، يصبح الهلام أكثر طراوة ولدونة. لذلك، فإن نسبة حمض غولورنيك وطول وحداته هي الميزة البنيوية الرئيسة لتكوين الهلام (Skjâk-Bræk, 1992). لذلك فإن البيانات المقدمة في المراجع السابقة تخضع لبعض الاختلافات اعتماداً على منشأ الألجينات لأن الألجينات حساسة للاختلافات بين دفعة وأخرى ومورد لآخر.

1-11- عمليات فصل حمض اللبن وتنقيته:

إنّ عمليات الفصل مهمة جداً في الصناعات الكيماوية والصناعات الأخرى المرتبطة بها. وذكر Komesu وآخرون (2015) أنّ مرحلتي الفصل والتنقية تمثل ما يصل إلى 50% من إجمالي تكاليف إنتاج حمض اللبن. إنّ تطوير طريقة فعالة لفصل حمض اللبن وتنقيته من محلول التخمير مهمة جداً لاستمرار الإنتاج من الناحية

الاقتصادية. على الرغم من أن الاختلاف بين نقطة غليان حمض اللبن والماء كبير نسبياً، إلا أنه من المستحيل في الغالب الحصول على حمض اللبن المتبلور النقي، وهذا ناتج عن امتلاك حمض اللبن ألفة عالية للماء (Lunelli *et al.*, 2010).

تتضمن عملية تصنيع حمض اللبن بالطريقة التقليدية سلسلة من المعاملات المتلاحقة مثل الترسيب، الترشيح التقليدي، التحميض، الادمصاص بالكربون، التبخير، البلورة، وغيرها من المعاملات (Pal *et al.*, 2009). يؤثر عدد مراحل العمليات المتلاحقة بشكل كبير في نوعية المنتج وسعره (Idler *et al.*, 2015). ومن جهة أخرى، تمت مناقشة مراحل الفصل بشكل موسع في الدراسات العلمية، مثل الترسيب (Min *et al.*, 2011; Kwak *et al.*, 2012)، الاستخلاص بالمذيبات (Alkaya *et al.*, 2009; Krzyzaniak *et al.*, 2013)، عمليات الفصل بالأغشية، وغيرها. تتضمن عمليات الفصل بالأغشية المدروسة الحلول العكسي، التحال الكهربائي، الترشيح الفائق (Pal and Dey, 2013; Wang *et al.*, 2014). يمكن الحصول على المردود والنقاوة الكفوءين لحمض اللبن من تقنيات التنقية هذه، وقد طُوِّر العديد من الطرائق، ولكن العقبات تتضمن التكلفة المرتفعة للمواد الكيماوية والحاجة إلى الترشيح وعمليات الفصل الأخرى، خاصة عندما تكون النقاوة العالية مطلوبة. من وجهة النظر البيئية، إنتاج كميات كبيرة من المخلفات السائلة هو عقبة كبيرة. علاوةً على ذلك، يتطلب إنتاج طن واحد من حمض اللبن طناً واحداً من كبريتات الكالسيوم رخيص التكلفة (Pal *et al.*, 2009)، الذي يمثل مشكلة خطيرة بالنسبة لمعالجة المخلفات. يتطلب الاستخلاص بالمذيبات مساحة تبادل كبيرة من أجل كفاءة الفصل، الذي يتطلب معدات غالية الثمن. وتطبيقاته في التخمير الاستخلاصي مقيدة باسترجاع المذيبات الذي يجري في مراحل الاستخلاص والسمية العالية للمادة المستخلصة تجاه الأحياء الدقيقة (Gao *et al.*, 2009). وعملية الفصل بالأغشية هي تقنيات واعدة، ولكن التكلفة المرتفعة للأغشية ومشاكل الاستقطاب والترسبات تحد من استخدام عمليات التحال الكهربائي على نطاق واسع.

في السنوات الحالية، أُجري العديد من الدراسات التي جرّبت حل مشاكل عملية الفصل التقليدية باستبدالها بعمليات الفصل بالتقطير غير التقليدية (Komesu *et al.*, 2016)، مثل التقطير التفاعلي (Lunelli *et al.*, 2010) والتقطير الجزيئي (Komesu *et al.*, 2014). هناك طريقة أخرى جديرة بالاهتمام هي التخمير المباشر للاكتات العضوية، مثل لاكتات الأمينيوم (بيبرازينيوم ثنائي لاكتات، إميدازول لاكتات وهيكسامثيلين ثنائي أمين ثنائي لاكتات)، من أجل إنتاج حمض اللبن عالي النقاوة (Idler *et al.*, 2015). علاوةً على ذلك، نحتاج إلى دراسات جديدة حول عمليات استرجاع حمض اللبن لتطوير عملية أكثر كفاءة وجذابة اقتصادياً من أجل التطبيقات الصناعية.

1-12- التقييم الاقتصادي لعملية إنتاج حمض اللبن:

ذكر Manandhar و Shah (2020) أن إجمالي تكاليف إنتاج حمض اللبن من حبوب الذرة باستخدام بكتريا حمض اللبن في منشأة ذات إنتاج سنوي قدره 100000 طن/سنة هو 1181 دولاراً أمريكياً/طن. إذ ساهمت المواد الخام (تكلفة حبوب الذرة، و تكاليف كربونات الكالسيوم وحمض الكبريت المستخدمة في أثناء التخمير واستخلاص حمض اللبن) في 44% من إجمالي تكاليف إنتاج حمض اللبن، وساهمت المرافق في 19% والخدمات في 28% والعمالة بين 4-6% من إجمالي تكلفة إنتاج حمض اللبن. يمكن أن تختلف أسعار حمض اللبن وفقاً لتطبيقه في المواد الغذائية والأدوية وإنتاج PLA، ويتراوح نطاق سعره من 1.30 دولاراً أمريكياً إلى 2.30 دولاراً/كغ في عام 2011؛ إلا أنّ السعر وصل حالياً إلى (3-4 دولارات/كغ). ذكر Komesu وآخرون (2015) أنّ مرحلتي الفصل والتنقية تمثل ما يصل إلى 50% من إجمالي تكاليف إنتاج حمض اللبن. وذكر Biddy وآخرون (2016) أنّ تكاليف إنتاج حمض اللبن تعتمد على أسعار المواد الأولية، مثل النشاء والسكر التي يتم استخدامها في عملية التخمير، كان الحد الأدنى لسعر البيع (دولار/طن) لحمض اللبن المنتج باستخدام حبوب الذرة في حدود 842-1226 دولاراً أمريكياً، وكان الحد الأدنى لسعر البيع في

نطاق سعر حمض اللبن في السوق والذي يختلف من 650–2300 دولاراً/طن، بحسب درجة حمض اللبن والباعة. ذكر Tejayadi و Cheryan (1994) أنه عند إنتاج حمض اللبن بتركيز 85% من مصل الجبن، كانت تكلفته 0.98 دولاراً/كغ، وأنَّ تكلفة نقل مصل الجبن وتكلفة مستخلص الخميرة، ساهمتا بحوالي 35% و38% في إجمالي تكلفته على التوالي. سعر السوق الحالي لحمض اللبن هو 1.60–2.20 دولاراً/كغ بحسب شكل اللاكتات (حمض أو ملح) وقوته (60–85%) ونقاوته، فإذا كان سيستخدم لتصنيع البوليمرات القابلة للتحلل الحيوي، يجب أن يكون بدرجة نقاوة عالية. كانت تكلفة المغذيات (مستخلص الخميرة 10غ/ل) المستخدمة في تجربة إنتاج حمض اللبن من مصل الجبن مرتفعة، والعثور على مغذيات أرخص سيكون عاملاً رئيساً في النجاح التجاري لهذه العملية. يمكن تقليل تكلفة نقل مصل الجبن عن طريق تركيب مصنع حمض اللبن في موقع مصنع الجبن نفسه، وهذا سوف يخفض التكلفة من 0.98 دولاراً/كغ إلى 0.64 دولاراً/كغ. وإذا لم يكن بالإمكان تحديد موقع مصنع حمض اللبن في المنطقة المجاورة نفسها لمصنع الجبن، فعلى الأقل يجب أن يتم التناضح العكسي 2.2 مرة لمصل الجبن في مصنع مصل الجبن قبل نقله، وهذا من شأنه أن يقلل تكلفة الإنتاج من 0.98 دولاراً/كغ إلى 0.79 دولاراً / كغ .

ذكر González وآخرون (2007) أنه تم تقييم تكلفة إنتاج حمض اللبن (بنسبة 50% بدرجة الغذاء) اقتصادياً من مصل الجبن فائق الترشيح في هذا العمل. وتتكون هذه العملية من الخطوات الآتية: التخمير والترشيح الفائق والتبادل الأيوني والتناضح العكسي والتركيز النهائي عن طريق التبخر بالفراغ، وقد أثبتت أنها مجدية اقتصادياً، فكانت التكلفة 1.25 دولاراً أمريكياً/كغ لحمض اللبن بنسبة 50% (وزن/وزن). وساهمت خطوة الفصل والتركيز بنسبة 40% من التكلفة الإجمالية، في حين ساهمت خطوة التخمير بنسبة أعلى من 47% من إجمالي التكلفة.

1-13- دور حمض اللبن في حفظ اللحوم من الفساد:

يمكن استخدام بعض المحاليل الكيميائية مثل حمض السوربيك وأملاحه (سوربات البوتاسيوم أو الصوديوم) وحمض الخل وحمض اللبن وحمض الأسكوربيك وغيرها من المواد في حفظ اللحوم، وقد أقرت باستخدامها منظمة الصحة العالمية (WHO) ومنظمة الأغذية والزراعة (FAO)، وتعد الأحماض العضوية من المواد المضافة الآمنة (Goncalves *et al.*, 2005)، كما تسمح منظمة الأغذية والأدوية الأمريكية (FDA) باستخدام الأحماض العضوية كمحاليل مطهرة لذبائح الدواجن (Kenawi *et al.*, 2009)، وسُمِحَ باستخدام حمض اللبن من قبل FDA بنسبة تتراوح بين 1.5-2.5% (Del Rio *et al.*, 2007)، وكذلك اعتُمد كمضاف جيد في حفظ اللحوم المصنعة في كندا (DJC, 2009).

تبينَّ أنَّ فاعلية الأحماض العضوية في إطالة مدة حفظ اللحوم ناتج عن التأثير الكبير في خفض حمولة الأحياء المجهرية في اللحوم، وذلك بسبب قدرتها على تخفيض رقم الـ pH ومن ثم جعل أغشية الخلايا الميكروبية غير مستقرة نتيجة منع نقل البروتون عبر غشاء الخلية الميكروبية (Doores, 2005; Davision *et al.*, 2005)، وليس لمحاليل الأحماض العضوية المخففة عند تراكيز من 1-3% أي تأثير سلبي في الخواص الحسية المرغوبة للحم عند استخدامها كمطهرات للذبيحة (Goncalves *et al.*, 2005).

وجد أن حمض اللبن، هو حمض عضوي ذو فاعلية مثبطة، يمكن أن يستخدم كمادة حافظة مع أنواع مختلفة من الأغذية، فهو يؤخر تكاثر الكائنات الحية الدقيقة المسببة للتلف، ويمنع تكوين المواد الكيماوية غير المرغوبة، ويحسن المواصفات الحسية، ويطيل العمر الافتراضي للحوم الدجاج في أثناء التخزين المبرد (Smaoui *et al.*, 2012). سجل Dainty و Mackey (1992) أن الميكروفلورا الأساسية التي توجد على سطح اللحم بعد عمليات الذبح والتحضير هي البكتريا أليفة الحرارة المتوسطة، وأن تعدادها يتراوح بين 2 و4 log CFU/g. وأن هذه الأعداد تزداد في لحوم الدواجن بسبب تلامس الذبائح الملوثة مع الذبائح الخالية من التلوث (Siham and Taha, 2009). ووجد Kozacinski وآخرون (2006) أن التعداد الكلي للبكتريا في لحم صدر الدجاج

يكون عادة بحدود 4.72 log CFU/g. يستخدم حمض اللبن لمعاملة عينات صدر الدجاج، وقد أعطى أعلى انخفاض مبدئي في أعداد البكتريا الهوائية أليفة الحرارة المتوسطة وأليفة البرودة بنسبة 3% (Cosansu *et al.*, 2011).

أضاف عزيزية(2010) حمض اللبن بتراكيز (1.5، 3، 4.5) % إلى عجينة لحم البقر المفروم خلال التخزين المبرد(4±1 °م) لمدة 15 يوماً، ودرس الصفات الميكروبيولوجية والصفات الحسية لهذه المعاملات خلال وبعد فترة التخزين المبرد وبعد عملية الشوي، فلاحظ انخفاض سريع في المحتوى الميكروبي بعد المعاملة مباشرة بحمض اللبن و استمر هذا التأثير خلال التخزين المبرد لمدة خمسة عشر يوماً وقد ازداد الانخفاض بزيادة تركيز الحمض، وكانت أفضل معاملة هي تركيز 4.5% حيث حافظت على صفات حسية وميكروبية جيدة بعد 15يوماً من التخزين .

الفصل الثاني

مواد البحث وطرائقه

Materials and Methods

2- مواد البحث وطرائقه MATERIALS AND METHODS:

2-1- مواد البحث:

2-1-1- مكان تنفيذ البحث وزمانه:

نفذ هذا البحث خلال الفترة (2018-2022) في مخابر قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة، جامعة دمشق، ومخابر التقانات الحيوية التابعة للهيئة العامة للتقانات الحيوية، ومخبر التموين المركزي التابع لوزارة التجارة الداخلية وحماية المستهلك بدمشق، ومخبر تموين مديرية التجارة الداخلية وحماية المستهلك بريف دمشق.

2-1-2- المواد الكيميائية والمعدات المستخدمة في البحث:

يبين الجدول (6) المواد الكيميائية المستخدمة في البحث.

الجدول-6. المواد الكيميائية المستخدمة في البحث ومصدرها.

اسم المادة	الشركة المصنعة
أوساط زرع جرثومي: PCA,PDA,VRBA, Cetrimide Agar,) BPW,MRSagar, MRS (broth,M17agar,M17broth	MERCK/ Germany
API 50 CHL : نظام التعريف للتمييز بين أنواع العصيات اللبنية المعزولة وهذا النظام يمكن أن يحدد جنس البكتريا ونوعها	Biomerieux/France
صبغة غرام (Gram stain)	HIMEDIA/India
ثلاثي كلور حمض الخل	HIMEDIA/India
حمض ثيوباربيتيوريك (TBA)	HIMEDIA/India
مالون ألديهايد	HIMEDIA/India
حمض لبن نقي L(+)Lactic acid	MERCK/Germany
لاكتوز نقي	AFCO/India

مجموعة استخلاص الدنا Wizard®Genomic DNA Purification	Promega/USA
مستخلص الخميرة (Yeast Extract)	HIMEDIA/India
كاشف (p–phenyl – phenol)	HIMEDIA/India
كربونات الكالسيوم	Carloerba/Germany
كبريتات المغنزيوم المائية ($MgSO_4.7H_2O$)	Carloerba/Germany
كبريتات المنغنيز المائية ($MnSO_4.4H_2O$)	Carloerba/Germany
فوسفات ثنائي البوتاسيوم (K_2HPO_4)	Carloerba/Germany
كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$)	Carloerba/Germany
الدايوكسان (Dioxane)	BDH/ England
كاشف (Bromocresol green)	BDH/ England
كحول إيتيلي مطلق	BDH/ England
كحول إيتيلي 70%	BDH/ England
هيدروكسيد الصوديوم (NaOH)	HIMEDIA/India
حمض كلور الماء (HCl)	HIMEDIA/India
حمض الكبريت (H_2SO_4)	HIMEDIA/India
كلور الصوديوم (NaCl)	HIMEDIA/India
ألجينات الصوديوم	Carloerba/Germany

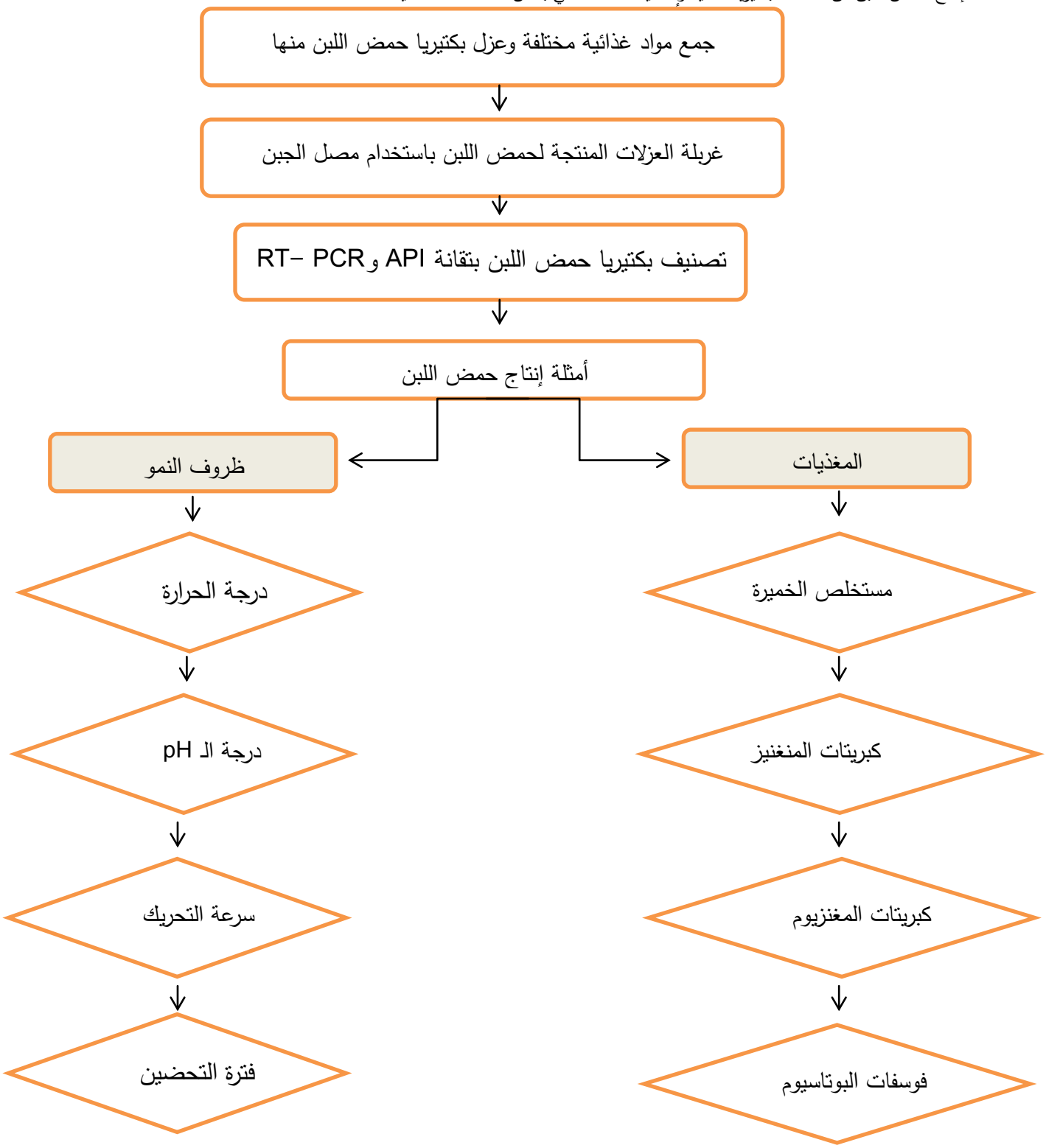
يبين الجدول (7) الأجهزة المستخدمة في البحث.

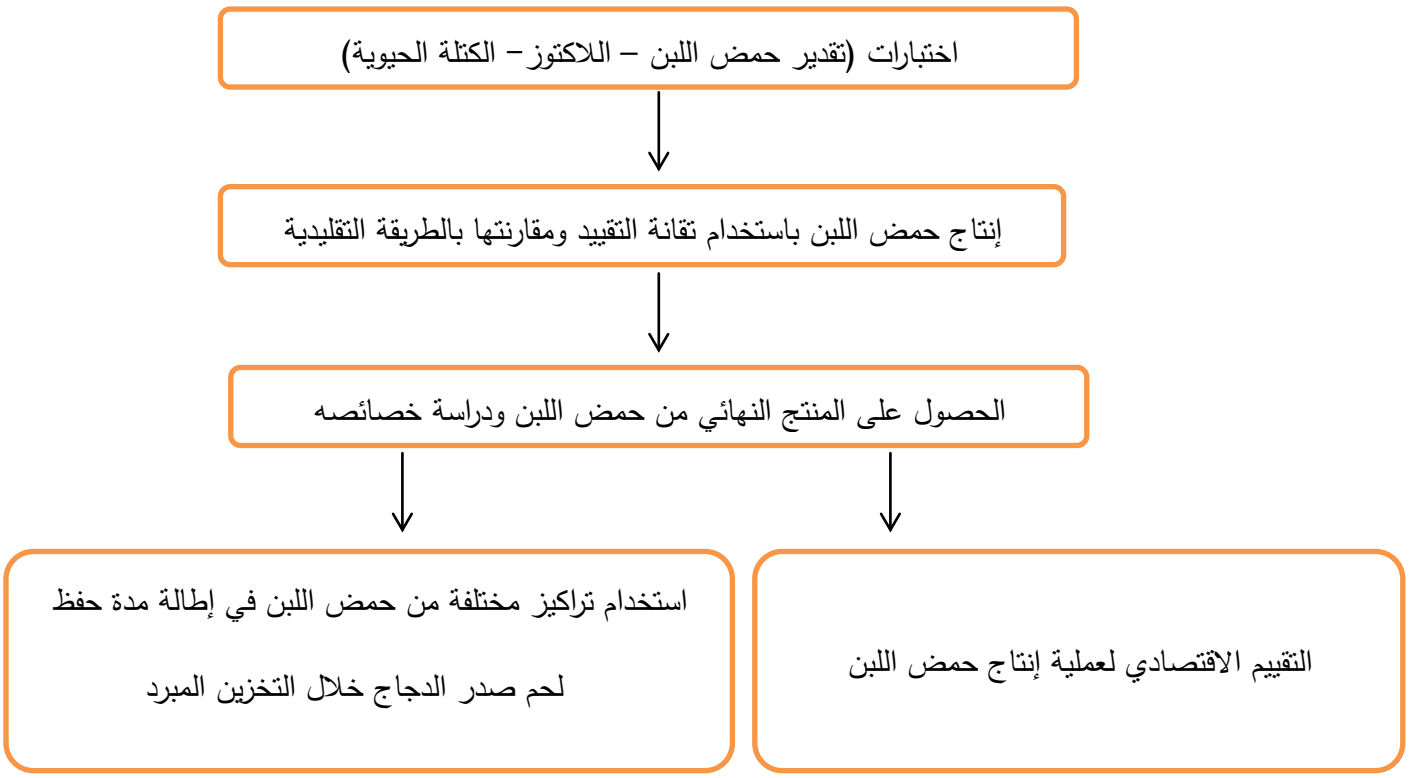
الجدول-7. الأجهزة المستخدمة في البحث ومصدرها.

الأجهزة المستخدمة	المصدر
المطياف الضوئي (Spectrophotometer)	Secomam –France
HPLC	SHIMADZU- Japan
جهاز طرد مركزي (Centrifuge)	Hettich – Germany
مجهر ضوئي (Microscope)	Motic – Germany
كلداهل	SHIMADZU- Japan
جهاز تقطير الماء	G F L – Germany
المخمر (Bioreactor)	Biotech-JPR5-China
جهاز المؤصدة (المعقم)(Autoclave)	ALP- Japan
غرفة زرع (Laminar flow cabinet)	Jeiotech – Korea
مازج الأنابيب (Vortex)	Stuart- China
فرن تجفيف (Oven)	Grad- Russian
ميزان حساس (Sensitive balance)	Sartorious – Germany
مقياس الرقم الهيدروجيني (pH- meter)	Mauritius – Germany
حاضنة هزازة (Shaking incubator)	Labtech – Korea
حواضن ميكروبية	Fisher Scientific – Germany
مسخن مع محرك مغناطيسي	Boeco – Germany
تقنية تفاعل البوليميراز التسلسلي في الزمن الحقيقي (RT-PCR)	Spartan/Canada
جهاز Flame photmeter	BWB-England
جهاز التقطير المرتد(لتركيز حمض اللبن)	Grad- Russian

2-1-3- مخطط البحث:

يبين الشكل (5) مراحل البحث الحالي وخطواته.


جمع مواد غذائية مختلفة وعزل بكتيريا حمض اللبن منها
غربلة العزلات المنتجة لحمض اللبن باستخدام مصل الجبن
تصنيف بكتيريا حمض اللبن بتقانة API و RT– PCR
أمثلة إنتاج حمض اللبن
ظروف النمو
المغذيات
درجة الحرارة
درجة الـ pH
سرعة التحريك
فترة التحضين
مستخلص الخميرة
كبريتات المنغنيز
كبريتات المغنزيوم
فوسفات البوتاسيوم



الشكل–5. مخطط البحث.

2–1–4– العينات المستخدمة في البحث:

1– مصل الجبن: تم الحصول على مصل الجبن الطازج من تصنيع الجبن الأبيض من الحليب البقري مخبرياً باستعمال المنفحة إذ تمت عملية التصنيع كالآتي: تصفية الحليب الخام بواسطة قطعة من القماش ومن ثمّ رفع درجة حرارة الحليب إلى C°42 ، ومن ثمّ إضافة المنفحة بمقدار(10ملغ رينين لكل 100 كغ حليب حسب تعليمات الشركة الصانعة)، ومن ثمّ التحضين على درجة حرارة C°40 لمدة ساعة، ومن ثمّ تقطيع الخثرة ووضعها في قطعة قماش وكبسها لفصل المصل عنها. ومن ثمّ أُجريت على المصل الناتج معاملة لإزالة البروتينات، وذلك بالمعالجة الحرارية (100°م لمدة 10 دقائق) ومن ثمّ ضبطت درجة الـ pH عند 4.6 (وهي نقطة التعادل الكهربائي لتخثر البروتين)، بإضافة محلول حمض كلور الماء (بتركيز 10

نظامي) قطرة فقطرة مع تبريد المصل إلى درجة حرارة الغرفة، ثم فُصلت البروتينات المترسبة عن محلول المصل بإجراء الطرد المركزي بسرعة 10000 دورة/دقيقة، ثم أخذت المادة الطافية للتحليل (Kitouni and Oulmi, 2013).

2- عينات من مصادر غذائية محلية بهدف عزل بكتريا حمض اللبن منها: جمعت 79 عينة من الأغذية الآتية(مخلل لفت، مخلل خيار، مخلل فليفلة، جبن عكاوي، جبنة شلل، شنكليش، لبن رائب، لبن عيران، لبن مصفى، جبنة شركسية، كشك، حليب بقري، حليب غنم).

3- عينات صدر الدجاج: أخذت من السوق المحلية لمدينة دمشق بواقع 2 كغ من صدر الدجاج بعد الذبح مباشرة، وتم نقلها مبردة في عبوات معقمة إلى المختبر. قطعت عينات صدر الدجاج في شروط معقمة إلى مكعبات بوزن 50 غ تقريباً، غطست عينات صدر الدجاج بمحلول حمض اللبن بتراكيز 1، 2 و3% مدة 10 دقائق، ثم حُفِظَتِ العينات بحرارة 4±1°م مدة 15 يوماً.

2-2- اختبارات مصل الجبن:

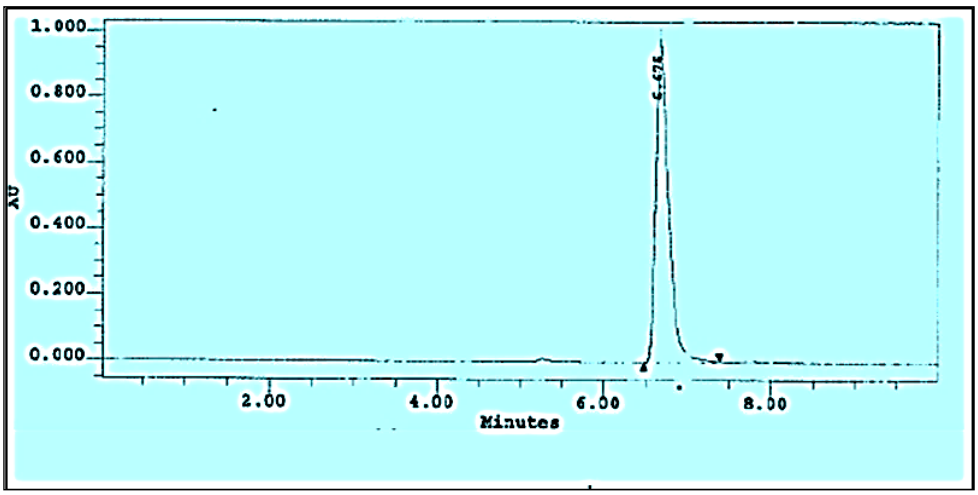
2-2-1- الاختبارات الكيميائية:

حُلل التركيب الكيميائي لمصل الجبن بعد المعاملة الحرارية وإزالة البروتينات، من حيث نسبة المادة الجافة الكلية، نسبة الدسم، نسبة البروتينات الكلية ونسبة الرماد الكلي وفق الطرائق المعتمدة في AOAC (AOAC, 2005).

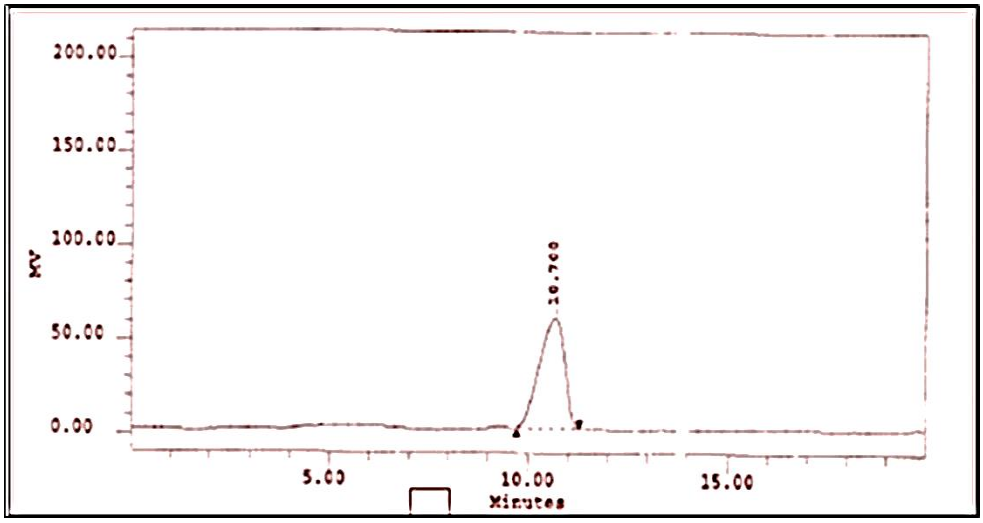
2-2-2- تقدير النسبة المئوية لحمض اللبن واللاكتوز:

قدرت باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC (Shimadzu – Japan) المجهزة بعمود RP C-18 ودرجة حرارته 60°C ومكشاف UV على طول موجة 210 nm وطور حامل من

حمض الكبريت تركيز 5 ميلي مول ومعدل تدفق 0.4 مل/دقيقة. للحصول على ارتفاع الذروة المطلوب، جرى تثفيل العينات عند 5000 دورة في الدقيقة مدة 5 دقائق ثم رُشِّحت من خلال ورق مساميته 0.2 ميكروميتر (filter Whatman)، ثم حقن 10 ميكرولتر من محلول العينة الصافية في جهاز HPLC (Tripathi *et al.*, 2015). في ظل هذه الظروف كان زمن الاحتفاظ لحمض اللبن 6.678 دقيقة (الشكل 6)، وزمن الاحتفاظ للاكتوز 10.7 دقيقة (الشكل 7)، ويظهر الجدول (8) خصائص HPLC وظروف التحليل وخصائصه.



الشكل-6. المخطط الكروماتوغرافي لحمض اللبن (+)L القياسي.



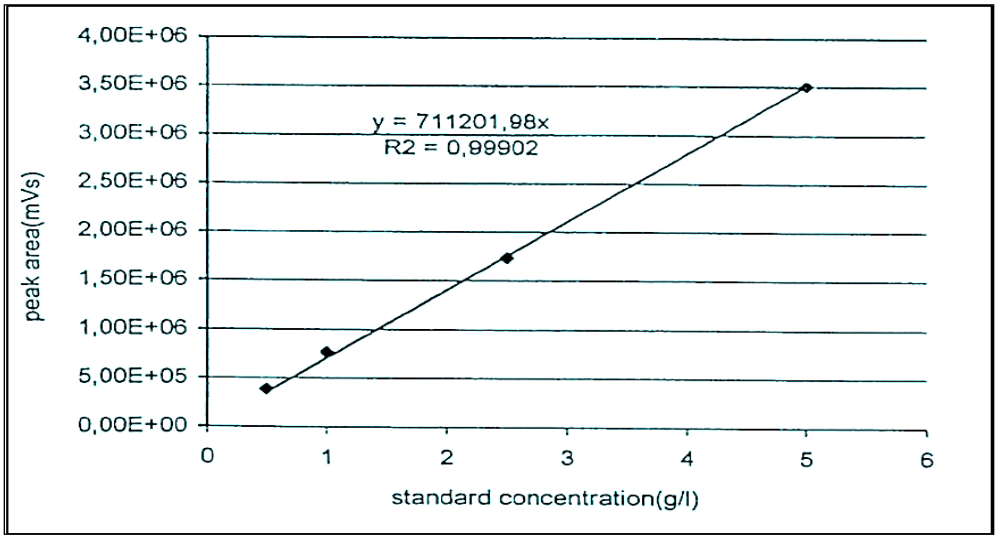
الشكل-7. المخطط الكروماتوغرافي للاكتوز القياسي.

الجدول-8. خصائص HPLC وظروف التحليل وخصائصه.

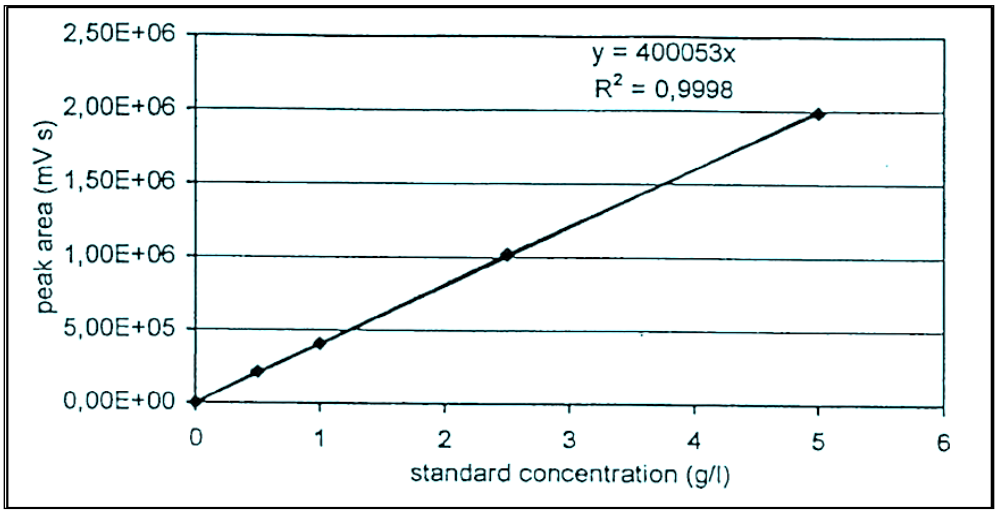
الخصائص	القيم أو الصفات
العمود	RP C-18
طول العمود	150 mm
قطر العمود	4.6 mm
حجم الجسيمات	45 µm
حشوة العمود	Styrene-Divinyl benzene copolymer
المجموعة الوظيفية	Octadecyl
مذيب تنظيف العمود	5% CH3CN in 5mM H2S04, 30% CH3CN in 5mM H2S04
الطور الحامل	حمض الكبريت تركيز 5 ميلي مول
معدل التدفق	0.4 مل/دقيقة
درجة حرارة العمود	ºC60
الكاشف	مكشاف UV على طول موجة 210 nm

تم تحضير محاليل المعايرة (Calibration standards) من المواد الكيميائية ذات الدرجة التحليلية.

تُظهر منحنيات المعايرة في الشكلين(8) و(9) أنّ قيم معامل التحديد (R^2) للاكتوز وحمض اللبن كانت أكبر من 0.999.



الشكل-8. منحنى المعايرة القياسي للاكتوز المستخدم في HPLC.



الشكل-9. منحى المعايرة القياسي لحمض اللبن (+)L المستخدم في HPLC.

2-3- عزل بكتريا حمض اللبن وتشخيصها:

2-3-1- عزل بكتريا حمض اللبن:

عُزلت بكتريا حمض اللبن كروية الشكل على وسط آغار M17 وبكتريا حمض اللبن عصوية الشكل على وسط آغار MRS وأجري اختبارا صبغة غرام والكتالاز على كلتا المجموعتين (Hassanzadazar and Ehsani, 2013).

2-3-2- حفظ عزلات بكتريا حمض اللبن:

حُفظت عزلات بكتيريا حمض اللبن كروية الشكل في وسط سائل مكون من وسط مرق M17 والغليسرول بنسبة 80 إلى 20% بدرجة حرارة -18°C، أما بكتريا حمض اللبن عصوية الشكل فقد حفظت في وسط مكون من مرق MRS والغليسرول بالنسبة السابقة ذاتها وبدرجة الحرارة ذاتها أيضاً (Oskouei *et al.*, 2010).

2-3-3- الاختبارات الشكلية والبيوكيميائية لتشخيص بكتريا حمض اللبن:

أجريت اختبارات صبغة غرام (Benson, 2001) لتمييز البكتريا إيجابية غرام عن البكتريا سلبية غرام ومعرفة شكل الخلية (مكورة، عصوية) تمهيداً لاختيار اختبار API المناسب للتشخيص، كما أجري اختبار الكتالاز للتحقق من أن العزلة تنتمي إلى بكتريا حمض اللبن (Benson, 2001). وأجري اختبار الكتالاز بمزج مستعمرة بكتيرية بعمر(18-24) ساعة، مع قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين 3% على شريحة زجاجية نظيفة، إذ إنّ ظهور الفقاعات دليل على إيجابية الاختبار.

2-3-4- غربلة عزلات بكتريا حمض اللبن لتقييم كفاءتها في إنتاج حمض اللبن:

أجريت عملية الغربلة الأولية لعزلات بكتريا حمض اللبن باستخدام نتائج أمثلة ظروف عملية التخمير لإنتاج حمض اللبن في دراسات سابقة (Ha *et al.*, 2003; Sarkar and Paul, 2019) كالآتي: درجة الحرارة 37°م، درجة الحموضة 5.5، وفترة التحضين 50 ساعة وعدد الدورات في الحاضنة الهزازة 150 دورة في الدقيقة، وحسبت كميات حمض اللبن المنتجة تبعاً للطريقة المتبعة من قبل (Tripathi *et al.*, 2015)، إذ استخدم جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC).

2-3-5- تشخيص العزلات الأكثر كفاءة بالطرائق التقليدية:

أجري تشخيص العزلة الأكثر كفاءة التي تبين أنها تنتمي لبكتريا حمض اللبن عصوية الشكل باستخدام شرائح API 50 CHL وفقاً لتعليمات الشركة الصانعة.

2-3-6- التحقق من تصنيف العزلة المتفوقة باستخدام تقنية RT-PCR:

وذلك باتباع الخطوات الآتية:

1- استخلاص الدنا من بكتريا حمض اللبن المعزولة:

استخلص الدنا من بكتريا حمض اللبن النقية بوساطة طاقم استخلاص الدنا Wizard®Genomic DNA Purification من شركة Promega وفقاً للتعليمات المرفقة من الشركة الصانعة. حددت نقاوة الدنا المستخلص باستخدام جهاز المطياف الضوئي بقياس الامتصاصية على طول موجة 260 و280 وحسبت النقاوة من المعادلة الآتية (Findlay, 2011):

النقاوة = الامتصاصية بطول موجة 260/ الامتصاصية بطول موجة 280

وعدَّ الرقم بين 1.8 و2.1 مقبولاً للتحليل بجهاز RT-PCR.

2- قياس تركيز الدنا وضبط تركيزه:

قيس تركيز الدنا المستخلص وفق المعادلة الآتية (Jain, 2004):

تركيز الدنا = الامتصاصية عند 260 × 50 × معامل التمديد

إذ إنَّ كل 1 درجة امتصاص تعادل 50 ملغ دنا/مل.

ضُبط تركيز الدنا عند 25 بيكومول/ميكرولتر للاستخدام في جهاز RT-PCR.

3- تصميم المرئسات (primers) المستخدمة في تشخيص البكتريا:

صمّمت المرئسات المستخدمة في تشخيص بكتريا حمض اللبن باستخدام جهاز RT-PCR وقاعدة البيانات (NCBI) كما هو مبين في الجدول (9):

الجدول-9. المرئسات المستخدمة في تشخيص بكتريا *Lactobacillus paracasei*.

نوع البكتريا	نوع المرئس	طول المرئس	ترتيب النكليوتيدات في المرئس 5'→3'
Lb. paracasei	أمامي	18	CACCGAGATTCAACATGG
	راجع	24	CCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT

2-4- أمثلة إنتاج حمض اللبن:

2-4-1- انتقاء العزلات:

استخدمت العزلات البكتيرية الأعلى إنتاجاً لحمض اللبن من مصل الجبن، حفظت في مرق (MRS) مع 20% غليسرول(حجم/ حجم) على درجة حرارة -18ºC .

2-4-2- تحضير اللقاح البكتيري:

أجري وفقاً لطريقة (Kitouni and Oulmi, 2013) مع بعض التعديل، وذلك بنقل (1 مل) من بيئة الغليسرول ومرق MRS إلى دورق يحتوي (100 مل) من مرق MRS المعقم، ثم تحضن على درجة حرارة 37ºC مدة 24 ساعة على هزاز دوراني يهتز 200 دورة بالدقيقة، وحضرت منه تخافيف متسلسلة تراوحت بين (10^{-1}–10^{-10})، وسحب 0.1 مل من كل تخفيف ونشر على طبق يحوي وسط (MRS الصلب) بواقع مكررين لكل تخفيف، وحضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مئوية مدة (24–48) ساعة، وبعد انتهاء فترة الحضن حسب عدد الخلايا وحدد التخفيف الذي يعطي عدد خلايا (10^{10} خلية/مل) واعتمد لأخذ اللقاح منه.

2-4-3- تحضير وسط التخمير:

عُقم مصل الجبن المعالج مسبقاً على درجة حرارة 120ºC مدة 15 دقيقة (Sweta and Samir 2016)، وأجريت تجارب الأمثلة باستخدام الخلايا الحرة لبكتريا أكثر العزلات إنتاجاً لحمض اللبن من مصل الجبن في دوارق سعة 250 مل يحتوي على 50 مل من وسط التخمير ولقح بـ 5% من اللقاح السابق (10^{10} خلية/مل)، وبحيث تصبح الكثافة الخلوية (5×10^{8} خلية/مل) في وسط التخمير. وضعت الدوارق على

هزاز دوراني يهتز بسرعات مختلفة وعلى درجة الحرارة المرغوبة وتحت ظروف لاهوائية وفقاً للتصميم التجريبي.

2-4-4- ضبط رقم الحموضة pH:

لتجنب انخفاض الـ pH بسبب إنتاج حمض اللبن يوضع (3 غ لكل 100مل من وسط التخمير) من بودرة كربونات الكالسيوم المعقمة لكل دورق، ويتم الحفاظ على الرقم الهيدروجيني عند القيمة المطلوبة عن طريق إضافة كمية من محلول هيدروكسيد الكالسيوم بتركيز 10مول/اللتر (Altıok *et al.*, 2006).

2-4-5- دراسة أمثلة ظروف وسط التخمير لإنتاج حمض اللبن:

اعتمدت الظروف الأتية تحت ظروف لاهوائية:

1. درجات حرارة التحضين: 27، 32، 37، 42 و47 °م.
2. درجات الحموضة (pH): 4.5، 5، 5.5، 6 و6.5.
3. سرعة التحريك في الحاضنة الهزازة(عدد الدورات بالدقيقة): 50، 100، 150، 200 و250.
4. فترات التحضين: 24، 36، 48، 60 و72 ساعة.

2-4-6- دراسة أمثلة إضافة المغذيات إلى وسط التخمير لإنتاج حمض اللبن:

اعتمدت الظروف الآتية تحت ظروف لاهوائية:

1. مستخلص الخميرة: 5، 10، 15، 20 و25 غ/ل.
2. كبريتات المغنزيوم: 0.1، 0.2، 0.3، 0.4 و0.5 غ/ل.
3. كبريتات المنغنيز: 0.02، 0.04، 0.06، 0.08 و0.1 غ/ل.
4. فوسفات ثنائية البوتاسيوم: 0.5، 1، 1.5، 2 و2.5 غ/ل.

2-4-7- التحليل الإحصائي:

اعتمد تصميم التجارب المتقدم Response Surface Methodology باستخدام برنامج Minitap Optimization Method لدراسة أمثلة كل عامل على حدة وتأثير العوامل المتفاعلة مع بعضها بعضاً.

2-5- طرائق التحليل المتبعة في التقييد:

2-5-1- تحضير اللقاح بغرض التقييد:

اتبعت طريقة (Al-Tayei, 2008) إذ لقح 7 مل من وسط MRS السائل بعروة من الخلايا الحرة للعزلة المختارة(الأكثر إنتاجاً لحمض اللبن من مصل الجبن). وحضن الوسط الملقح بدرجة حرارة 37 مئوية مدة 18 ساعة. وبعد انتهاء مدة التحضين رسبت الخلايا بجهاز الطرد المركزي (5000 دورة/دقيقة) مدة 10 دقائق وغسل الراسب مرتين بـ7 مل من محلول الملح الفيزيولوجي ثم علق الراسب في 5 مل من المحلول نفسه، وحضرت منه تخافيف متسلسلة تراوحت بين (10^{-1} -10^{-10}) وسحب 0.1 مل من كل تخفيف ونشر على طبق يحوي وسط (MRS الصلب) بواقع مكررين لكل تخفيف، وحضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مئوية مدة (48-24ساعة) وبعد انتهاء فترة الحضن حُسب عدد الخلايا وحدد التخفيف الذي يعطي عدد خلايا (120×10^8 خلية/مل) لتجرى عليه عملية التقييد.

2-5-2- تقييد الخلايا الحرة للعزلة الأكثر إنتاجاً لحمض اللبن في هلام ألجينات الكالسيوم (طريقة الحجز التقليدية):

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (El-Gendy *et al.*, 2015)، وأجريت العملية بمزج محلول ألجينات الصوديوم المعقم (4%) مع حجم مماثل من معلق الخلايا الحرة لبكتريا أكثر العزلات إنتاجاً لحمض اللبن

من مصل الجبن الحاوي على عدد خلايا (120×10^8 خلية/مل) لتعطي تركيزاً مقداره 2% من ألجينات الصوديوم بعدد خلايا (60×10^8 خلية/مل) ونقل المزيج إلى محقنة طبية (Syringe) وتم إنزال قطرات المعلق من المحقن بهدوء إلى سطح محلول كلوريد الكالسيوم 2% (المعقم) لتتحول القطرات عند ملامستها لسطح المحلول إلى حبيبات هلامية كروية الشكل من ألجينات الكالسيوم. تركت حبيبات الهلام في المحلول مدة 30 دقيقة لإكمال عملية التصلب. جمعت الحبيبات وعلقت في ماء الببتون بتركيز 0.1% (Peptone water) المعقم وخزنت في البراد لحين الاستعمال، وبلغ تركيز الخلايا المقيدة في ألجينات الكالسيوم (50×10^8 خلية/غ خرزات).

2-5-3- تقدير عدد الخلايا المقيدة في 1 غ خرزات:

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل(Chavarri *et al.*, 2010)، فبعد الانتهاء من تقييد الخلايا وتصلبها فصلت 5 غ حبيبات الهلام وجرى إسالتها بوضعها في 50 مل من محلول سترات الصوديوم المعقم (تركيزه 1% ودرجة حموضة(pH) مقدارها 6) مدة 30 دقيقة وبدرجة حرارة الغرفة مع التحريك المستمر، ثم أجريت عملية طرد مركزي وتم التخلص من الراشح، ثم غسلت الخلايا المترسبة بماء الببتون ثم أجريت عملية طرد مركزي مرة أخرى، ومن ثم علقت الخلايا في 50 مل من ماء الببتون وحسب عددها بطريقة الأطباق المصبوبة (Pouring plate count) ومن ثم حُسب عدد الخلايا المقيدة في 1 غ خرزات.

2-5-4- عملية التخمر وإنتاج حمض اللبن بوساطة الخلايا المقيدة بطريقة الوجبات:

وزع المصل في دوارق مخروطية سعة 100 مل بواقع 25 مل لكل دورق وعقم بدرجة حرارة 121 م° مدة 15 دقيقة. بردت الدوارق إلى حرارة الغرفة ولقحت بكمية من حبيبات هلام ألجينات الكالسيوم المحتوية على بكتريا أكثر العزلات إنتاجاً لحمض اللبن من مصل الجبن المقيدة، بمعدل 10 غ خرزات لكل 100 مل من وسط التخمير، وبحيث يصبح تركيز الخلايا المضافة إلى المصل يعادل (5×10^8 خلية/مل). ثم طبقت

الظروف المثلى لعملية التخمير وإضافة المغذيات المثلى تحت ظروف لاهوائية، وبعد انتهاء التخمر أجريت عملية طرد مركزي بسرعة 4000 دورة مدة 10 دقائق، ثم قُدِّر حمض اللبن في راشح المزرعة.

2-5-5- تقدير وزن الكتلة الحيوية:

يؤخذ 20 مل من وسط التخمير وتثقل 10000 د/د مدة 10 د على درجة حرارة 4 °م، ويؤخذ الراسب ويغسل بمحلول ملحي تركيز (0.8%) ويجفف على درجة 90 °م مدة 24 ساعة بفرن التجفيف (Tripathi *et al.*, 2015).

2-6- تعريفات شروط تقييم التخمير:

1- الإنتاجية (Productivity):

الإنتاجية هي كمية المنتج الذي يُنتج في كل مرة ولكل حجم.

$$\text{Productivity} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i}$$

حيث P_f: تركيز حمض اللبن المنتج في نهاية عملية التخمير.

P_i: تركيز حمض اللبن المنتج في بداية عملية التخمير.

t_f: الزمن في نهاية عملية التخمير.

t_i: الزمن في بداية عملية التخمير.

2- تحويل الركيزة (Substrate conversion):

هي كمية الركيزة المستخدمة وتمثل الفرق بين تركيز الركيزة النهائي وتركيز الركيزة الأولي مقسوماً على تركيز الركيزة الأولي.

$$\text{substrate conversion} = -\frac{\Delta S}{S_0}$$

حيث ΔS: الفرق بين تركيز الركيزة الأولي وتركيز الركيزة النهائي.

S_0 : تركيز الركيزة الأولي.

3- عائد المنتج (Product yield):

هو كمية المنتج التي تُنتج مقسومة على الركيزة المستخدمة.

$$Y_{P/S} = -\frac{\Delta P}{\Delta S}$$

حيث ΔP : الفرق بين تركيز حمض اللبن المنتج في بداية عملية التخمير وتركيز حمض اللبن المنتج في نهاية عملية التخمير. وحيث ΔS: الفرق بين تركيز الركيزة الأولي وتركيز الركيزة النهائي.

4- عائد النمو (Growth yield):

هو مقدار الكتلة الحيوية المنتجة مقسوماً على كمية الركيزة المستخدمة.

$$Y_{X/S} = -\frac{\Delta X}{\Delta S}$$

حيث حيث ΔX: الفرق بين تركيز الكتلة الحيوية الجافة الأولي وتركيز الكتلة الحيوية الجافة النهائي.

حيث ΔS: الفرق بين تركيز الركيزة الأولي وتركيز الركيزة النهائي.

5- أقصى معدل نمو (Maximum specific growth rate)μmax:

هو توصيف معدل نمو الميكروبات ويتم تعريفه على أنه:

$$\mu max = \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1}$$

X_2 : تركيز الكتلة الحيوية الجافة في نهاية عملية التخمير.

X_1 : تركيز الكتلة الحيوية الجافة في نهاية عملية التخمير.

t_2: الزمن في نهاية عملية التخمير.

t_1: الزمن في بداية عملية التخمير.

2-7- طريقة التخمير في المخمر:

2-7-1- وصف المخمر:

استخدم المخمر BIOTECH-4 GPR-5 متعدد الأوعية، ويتألف من أربع حجرات للتخمير إذ يتم التخمير في كل حجرة بشكل منفصل عن الأخرى. الحجرات الأربع موصولة مع لوحة تحكم ومراقبة إلكترونية تتحكم بدرجة حرارة الوسط وحموضته وسرعة تحريكه وهوائيته والرغوة المتشكلة. حجرة التخمير هي عبارة عن حجرة زجاجية أسطوانية سعة 1 ليتر، ومزودة بمحرك كهربائي وغطاء معدني محكم الإغلاق تخرج منه مآخذ (إلكترودات) لقياس درجة الحرارة وحموضة الوسط والرغوة المتشكلة، كما تخرج من الغطاء أنابيب مطاطية لأخذ عينات من الحجرة في أثناء التخمير وفتحة محكمة الإغلاق لإضافة البادئ.

2-7-2- وصف آلية عمل المخمر وضبطه:

أجريت عمليات التخمير في المخمر بحجم عمل قدره 1 لتر. جرى تنظيف المفاعل الحيوي وتجميعه وتجهيزه بمجسات معايرة مسبقاً. وجرى تحضير وسط التخمير(مصل الجبن) وتعقيمه، ومن ثم نُقل إلى المفاعل الحيوي وأضيف إليه اللقاح. لقحت بكمية من حبيبات هلام ألجينات الكالسيوم المحتوية على بكتريا أكثر العزلات إنتاجاً لحمض اللبن من مصل الجبن المقيدة، بحيث كان تركيز الخلايا المقيدة المضافة إلى المصل يعادل (5×10^8 خلية/مل)، وجرى تطبيق نتائج أمثلة ظروف عملية التخمير (درجة حرارة التحضين ودرجة الحموضة وفترة التحضين وسرعة التدوير المثالية في الحاضنة الهزازة. ونتائج أمثلة إضافة المغذيات إلى وسط التخمير (مستخلص الخميرة، فوسفات ثنائية البوتاسيوم، كبريتات المغنزيوم، كبريتات المنغنيز) وذلك في ظروف لاهوائية(إذ لم يتم تشغيل مضخة الهواء). تم الحفاظ على الرقم الهيدروجيني عند درجة الحموضة المثلى من خلال الجرعات التلقائية لمحلول هيدروكسيد الكالسيوم 10 مول/اللتر بهدف الحفاظ على نسبة حمض اللبن الحر في وسط النمو أقل من 0.6%، كما أن تعديل حموضة وسط النمو يقصر

زمن التخمير ويزيد نسبة الناتج النهائي لحمض اللبن، إذ يتم تخليط الوسط بشكل جيد عند إضافة هيدروكسيد الكالسيوم.

2-8- اختبارات فصل حمض اللبن وتنقيته :

2-8-1- الترويق (Clarification):

استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل (Vijayakumar *et al.*, 2008) إذ ضبطت درجة الحموضة(pH) لوسط التخمير إلى 10 باستخدام هيدروكسيد الكالسيومN1 ثم سخن وسط التخمير إلى درجة 80 Cº مدة 15 دقيقة، أعقبته عملية نبذ مركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة مدة 10 دقائق، وبعد أن أهمل الراسب عدلت درجة الحموضة(pH) في الراشح إلى 6.5-7.0، يمثل الراشح الموصوف أعلاه المستخلص المروق (Clarified extract).

2-8-2- فصل حمض اللبن واستعادته من لاكتات الكالسيوم في المستخلص المروق:

استخدمت طريقة الترسيب الموصوفة من قبل (Min *et al.*, 2011) وتمت وفق المعاملات الآتية:

- النسبة المولية $Ca(LA)_2/H_2SO_4$ هي 1:1.
- درجة pH خلال عملية الترسيب 6.83.
- يمكن تسهيل عملية الترسيب بإضافة حمض الكبريت إلى محلول لاكتات الكالسيوم (المستخلص المروق) مع الخلط حتى 220 دورة في الدقيقة، إذ يؤدي الخلط إلى تفتيت كتلة راسب كبريتات الكالسيوم إلى قطع أصغر.
- أضيفت كمية حمض الكبريت كنسبة 100% من مجموع حمض الكبريت في بداية التفاعل.

2-8-3- إزالة الصباغ:

استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل (Min *et al.*, 2011) لإزالة الصبغة (اللون) من حمض اللبن المستخرج من مرق التخمير، وأجريت المعالجة بالكربون المنشط إذ أضيفت تسعة جرامات لكل لتر من الراشح الطافي وتم تقليبه في حاضنة هزازة مدة 30 دقيقة عند 220 دورة في الدقيقة و25 درجة مئوية.

2-8-4- تركيز حمض اللبن:

للحصول على تركيز عالٍ من حمض اللبن استخدمت طريقة (Min *et al.*, 2011) باستخدام جهاز التقطير المرتد، إذ عُرِّض 100 ميليلتر من الراشح الطافي لعملية تركيز عند 760 مم زئبقي عند درجة حرارة تبلغ 90Cº مدة 100 دقيقة.

2-9- اختبارات حمض اللبن:

أجريت الاختبارات الآتية بحسب المواصفة القياسية السورية لحمض اللبن 2715 لعام 2002:

- تقدير نقاوة حمض اللبن: يوزن بدقة 3 غ من حمض اللبن وينقل إلى دورق حجمي سعته 250 مل، يضاف إليه 50 مل من محلول ماءات الصوديوم 1 نظامي ويخلط ثم يعرض للغليان مدة 20 دقيقة، ثم يضاف كاشف الفينول فتالين ويعاير المحلول القلوي الحار بوساطة السحاحة مع حمض الكبريت 1نظامي. تكرر العملية على المحلول الصودي من دون استخدام العينة، ويمثل الفرق بين المعايرتين كمية حمض الكبريت التي تكافىء ماءات الصوديوم المتفاعلة مع حمض اللبن بحيث كل 1 مل من ماءات الصوديوم 1 نظامي يكافىء 9.08 ملغ من حمض اللبن.
- تقدير الزرنيخ: يتم تقدير الزرنيخ بحسب الطريقة المذكورة في المواصفة القياسية السورية (المضافات الغذائية – كربونات الكالسيوم) رقم 2581.

- تقدير الكلور: يوزن بدقة 5 غ من العينة ويذاب في 50 مل من الماء ويعادل باستعمال محلول ماءات الصوديوم (1:4). يضاف 2 مل من كاشف كرومات البوتاسيوم إلى محلول الاختبار ويعاير بوساطة السحاحة وبوجود ورقة عباد الشمس مع نترات الفضة AgNO3 (0.1 نظامي) وذلك حتى أول ظهور اللون الأحمر الآجري. كل 1 مل من نترات الفضة 0.1 نظامي يعادل 3.545 ملغ من الكلور.
- حمض الليمون أو الأوكزاليك أو الفوسفور أو الطرطير: يمدد 1 غ من العينة بوساطة 10 مل من الماء ويضاف 40 مل من محلول ماءات الكالسيوم (0.3%)، ثم يغلى المزيج مدة دقيقتين. يشترط ألا تظهر أية عكارة في المزيج.
- تقدير البقايا بعد الحرق: يبخر 2 غ من الحمض حتى الجفاف بالتسخين الهادىء ومن دون غليان ثم يبرد ويحرق في حرارة 800 °م مدة دقيقة ويبرد في المجفف ويوزن.
- الكشف عن السكريات: تضاف 5 قطرات من الحمض إلى 10 مل من طرطرات النحاس القلوية الحارة، إذ يشترط عدم تكون رواسب حمراء.
- تقدير الكبريت: يوزن 50 غ من العينة بدقة ويذاب في 200 مل ماء مع تعديل درجة pH ويرشح، وتسخن الرشاحة حتى الغليان، ثم يضاف 10 مل من محلول كلور الباريوم ويحرك بقوة ويغلى المزيج بهدوء مدة 5 دقائق ويترك مدة ساعتين على الأقل، وتجمع رواسب كبريتات الباريوم في جفنة ثم تغسل الرواسب من الكلور جيداً حتى تصبح خالية منها، ثم تجفف الرواسب وتحرق عند درجة حرارة 600 °م، ثم يتم الحساب على أساس وزن الكبريتات في العينة يساوي وزن كبريتات الباريوم المستحصل عليها مضروباً في الثابت 0.412.
- تقدير الحديد: يضاف 2 مل من حمض كلور الماء الممدد بنسبة (1:2) إلى الرماد الناتج من فحص البقايا بعد الحرق ويبخر الحمض على حمام بخاري حتى الجفاف. تذاب البقايا بعد الحرق في 1 مل

من حمض كلور الماء (الممدد بنسبة 2:1) ويمدد المزيج بالماء حتى (40) مل، ثم يضاف (40) ملغ تقريباً من بلورات بيروكبريتات الأمونيوم و(10) مل من تيوسيانات الأمونيوم (تركيزه1 نظامي). يقارن اللون الأحمر أو الوردي مع مثيله الناتج عن محلول الحديد القياسي الذي يحتوي (20) مل مكافىء حديد في حجم مماثل للمحلول الذي يحتوي الكميات المستعملة نفسها من الكواشف في الاختبار.

- المعادن الثقيلة محسوبة كـ (pb): تُقدَّر المعادن الثقيلة بحسب الطريقة المذكورة في المواصفة القياسية السورية (المضافات الغذائية – كربونات الكالسيوم) رقم (2581).
- تقدير الكالسيوم: تم تقديره باستخدام جهاز Flame photometer بحسب تعليمات الشركة الصانعة.

2-10- اختبارات حفظ لحم صدر الدجاج خلال التخزين المبرد:

2-10-1- المعاملة بحمض اللبن:

قسمت العينات إلى أربع مجموعات متساوية؛ إذ بقيت المجموعة الأولى من دون معاملة كعينة شاهد، وغطست المجموعات الثانية والثالثة والرابعة بحمض اللبن بتراكيز 1، 2 و3% على التوالي مدة 10 دقائق، وصفيت قطع الدجاج من الحمض لضمان إزالة ما تبقى منه، ووزعت العينات ضمن أكياس من البولي إيثلين مع إغلاقه يدوياً. حُفِظَتِ العينات جميعها في البراد بحرارة 4±1°م مدة 15 يوماً، وأجريت التحاليل الميكروبية والكيميائية والحسية للعينات خلال مدد التخزين 0، 3، 6، 9، 12 و15 يوماً.

ويبين الجدول (10) المعاملات المطبقة على عينات صدر الدجاج الطازج.

الجدول-10. المعاملات المطبقة على صدر الدجاج.

رقم المعاملة	طبيعة المعاملة
0	شاهد غير معامل بالحمض
1	عينة معاملة بحمض اللبن بتركيز 1% مدة 10 دقائق.
2	عينة معاملة بحمض اللبن بتركيز 2% مدة 10 دقائق.
3	عينة معاملة بحمض اللبن بتركيز 3% مدة 10 دقائق.

2-10-2- الاختبارات الميكروبيولوجية:

أجريت وفق الطرائق المعتمدة في (AOAC, 2005)، واستخدمت أوساط من إنتاج شركة HIMEDIA وعُبّرت عن النتائج بـ(log(CFU/g:

1. أجري العد الكلي للبكتريا الهوائية أليفة الحرارة المتوسطة: باستخدام وسط آغار العد في الأطباق Plate Count Agar (PCA)، والتحضين عند درجة حرارة 37°C مدة 48 ساعة.
2. الخمائر والفطور: باستخدام بيئة Potato Dextrose Agar (PDA)، والتحضين عند درجة حرارة 25°C مدة 5 أيام.
3. مجموعة الكوليفورم: باستخدام بيئة Violent Red Bile Agar (VRB)، والتحضين عند درجة حرارة 37°C مدة 24 ساعة
4. الكشف عن بكتيريا السالمونيلا: بالإغناء الأولي على وسط Selenite Cystine broth، ثم التخطيط على وسط Agar *Salmonella–Shigella* (SSA)، والتحضين عند درجة حرارة 37°C مدة 24 ساعة، إذ تكون المستعمرات النموذجية شفافة ذات مركز أسود.
5. الكشف عن بكتريا *Pseudomonas*: باستخدام وسط آغار ستريميد Cetrimide Agar، والتحضين عند درجة حرارة 25°C مدة 48 ساعة.

2-10-3- الاختبارات الكيميائية:

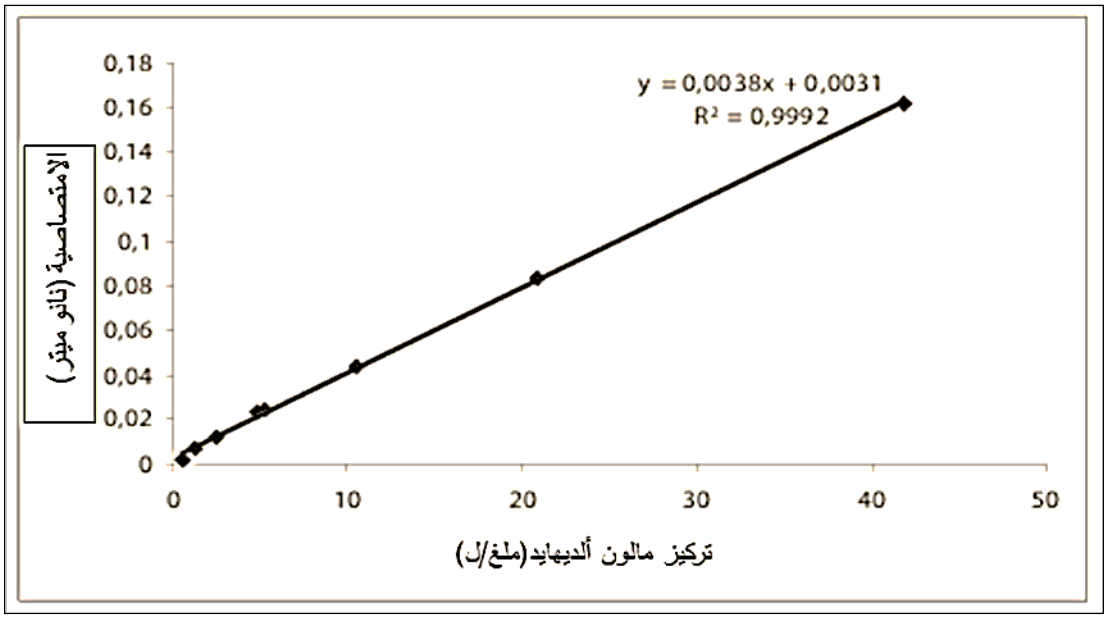
1- درجة الحموضة:

قيست درجة الحموضة وفقاً لطريقة (Sallam and Samejima, 2004) خلال مدة التخزين 0، 3، 6، 9، 12 و15 يوماً. وذلك باستخدام مقياس رقم الـ pH، إذ أخذ 10 غ لحم من كل عينة وخلطت مع 50 مل ماء مقطر في خلاط كهربائي مدة 30 ثانية، رُشح المزيج ثم قيست درجة الـ pH للراشح الناتج.

2- رقم حمض ثيوباربيتيوريك (TBA):

قدر وفقاً لطريقة Schmedes وHolmer (1989)، وذلك بأخذ 10 غ من عينة لحم الدجاج المطحون وخلطها مع 25 مل من محلول ثلاثي كلور حمض الخل بشكل جيد مدة 30 ثانية. رُشح المزيج وأضيف 2 مل من الراشح إلى حجم مساوٍ من محلول TBA (3 غ/ل) في أنبوب اختبار وحُضن المزيج في الظلام بدرجة حرارة الغرفة مدة 20 ساعة. إذ تعتمد هذه الطريقة على تفاعل مالون ألديهايد (الناتج المميز لحدوث الأكسدة) مع حمض ثيوباربيتيوريك (TBA) وهذا التفاعل يجري في وسط حامضي ويكون ناتجاً ملوناً وتقاس شدة امتصاصيته باستخدام المطياف الضوئي بطول موجة 532 نانومتر (نموذج Anthelie Junior، صنع شركة Secomam- فرنسا). وحضر منحني قياسي من المالون ألديهايد (0-50) ملغ/ل (الشكل 10)، عُبِّرَ عن قيمة TBA بشكل ملغ مالون ألديهايد/كغ لحم.

يعطي هذا المؤشر فكرة عن درجة أكسدة اللبيدات وتحديداً الأحماض الدهنية غير المشبعة (Gheisari, 2011)، وترتفع قيمة هذا المؤشر بزيادة مدة التخزين (Tomankovaet *et al.*, 2012).



الشكل-10. المنحنى القياسي للمالون ألديهايد.

2-10-4- الاختبارات الحسية:

قيمت المواصفات الحسية التي تضمنت (اللون، الرائحة والقوام) للعينات بوساطة لجنة مكونة من 7 أشخاص مدربين لإجراء الفحوص الحسية واستخدمت طريقة Hedonic Scale، وأعطيت كل صفة من الصفات الحسية درجة من 1-5 (Lawless and Heymann, 1995).

2-10-5- التحليل الإحصائي:

حُسبت المتوسطات الحسابية والانحرافات المعيارية والفروق المعنوية بينها على مستوى 5% باستخدام برنامج SPSS النسخة 19.

2-11- تحديد نوع المماكب من حمض اللبن المنقى بطريقة (TLC) كروماتوغرفيا الطبقة الرقيقة:

استُخدم هذا النوع من الكروماتوغرافيا لمعرفة نوع النظير الضوئي لحمض اللبن (L أو D).

المواد والمحاليل المستخدمة (Sajewicz *et al.*, 2008):

- 90% دايوكسان Dioxane: حضر هذا المحلول بإضافة 10 مل من الماء المقطر إلى 90 مل من الدايوكسان.
- محلول الإظهار: حضر هذا المحلول بإذابة 0.1 غ من كاشف (Bromocresol green) في500 مل من الإيثانول وبعد إتمام الإذابة أضيف 9 مل من محلول (0.1 ع) هيدروكسيد الصوديوم.
- صفيحة سليكا بأبعاد (20×20 سم).
- حوض ترحيل (Tank).

حملت الصفيحة بـ 3 ميكرولتر من حمض اللبن المنقى من وسط التخمير في هذه الدراسة وكذلك بنموذج من حمض اللبن القياسي (L- lactic acid). إذ تم تحميل النماذج المذكورة على خط موازٍ للحافة السفلى للصفيحة ويبعد عنها مسافة 2 سم، أما المسافة بين النماذج والحواف الجانبية للصفيحة وكذلك بين النموذج وآخر فكانت 2 سم أيضاً. وضعت الصفيحة بعد ذلك في حوض الترحيل الحاوي على محلول 90% دايوكسان، وتمت مراقبة قمة سريان المذيب وأوقفت عملية الفصل عند وصول المذيب إلى مسافة تبعد 1 سم عن الحافة العليا للصفيحة، إذ أخرجت الصفيحة وتركت لتجف في جو الغرفة ورُشّت الصفيحة برذاذ من الكاشف وبعد جفافها تماماً حددت مواقع البقع المفصولة وقيست المسافة التي قطعتها البقعة وكذلك المسافة التي تحركها المذيب لحساب قيمة الحركة النسبية (Rf) كما يأتي:

Rf = المسافة التي قطعتها البقعة / المسافة التي قطعها المذيب

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

3- النتائج والمناقشة RESULTS AND DISCUSSION:

3-1- نتائج تحليل مصل الجبن بعد المعاملة الحرارية وإزالة البروتينات:

حُلّل التركيب الكيميائي لمصل الجبن بعد المعاملة الحرارية لإزالة البروتينات، من حيث نسبة المادة الجافة الكلية، نسبة الدسم، نسبة البروتينات الكلية، نسبة الرماد الكلي ونسبة اللاكتوز بواقع ثلاثة مكررات لكل قرينة وسُجلت النتيجة بشكل متوسطات حسابية ± الانحراف المعياري، وكانت النتائج كما هو مبين في الجدول (11).

الجدول-11. نتائج التركيب الكيميائي لمصل الجبن (بعد المعاملة الحرارية وإزالة البروتينات).

القرينة	القيمة
المادة الجافة الكلية (%)	*0.21±5.70
المواد الدسمة (%)	0.03±0.42
البروتينات (%)	0.04±0.4
الرماد الكلي (%)	0.01±0.37
اللاكتوز (%)	0.12±4.5
الحموضة مقدرة على أساس حمض اللبن (%)	0.01±0.14
درجة الـ pH	0.11±4.6
*** المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري لثلاثة مكررات**	

يلاحظ من الجدول السابق أن نسب اللاكتوز والرماد المسجلة في البحث الحالي (4.5 و0.37%، على التوالي) كانت أقل من النسب المسجلة من قبل M'hir وآخرين (2019) (5.4 و0.7%، على التوالي) وكذلك النسب المسجلة من قبل Zadow (1994) و Smithers وآخرين (1996) (4.9 و0.5%، على التوالي)، في حين كانت نسبة الدهن المسجلة في البحث الحالي (0.42%) أعلى من تلك المسجلة من قبل

M'hir وآخرين (2019) (0.26%) وأعلى كذلك من تلك المسجلة من قبل Zadow (1994) و Smithers وآخرين (1996) (0.1%)، في حين كانت درجة الـ pH المسجلة في البحث الحالي (4.6) أقل من تلك المسجلة في البحث السابق (M'hir et al., 2019) (6.4). وكانت نسبة البروتين المسجلة في البحث الحالي (0.4%) أقل من تلك المسجلة من قبل M'hir وآخرين (2019) (2.5%) وكذلك أقل من تلك المسجلة من قبل Zadow (1994) و Smithers وآخرين (1996) (0.7%). قد يعود الاختلاف إلى أن تركيب مصل الجبن يعتمد على أصل الحليب وأنواع الجبن المصنعة (التخثر بالمنفحة أو التخثر الحمضي)، وبصورة عامة، على العوامل التي تؤثر في تكوين الحليب مثل السلالة، الدورات الموسمية، والأعلاف، ومرحلة الإرضاع.

3-2- نتائج عزل بكتريا حمض اللبن والاختبارات البيوكيميائية:

عُزلت بكتريا حمض اللبن من أغذية متنوعة باستخدام وسطي آغار M17 لعزل بكتريا حمض اللبن الكروية الشكل، ووسط آغار MRS لعزل بكتريا حمض اللبن عصوية الشكل، وذلك بتخطيط حمولة حلقة التلقيح على أطباق الآغار من الوسط السائل أو من التمديدات 10^{-1} وحتى 10^{-3} في الماء المقطر والمعقم بالنسبة للأغذية الصلبة، وكانت النتائج، كما هو مبين في الجدول (12).

الجدول–12. العينات الغذائية المستخدمة في عزل بكتريا حمض اللبن وأعداد ورموز وشكل العزلات إيجابية غرام وسلبية الكتالاز.

العينة	عدد العينات	عدد العزلات	عدد العزلات G^+، C^-(*)	رمز العزلات المنتخبة وشكلها	
				عصوية	كروية
مخلل لفت	6	4	4	P1-P2	P3-P4
مخلل خيار	5	3	3	P7	P5-P6
مخلل فليفلة	3	2	2	-	P8-P9
جبن عكاوي	9	9	9	C7-C1	C2-C3-C4-C5-C6-C8-C9
جبنة شلل	7	6	6	CH3	CH1-CH2- CH4-CH5-CH6
شنكليش	5	4	4	SH4	SH1-SH2-SH3
لبن رائب	5	5	5	Y1-Y2	Y3-Y4-Y5
لبن رائب	4	4	4	Y7	Y6- Y8-Y9
لبن عيران	5	4	4	-	A1-A2-A3-A4
لبن مصفى	6	5	3	YN1	YN2-YN3
جبنة شركسية	3	-	-	-	-
كشك	8	7	7	K6	K1-K2-K3-K4-K5- K7
حليب بقري	8	6	4	M3-M4	M1-M2
حليب غنم	5	5	5	ME1-ME2-ME3-ME4	ME5
المجموع	79	64	60	18	42
النسبة المئوية للعزلات كروية وعصوية الشكل (%)				30	70
(*) G^+: إيجابية غرام، C^-: سلبية الكاتلاز					

يلاحظ من الجدول (14) أن بكتريا حمض اللبن المعزولة من الأغذية(موجبة غرام وسلبية الكتالاز) كانت عبارة عن بكتريا كروية الشكل 70%، في حين كانت السلالات عصوية الشكل أقل تكراراً بنسبة 30%. احتوت أغلب الأغذية المدروسة على كلتا المجموعتين من بكتريا حمض اللبن الكروية والعصوية، ولم تحتوي الجبنة الشركسية (المصنوعة بالتخثير الحامضي للحليب بإضافة عامل تحميض كحمض الليمون أو

مصل اللبن والغلي) على بكتريا حمض اللبن الكروية أو العصوية، في حين احتوت بعض الأغذية على بكتريا حمض اللبن الكروية ولم تحتو على بكتريا حمض اللبن العصوية مثل مخلل الفليفلة، واحتوت فقط على بكتريا حمض اللبن العصوية.

3-3- نتائج غربلة العزلات لتحديد السلالة الأكثر إنتاجاً لحمض اللبن:

استخدمت النتائج التي تم التوصل إليها في دراسات سابقة (Ha *et al.*, 2003; Sarkar and Paul, 2019) وهي درجة حرارة التحضين 37 °م، مدة التخمير 50 ساعة، درجة حموضة وسط التخمير pH = 5.5 وسرعة دوران الحاضنة الهزازة 150 دورة/دقيقة، وذلك لتحديد العزلة الأكثر إنتاجاً لحمض اللبن، وكانت النتائج كما هو موضح في الجدول (13).

الجدول-13. متوسط إنتاج حمض اللبن بوساطة عزلات بكتريا حمض اللبن باستخدام مصل الجبن كوسط تخمير.

رمز العزلة	كمية حمض اللبن (غ/ل)	رمز العزلة	كمية حمض اللبن (غ/ل)
P1	18.65	Y3	25.68
P2	17.34	Y4	24.32
P3	15.44	Y5	26.55
P4	13.33	Y6	20.74
P5	14.22	Y7	28.12
P6	16.55	Y8	20.23
P7	17.44	Y9	19.55
P8	18.33	A1	22.97
P9	18.65	A2	25.66
C1	20.45	A3	23.54
C2	19.22	A4	24.64

18.78	YN1	21.44	C3
20.73	YN2	22.66	C4
26.32	YN3	19.84	C5
18.48	K1	23.12	C6
18.65	K2	15.65	C7
19.78	K3	18.77	C8
19.66	K4	19.18	C9
23.55	K5	23.42	CH1
25.66	K6	24.65	CH2
26.77	K7	19.33	CH3
21.55	M1	20.44	CH4
23.98	M2	25.43	CH5
21.25	M3	23.25	CH6
23.66	M4	26.33	SH1
24.55	ME1	20.12	SH2
26.11	ME2	23.36	SH3
24.55	ME3	19.76	SH4
19.18	ME4	23.66	Y1
20.16	ME5	24.53	Y2

يلاحظ من الجدول السابق أن العزلة Y7 هي العزلة الأكثر إنتاجاً لحمض اللبن، إذ أنتجت هذه العزلة 28.12 غ/ل من حمض اللبن، وكانت هذه العزلة المتفوقة (Y7) هي عبارة عن بكتريا عصوية الشكل إيجابية غرام سلبية الكاتلاز لذلك استخدم نظام API 50 CHL في تشخيصها، ثم استخدمت تقانة RT-PCR للتحقق من صحة التشخيص.

3-4- تشخيص العزلة المتفوقة Y7 باستخدام نظام API 50 CHL:

استخدم نظام API 50 CHL في تشخيص العزلة Y7 كونها تنتمي إلى البكتريا عصوية الشكل إيجابية غرام سلبية الكتالاز وفقاً لتعليمات الشركة الصانعة، وكانت نتائج الاختبارات البيوكيميائية لهذه العزلة كما هو مبين في الشكل (11) والجدول(14).

الشكل-11. نتائج اختبارات API 50 CHL للعزلة Y7 المتفوقة.

الجدول-14. نتائج اختبارات نظام API 50 CHL لتشخيص العزلة Y7 المتفوقة في إنتاج حمض اللبن.

الاختبار	النتيجة	الاختبار	النتيجة
0	-(*)	SAL	+
GLY	-	CEL	+
ERY	-	MAL	+
DARA	-	LAC	+
LARA	-	MEL	-
RIB	+(*)	SAC	+
DXYL	-	TRE	+
LXYL	-	INU	-
ADO	+	MLZ	+
MDX	-	RAF	-
GAL	+	AMD	-
GLU	+	GLYG	-
FRU	+	XLT	-
MNE	+	GEN	+
SBE	+	TUR	+
RHA	-	LYX	-
DUL	+	TAG	+
INO	-	DFUC	-
MAN	+	LFUC	-
SOR	+	DARL	-
MDM	-	LARL	+
MDG	-	GNT	+
NAG	+	2KG	-
AMY	+	5KG	-
ARB	+	SAL	+
ESC	+	CEL	+

(*) + اختبار إيجابي، – اختبار سلبي

استخدم برنامج APIweb لتحديد العزلة Y7 وذلك بإدخال نتائج الاختبارات السابقة، وحُدّدت العزلة على أنها من النوع *Lactobacillus paracasei*.

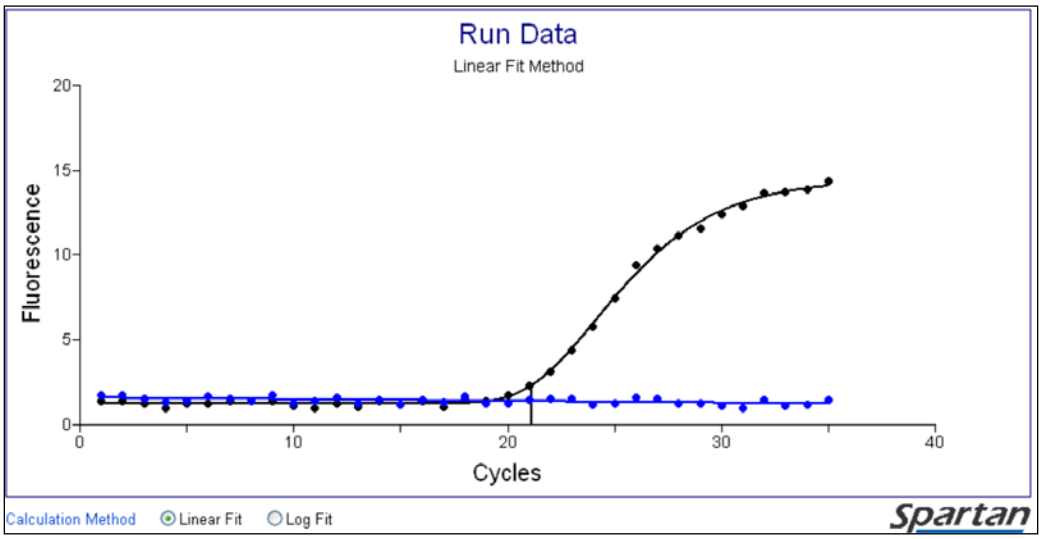
3-5- تشخيص العزلة المتفوقة Y7 باستخدام تقنية RT-PCR:

استخدمت تقنية تفاعل البوليميراز التسلسلي في الزمن الحقيقي (RT-PCR) للتحقق من تشخيص العزلة Y7 وذلك باستخدام المرئسات المبينة في فقرة مواد البحث وطرائقه ، لمعرفة قيمة الدورة الحدية (CT) وللتحقق من ارتباط المرئسات بشكل صحيح من خلال قياس درجة انصهار الشدفة الناتجة، وكانت نتيجة اختبار RT-PCR كما هو مبين في الجدول (15)، إذ تم التحقق من كون العزلة Y7 تنتمي للنوع *Lactobacillus paracasei* (Findlay, 2011).

الجدول-15. نتائج اختبار RT-PCR للعزلة Y7.

النوع	قيمة الدورة الحدية C_T	قيمة درجة انصهار الشدفة الناتجة
Lactobacillus paracasei	21	74.4

ويبين الشكل (12) منحني التألق لبكتريا *Lb.paracasei* (Ct = 21).



الشكل-12. منحني التألق لبكتريا *Lb.paracasei* (Ct = 21).

3-6- أمثلة ظروف عملية التخمير لإنتاج حمض اللبن:

3-6-1- التحليل الإحصائي لنتائج أمثلة ظروف عملية التخمير:

وضع التصميم الإحصائي المشار إليه في الجدول (16) باستخدام البرنامج الإحصائي Minitap الذي يعبر عن المتغيرات والتجارب التي أجريت وعددها 30 مع مكرراتها لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن باستخدام بكتريا *Lactobacillus paracasei* المعزولة محلياً.

الجدول-16. نتائج تجارب التصميم الإحصائي لأمثلة ظروف عملية التخمير.

القطاعات	درجة الحرارة (°م)	pH	سرعة الدوران (د)	مدة التحضين (ساعة)	تركيز حمض اللبن (غ/ل)
1	42	5	100	36	28.18
1	32	6	100	36	28.61
1	32	5	200	36	28.75
1	42	6	200	36	28.21
1	32	5	100	60	29.83
1	42	6	100	60	29.45
1	42	5	200	60	29.59
1	32	6	200	60	29.61
1	37	5.5	150	48	32.5
1	37	5.5	150	48	32.55
2	32	5	100	36	28.51
2	42	6	100	36	28.13
2	42	5	200	36	28.03
2	32	6	200	36	27.91
2	42	5	100	60	29.78
2	32	6	100	60	29.18
2	32	5	200	60	29.62
2	42	6	200	60	29.71
2	37	5.5	150	48	32.53
2	37	5.5	150	48	32.67
3	27	5.5	150	48	28.38
3	47	5.5	150	48	26.16
3	37	4.5	150	48	31.03
3	37	6.5	150	48	31.21

31.19	48	50	5.5	37	3
32.07	48	250	5.5	37	3
30.41	24	150	5.5	37	3
31.41	72	150	5.5	37	3
32.48	48	150	5.5	37	3

يبين الجدول (17) تأثير العوامل المدروسة (كل عامل لمفرده، ومربع العوامل والتفاعل المتبادل بين العوامل) في إنتاج حمض اللبن كما يأتي:

- التأثير الخطي (Linear effect): تأثير كل عامل مفرد في إنتاج حمض اللبن، نلاحظ من الجدول (17) أنَّ هناك تأثيراً خطياً معنوياً لمدة التحضين فقط، إذ كانت ($P<0.05$)، أما بقية العوامل (درجة حرارة التحضين، درجة الحموضة pH وسرعة الدوران في الدقيقة) لم يكن لها تأثير معنوي في إنتاج حمض اللبن، إذ كانت قيمة P لكل منها أكبر من 0.05 ($0.05<P$).
- تأثير مربع العوامل (Squares effect) في إنتاج حمض اللبن: نلاحظ من الجدول (17) أن قيمة P لمربع العوامل الأربعة كانت أقل من 0.05 ($P<0.05$)، وهذا يعني أن العوامل الأربعة تؤثر معنوياً في إنتاج حمض اللبن، وتأخذ العلاقة بين مربع هذه المتغيرات وإنتاج حمض اللبن شكل قطع مكافئ (الشكل 20).
- تأثير التفاعل المتبادل (Interaction effect) في إنتاج حمض اللبن: نلاحظ من الجدول (17) أن علاقة التفاعل بين درجة الحرارة ودرجة الحموضة معنوية التأثير في إنتاج حمض اللبن، في حين كانت علاقات التفاعل الأخرى غير معنوية التأثير في إنتاج حمض اللبن إذ كانت ($p>0.05$).

الجدول–17. التحليل الإحصائي لتأثير المتغيرات المدروسة (ظروف عملية التخمير) في إنتاج حمض اللبن.

المتغيرات المدروسة	معامل التغير	مربع العامل المتغير	الخطأ المعياري للمعامل T	الاحتمالية P
الثابت	32.528	0.253	128.617	0.000
درجة الحرارة	-0.224	0.127	-1.773	0.100
درجة الـ pH	-0.047	0.127	-0.369	0.718
عدد الدورات	0.063	0.127	0.501	0.625
مدة التخمير	0.518	0.127	4.099	0.001
درجة الحرارة × درجة الحرارة	-1.529	0.118	-12.929	0.000
pH × pH	-0.567	0.118	-4.792	0.000
عدد الدورات × عدد الدورات	-0.439	0.118	-3.714	0.003
مدة التخمير × مدة التخمير	-0.619	0.118	-5.236	0.000
درجة الحرارة × pH	0.083	0.155	0.533	0.030
درجة الحرارة × عدد الدورات	0.015	0.155	0.097	0.924
درجة الحرارة × مدة التخمير	0.095	0.155	0.613	0.550
pH × عدد الدورات	0.024	0.155	0.153	0.880
pH × مدة التخمير	-0.016	0.155	-0.105	0.918
عدد الدورات × مدة التخمير	0.051	0.155	0.331	0.746

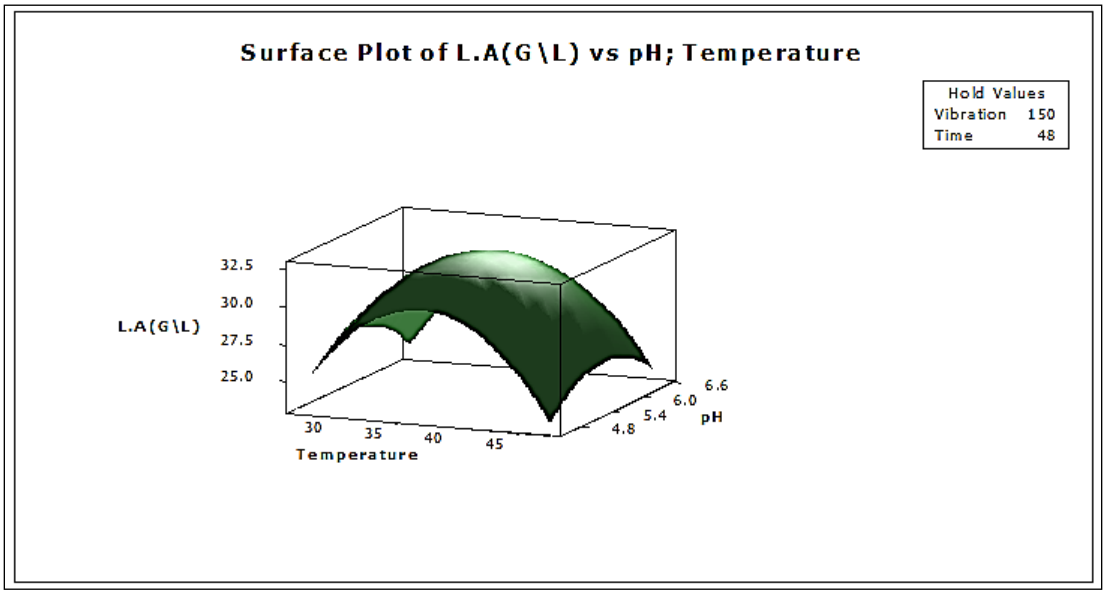
يدل معامل التحديد (R^2) والذي بلغت قيمته (94.60%) على أنَ العوامل الأربعة المتغيرة المدروسة ومربعاتها وعلاقتها مع بعض مسؤولة عن إنتاج حمض اللبن بنسبة 94.60%، ومن ثم يمكن من الجدول (17) كتابة معادلة من الدرجة الثانية لإنتاج حمض اللبن:

$$Y= 32.528-0.224\times_1-0.047\times_2+0.063\times_3+0.518\times_4-1.529\times_1^2-0.567\times_2^2-0.439\times_3^2-$$

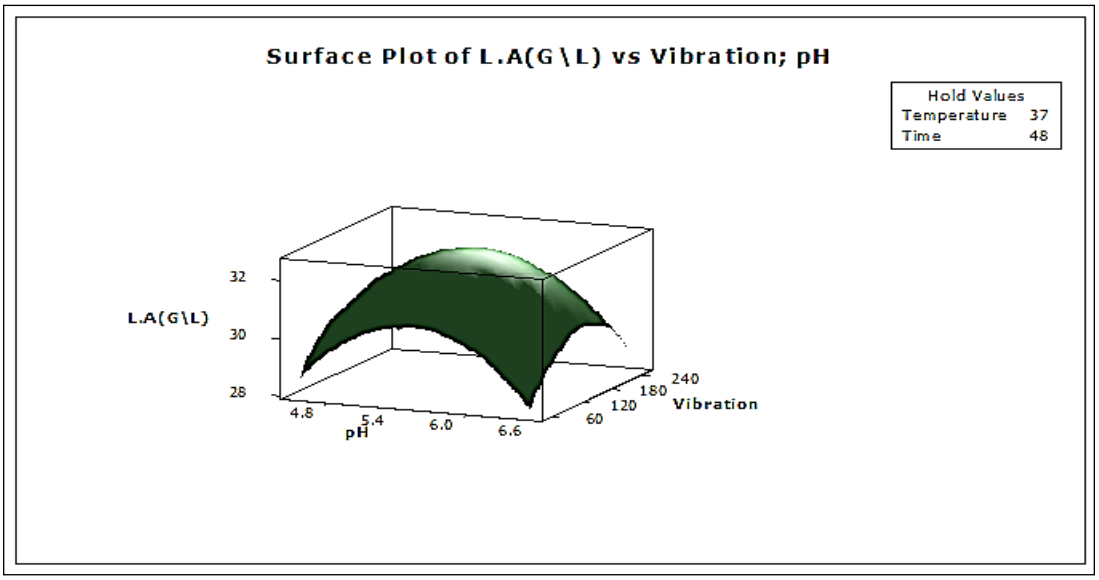
$$0.619\times_4^2+0.083\times_1\times_2+0.015\times_1\times_3+0.095\times_1\times_4+0.024\times_2\times_3-0.016\times_2\times_4+0.051\times_3\times_4$$

Y: الاستجابة التجريبية (لإنتاج حمض اللبن)، x_1 درجة حرارة التحضين، x_2 درجة الحموضة، x_3 عدد الدورات بالدقيقة، x_4 فترة التحضين.

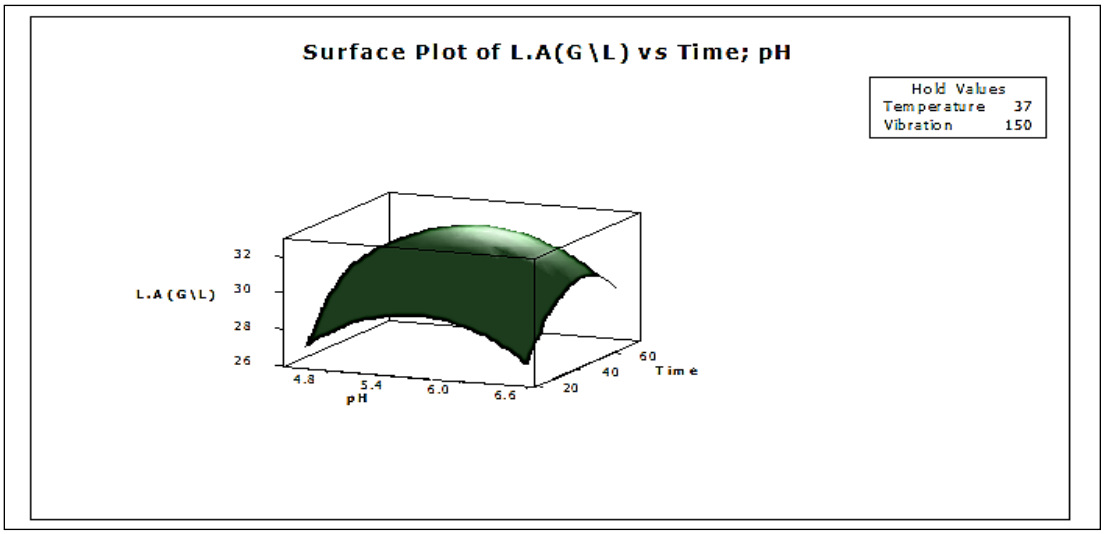
وتبين الأشكال (13، 14، 15، 16، 17 و18) تمثيلات رسومية لمعادلة الانحدار، وتستخدم لدراسة تفاعل المتغيرات وتحديد المستوى الأمثل لكل متغير للحصول على أقصى استجابة. يمثل كل سطح استجابة ثلاثي الأبعاد لإنتاج حمض اللبن مجموعات مختلفة من اختبار متغيرين في وقت واحد مع الحفاظ على المتغيرين الآخرين عند المستويين الخاصين فيهما. تشير سطوح الاستجابة المحدبة إلى وجود متغيرات مثالية محددة جيداً.



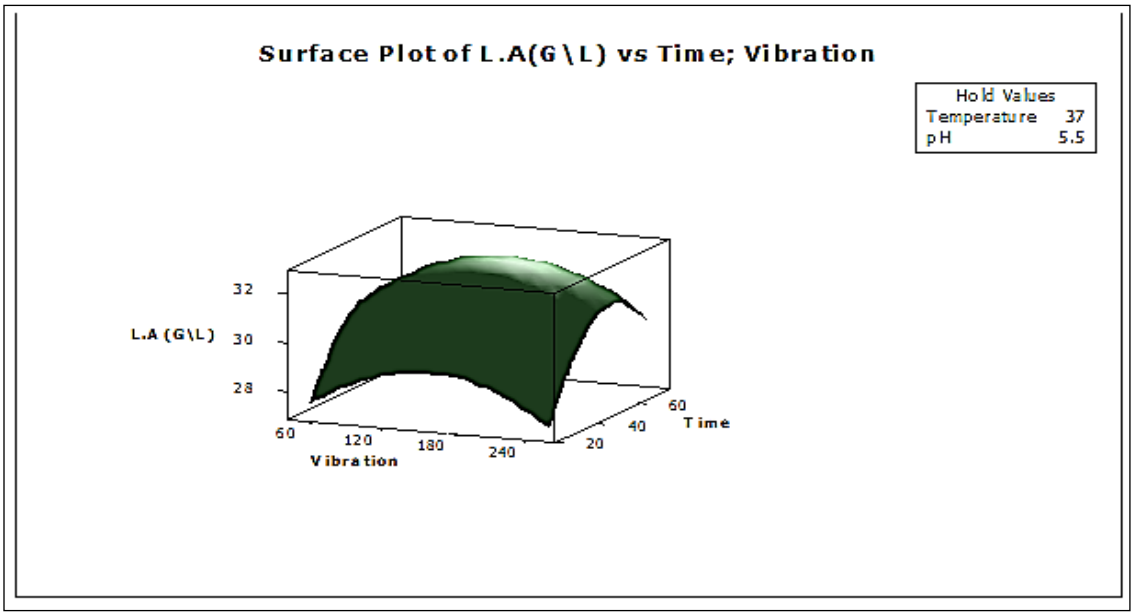
الشكل-13. تأثير درجة الحموضة ودرجة حرارة التحضين في إنتاجية حمض اللبن.



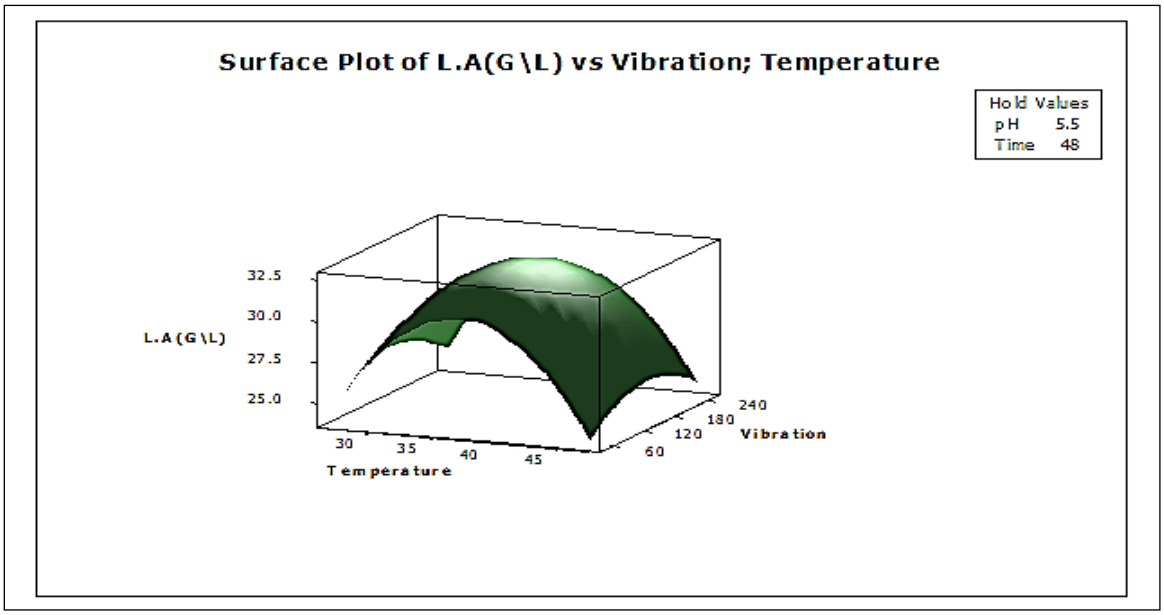
الشكل-14. تأثير درجة الحموضة وعدد الدورات في الدقيقة في إنتاجية حمض اللبن.



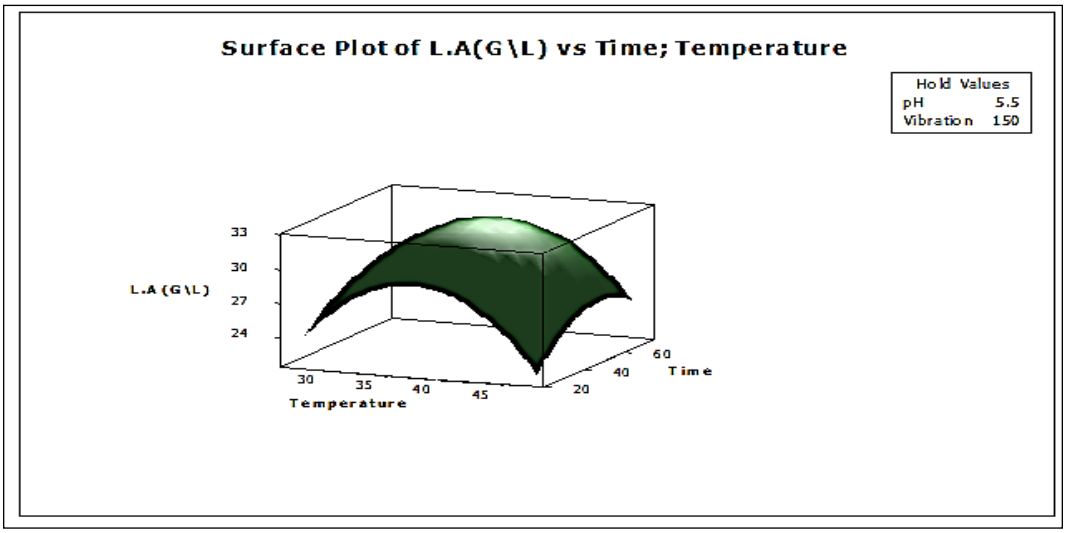
الشكل-15. تأثير درجة الحموضة وفترة التحضين في إنتاجية حمض اللبن.



الشكل-16. تأثير فترة التحضين وعدد الدورات في الدقيقة في إنتاجية حمض اللبن.



الشكل-17. تأثير درجة حرارة التحضين وعدد الدورات في الدقيقة في إنتاجية حمض اللبن.



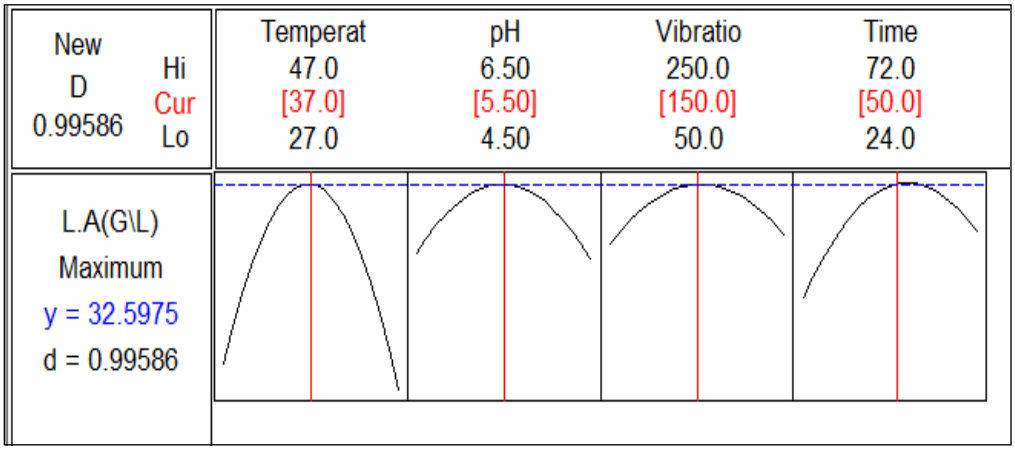
الشكل-18. تأثير درجة حرارة التحضين وفترة التحضين في إنتاجية حمض اللبن.

يبين الجدول (18) تحليل التباين للمتغيرات المدروسة التي تؤثر في إنتاج حمض اللبن، وجود متغير خطي واحد (Linear) من المتغيرات الأربعة على الأقل ذي تأثير معنوي ($P<0.05$)، كما يوجد متغير مربع واحد (Square) من بين المتغيرات الأربعة المربعة على الأقل معنوياً ($P<0.05$)، كما توجد علاقة ترابط (Interraction) واحدة معنوية ($P<0.05$) من بين علاقات الترابط الست.

ويبين الشكل (19) الظروف المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن بطريقة الخلايا الحرة وكانت كالآتي: درجة حرارة التحضين = 37 °م، فترة التحضين = 50 ساعة، pH وسط التخمير= 5.5، سرعة الدوران بالدقيقة = 150.

الجدول-18. تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة (ظروف عملية التخمير) في إنتاج حمض اللبن.

مصادر التباين	درجة الحرية (DF)	مربع الانحرافات (SS)	مربع الانحرافات المعدل (Adj SS)	التباين (MS)	قيمة F	P
الانحدار (Regression)	14	79.846	79.846	5.703	14.860	0.000
التأثير الخطي (Linear)	4	7.803	7.803	1.951	5.080	0.011
التأثير من الدرجة الثانية (Square)	4	71.732	71.732	17.933	46.730	0.000
التفاعل المتبادل (Interaction)	6	0.312	0.312	0.052	0.140	0.049
الخطأ المتبقي (Residual Error)	13	4.989	4.989	0.384		
الخطأ في الملاءمة (Lack-of-Fit)	10	4.977	4.977	0.498	126.010	0.211
الخطأ الكلي (Pure Error)	3	0.012	0.012	0.004		
المجموع (Total)	29	91.716				

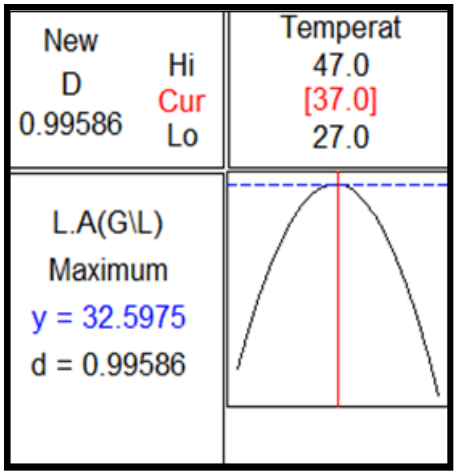


الشكل-19. الظروف المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن بطريقة الخلايا الحرة.

طبقت الظروف المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن بطريقة الخلايا الحرة الواردة في الشكل (19) فكانت قيمة كمية حمض اللبن المنتجة مساوية (32.650 غ/ل)، وهذه القيمة قريبة من القيمة النظرية (32.5975 غ/ل).

3-6-2- درجة حرارة التحضين المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن:

تدل النتائج الواردة في الشكل (20) إلى ازدياد كمية حمض اللبن المنتجة مع ازدياد درجة حرارة التحضين إلى 37 °م، وبعدها نلاحظ انخفاضاً تدريجياً في الكمية المنتجة لحمض اللبن، إذ أثرت درجة الحرارة تأثيراً معنوياً في إنتاج حمض اللبن، وكانت العلاقة بين درجة حرارة التحضين وإنتاج حمض اللبن علاقة قطع مكافئ، ويظهر الشكل (20) أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج حمض اللبن 37 °م، إذ كانت عندها كمية حمض اللبن المنتجة النظرية (32.5975 غ/ل).



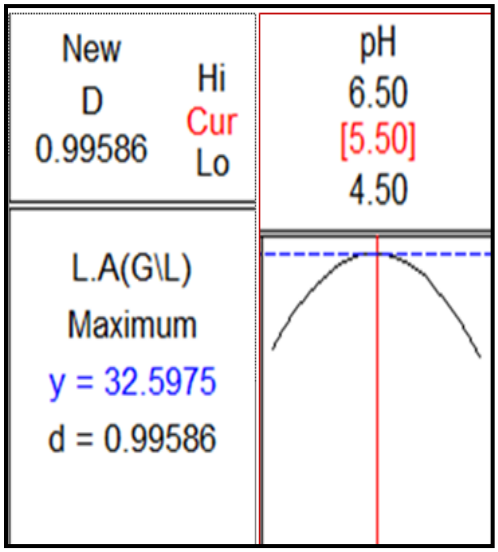
الشكل-20. العلاقة بين درجة حرارة التحضين وكمية حمض اللبن المنتجة من مصل الجبن.

جاءت هذه النتائج متقاربة مع نتائج Ha وآخرين (2003)، إذ تتراوح درجة الحرارة المثالية لنمو بكتريا حمض اللبن بين 20 إلى 45 °م ومن الواضح أنها تختلف من نوع لآخر. استخدم Krischke وآخرون (1991)

درجة حرارة 37 °م لإنتاج حمض اللبن باستخدام *L. casei*. سجل Ilmen وآخرون (2007) إنتاجاً أعظمياً لإنتاج حمض اللبن مقداره (33.72 غ/ل) بدرجة حرارة 37 °م بوساطة *L. casei*. وأكد Sarkar وPaul (2019) أنه من الواضح أن درجة الحرارة التي تتراوح بين (37–40 °م) تعدُّ مثالية لتحويل اللاكتوز إلى حمض لبن باستخدام بكتيريا *Lactobacillus sp*، وأنَّ درجة الحرارة هي أحد العوامل المهمة التي تؤثر في نشاط أنزيمات الخلايا الأيضية ويكون كل أنزيم أكثر نشاطًا في درجة الحرارة المثلى. في درجة الحرارة المثلى يظهر التفاعل الأنزيمي أقصى سرعة رد فعل، ومع ذلك، تحت درجة الحرارة المثلى وفوقها، يتباطأ معدل التفاعل، وهذا قد يؤثر في عملية التمثيل الغذائي الخلوي.

2-6-3- درجة الحموضة (pH) المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن:

تدل النتائج الواردة في الشكل (21) إلى ازدياد كمية حمض اللبن المنتجة مع ازدياد درجة الحموضة إلى 5.5، وبعدها نلاحظ انخفاضاً تدريجياً في الكمية المنتجة لحمض اللبن، إذ أثرت درجة الحموضة تأثيراً معنوياً في إنتاج حمض اللبن، وكانت العلاقة بين درجة الحموضة وإنتاج حمض اللبن علاقة قطع مكافئ، ويظهر الشكل (21) أن درجة الحموضة المثلى لإنتاج حمض اللبن 5.5، إذ كانت عندها كمية حمض اللبن المنتجة النظرية (32.5975 غ/ل).

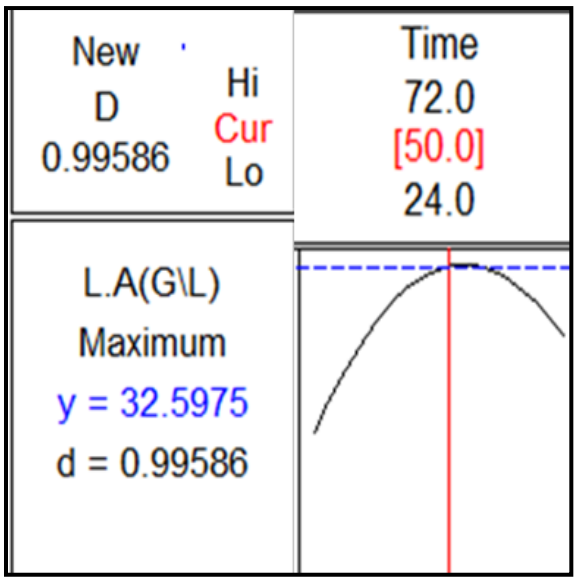


الشكل-21. العلاقة بين درجة الحموضة وكمية حمض اللبن المنتجة من مصل الجبن.

توافقت نتائج درجة الحموضة في هذه الدراسة مع ما توصل إليه (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal, 2000) وهو أنَّ درجة الـ pH الأقل من 5.7 هي مثالية فقط لسلالات*Lactobacillus*، المعروفة بتحملها لدرجات الـ pH المنخفضة أكثر من*Lactococcus*. وتوافقت مع Ha وآخرين (2003) أن درجة pH 5.5 كانت مثالية لإنتاج حمض اللبن باستخدام سلالة *L. helveticus*. واختلفت مع Krischke وآخرين (1991) بأنه باستخدام سلالة *L. casei* كان مجال درجة pH بين 6.0 و6.5 مثالياً لإنتاج حمض اللبن.

2-6-4- فترة التحضين المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن:

تدل النتائج الواردة في الشكل (22) إلى ازدياد كمية حمض اللبن المنتجة مع ازدياد فترة التحضين إلى 50 ساعة، وبعدها نلاحظ انخفاضاً تدريجياً في الكمية المنتجة لحمض اللبن، إذ أثرت فترة التحضين تأثيراً معنوياً في إنتاج حمض اللبن، وكانت العلاقة بين فترة التحضين وإنتاج حمض اللبن علاقة قطع مكافئ. ويظهر الشكل (22) أن فترة التحضين المثلى لإنتاج حمض اللبن 50 ساعة، إذ كانت عندها كمية حمض اللبن المنتجة النظرية (32.5975 غ/ل).



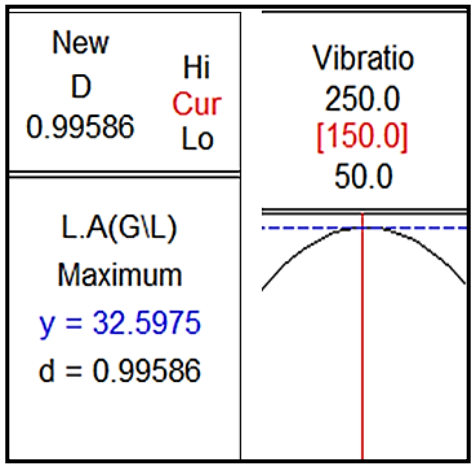
الشكل-22. العلاقة بين فترة التحضين وكمية حمض اللبن المنتجة من مصل الجبن.

لم تتوافق هذه الدراسة مع (Sarkar and Paul, 2019)، إذ لاحظا أنَّ الإنتاج الأعظمي من حمض اللبن وهو 41.7 غ/ل بعد 120 ساعة من التحضين عند إنتاج حمض اللبن من مصل الجبن باستخدام بكتريا *Lactobacillus sp*، في حين كانت فترة التحضين متقاربة من التي سجلها العديد من الباحثين وهي أن فترة تحضين 48 ساعة قد استخدمت عموماً لإنتاج حمض اللبن باستخدام مزارع مختلفة من بكتريا *Lactobacillus* (Ilmen *et al.*, 2007; Garg and Hang, 1995) مع أنَّ اختصار زمن التخمير أكثر فائدة من الناحية الاقتصادية.

2-6-5- سرعة التحريك المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن:

تدل النتائج الواردة في الشكل (23) إلى ازدياد كمية حمض اللبن المنتجة مع ازدياد سرعة التحريك، وبعدها نلاحظ انخفاضاً تدريجياً في الكمية المنتجة لحمض اللبن، إذ أثرت سرعة التحريك تأثيراً معنوياً في إنتاج حمض اللبن، وكانت العلاقة بين سرعة التحريك وإنتاج حمض اللبن علاقة قطع مكافئ، ويظهر الشكل

(23) أن سرعة التحريك المثلى لإنتاج حمض اللبن 150 دورة في الدقيقة، إذ كانت عندها كمية حمض اللبن المنتجة النظرية (32.5975 غ/ل).



الشكل-23. العلاقة بين سرعة التحريك وكمية حمض اللبن المنتجة من مصل الجبن.

توافقت هذه الدراسة مع Sarkar و Paul (2019) من أجل إيجاد سرعة التحريك المثالية في الحاضنة الهزازة من أجل الحد الأقصى لاستخدام اللاكتوز وإنتاج حمض اللبن، بتحضين الوسط الملقح ببكتريا *Lactobacillus sp* بسرعات مختلفة تراوحت بين 50-200 دورة/دقيقة، ووجدا أنَّ الإنتاج الأعظمي من حمض اللبن كان بسرعة 150 دورة/دقيقة، عندما تمت المحافظة على الشروط المثالية الأخرى. عندما ارتفعت سرعة الدوران إلى 200 دورة/دقيقة انخفضت الكمية المنتجة.

3-7- أمثلة إضافة المغذيات إلى مصل الجبن لإنتاج حمض اللبن:

3-7-1- التحليل الإحصائي لنتائج أمثلة إضافة المغذيات إلى مصل الجبن (وسط التخمير):

وضع التصميم الإحصائي المشار إليه في الجدول (19) باستخدام البرنامج الإحصائي Minitap الذي يعبر عن المتغيرات والتجارب التي أجريت وعددها 30 مع مكرراتها لإنتاج حمض اللبن باستخدام بكتريا *Lactobacillus paracasei* المعزولة محلياً.

الجدول-19. نتائج تجارب التصميم الإحصائي لأمثلة إضافة المغذيات.

القطاعات	مستخلص الخميرة Yeast extract	كبريتات المغنزيوم $MgSO_4$	كبريتات المنغنيز $MnSO_4$	فوسفات ثنائي البوتاسيوم K_2HPO_4	تركيز حمض اللبن (غ/ل)
1	20	0.2	0.04	1	38.03
1	10	0.4	0.04	1	37.99
1	10	0.2	0.08	1	38.01
1	20	0.4	0.08	1	37.65
1	10	0.2	0.04	2	37.19
1	20	0.4	0.04	2	36.81
1	20	0.2	0.08	2	36.73
1	10	0.4	0.08	2	36.22
1	15	0.3	0.06	1.5	36.82
1	15	0.3	0.06	1.5	36.84
2	10	0.2	0.04	1	39.87
2	20	0.4	0.04	1	36.53
2	20	0.2	0.08	1	36.48
2	10	0.4	0.08	1	37.64
2	20	0.2	0.04	2	35.61
2	10	0.4	0.04	2	35.7
2	10	0.2	0.08	2	36.23
2	20	0.4	0.08	2	35.09
2	15	0.3	0.06	1.5	36.95
2	15	0.3	0.06	1.5	36.78
3	5	0.3	0.06	1.5	33.01
3	25	0.3	0.06	1.5	35.69
3	15	0.1	0.06	1.5	34.3
3	15	0.5	0.06	1.5	33.92
3	15	0.3	0.02	1.5	33.79

34.58	1.5	0.1	0.3	15	3
35.11	0.5	0.06	0.3	15	3
33.26	2.5	0.06	0.3	15	3
34.27	1.5	0.06	0.3	15	3

يبين الجدول (20) تأثير العوامل المدروسة (كل عامل لمفرده، مربع العوامل والتفاعل المتبادل بين العوامل) في إنتاج حمض اللبن كما يأتي:

- التأثير الخطي (Linear effect): تأثير كل عامل مفرد في إنتاج حمض اللبن، نلاحظ من الجدول (20) أن هناك تأثيراً خطياً معنوياً لفوسفات ثنائي البوتاسيوم فقط إذ كانت ($P<0.05$)، أما بقية العوامل (مستخلص الخميرة ، كبريتات المنغنيز وكبريتات المغنزيوم) لم يكن لها تأثري معنوي في إنتاج حمض اللبن، إذ كانت قيمة P لكل منها أكبر من 0.05 ($P>0.05$).
- تأثير مربع العوامل (Squares effect) في إنتاج حمض اللبن: نلاحظ من الجدول (20) أن قيمة P لمربع العوامل الأربعة كانت أقل من 0.05 ($P<0.05$)، وهذا يعني أن العوامل الأربعة تؤثر معنوياً في إنتاج حمض اللبن، وتأخذ العلاقة بين مربع هذه المتغيرات وإنتاج حمض اللبن شكل قطع مكافئ (الشكل 31).
- تأثير العوامل المتفاعلة (Interaction effect) في إنتاج حمض اللبن: نلاحظ من الجدول (20) أن علاقة التفاعل بين جميع المتغيرات (مستخلص الخميرة، كبريتات المنغنيز، كبريتات المغنزيوم وفوسفات ثنائية البوتاسيوم) غير معنوية التأثير في إنتاج حمض اللبن إذ كانت ($p>0.05$).

الجدول–20. التحليل الإحصائي لتأثير المتغيرات المدروسة (المغذيات) في إنتاج حمض اللبن.

المتغيرات المدروسة	معامل التغير	مربع العامل المتغير	الخطأ المعياري للمعامل T	الاحتمالية P
الثابت	35.978	0.372	96.758	0.000
مستخلص الخميرة	-0.023	0.186	-0.126	0.902
كبريتات المغنزيوم	-0.220	0.186	-1.183	0.258
كبريتات المنغنيز	-0.088	0.186	-0.471	0.646
فوسفات ثنائي البوتاسيوم	-0.680	0.186	-3.657	0.003
مستخلص الخميرة × مستخلص الخميرة	0.056	0.174	0.322	0.042
كبريتات المغنزيوم × كبريتات المغنزيوم	-0.004	0.174	-0.023	0.002
كبريتات المنغنيز × كبريتات المنغنيز	0.015	0.174	0.085	0.004
فوسفات ثنائي البوتاسيوم × فوسفات ثنائي البوتاسيوم	0.015	0.174	0.085	0.021
مستخلص الخميرة × كبريتات المغنزيوم	0.186	0.228	0.818	0.428
مستخلص الخميرة × كبريتات المنغنيز	0.101	0.228	0.445	0.664
مستخلص الخميرة × فوسفات ثنائي البوتاسيوم	0.233	0.228	1.021	0.326
كبريتات المغنزيوم × كبريتات المنغنيز	0.176	0.228	0.774	0.453
كبريتات المغنزيوم × فوسفات ثنائي البوتاسيوم	0.040	0.228	0.176	0.863
كبريتات المنغنيز × فوسفات ثنائي البوتاسيوم	0.100	0.228	0.439	0.668

يدل معامل التحديد (R^2) والذي بلغت قيمته (0.86) على أنَ العوامل الأربعة المتغيرة المدروسة ومربعاتها وعلاقتها مع بعض مسؤولة عن إنتاج حمض اللبن بنسبة 0.86، ومن ثم يمكن من الجدول (20) كتابة معادلة الانحدار من الدرجة الثانية لإنتاج حمض اللبن:

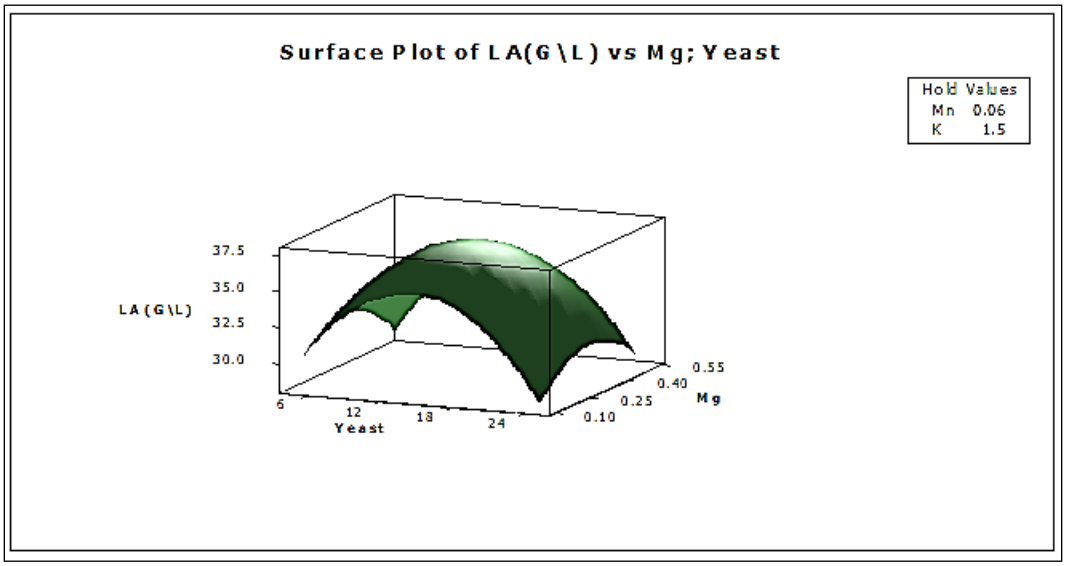
$$Y= 35.978-0.023\times_1-0.220\times_2-0.088\times_3-0.680\times_4+0.056\times_1^2-$$

$$0.004\times_2^2+0.015\times_3^2+0.015\times_4^2+0.186\times_1\times_2+0.101\times_1\times_3+0.233\times_1\times_4+0.176\times_2\times_3-$$

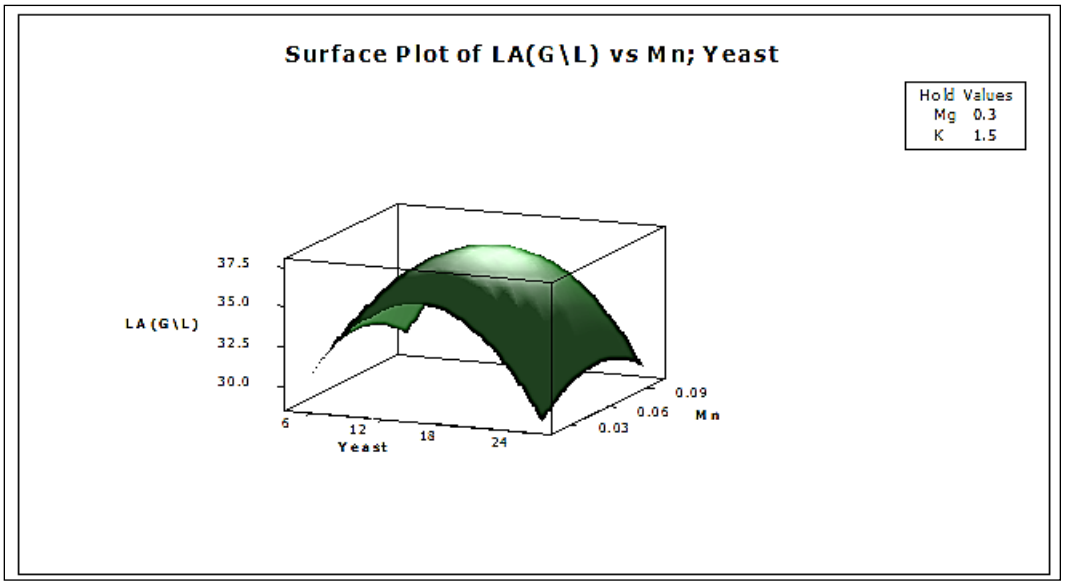
$$0.040\times_2\times_4+0.100\times_3\times_4$$

Y: الاستجابة التجريبية (لإنتاج حمض اللبن)، x_1 مستخلص الخميرة، x_2 كبريتات المغنزيوم، x_3 كبريتات المنغنيز، x_4 فوسفات ثنائي البوتاسيوم.

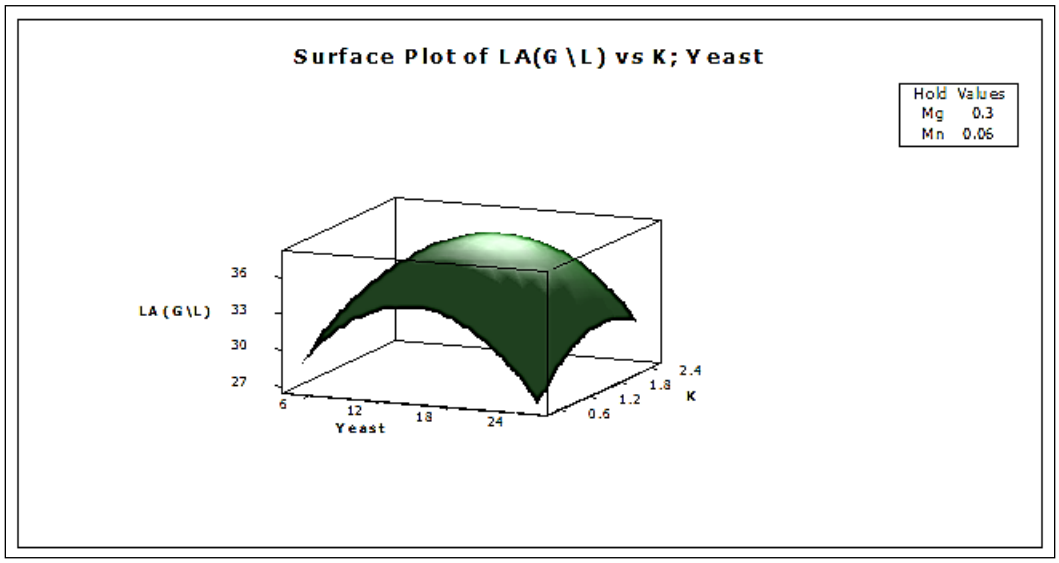
تبين الأشكال (24، 25، 26، 27، 28 و29) تمثيلات رسومية لمعادلة الانحدار، وتستخدم لدراسة تفاعل المتغيرات وتحديد المستوى الأمثل لكل متغير للحصول على أقصى استجابة. يمثل كل سطح استجابة ثلاثي الأبعاد لإنتاج حمض اللبن مجموعات مختلفة من اختبار متغيرين في وقت واحد مع الحفاظ على المتغيرين الآخرين عند المستويين الخاصين فيهما. تشير سطوح الاستجابة المحدبة إلى وجود متغيرات مثالية محددة جيداً.



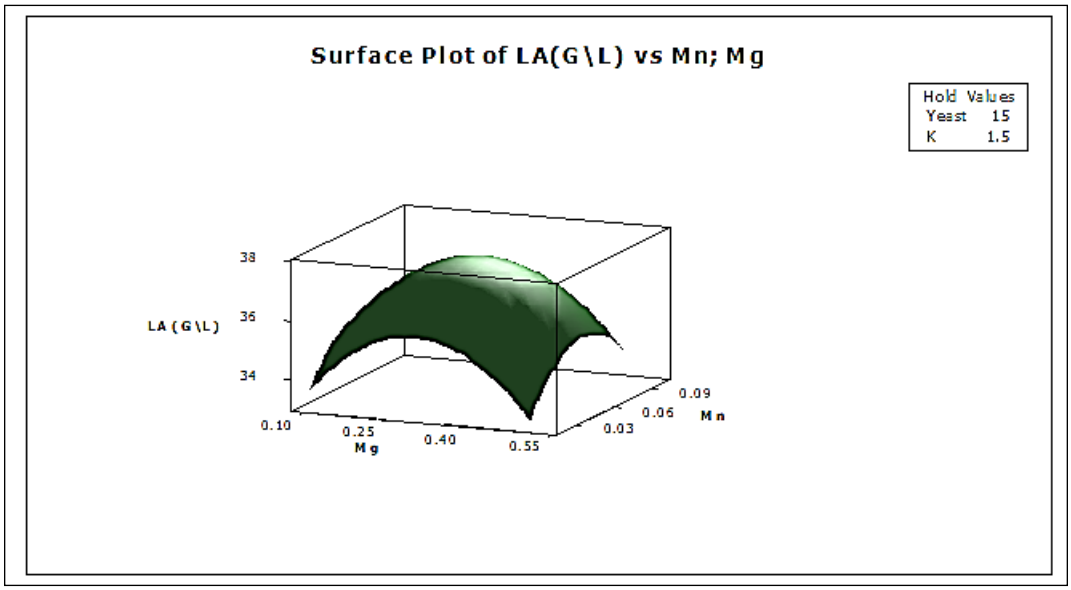
الشكل-24. تأثير مستخلص الخميرة وكبريتات المغنزيوم في إنتاج حمض اللبن.



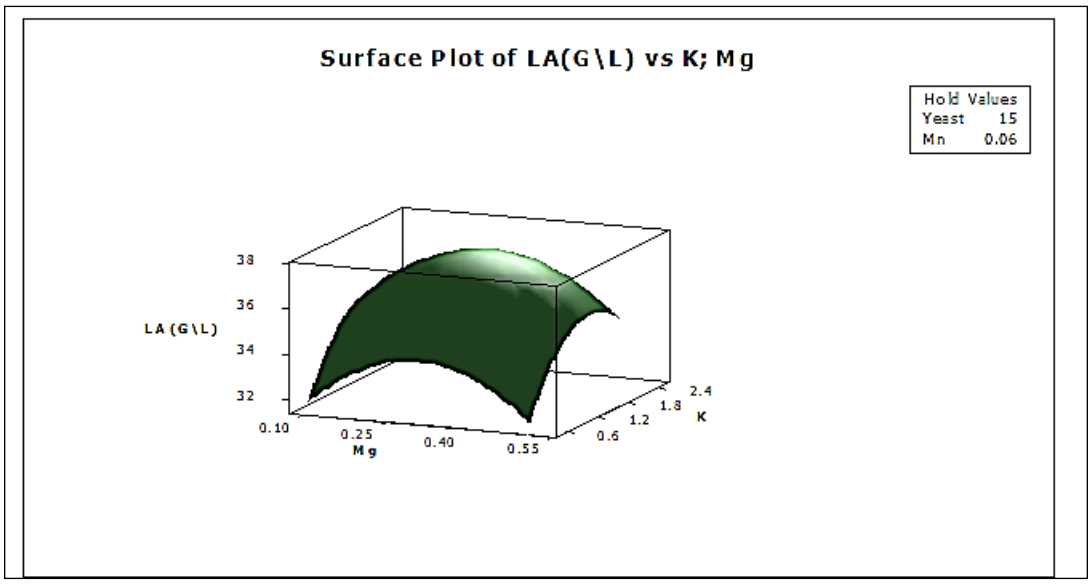
الشكل-25. تأثير مستخلص الخميرة وكبريتات المنغنيز في إنتاج حمض اللبن.



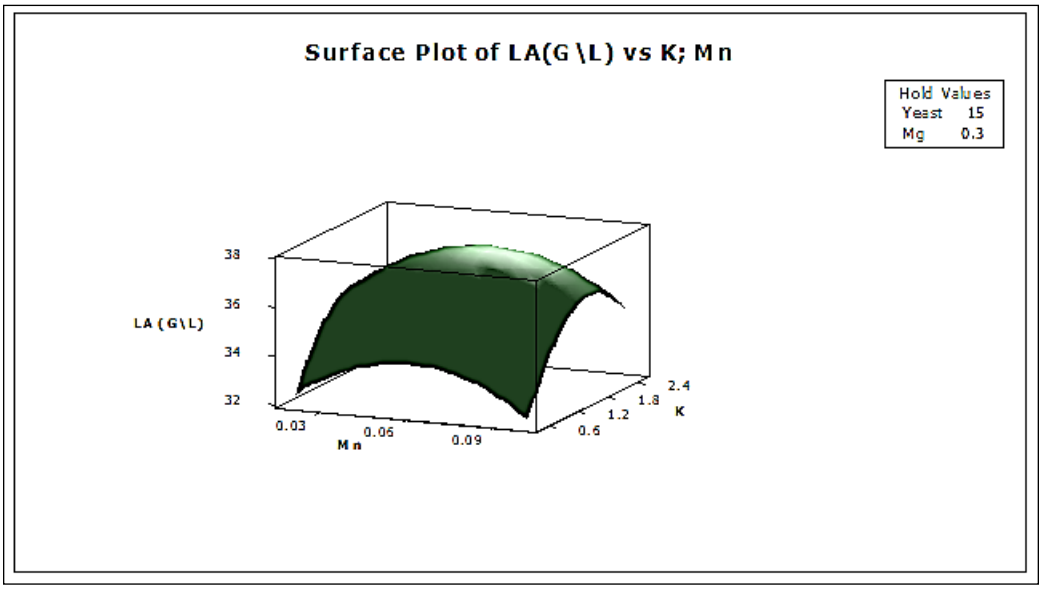
الشكل-26. تأثير مستخلص الخميرة وفوسفات ثنائية البوتاسيوم في إنتاج حمض اللبن.



الشكل–27. تأثير كبريتات المغنزيوم وكبريتات المنغنيز في إنتاج حمض اللبن.



الشكل–28. تأثير كبريتات المغنزيوم وفوسفات ثنائية البوتاسيوم في إنتاج حمض اللبن.



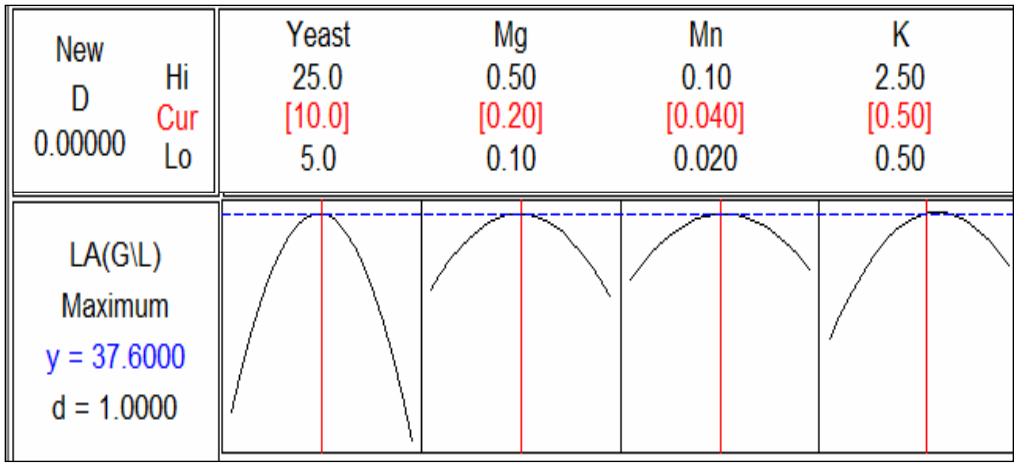
الشكل–29. تأثير كبريتات المنغنيز وفوسفات ثنائية البوتاسيوم في إنتاج حمض اللبن.

يبين الجدول (21) تحليل التباين للمتغيرات المدروسة التي تؤثر في إنتاج حمض اللبن، وجود متغير خطي واحد (Linear) من المتغيرات الأربعة على الأقل ذي تأثير معنوي ($P<0.05$)، كما يوجد متغير مربع واحد (Square) من بين المتغيرات الأربعة المربعة على الأقل معنوياً ($P<0.05$)، ولا توجد علاقات تفاعل (Interraction) معنوية ($0.05<P$) بين علاقات التفاعل الست.

الجدول-21. تحليل التباين لتأثير المتغيرات المدروسة (المغذيات) في إنتاج حمض اللبن.

مصادر التباين	درجة الحرية (DF)	مربع الانحرافات (SS)	مربع الانحرافات المعدل (Adj SS)	التباين (MS)	قيمة F	P
الانحدار (Regression)	14	14.816	14.816	1.058	1.280	0.003
التأثير الخطي (Linear)	4	12.456	12.456	3.114	3.750	0.030
التأثير من الدرجة الثانية (Square)	4	0.094	0.094	0.023	0.030	0.008
التفاعل المتبادل (Interaction)	6	2.267	2.267	0.378	0.460	0.829
الخطأ المتبقي (Residual Error)	13	10.785	10.785	0.830		
الخطأ في الملاءمة (Lack-of-Fit)	10	10.768	10.768	1.077	196.380	0.541
الخطأ الكلي (Pure Error)	3	0.017	0.017	0.006		
المجموع (Total)	29	77.280				

ويبين الشكل (30) نسب المغذيات المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن بطريقة الخلايا الحرة وكانت كالآتي: مستخلص الخميرة 10 غ/ل، فوسفات ثنائية البوتاسيوم 0.5 غ/ل، كبريتات المغنزيوم 0.2 غ/ل، كبريتات المنغنيز 0.04 غ/ل.

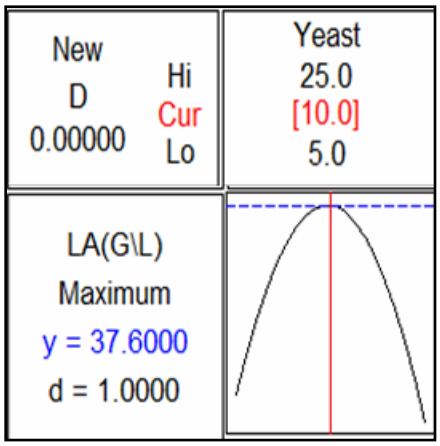


الشكل-30. المغذيات المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن بطريقة الخلايا الحرة.

طبقت النسب المثلى للمغذيات لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن بطريقة الخلايا الحرة الواردة في الشكل (30) فكانت قيمة كمية حمض اللبن المنتجة مساوية (37.9 غ/ل)، وهذه القيمة قريبة من القيمة النظرية (37.6 غ/ل).

3-7-2- نسبة مستخلص الخميرة المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن:

تدل النتائج الواردة في الشكل (31) إلى ازدياد كمية حمض اللبن المنتجة مع ازدياد نسبة مستخلص الخميرة إلى 10غ/ل، وبعدها نلاحظ انخفاضاً تدريجياً في الكمية المنتجة لحمض اللبن، إذ أثر مستخلص الخميرة كمصدر للأزوت تأثيراً معنوياً في إنتاج حمض اللبن، وكانت العلاقة بين مستخلص الخميرة وإنتاج حمض اللبن علاقة قطع مكافئ، ويظهر الشكل (31) أن النسبة المثلى لمستخلص الخميرة لإنتاج حمض اللبن 10غ/ل إذ كانت عندها كمية حمض اللبن المنتجة النظرية (37.6غ/ل).



الشكل-31. العلاقة بين مستخلص الخميرة وكمية حمض اللبن المنتجة من مصل الجبن.

وتقع النسبة المثلى لمستخلص الخميرة 10غ/ل في هذه الدراسة ضمن المجال الذي حدده (Lund,1992) إذ يزداد تركيز إنتاج حمض اللبن مع ازدياد التركيز المكمل خاصة مستخلص الخميرة، وتم الحصول على أعلى معدل إنتاج مع إضافة خلاصة خميرة 5-15 غ/لتر.

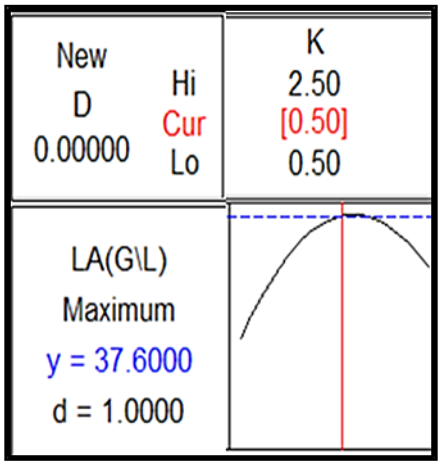
وتوافقت النسبة المثلى لمستخلص الخميرة 10 غ/ل تقريباً مع (Ghaly *et al.*, 2003)، إذ وجدوا أنّ كمية حمض اللبن المنتجة كانت (22.1، 34.8 و26.8 غ/ل) عند استخدام التراكيز التالية من مستخلص الخميرة (10.5، 15 غ/ل) على الترتيب، في دراستهم لأمثلة إنتاج حمض اللبن من مصل الجبن باستخدام بكتريا *Lactobacillus helveticus*.

3-7-3- نسبة فوسفات ثنائية البوتاسيوم المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن:

تدل النتائج الواردة في الشكل (32) إلى ازدياد كمية حمض اللبن المنتجة مع ازدياد نسبة فوسفات ثنائي البوتاسيوم إلى 0.5 غ/ل، وبعدها نلاحظ انخفاضاً تدريجياً في الكمية المنتجة لحمض اللبن، إذ أثرت فوسفات ثنائية البوتاسيوم تأثيراً معنوياً في إنتاج حمض اللبن، وكانت العلاقة بين فوسفات ثنائية البوتاسيوم

وإنتاج حمض اللبن علاقة قطع مكافئ، ويظهر الشكل (32) أن النسبة المثلى لفوسفات ثنائية البوتاسيوم هي 0.5 غ/ل لإنتاج حمض اللبن بكمية نظرية (37.6 غ/ل).

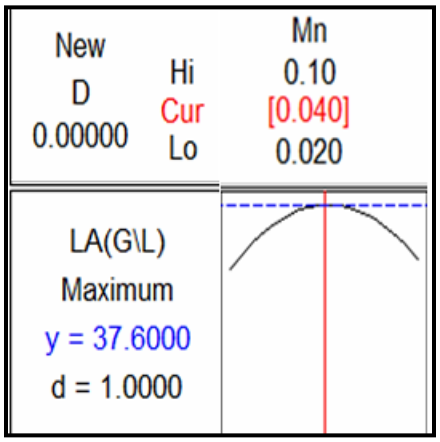
في دراسة أجريت من قبل (Patel and Patel, 2016) لأمثلة إنتاج حمض اللبن من مصل الجبن بوساطة بكتريا *Lactobacillus casei* إذ أثرت نسبة فوسفات ثنائي البوتاسيوم معنوياً في إنتاج حمض اللبن وكانت نسبتها المثلى 0.36%، وكمية حمض اللبن المنتجة 15.43 غ/ل، وهذه القيم أقل بـ 0.14% و21.57 غ/ل على الترتيب من الدراسة الحالية، وقد يعزى ذلك إلى اختلاف نوع البكتريا وبعض العوامل الأخرى المؤثرة في إنتاج حمض اللبن. وذكر(Coelho *et al.*,2011) أنّ استخدام فوسفات ثنائي البوتاسيوم يوفر أيونات البوتاسيوم والفوسفات الضروريتين لنمو بكتريا حمض اللبن، ولها أيضاً دورٌ منظمٌ لحموضة وسط التخمير، إذ ازداد انتاج حمض اللبن مع زيادة تركيزها إلى 2.5 غ /ل، في حين في الدراسة الحالية كانت النسبة المثلى 0.5 غ/ل، وهذا الفارق عائد إلى اختلاف نوع البكتريا، إذ كانت في دراستهم *Lactobacillus plantarum* ووسط التخمير هو المولاس.



الشكل-32. العلاقة بين فوسفات ثنائية البوتاسيوم وكمية حمض اللبن المنتجة من مصل الجبن.

3-7-4- نسبة كبريتات المنغنيز المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن:

تدل النتائج الواردة في الشكل (33) إلى ازدياد كمية حمض اللبن المنتجة مع ازدياد نسبة كبريتات المنغنيز إلى 0.04 غ/ل، وبعدها نلاحظ انخفاضاً تدريجياً في الكمية المنتجة لحمض اللبن، إذ أثرت كبريتات المنغنيز تأثيراً معنوياً في إنتاج حمض اللبن، وكانت العلاقة بين كبريتات المنغنيز وإنتاج حمض اللبن علاقة قطع مكافئ، ويظهر الشكل (33) أن النسبة المثلى لكبريتات المنغنيز هي 0.04 غ/ل لإنتاج حمض اللبن بكمية نظرية (37.6 غ/ل).

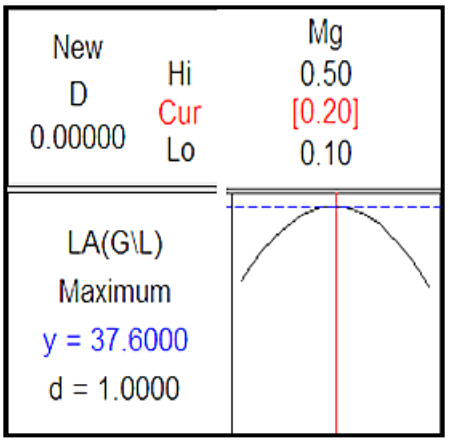


الشكل-33. العلاقة بين كبريتات المنغنيز وكمية حمض اللبن المنتجة من مصل الجبن.

خلص (Büyükkileci and Harsa, 2004) إلى أن كبريتات المنغنيز كانت ضرورية لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن بوساطة *L. casei* التي تحتاج لأيون المنغنيز (Mn^{+2})، وقد يكون مصل الجبن قدَّم بعضاً آخر من الأيونات كذلك، والنسبة المثلى كانت 0.05 غ/ل وكمية حمض اللبن المنتجة 44 غ/ل، وهذه النتيجة متقاربة مع الدراسة الحالية، إلا أنه لاحظ أنّ الأملاح الأخرى (K_2HPO_4, $MgSO_4$) كان تأثيرها طفيفاً في إنتاج حمض اللبن.

3-7-5- نسبة كبريتات المغنزيوم المثلى لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن:

تدل النتائج الواردة في الشكل (34) إلى ازدياد كمية حمض اللبن المنتجة مع ازدياد نسبة كبريتات المغنزيوم إلى 0.2 غ/ل، وبعدها نلاحظ انخفاضاً تدريجياً في الكمية المنتجة لحمض اللبن، إذ أثرت كبريتات المغنزيوم تأثيراً معنوياً في إنتاج حمض اللبن، وكانت العلاقة بين كبريتات المغنزيوم وإنتاج حمض اللبن علاقة قطع مكافئ، ويظهر الشكل (34) أن النسبة المثلى لكبريتات المغنزيوم هي 0.2 غ/ل لإنتاج حمض اللبن بكمية نظرية (37.6 غ/ل).



الشكل-34. العلاقة بين كبريتات المغنزيوم وكمية حمض اللبن المنتجة من مصل الجبن.

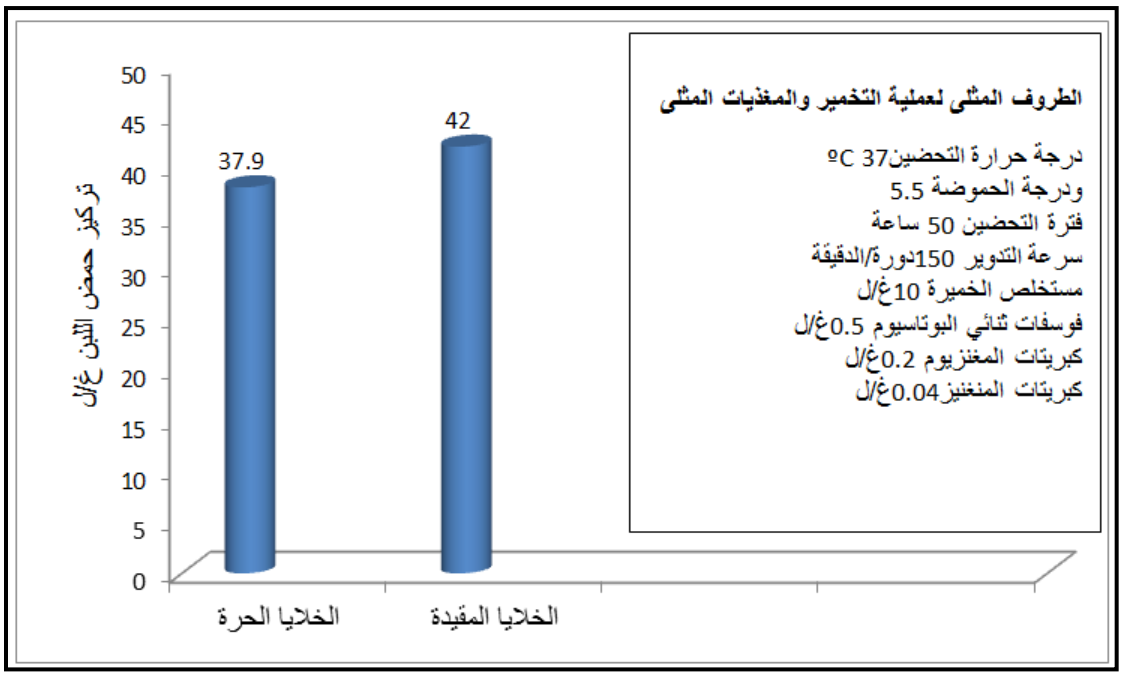
في دراسة لـ (Patel and Patel, 2016) لأمثلة إنتاج حمض اللبن من مصل الجبن بوساطة بكتريا *Lactobacillus casei* إذ أثرت كبريتات المغنزيوم معنوياً في إنتاج حمض اللبن وكانت نسبتها المثلى 0.42%، أي 4.2 غ/ل وهي أعلى بـ 4 غ/ل عن النسبة المثلى في الدراسة الحالية (0.2 غ/ل)، وكمية حمض اللبن المنتجة 15.43 غ/ل وهي أقل بـ 21.57 غ/ل عن كمية حمض اللبن المنتجة في الدراسة الحالية (37.6 غ/ل)، وقد يعزى ذلك إلى اختلاف نوع البكتريا وبعض العوامل الأخرى المؤثرة في إنتاج

حمض اللبن. وفي دراسة لـ (Kitouni and Oulmi, 2013) لتحقيق الشروط المثلى لإنتاج حمض اللبن بوساطة *Lactobacillus bulgaricus* 11842 المزروعة على مصل الجبن كانت النسبة المثلى لكبريتات المغنزيوم 0.124 غ/ل؛ وهي أقل من الدراسة الحالية بـ 0.076 غ/ل، ومتوسط كمية حمض اللبن المنتجة 20.9 غ/ل وهي أقل من الدراسة الحالية بـ 16.7 غ/ل.

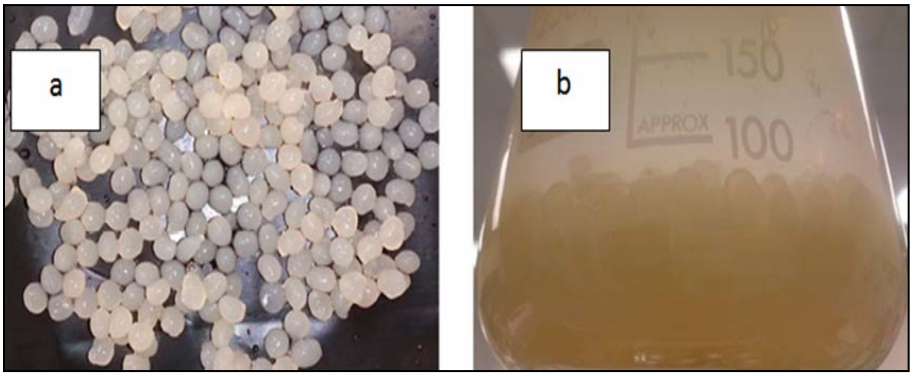
3-8- مقارنة إنتاجية *Lactobacillus paracasei* من حمض اللبن بطريقتي الخلايا الحرة والخلايا المقيدة:

يبين الشكل (35) أنَ إنتاج حمض اللبن من بكتريا (*Lactobacillus paracasei*) الحرة كان 37.9 غ/ل، وعندما قيدت في مادة ألجينات الصوديوم كان إنتاجها 42 غ/ل، أي زادت إنتاجية حمض اللبن عند تثبيت تلك الخلايا بمقدار 10.82%، وهذه الزيادة في الإنتاج تعد أقل من دراسات أخرى ربما لاختلاف نوع البكتريا ونوع ركيزة وسط التخمير ومدى نقاوة المواد ومصدرها مثل الألجينات وكلوريد الكالسيوم المستخدمة في التقييد، فوفقاً لتجارب أجراها (Sekar *et al.*, 2014) فإن تثبيت خلايا LAB على ألجينات الصوديوم هو الأفضل لإنتاج حمض اللبن على نطاق معملي بالمقارنة مع الخلايا الحرة، كما أن لديها القدرة على استخدامها في أثناء مزارع الدُفعات المتكررة لإنتاج حمض اللبن، إذ أظهرت العزلة المقيدة LAB P إنتاجية أعلى بنسبة 83% (11.35 غ/لتر) مقارنةً بمتوسط إنتاجها البالغ 6.2 غ/لتر كخلية حرة في وسط التخمير. وأجرى (Rao *et al.*, 2009) دراسة لإنتاج حمض اللبن من بكتريا *L. delbrueckii* الحرة والمقيدة بمشتقات الألجينات باستخدام 10% من الغلوكوز في وسط التخمير، إذ بلغ إنتاج الحمض 80.5 غ لتر للخلايا المقيدة في مادة (Palmitolyted alginate) و51 غ/لتر للخلايا الحرة، أي زادت كمية حمض اللبن بمقدار 57.8% عند تقييد البكتريا سابقة الذكر.

يظهر الشكل (36) شكل خرزات ألجينات الكالسيوم.



الشكل-35. إنتاجية حمض اللبن من بكتريا (*Lactobacillus paracasei*) الحرة والمقيدة.



الشكل-36. شكل خرزات ألجينات الكالسيوم.

3-9- دراسة ثبوتية الخلايا المقيدة:

درست ثبوتية بكتريا(*Lactobacillus paracasei*) المقيدة بمادة ألجينات الصوديوم بتركيز 2% لاستخدامها بشكل متكرر لإنتاج حمض اللبن من مصل الجبن، إذ تم فصلها من وسط التخمر وأعيد استعمالها في

الإنتاج سبع مرات متتالية. يبين الجدول (22) أنّ كميات حمض اللبن المنتجة تناقصت بصورة غير معنوية في الدورة الأولى والثانية وفي الدورة الثانية والثالثة وفي الدورة الثالثة والرابعة، في حين تناقصات كميات حمض اللبن المنتجة بصورة معنوية في الدورة الرابعة والخامسة، ولم يكن التناقص معنوياً في الدورة الخامسة والسادسة وكذلك في الدورة السادسة والسابعة. وعموماً، كان التناقص في كميات حمض اللبن المنتجة معنوياً عند مقارنة الدورات الثلاث الأخيرة (الخامسة والسادسة والسابعة) مع الدورات (الأولى والثانية والثالثة والرابعة)، ولوحظ في الدورة السابعة تحطم وتشقق في حبيبات الهلام. وهذه النتائج متوافقة تقريباً مع دراسة (Goksungur *et al.*, 2005) إذ أعاد استعمال خلايا *L. casei* المقيدة في حبيبات هلام ألجينات الكالسيوم في إنتاج حمض اللبن مرات عدة، وقد أعطت نتيجة جيدة خلال دورات الإنتاج الخمس الأولى ثم بدأ الإنتاج بالانخفاض في الدورة السادسة من الإنتاج. ولاحظ أنه في الوجبتين الأخيرتين قد بدأ ظهور تحطم وتشقق وانكماش في الحبيبات، أما في الوجبة الحادية عشر فقد حصل تضرر وتحطم كامل لحبيبات الهلام. وقد عزى (Sheet and Mahmood, 2020) الانخفاض المستمر في إنتاج حمض اللبن إلى بضعة أسباب منها التسرب المستمر للخلايا من الحبيبات إلى وسط التخمر بسبب تضرر بعض الحبيبات وتهشمها والناتج عن التحريك المستمر في الحاضنة الهزازة وهذا ما أدى إلى تناقص أعدادها في الدورات أو الوجبات اللاحقة من التخمر، وكذلك موت بعض الخلايا أو انخفاض فاعليتها بالإضافة إلى انخفاض فاعلية أنزيماتها وثباتها بزيادة مدة التخمر.

الجدول-22. ثبوتية خلايا بكتريا(*Lactobacillus paracasei*) المقيدة بألجينات الصوديوم في إنتاج حمض اللبن من مصل الجبن بطريقة الوجبات (الدفعات).

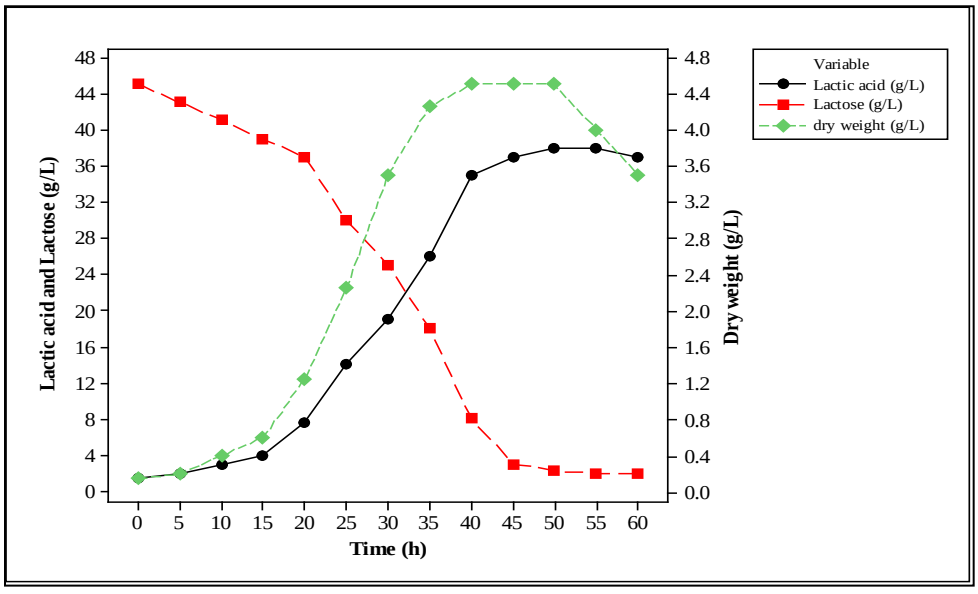
عدد الدورات التخميرية	تركيز حمض اللبن (غ/ل)
1	42.00 ± 0.50^{a}
2	$41.50 \pm 1.10^{a,b}$
3	$39.80 \pm 0.70^{b,c}$
4	38.57 ± 0.80^{c}
5	36.30 ± 0.70^{d}
6	$34.40 \pm 2.00^{d,e}$
7	32.60 ± 1.30^{e}

تدل الأحرف المتشابهة في العمود الواحد على عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة $P \leq 0.05$.

3-10- تقدير الكتلة الحيوية:

دُرست تراكيز اللاكتوز وحمض اللبن والكتلة الحيوية الجافة لخلايا بكتريا *L. paracasei* الحرة المنماة في وسط مصل الجبن في الدوارق الهزازة في ظل الظروف المثلى لعملية التخمير والمغذيات. ويظهر الشكل (37) أنّ تركيز الكتلة الحيوية الجافة الأولي بلغ 0.15 غ/ل في بداية عملية التخمير، ومن ثم ازداد تركيز الكتلة الحيوية تصاعدياً من 5 إلى 40 ساعة، ومن 40 إلى 50 ساعة ظلت الكتلة الحيوية ثابتة عند حوالي 4.5 غ/ل، ومن ثم انخفضت إلى حوالي 3.5 غ/ل، وبدأ هذا الانخفاض في الوقت الذي استُخدم فيه معظم اللاكتوز، إذ بلغ المتبقي منه في وسط التخمير (2 غ/ل) في نهاية عملية التخمير. وأيضاً لم يكن هناك إنتاج كبير لحمض اللبن حتى مدة 15ساعة (4 غ/ل)، ولوحظ فيها زيادة في تركيز الكتلة الحيوية. استمر إنتاج حمض اللبن حتى 50 ساعة حيث بلغت كميته (38 غ/ل)، في حين توقف نمو الكتلة الحيوية عند 40 ساعة. ولذلك استنتج أنّ ما يصل إلى 40 ساعة من إنتاج حمض اللبن كان مرتبطاً بالنمو، ومن 40 ساعة وحتى 50 ساعة كان إنتاج حمض اللبن غير مرتبط بالنمو.

في ظل هذه الظروف تم حساب عائد الإنتاج من حمض اللبن (Yp/s) فكان 0.85 غ حمض لبن لكل غ لاكتوز، وبلغت الإنتاجية من حمض اللبن 0.73 غ/ل/سا، كما حسب عائد النمو (Yx/s) فكان 0.1 غ خلية جافة لكل غ اللاكتوز، وحُسب أقصى معدل نمو (μmax) فكان 0.11 غ خلية جافة/ ساعة. وهذه النتائج متوافقة تقريباً مع (Büyükkileci, 2000) من حيث ارتباط معظم إنتاج حمض اللبن بالنمو، ومع عائد الإنتاج من حمض اللبن (Yp/s) فكانت 0.86 غ حمض لبن لكل غ لاكتوز، وعائد النمو 0.084 غ خلية جافة لكل غ لاكتوز. واختلفت معه من حيث الإنتاجية من حمض اللبن إذ بلغت 2.40 غ/ل/سا، وأيضاً اختلفت معه من حيث أقصى معدل نمو إذ بلغ لديه 0.32 غ خلية جافة/سا، وقد يعود هذا الاختلاف إلى اختلاف ظروف عملية التخمير والمغذيات المستخدمة في عملية التخمير، بالإضافة الى أنه استخدم بكتريا *Lactobacillus casei* NRRL B-441 وتركيز لاكتوز أولي 5.4%، في حين استخدم في الدراسة الحالية *Lactobacillus paracasei* وتركيز لاكتوز أولي 4.5%.

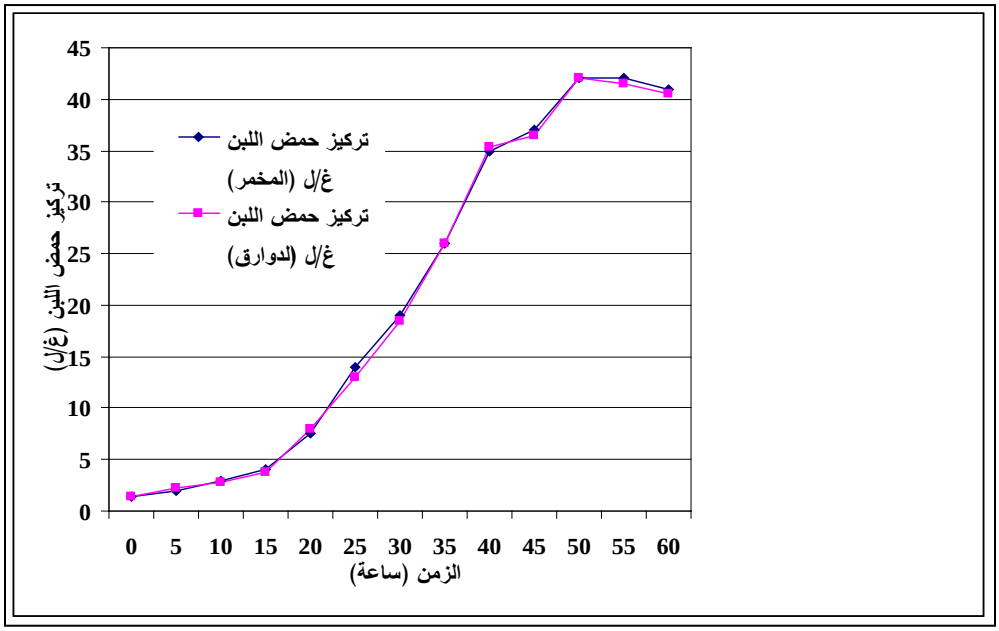


الشكل-37. تراكيز اللاكتوز وحمض اللبن والكتلة الحيوية الجافة لخلايا بكتريا *L. paracasei* الحرة المنماة في وسط مصل الجبن.

3-11- مقارنة إنتاجية حمض اللبن في المخمر والدوارق الهزازة:

تم توسيع نطاق دراسة التخمير باستخدام خلايا بكتريا *Lactobacillus paracasei* المقيدة في ألجينات الصوديوم في الدوارق الهزازة إلى المخمر. أُجريت عمليات التخمير في مخمر بحجم عمل قدره 1 لتر. جرى تنظيف المخمر وتجميعه وتجهيزه بمجسات معايرة مسبقاً، وجرى تحضير وسط التخمير (مصل الجبن) وتعقيمه، ومن ثم نقل إلى المخمر وأضيف إليه اللقاح (لقحت بكمية من حبيبات هلام ألجينات الكالسيوم المحتوية على بكتريا *Lactobacillus paracasei* المقيدة بحيث كان تركيز الخلايا المضافة إلى المصل يعادل (5×10^8 خلية/مل)، وتم تطبيق نتائج أمثلة ظروف عملية التخمير (درجة حرارة التحضين37 °م، درجة الحموضة(pH) 5.5، فترة التحضين 50 ساعة وسرعة التدوير المثالية في الحاضنة الهزازة 150 دورة في الدقيقة) ونتائج أمثلة إضافة المغذيات إلى وسط التخمير (مستخلص الخميرة 10غ/ل، فوسفات ثنائي البوتاسيوم 0.5غ/ل، كبريتات المغنزيوم 0.2غ/ل وكبريتات المنغنيز0.04غ/ل)، إذ تم تعديل درجة حرارة المخمر إلى 37 °م وسرعة التدوير 150 دورة في الدقيقة، وتم الحفاظ على درجة الحموضة(pH)عند 5.5 ± 0.1 من خلال الجرعات التلقائية لمحلول هيدروكسيد الكالسيوم بتركيز 10مول/ الليتر، من خلال المراقبة في الوقت الحقيقي في أثناء عملية التخمير.

يبين الشكل (38) المقارنة بين إنتاج حمض اللبن في المخمر والدوارق الهزازة باستخدام خلايا *L. paracasei* المقيدة في ألجينات الصوديوم، إذ لوحظ أنه بعد 50 ساعة من التخمير كانت كمية حمض اللبن المنتجة في المخمر وكذلك في الدوارق الهزازة هي 42 غ/ل، وتتوافق هذه النتائج مع ما ذكره (Büyükkileci, 2000) إذ لاحظ معدلات إنتاج مماثلة للمخمر والدوارق الهزازة.



الشكل-38. مقارنة إنتاج حمض اللبن في المخمر والدوارق الهزازة.

3-12- نتائج عمليات الفصل والتنقية:

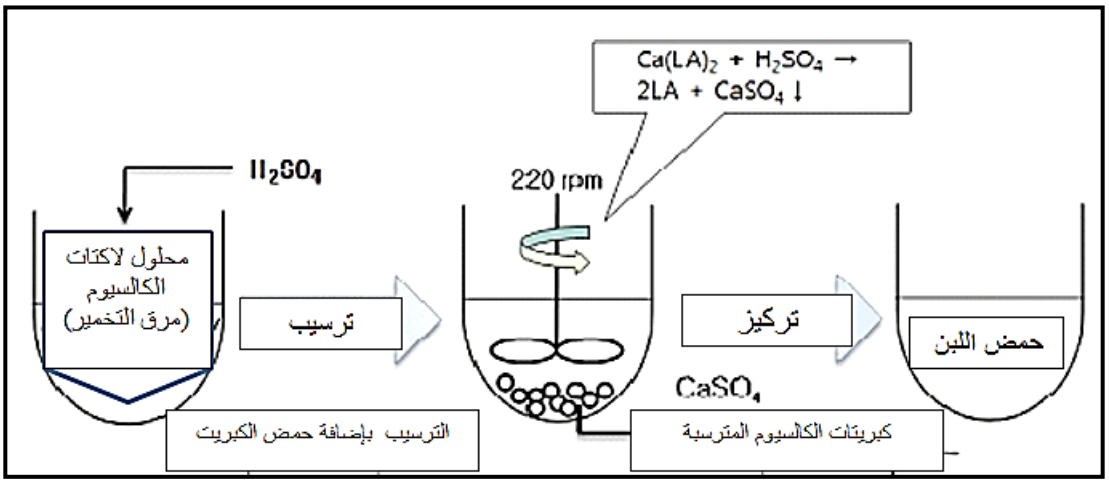
تمت عملية الفصل والتنقية وفق الخطوات الآتية:

1. اختيرت الخلايا المقيدة لإنتاج حمض اللبن المراد تنقيته في هذه الدراسة: لأن نواتج التخمر تكون خالية عموماً من الخلايا وبعض منتجاتها الثانوية، وهذا يؤدي إلى تسهيل عمليات الاستخلاص والتنقية النهائية، وفي هذه الدراسة كان إنتاج حمض اللبن من بكتريا (*Lactobacillus paracasei*) المقيدة في مادة ألجينات الصوديوم مساوياً (42 غ/ل).
2. الترويق (Clarification): إن تعديل الرقم الهيدروجيني للراشح الحاوي على حمض اللبن بهيدروكسيد الكالسيوم إلى (pH 10) ومعاملته حرارياً وطرده مركزياً ساعد في تحويل حمض اللبن إلى لاكتات الكالسيوم إضافة الى قتل البكتريا وتخثير بروتينات الوسط والتخلص من كربونات الكالسيوم الزائدة وتكسير السكريات المتبقية في الوسط (Vijayakumar *et al.*, 2008)، وبعد أن أهمل الراسب

عدلت درجة الحموضة(pH) في الراشح إلى 6.5–7، ويمثل الراشح الموصوف أعلاه المستخلص المروق.

3. الحصول على المنتج النهائي من حمض اللبن: استخدمت طريقة الترسيب(الشكل 39)، وهي طريقة بسيطة وفعالة لفصل حمض اللبن واستعادته من لاكتات الكالسيوم في المستخلص المروق بإضافة حمض الكبريت وفق المعادلة الآتية:

$$(CH_3–CHOH–COO)_2Ca + H_2SO_4 \longrightarrow 2CH_3–CHOH–CHOH + CaSO_4$$

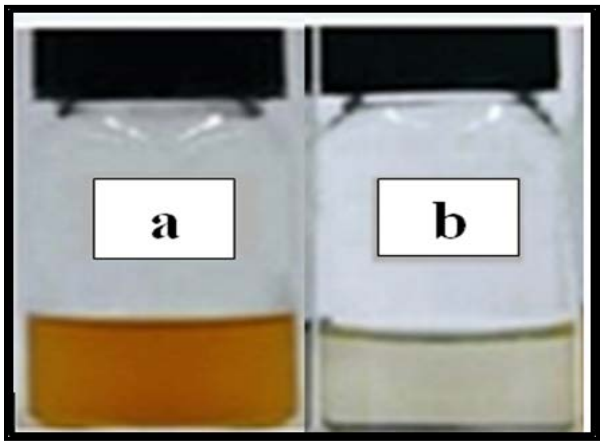


الشكل–39. فصل حمض اللبن واستعادته من لاكتات الكالسيوم في المستخلص المروق بإضافة حمض الكبريت. (Min *et al.*, 2011)

وأظهرت النتائج أنّ عملية الترسيب اكتملت بعد 18 ساعة من بدء التفاعل، ومن ثم أجريت عملية طرد مركزي على المستخلص المروق والمحمض ومن ثم رشحت كبريتات الكالسيوم وفصلت، وأخذ الراشح الطافي لإجراء التحاليل عليه، إذ تم الحصول على عائد مرتفع (90%) في استعادة حمض اللبن من مرق التخمير، وبلغت نقاوة حمض اللبن 71%، وقدرت أيونات الكالسيوم وأيونات الكبريتات فبلغت 0.15%، 0.18%

على الترتيب. وكانت هذه النتائج قريبة من النتائج التي ذكرها (Min *et al.*, 2011) في دراسته حول تأثير عوامل مختلفة في الترسيب لاستعادة حمض اللبن من مرق تخمير لاكتات الكالسيوم، فكان العائد من حمض اللبن من مرق تخمير لاكتات الكالسيوم 92% ونقاوة حمض اللبن 70.6%، وكانت نسبة أيونات الكالسيوم وأيونات الكبريتات 0.1%، 0.16% على الترتيب في الراشح الطافي.

4. إزالة الصباغ: استخدم الكربون المنشط لإزالة الصبغة (اللون الداكن) من حمض اللبن المستخرج من مرق التخمير، إذ تمت إزالة الصبغة البنية من الراشح الطافي كما هو مبين في الشكل (40)، وهذه النتيجة متوافقة ما ذكره (Pyo *et al.*, 2004)، إذ تمكنوا من إزالة الصبغة بالكربون المنشط بشكل أكثر فاعلية.



الشكل–40. تأثير الكربون المنشط في إزالة الصبغة (اللون) من مرق التخمير.

(a) مرق التخمير (الراشح الطافي)، (b) مرق التخمير (الراشح الطافي) بعد المعالجة بالكربون المنشط.

5. تركيز حمض اللبن: للحصول على تركيز عالٍ من حمض اللبن استخدمت طريقة (Min *et al.*, 2011)، إذ تم تعريض 100 ميليلتر من الراشح الطافي (تركيز حمض اللبن فيه 4.2%) لعملية تركيز عند 760 مم زئبقي عند درجة حرارة تبلغ 90 °م لمدة 100 دقيقة باستخدام جهاز التقطير

المرتد، ومن ثَمَّ تم الحصول على محلول تركيز حمض اللبن فيه 84%، أي أمكن تحقيق تركيز حمض اللبن بالقرب من تركيز حمض اللبن التجاري 85%.

3-13- مدى مطابقة حمض اللبن المنقى والمركز للمواصفة القياسية السورية:

يبين الجدول (23) مدى مطابقة حمض اللبن المنقى والمركز في هذه الدراسة للمواصفة القياسية السورية رقم 2715 لعام 2002، من حيث الخصائص الواجب توافرها في حمض اللبن عند استخدامه في الأغذية.

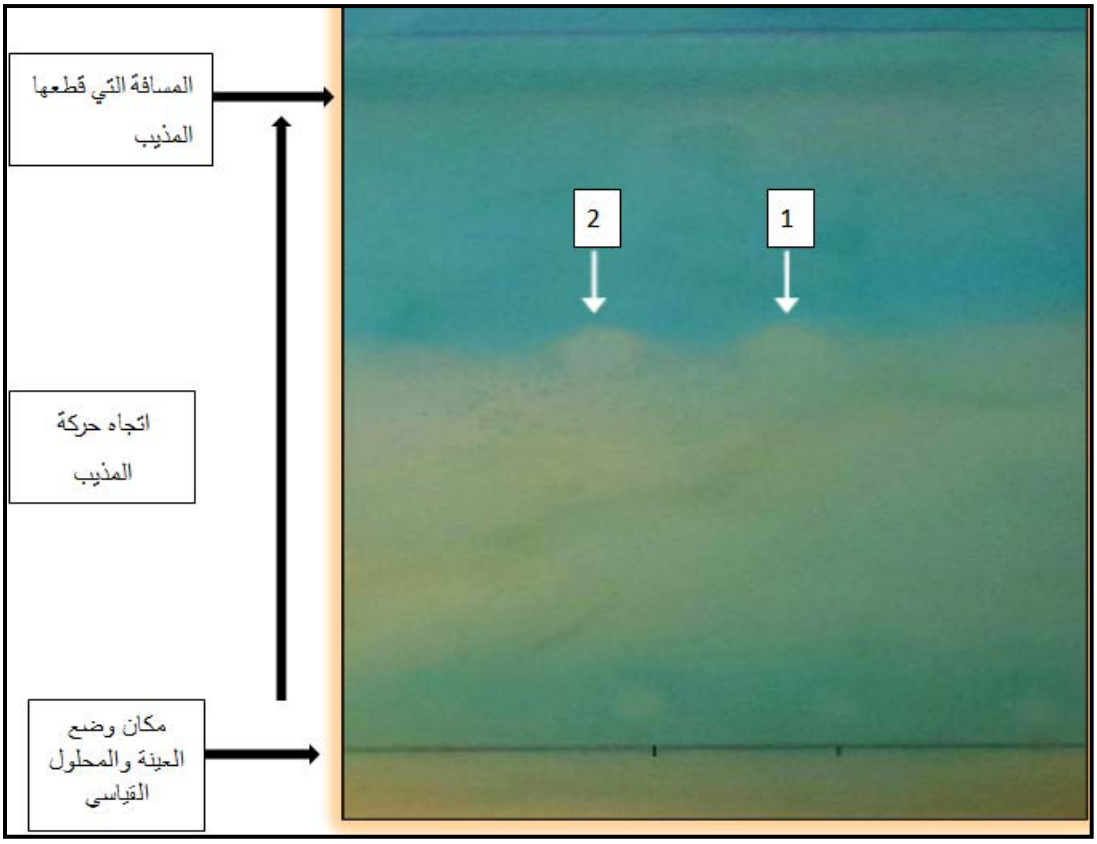
الجدول-23. مقارنة خصائص حمض اللبن المنقى والمركز مع خصائص حمض اللبن المستخدم في الأغذية الواردة في المواصفة القياسية السورية.

خصائص حمض اللبن	الاشتراطات في المواصفة	خصائص حمض اللبن المنقى والمركز
اللون	عديم اللون إلى أصفر قليلاً	أصفر قليلاً
الرائحة	عديم الرائحة	عديم الرائحة
القدرة على الامتزاج في الماء	يجتاز الاختبار	يجتاز الاختبار
القدرة على الامتزاج في الكحول	يجتاز الاختبار	يجتاز الاختبار
النقاوة %	105-95	71
الزرنيخ ملغ/كغ حد أقصى	3	0
الكلوريد (% بالكتلة، حد أقصى)	0.2	0.09
حمض الليمون أو الأوكزاليك أو الفوسفور أو الطرطير	يجتاز الاختبار	يجتاز الاختبار
المعادن الثقيلة محسوبة كـ pb ملغ/كغ حد أقصى	10	2
الحديد ملغ/كغ حد أقصى	10	3
البقايا بعد الحرق (% بالكتلة، حد أقصى	0.1	0.08
السكريات (%، حد أقصى)	0.1	0.4
الكبريت (%، حد أقصى)	0.25	0.18

نلاحظ من الجدول أنّ نتائج خصائص حمض اللبن المنقى والمركز في هذه الدراسة كانت ضمن حدود الاشتراطات في مواصفة حمض اللبن 2715 لعام 2002، عدا النقاوة فكانت 71% وهي أقل من حدود المواصفة (95–105%)، وهذا عائد إلى طريقة التنقية التقليدية المستخدمة في هذه الدراسة، والسكريات (اللاكتوز) كانت 0.4% وهي أعلى من حد المواصفة بمقدار 0.3%، وهذا عائد إلى عدم قدرة بكتريا *Lactobacillus paracasei* على تحويل كامل نسبة اللاكتوز (4.5%) إلى حمض لبن.

3-14- تحديد نوع المماكب من حمض اللبن المنقى بطريقة (TLC) كروماتوغرفيا الطبقة الرقيقة:

قيست قيمة (Rf) باستخدام Dioxane 90% كمذيب في عملية الفصل، وأسفرت عملية الترحيل عن ظهور بقعة غير منتظمة الشكل ذات لون أصفر على أرضية زرقاء بعد رش الصفيحة بكاشف (Bromocresol green) (الشكل 41)، وهي مشابهة للبقعة غير المنتظمة لحمض اللبن القياسي (L)، و حُسبت قيمة (Rf) لحمض اللبن الناتج من عملية التخمير إذ بلغت 0.671 وهي مقاربة لقيمة (Rf) لحمض اللبن القياسي (L) والتي بلغت0.675، وهذا يدل على أنّ حمض اللبن الناتج من عملية التخمير من النوع L. وجد Sajewicz وآخرون (2008) أنّ قيم (Rf) للنظيرين الضوئيين لحمض اللبن (L و D) بلغت على الترتيب (0.69 و0.88).



الشكل-41. تحديد نوع المماكب من حمض اللبن المنقى بطريقة (TLC) كروماتوغرفيا الطبقة الرقيقة

المسار 1 حمض اللبن القياسي L، المسار 2 حمض اللبن الناتج من عملية التخمير

3-15- استخدام تراكيز مختلفة من حمض اللبن في إطالة مدة حفظ لحم صدر الدجاج خلال التخزين المبرد:

3-15-1- الاختبارات الكيميائية:

درست بعض التغيرات الكيميائية لعينات قطع صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن بتراكيز 0، 1، 2 و3% على التوالي مدة 10 دقائق، خلال فترة التخزين التي امتدت 15 يوماً بدرجة حرارة 4±1 °م، بفواصل زمنية مقدارها 3 أيام (اليوم 0 (بداية المعاملة)، والأيام 3، 6، 9، 12 و15)، وكانت النتائج كالآتي:

1- درجة الحموضة (pH):

يبين الجدول (24) تغييرات درجة الحموضة(pH) لعينات قطع صدر الدجاج المعاملة بتراكيز مختلفة من حمض اللبن في أثناء مدة الحفظ.

الجدول-24. تغيرات درجة الحموضة(pH) في عينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن في أثناء مدة الحفظ.

مدة الحفظ/ يوم	المعاملات			
	0	1	2	3
0	5.55 ± 0.01^{c}	5.44 ± 0.01^{b}	5.35 ± 0.02^{a}	5.34 ± 0.02^{a}
3	5.81 ± 0.03^{c}	5.54 ± 0.01^{b}	5.45 ± 0.01^{a}	5.39 ± 0.03^{a}
6	6.23 ± 0.03^{c}	5.62 ± 0.02^{b}	5.50 ± 0.01^{a}	5.46 ± 0.02^{a}
9	6.49 ± 0.04^{c}	5.70 ± 0.03^{b}	5.65 ± 0.02^{b}	5.50 ± 0.01^{a}
12	6.77 ± 0.04^{d}	5.85 ± 0.02^{c}	5.73 ± 0.01^{b}	5.58 ± 0.02^{a}
15	6.88 ± 0.05^{d}	5.95 ± 0.02^{c}	5.83 ± 0.01^{b}	5.75 ± 0.01^{a}

تدل الأحرف المتشابهة في الصف الواحد على عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة $P \leq 0.05$.

يلاحظ من الجدول السابق وجود فروق معنوية بين المعاملات في الصف الواحد(عند مستوى ثقة $P<0.05$)، إذ نلاحظ أنه بعد التخزين لمدة 15 يوماً انخفضت درجة الحموضة(pH) لعينة الشاهد من 6.88 إلى 5.95 عند المعاملة بحمض اللبن تركيز 1%، وإلى 5.83 عند المعاملة بحمض اللبن تركيز2%، وإلى 5.75 عند المعاملة بحمض اللبن تركيز 3% إذ كانت هذه المعاملة أفضل المعاملات من حيث أقل درجة حموضة(pH).

كما يلاحظ من الجدول السابق أن قيمة رقم الـ pH في عينة صدر الدجاج غير المعاملة بحمض اللبن(الشاهد) قد وصلت إلى 6.23 بعد 6 أيام من التخزين المبرد، أي إنه قد وصل إلى رقم الـ pH ضمن المجال 6.1-6.3، الذي يجعل من اللحوم البيضاء وسطاً ملائماً لنمو الميكروبات للوصول إلى التعداد المسبب لظهور الفساد (10^7 وحدة مكونة للمستعمرة/غ) (El-khateib *et al.*, 1988; Johnston and Tompkin, 1992). في حين يلاحظ أن عينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن بنسبة 1% والمخزنة بشروط التبريد بحرارة 4±1 °م لمدة حتى 15 يوماً قد حافظت على رقم pH 5.95 وهو أقل من الحد الأدنى (6.1) المناسب لوصول أعداد الميكروبات إلى عتبة الفساد (10^7) (El-khateib *et al.*, 1988; Johnston and Tompkin, 1992)، في حين كان رقم الـ pH في العينات المعاملة بنسبة 2 و3% والمخزنة بشروط التبريد مدة 15 يوماً (5.83 و5.75، على التوالي)، كما يلاحظ أن رقم الـ pH في العينات غير المعاملة قد وصل إلى 6.49 بعد التخزين المبرد مدة 9 أيام، وهو يتجاوز رقم الـ pH في اللحوم الفاسدة أو غير الصحية وهو 6.4 بحسب Neuman (1983)، وهذا يعني عدم إمكانية تخزين لحم صدر الدجاج غير المعامل بحمض اللبن مدة تزيد عن 6 أيام، وإمكانية تخزين لحم صدر الدجاج المعامل بحمض اللبن بنسبة 1-3% حتى 15 يوماً في شروط التبريد بحرارة 4±1 °م.

2- رقم TBA:

يبين الجدول (25) قيم رقم TBA مقدراً بملغ مالون ألديهايد/كغ (MDA/kg) في عينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن بتراكيز 0، 1، 2 و3%، والمخزنة بحرارة 4±1 °م خلال مدة تخزين 15 يوماً.

الجدول-25. تغيرات رقم الـ TBA في عينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن في أثناء مدة الحفظ.

مدة الحفظ/ يوم	المعاملات			
	0	1	2	3
0	0.32 ± 0.02^{b}	0.27 ± 0.01^{a}	0.32 ± 0.02^{b}	0.26 ± 0.01^{a}
3	0.82 ± 0.03^{c}	0.44 ± 0.03^{b}	0.38 ± 0.04^{b}	0.28 ± 0.01^{a}
6	1.27 ± 0.05^{d}	0.65 ± 0.02^{c}	0.50 ± 0.01^{b}	0.37 ± 0.02^{a}
9	1.32 ± 0.04^{c}	0.82 ± 0.05^{b}	0.75 ± 0.04^{b}	0.57 ± 0.02^{a}
12	1.51 ± 0.03^{d}	1.24 ± 0.02^{c}	1.13 ± 0.01^{b}	0.82 ± 0.03^{a}
15	1.57 ± 0.03^{d}	1.31 ± 0.02^{c}	1.25 ± 0.01^{b}	0.88 ± 0.01^{a}

تدل الأحرف المتشابهة في الصف الواحد على عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة $P \leq 0.05$.

يلاحظ من الجدول السابق وجود فروق معنوية بين المعاملات في الصف الواخد (عند مستوى ثقة $P<0.05$).

يحصل الفساد في لحوم الدواجن بحسب المواصفة القياسية المصرية رقم 1090 لعام 2005، عندما يزيد رقم TBA عن 0.9 ملغ MDA/kg. يلاحظ أن رقم TBA في عينات الشاهد قد وصل إلى قيمة 1.27 ملغ مالون ألديهايد/كغ في اليوم السادس وهو دليل على حدوث الفساد حسب المواصفة السابقة، ووصل رقم TBA في عينات لحم صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن بنسبة 1% إلى 0.82 في اليوم التاسع من التخزين المبرد بحرارة 4±1 °م أي لم يتجاوز عتبة الفساد (0.9 ملغ MDA/kg) في أثناء مدة التخزين هذه، وكذلك الحال في العينات المعاملة بحمض اللبن بنسبة 2% (إذ وصل رقم TBA إلى 0.75 ملغ MDA/kg في اليوم التاسع من التخزين)؛ في حين وصل رقم TBA في العينة المعاملة بنسبة 3% إلى

0.88 ملغ MDA/kg في اليوم 15، وهذه المؤشرات تدل على إمكانية تخزين لحم صدر الدجاج غير المعامل بحمض اللبن (الشاهد) مدة 3 أيام في شروط التخزين المبرد، ولكن يمكن إطالة فترة حفظ العينات المعاملة بحمض اللبن بنسب 1% و2% إلى 9 أيام، والمعاملة بنسبة 3% إلى 15 يوماً وهذه النتائج تتوافق مع ما ذكره Khalafalla وآخرون (2016) من حيث إمكانية تخزين لحم صدر الدجاج في درجة حرارة 4±1 °م عند معاملته بحمض اللبن تركيز 3% لمدة 15 يوماً ، إذ لم يتجاوز رقم (TBA) 0.9 ملغ MDA/kg.

3-15-2- الاختبارات الحسية:

يبين الجدول (26) تغيرات المواصفات الحسية لعينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن بتراكيز 0 ، 1، 2 و3% في أثناء التخزين المبرد بحرارة 4±1 °م مدة 15 يوماً. شملت المواصفات الحسية المدروسة كلاً من اللون والرائحة والقوام، وأعطيت كل صفة من هذه الصفات درجة من 1 إلى 5، بحيث تعني الدرجة 1 أن الصفة سيئة جداً، و2 أن الصفة سيئة، و3 مقبولة، و4 جيدة، و5 جيدة جداً (Kenawi *et al.*, 2005; Lawless and Heymann, 1999).

الجدول–3. تغيرات الخصائص الحسية في عينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن في أثناء مدة الحفظ.

الصفات الحسية	مدة التخزين (يوم)	المعاملات			
		0	1	2	3
اللون	0	4.80	4.90	4.85	4.90
	3	4.70	4.85	4.80	4.90
	6	4.00	4.75	4.80	4.85
	9	3.00	4.65	4.75	4.85
	12	1.80	4.00	4.60	4.80
	15	1.00	3.80	4.00	4.80
الرائحة	0	4.70	4.85	4.95	4.95
	3	4.65	4.83	4.90	4.95
	6	3.30	4.70	4.85	4.85
	9	2.50	4.50	4.60	4.70
	12	1.80	4.40	4.50	4.55
	15	1.00	3.80	4.00	4.45
القوام	0	4.85	4.87	4.90	4.90
	3	4.00	4.85	4.85	4.90
	6	3.70	4.30	4.60	4.75
	9	3.30	4.30	4.50	4.65
	12	3.00	3.80	3.85	4.50
	15	1.80	3.70	3.90	4.20
متوسط القبول العام	0	4.78	4.87	4.90	4.91
	3	4.45	4.84	4.85	4.90
	6	3.66	4.58	4.75	4.81
	9	2.85	4.48	4.61	4.73
	12	2.20	4.06	4.20	4.61
	15	1.26	3.76	3.96	4.48

يلاحظ من الجدول السابق أن عينات الشاهد قد بقيت مقبولة حتى اليوم 9 من حيث اللون، والرائحة واليوم 12 من حيث القوام؛ مقارنة بالعينات المعاملة بنسبة 1، 2 و3% التي بقيت مقبولة من حيث المواصفات الحسية كافة حتى نهاية فترة التخزين الممتدة حتى 15 يوماً. وهذه النتائج تتوافق إلى حد كبير مع ما توصل إليه Zeitoun وDebevere (1990) اللذان درسا تأثير معاملة أرجل الدجاج بحمض اللبن بنسب 5،

7.5 و10%، المخزنة بحرارة 6 °م مدة 12 يوماً، على المواصفات الحسية، وهي الرائحة والمظهر الخارجي للحم النيئ وطعم اللحم المقلي بحرارة 170 °م مدة 13 دقيقة، ووجدا أن هذه المعاملات لم تؤثر سلبياً في المواصفات الحسية السابقة طوال فترة التخزين، باستثناء العينات المعاملة بنسبة 10%، بسبب انخفاض رقم الـ pH إلى أقل من 4.4 منذ بداية المعاملة، في حين ظهرت علامات الفساد التي تمثلت بإنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين في اليوم التاسع في عينات الشاهد، وتأخر ظهورها حتى اليوم 11 في العينات المعاملة بنسبة 5%، واليوم 12 في العينات المعاملة بنسبة 7.5%.

3-15-3- الاختبارات الميكروبيولوجية:

1- تعداد البكتريا الهوائية الأليفة للحرارة المتوسطة:

يبين الجدول (27) تغيرات تعداد البكتريا الهوائية أليفة الحرارة المتوسطة في أثناء التخزين المبرد لعينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن بتراكيز 1، 2 و3% ومقارنتها بعينة الشاهد غير المعاملة بحمض اللبن في أثناء التخزين المبرد.

الجدول-27. تغيرات أعداد البكتريا الهوائية المحبة للحرارة المتوسطة في عينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن في أثناء مدة الحفظ.

المعاملات	تعداد البكتريا الهوائية أليفة الحرارة المتوسطة (log CFU/g) في أثناء مدة الحفظ (يوم)					
	0	3	6	9	12	15
0	5.20	6.25	6.97	8.55	9.20	9.65
1	5.10	5.64	6.40	7.15	7.80	8.50
2	4.70	5.12	5.75	6.65	7.15	8.20
3	4.62	5.05	5.61	6.35	6.90	6.98

لوحظ من خلال هذه الدراسة تزايد تعداد البكتريا الهوائية أليفة الحرارة المتوسطة مع ازدياد مدة الحفظ بالتبريد، إذ وصلت إلى حد الفساد في اليوم التاسع، وهذا يتفق مع ما ذكره (Del Rio, 2007) بأن التعداد الميكروبي العام يزداد في اللحوم المخزنة بجو التبريد خلال أسبوع من الحفظ ليصل إلى رقم الفساد (7 log CFU/g)، كما نصت المواصفة القياسية السورية الخاصة بالاشتراطات الخاصة بالأحياء الدقيقة الواجب تحققها في المنتجات الغذائية رقم 2179 لعام 2007 على أن التعداد الكلي للبكتريا في الدجاج الطازج والمبرد يجب ألا يزيد عن 10^7 وحدة مكونة للمستعمرة/غ. لكن هذا الازدياد تناقص بارتفاع تركيز حمض اللبن المستخدم في المعاملات، وأن أفضل معاملة هي استخدام حمض اللبن بتركيز 3% إذ وصل تعداد البكتريا الهوائية أليفة الحرارة المتوسطة إلى 6.98 log cfu/g في اليوم 15 خلال التخزين المبرد، في حين بقيت العينات المعاملة بحمض اللبن بتركيز 1% مقبولة حتى اليوم السادس، حيث كانت 6.40 log cfu/g، وبقيت العينات المعاملة بحمض اللبن بتركيز 2% مقبولة حتى اليوم التاسع إذ كانت 6.65 log cfu/g.

2- التحري عن وجود بكتريا السالمونيلا:

وجد أن جميع عينات صدر الدجاج سواء المعاملة بحمض اللبن أو غير المعاملة كانت خالية من بكتريا السالمونيلا.

3- تعداد بكتريا *Pseudomonas*:

أجري تعداد بكتريا *Pseudomonas* لعينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن بنسب 1،2 و3% ومقارنتها بعينة الشاهد غير المعاملة بحمض اللبن، والجدول (28) يبين نتائج تعداد هذه البكتريا في العينات المعاملة وعينة الشاهد في أثناء التخزين المبرد بحرارة 4±1 °م.

الجدول-28. تغيرات تعداد بكتريا *Pseudomonas* في عينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن في أثناء مدة الحفظ.

المعاملات	تعداد بكتريا *Pseudomonas* (log CFU/g) في أثناء مدة الحفظ (يوم)					
	0	3	6	9	12	15
0	3.46	4.60	5.57	5.35	7.60	7.77
1	3.21	4.30	5.27	5.02	6.30	6.72
2	3.02	4.05	4.95	4.77	5.60	5.54
3	2.60	3.45	4.46	4.22	4.80	5.27

وجد Doulgeraki و Nychas (2013) أن تعداد بكتريا *Pseudomonas* قد وصل إلى 7-8 log CFU/g خلال سبعة أيام في لحم الدجاج المحفوظ بالتبريد في ظروف عدم التغليف، إذ تنمو البكتريا المتحملة للبرودة ومنها *Pseudomonas* على اللحوم الطازجة الملوثة بهذا النوع من البكتريا خلال ثلاثة أيام بحرارة 7 °م (Jay, 2002)، لتسبب ظهور رائحة الفساد عندما يصل تعداد البكتريا إلى 10^7-10^8 CFU/g نتيجة لاستهلاك الغليكوجين وتفكيك البروتينات وإنتاج الأحماض الأمينية بكثرة (Nychas *et al.*, 2008)، إذ يستهلك الغليكوجين في الطبقات السطحية فتتغلغل بكتريا *Pseudomonas* وينتج عن هذا التغلغل تفكيك البروتينات المصحوب بإطلاق الأمونيا والأمينات والكبريتيد (Koutsoumanis *et al.*, 2008)، وفي مثل هذه الحالة تتنافس البكتريا المحللة للبروتين مع مجموعات البكتريا الأخرى من جنس *Pseudomonas* لتتغلغل إلى الطبقات العميقة في اللحوم وتحدث الفساد (Nychas *et al.*, 2008). وقد اعتُمد الرقم 7.5 log CFU/g لبكتريا *Pseudomonas* في لحوم الدواجن للإشارة إلى فساد هذه اللحوم وعدم صلاحيتها للاستهلاك البشري، مع مراعاة النظر إلى المواصفات الحسية من رائحة وقوام ولون، إذ سُجل انتشار رائحة كريهة وظهور لون متغير عن اللون الطبيعي عند الوصول إلى هذا الرقم لتعداد بكتريا *Pseudomonas* (Pruckner *et al.*, 2012). يلاحظ من الجدول السابق أن عينات الشاهد قد بقيت مقبولة حتى اليوم 9 إذ كان تعداد بكتريا *Pseudomonas* 5.35 log CFU/g؛ مقارنةً

بالعينات المعاملة بنسبة 1، 2 و3% التي بقيت مقبولة من حيث تعداد بكتريا *Pseudomonas* حتى نهاية فترة التخزين الممتدة حتى 15 يوماً.

4- تعداد بكتريا الكوليفورم:

يبين الجدول (29) نتائج إجراء تعداد بكتريا الكوليفورم لعينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن بنسب 1، 2 و3% ومقارنتها بعينة الشاهد غير المعاملة بحمض اللبن.

الجدول-29. تغيرات تعداد بكتريا الكوليفورم في عينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن في أثناء مدة الحفظ.

المعاملات	تعداد بكتريا الكوليفورم (log cfu/g) في أثناء مدة الحفظ (يوم)					
	0	3	6	9	12	15
0	2.5	2.95	3.94	4.85	5.5	6.40
1	1.60	1.95	2.92	3.87	4.45	5.15
2	1.54	2.26	2.30	3.18	4.06	4.43
3	1.46	1.09	1.28	2.14	3.05	3.35

يبين الجدول (31) تزايد تعداد بكتريا كوليفورم في جميع العينات مع ازدياد مدة التخزين، وهذا يتوافق مع ما ذكره Del Rio وآخرون (2007) و Kenawi وآخرون (2005) و Soccol و Oetterer (2005). وأشار Saucier وآخرون (2000) إلى أن الحد المسموح به لبكتريا الكوليفورم في لحم الدجاج الطازج في المواصفة الكندية يجب ألا يتجاوز 3 log cfu/g، لكن هذا الازدياد تناقص بارتفاع تركيز حمض اللبن المستخدم في المعاملة، وأن أفضل معاملة هي استخدام حمض اللبن بتركيز 3%، حيث وصل تعداد بكتريا الكوليفورم إلى 3.05 log cfu/g في اليوم 12 خلال التخزين المبرد.

5- تعداد الخمائر والفطور:

أجري تعداد الخمائر والفطور خلال مدة التخزين المبرد حتى 15 يوماً على عينات صدر الدجاج، والجدول (30) يبين تعداد الخمائر والفطور (log cfu/g) في العينات مع تقدم فترة التخزين.

الجدول-30. تغيرات تعداد الخمائر والفطور في عينات صدر الدجاج المعاملة بحمض اللبن في أثناء مدة الحفظ.

المعاملات	تعداد الخمائر والفطور (log cfu/g) في أثناء مدة الحفظ (يوم)					
	0	3	6	9	12	15
0	4.15	4.75	4.80	5.30	6.50	7.30
1	4.08	4.40	4.35	4.39	4.65	5.03
2	3.31	4.15	4.19	4.35	4.61	5.50
3	3.20	3.84	3.85	4.10	4.45	4.55

يلاحظ من الجدول السابق ازدياد تعداد الخمائر والفطور مع تقدم فترة التخزين المبرد، لكن هذا الازدياد تناقص بارتفاع تركيز حمض اللبن المستخدم في المعاملة، وأنَّ أفضل معاملة هي استخدام حمض اللبن بتركيز 3%، وأن جميع المعاملات الأخرى قد تجاوز تعداد الخمائر والفطور المسجل من قبل Jimenez وآخرين (1997)، الذين وجدوا أن تعداد الخمائر والفطور على سطح اللحوم يتراوح بين 1.3 و4.8 log cfu/g.

3-16- دراسة التقييم الاقتصادي لعملية إنتاج حمض اللبن من مصل الأجبان مخبرياً:

قُيِّمت العملية المتكاملة لإنتاج حمض اللبن بتركيز 84% من الدرجة الغذائية اقتصادياً باستخدام البيانات الفنية التي تم الحصول عليها على نطاق المختبر، إذ حسبت تكاليف إنتاج 50 مل من حمض اللبن بتركيز 84% من 1 لتر من مصل الجبن، كما هو مبين في الجدول (31).

الجدول–31. تكاليف إنتاج 50 مل من حمض اللبن بتركيز 84% من 1 لتر من مصل الجبن.

مرحلة الانتاج	تكلفة مرحلة الانتاج(ل.س)		ملاحظات
تحضير اللقاح وإضافته إلى المصل	تنشيط اللقاح	200	التكلفة تتضمن تكلفة تنشيط خلايا البكتريا في وسط مرق MRS ومن ثم تقييدها في ألجينات الصوديوم 2%، كلوريد الكالسيوم 2%، ماء الببتون 0.1%
	تقييد (ألجينات الصوديوم)	100	
تحضير مصل الجبن كوسط للتخمير	الركيزة (مصل الجبن)	0	تتضمن العملية تعقيم الوسط وإزالة البروتينات المترسبة
	تعقيم الركيزة	0	
	إزالة البروتينات المترسبة	0	
تعديل درجة الحموضة بإضافة كربونات الكالسيوم 30 غ/ل وهيدروكسيد الكالسيوم	200		
إضافة مستخلص الخميرة 10 غ/ل	288		
إضافة كبريتات المعنزيوم 0.2 غ/ل	70		
إضافة كبريتات المنغنيز 0.04 غ/ل	30		
إضافة فوسفات ثنائية البوتاسيوم 0.5 غ/ل	50		
تعديل درجة حموضة الراشح (هيدروكسيد الكالسيوم 1ع)	55		
الترسيب: باستخدام حمض الكبريت النسبة المولية 1:1 هي $Ca(LA)_2/H_2SO_4$	154		
إزالة الصباغ (9 غ فحم منشط/لتر)	50		
تركيز حمض اللبن بالتبخير	0		
مجموع التكاليف الكلية (ل.س)	1197		

نستنتج من الجدول السابق أنّ تكلفة إنتاج 50 مل من محلول حمض اللبن بتركيز 84% هي (1197 ل.س)، ومن ثمَّ تكون تكلفة إنتاج 1 لتر من حمض اللبن بتركيز 84% هي (23940 ل.س)، في حين تبلغ قيمة 1 لتر من محلول حمض اللبن بتركيز 84% المستورد (30000 ل.س). ونستنتج أنَّ تكلفته مخبرياً أقل من سعر السوق، لأنه لم يتم احتساب تكاليف الكهرباء وأجور العمالة وأجور نقل مصل الجبن أو ثمنه. نلاحظ من الجدول (33) أنَّ تكلفة مستخلص الخميرة هي المساهمة الرئيسة في تكلفة الإنتاج، إذ بلغت نسبتها 24%، وهذه النسبة قريبة من النسبة التي ذكرها (González *et al.*, 2007) التي بلغت 25%.

الفصل الرابع

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions

and

Recommendations

4- الاستنتاجات CONCLUSIONS:

1. تفاوتت قدرة عزلات بكتريا حمض اللبن على إنتاج حمض اللبن، إذ تراوحت كميته المنتجة ما بين 13.33 غ/ل للعزلة P4 كروية الشكل و28.12 غ/ل للعزلة Y7 العصوية، وبينت نتائج التشخيص بوساطة شريط API 50 CHL وكذلك نتائج اختبار RT-PCR أن العزلة Y7 المتفوقة في إنتاج حمض اللبن تنتمي للنوع *Lactobacillus paracasei* المعزولة من اللبن الرائب.

2. تبين أن نتائج أمثلة ظروف عملية التخمير لإنتاج حمض اللبن كانت كالآتي: درجة حرارة التحضين 37 °م، درجة الحموضة(pH) 5.5، فترة التحضين 50 ساعة وسرعة التحريك في الحاضنة الهزازة 150 دورة في الدقيقة، وأظهرت النتائج إنتاج (32.59 غ/ل) من حمض اللبن نظرياً، و(32.650 غ/ل) عملياً.

3. تبين أن نتائج أمثلة إضافة المغذيات لإنتاج حمض اللبن كانت كالآتي: مستخلص الخميرة 10 غ/ل، فوسفات ثنائية البوتاسيوم 0.5 غ/ل، كبريتات المغنزيوم 0.2 غ/ل وكبريتات المنغنيز 0.04 غ/ل، وأظهرت النتائج إنتاج (37.6 غ/ل) من حمض اللبن نظرياً، و(37.9 غ/ل) عملياً.

4. بلغ إنتاج حمض اللبن من بكتيريا *Lactobacillus paracasei* الحرة المعزولة محلياً(37.9غ/ل)، ولكن عندما قيدت في مادة ألجينات الصوديوم كان إنتاجها (42 غ/ل)، أي زادت إنتاجية حمض اللبن عند تثبيت تلك الخلايا بمقدار 10.82%.

5. أمكن استخدام خلايا بكتيريا *Lactobacillus paracasei* المعزولة محلياً المقيدة بألجينات الصوديوم في إنتاج حمض اللبن من مصل الجبن بطريقة الدفعات لست دورات تخميرية، ولوحظ في الدورة السابعة تحطم وتشقق في حبيبات الهلام.

6. في ظل الظروف المثلى، حُسب عائد الإنتاج من حمض اللبن (Yp/s) فكان 0.85 غ حمض لبن لكل 1 غ لاكتوز، وبلغت الإنتاجية من حمض اللبن 0.73 غ/ل/سا، كما حُسب عائد النمو (Yx/s) فكان 0.1 غ خلية جافة لكل غ اللاكتوز، وحُسب أقصى معدل نمو (μmax) فكان 0.11 غ خلية جافة/ ساعة.

7. لا فرق بين إنتاج حمض اللبن في المخمر والدوارق الهزازة باستخدام خلايا *L. paracasei* المقيدة في ألجينات الصوديوم، إذ لوحظ معدلات إنتاج مماثلة لكليهما.

8. تبيَّن أنّ خصائص حمض اللبن المنقى والمركز في هذه الدراسة كانت ضمن حدود الاشتراطات في مواصفة حمض اللبن 2715 لعام 2002، عدا النقاوة فكانت 71% وهي أقل من حدود المواصفة (95–105%)، والسكريات (اللاكتوز) كانت 0.4% وهي أعلى من حد المواصفة بمقدار 0.3%.

9. تم فصل حمض اللبن واستعادته من لاكتات الكالسيوم في المستخلص المروق بإضافة حمض الكبريت، وأظهرت النتائج أنّ عملية الترسيب اكتملت بعد 18 ساعة من بدء التفاعل، إذ تم الحصول على عائد مرتفع (90%) في استعادة حمض اللبن من مرق التخمير، وبلغت نقاوة حمض اللبن 71%، وقدرت أيونات الكالسيوم وأيونات الكبريتات فبلغت 0.15% و0.18% على الترتيب.

10. تمت إزالة الصبغة (اللون) من حمض اللبن المستخرج من مرق التخمير بالمعالجة بالكربون المنشط.

11. بينت كروماتوغرفيا الطبقة الرقيقة أنّ حمض اللبن الناتج من عملية التخمير من النوع L.

12. حافظت المعاملة 3 (تركيز حمض لبن 3%) على صفات حسية جيدة تضمنت(اللون والرائحة والقوام)، ومحتوى مكروبي مسموح به، وقللت من قيمة TPA (درجة أكسدة اللبيدات) خلال التخزين المبرد مدة 15 يوماً.

5- المقترحات والتوصيات RECOMMENDATIONS:

1. تشجيع معامل الأجبان على الاستفادة من مصل الجبن بدلاً من التخلص منه في مياه الصرف الصحي والأنهار المجاورة، وذلك لتحقيق غايتين:

- إنتاج حمض اللبن محلياً بتكلفة قليلة نسبياً.
- التقليل من تلوث البيئة الذي يحدثه مصل الجبن كمنتج ثانوي لصناعة الجبن.

2. دراسة مواد أولية أخرى في إنتاج حمض اللبن، مثل بقايا المحاصيل الزراعية (أعواد الذرة وأكوازها، ....إلخ) ومخلفات معامل العصائر (تفل التفاح والبرتقال وتفل الشوندر السكري.... إلخ).

3. دراسة سلالات أخرى من بكتريا حمض اللبن في إنتاج حمض اللبن من مصل الجبن.

4. استخدام أكثر من سلالة في الوقت نفسه ، في حال استخدام أكثر من مادة أولية مع بعضها لإنتاج حمض اللبن.

المراجع العلمية

References

6- المراجع العلمية REFERENCES:

- **المراجع العربية**

المواصفة القياسية السورية رقم 2715 لعام 2002 الخصائص الواجب توافرها في حمض اللبن عند استخدامه في الأغذية.

المواصفة القياسية السورية رقم 2179 لعام 2007 الخاصة بالاشتراطات الخاصة بالأحياء الدقيقة الواجب تحققها في المنتجات الغذائية.

المواصفة القياسية المصرية رقم 1090 لعام 2005 الخاصة بالدجاج والأرانب المجمدة.

عزيزية، عبد الحكيم.(2010) . تأثير المعاممة بحمض الفيوماريك وحمض اللبن في المحتوى الميكروبي والصفات الحسية لعجينة لحم البقر المفروم خلال التخزين المبرد. **مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية – سلسلة العلوم البيولوجية المجلد** (23)العدد (3).

- **المراجع الأجنبية**

Abdel-Naby, M., Mok, C. and Lee, C. (1992). Production of organic acids from enzymatic hydrolyzate of starch by immobilized lactic acid bacteria. In **Proceedings of the UNIDO International Workshop on Lactic Acid Fermentation of Non-Dairy Food and Beverages**, Songnam, Korea, 25–27 June 1992. pp 227-243.

Abdel-Rahman, M. A. and Sonomoto, K. (2016). Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid. **J. Biotechnol.**, 236, 176-192.

Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y. and Sonomoto, K. (2011). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. **J. Biotechnol.**, 156(4), 286-301.

Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y. and Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnol. Adv.**, 31(61), 877-902.

Adthalungrong, C. and Temviriyanukul, S. (2010). Optimization of lactic acid production from tapioca starch hydrolysate by Lactobacillus casei TISTR 453. **KKU Res. J.**, 15(5).

Alkaya, E., Kaptan, S., Ozkan, L., Uludag-Demirer, S. and Demirer, G. N. (2009). Recovery of acids from anaerobic acidification broth by liquid–liquid extraction. **Chemosphere**, 77(8), 1137-1142.

Altaf, M., Naveena, B. J. and Reddy, G. (2007). Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. **Bioresource Technology**, 98, 498-503.

AL-Tayie, S. R. M. (2008). Production and Purification of Lactic Acid from Immobilized Lactobacillus Local Isolates. **Master of Science in Biology**. A Thesis Submitted to the College of Science University of Kerbala.

Altıok, D., Tokatl, F. and Harsa, S. (2006). Kinetic modelling of lactic acid production from whey by Lactobacillus casei (NRRL B-441). **J Chem Technol Biotechnol.**, 81, 1190-1197.

AOAC. (2005). Official Methods of Analysis of the AOAC, 17th ed Vol. II, 33: Methods **926.08, 2000.18, 933.05, 2001.14, 935.42, 920.124,** AOAC International, Gaithersburg, MD.

Arasaratnam, V., Senthuran, A. and Balasubrama-niam, K. (1996). Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by Lactobacillus delbrueckii. **Enzyme and Microbial Technology**, 19(7), 482-486.

Argenta, A. B. and Scheer, A. D. P. (2019). Membrane Separation Processes Applied to Whey: A Review. **Food Reviews International**, 1–30.

Arihara K. and Luchansky 1. B. (1995). Dairy Lactobacilli, In Food biotechnologymicroorganisms, edited by Hui, Y. H. and Khachatourians G. G., **Wiley-VCH**, USA, 609-664.

Benninga, H. A. (1990). A History of Lactic Acid Making, **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, Netherlands.

Benson, H. J. (2001). Microbiological applications laboratory manual in general microbiology. In microscope slide techniques. 8th edition. **The McGraw-Hill**. Pp. 64-68.

Biddy, M. J., Scarlata, C. J. and Kinchin, C. M. (2016). Chemicals from Biomass: A Market Assessment of Bioproducts With Near-Term Potential; **NREL Report NREL/TP-5100-65509**, National Renewable Energy Laboratory, USA.

Boyaval, P. and Goulet, J. (1988). Optimal conditions for production of lactic acid from cheese whey permeate by Ca-alginate entrapped Lactobacillus helveticus. **Enzyme Microbiol Technol.**, 10, 725-728.

Bruckner, S., Albrecht, A., Petersen, B. and Kreyenschmidt, J. (2012). Characterization and comparison of spoilage processes in fresh pork and poultry. **J. Food Qual.**, 35, 372-382.

Busairi, A. M. (2002). Lactic Acid Fermentation of Pineapple Wastes Fermentation Using Lactobacillus Delbrueckii. **University Technology of Malaysia**, PhD Thesis.

Busairi, A. M. (2010). Effect of Nitrogen Source and Initial Sugar Concentration on Lactic acid Fermentation of Pineapple Waste Using L. delbrueckii. **Teknik**, 31, No.1, ISSN 0852-1697.

Büyükkileci , A. O. (2000). L(+) Lactic Acid Production From Whey Lactobacillus Casei NRRL B-441. **Master of Science**. Department of biotechnology. Izmir Institute of Technoloy, Turkey.

Büyükkileci, A. O. and Harsa, S. (2004). Batch production of L(+) lactic acid from whey by Lactobacillus casei (NRRL B-441). **J Chem Technol Biotechnol.**, 79, 1036-1040.

Cachon, R. and Diviès, C. (1993). Difference of behaviour between free and immobilized lactic acid bacteria, in Proceedings of the First Lactic Acid Bacteria Computer Conference, ed by Foo, E. L., Griffin, R., Moellby, R. and Heden, C G., **Horizon Scientific Press**, Wymondham, pp 69-71.

Carvalho, F., Prazeres, A. R. and Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Sci. Total Environ.**, 445, 385–396

Cassano, A., Conidi, C. and Castro-Muñoz, R. (2019). Current and Future Applications of Nanofiltration in Food Processing. In **Separation of Functional Molecules in Food by Membrane Technology**; Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 305–348.

Castillo Martinez, F. A., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti A. and Oliveira, R. P. S. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends Food Sci. Tech.**, 30(1), 70-83.

Chavarri, M., Maranon, I., Ares, R., Ibanez, F. C., Marzo, F. and Mdel, C.V. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**. 142(1-2), 185-189.

Coelho, L F., de Lima, C. J. B., Rodovalho, C. M., Bernardo, M. P. and Contiero, J. (2011). Lactic acid production by new lactic acid production by new Lactobacillus plantarum LMISM6 grown in molasses: Optimization of medium composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 28, 27-36.

Cosansu, S., Tag, S. and Ayhan, K. (2011). Effects of lactic and acetic acids on sensory properties and shelf life of chicken meats Investigations during refrigerated and frozen storage. **Fleischwirtschaft International**, 26, 74.

Curry, B. and Crow, V. (2003a) Lactobacillus casei group. In Roginski, H., Fuquay, J. W. and Fox, P. F. (Eds.). **Encylcopedia of Dairy Sciences**, (3), 1488-1493, London: Academic Press.

Curry, B. and Crow, V. (2003b). Lactobacillus spp.: General characteristics.In Roginski, H., Fuquay, J. W. and Fox, P. F. (Eds.). **Encylcopedia of Dairy Sciences**, (3), 1479-1484, London: Academic Press.

Dainty, R. H. and Mackey, B. M. (1992): The Relationship Between The Phenotypic Properties Of Bacteria From Chill-Stored Meat And Spoilage Processes. **Journal of Applied Bacteriology, Symposium Suppl.**, 21, 103S-114S.

Datta, R. and Henry, M. (2006). Lactic acid: Recent advances in products, processes and technologies–A review. **J. Chem. Technol. Biot.**, 81(7), 1119-1129.

Davidson, P. M., Sofos, J. N. and Branen, A.L. (2005). Antimicrobials In Food, 3rd Edn., **CRC Press**, Boca.

Del Rio, E. and Panizo-Maron, M. (2007). Effect of various chemical decontamination treatment on natural microflora and sensory characteristics of poultry. **Intern. J. Food Microbio.**, 115, 280-286.

deLima, C. J. B., Coelho, L. F., Da Silva, G. P., Alvare, G. L. and Contiero, J. (2010). L(+) Lactic acid Production by New Lactobacillus Rhamnosus B 103. **Journal of Microbial &Biochemical Technology**, 2(3), 064-069.

Dellaglio, F., Dicks, L.M.T. and Torriani, S. (1995). The genus Leuconos. oc, Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H., Eds., **The Genera Of Lactic Acid Bacteria**. Vol. 2., Aspen Publishers, Gaithersburg, MD., 235-278.

DJC. (2009). Food and Drug Act, Department of Justice Canada. Http://Laws.Justice.Go.Ca/En/Showtdm/Cr/C.R.C.-C.870

Doores, S. (2005). Organic acids. In: Antimicrobials in food, 3rd Edn., Davidson, P. M., Sofos, J. N. and Branen A. L. (Ed.). **CRC Press**, FL, 91-142.

Doulgeraki, A. L. and Nychas, G. J. E. (2013). Monitoring the succession of the biota grown on a selective medium for Pseudomonads during storage of minced beef with molecular-based methods. **Food Microb.**, 34, 62-69.

Dumbrepatil, A. Adsul, M., Chaudhari, S., Khire, J. and Gokhale, D. (2008). Utilization Of Molasses Sugar For Lactic acid Production By Lactobacillus delbrueckii Subsp. Delbrueckii Mutant UC-3 Batch Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, 74, 333- 335.

EL- Hawary, F., Selim, I. A. and Omar, S. A. (2009). Production of L(+) Lactic Acid From Whey By Immobilized Whole Cells of Lactobacillus delbrueckii and Lactobacillus gasser. **The First International Conference of Food Industries and Biotechnology & Associateted Fair**.

El-Gendy, N. S., Abidin, Z. Z., Abu Amr, S. S. and Nassar, H. N. (2015). Statistical optimization of alginate immobilization process of Candida stauntonica strain MY1 for bioethanol production. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 4(3), 397-420.

EL-Khateib, T., Abd El-Rahman, H., Hamdy, M. and Lotfi, A. (1988). Poultry meat production in Egypt "Proximal chemical composition and microbiological quality". **Fleischwirtsch**, 68(6), 756-757.

Eom, I.-Y., Oh, Y.-H., Park, S. J., Lee, S.-H. and Yu, J.-H. (2015). Fermentative L-lactic acid production from pretreated whole slurry of oil palm trunk treated by hydrothermolysis and subsequent enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technol.**, 185, 143-149.

Findlay, J. (2011). Klebsiella pneumoniae: a progression to multidrug resistance. PHD. Thesis. **University of Edinburgh**. P. 89.

Fitzpatrick, J. J., Ahrens, M. and Smith, S. (2001). Effect of manganese on Lactobacillus casei fermentation to produce lactic acid from whey permeate. **Proc Biochem.**, 36, 671-675.

Gamal, A., Ibrahim, Y. A., Mawgoud, N. M., Dabiza1, O. and Sharaf, M. and Mohamedm F. E. (2017). Optimization of lactic acid production from supplemented whey permeate using immobilized Lactobacillus plantarum. **Middle East Journal of Applied Sciences**, 07,794-804.

Gao, C., Ma, C. and Xu, P. (2011). Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. **Biotechnol. Adv.**, 29(6), 930-939.

Gao, M., Shimamura, T., Ishida, N., Nagamori, E., Takahashi, H., Uemoto, S., Omasa, T. and Ohtake, H. (2009). Extractive lactic acid fermentation with tri-n-decylamine as the extractant. **Enzyme Microb. Tech.**, 44(5), 350-354.

Garg, N. and Hang, Y. D. (1995). Microbial production of organic acids from carrot processing waste. **J. Food Sci. Technol.**, 32, 119-121.

Ghaly, A. E., Tango, M. S. A. and Adams, M. A. (2003). Enhanced Lactic Acid Production from Cheese Whey with Nutrient Supplement Addition. Agric**. Eng. Int.: CIGR J. Sci. Res. Dev.**,V, 1–20.

Gheisari, H. R. (2011). Correlation between acid, TBA, peroxide and iodine values, catalase and glutathione peroxidase activities of chicken, cattle and camel meat during refrigerated storage. **Veterinary World**, 4(4), 153-157.

Ghorbani, F., Younesi, H., Sari, A. E. and Najafpour, G. (2011). Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by Saccharomyces cerevisiae. **Renewable Energy**, 36, 503-509.

Göksungur, Y. and Güvenç, U. (1999). Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized Lactobacillus delbrueckii IFO 3202. **J Chem Technol Biotechnol.**, 74, 131-136

Göksungur, Y., Gunduz, M. and Harsa, S. (2005). Optimization of lactic acid production from whey by L. casei NRRL B-441 immobilized in chitosan stabilized Ca-alginate beads. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 80, 1282-1290.

Goncalves, C. A., Rodrigues Filho, J. A., Camarao, A. P. and Azevedo, G. P. C. De. (2005). Evaluation of Panicum maximum Cv. Tobiata Pasture to milk production of under two levels of concentrate supplementation in the Northeast of the State of Para. **Documentos-Embrapa Amazonia Oriental**, (39), 35.

González, M. I., Álvarez, S., Riera, F. and Álvarez, R. (2007). Economic evaluation of an integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey. **Journal of Food Engineering**, 80, 53-561.

Gunduz, M. (2005). Lactic acid Production by Lactobacillus Casei NRRL B-441 Immobilized In Chitosan Stabilized Ca-Alginate Beads. MSC Thesis, **Graduate School of Engineering and Sciences of Izmir**, Institute of Technology.

Guo, M. and Wang, G. (2019). History of Whey Production and Whey Protein Manufacturing. In **Whey Protein Production**, Chemistry, Functionality, and Applications; Guo, M., Ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, pp. 1–12.

Guo, Y., Yan, Q., Jiang, Z., Teng, C. and Wang, X. (2010). Efficient production of lactic acid from sucrose and corncob hydrolysate by a newly isolated Rhizopus oryzae GY18. **J. Ind. Microbiol. Biot.**, 37(11), 1137-1143.

Ha, M. Y., Kim, S. W, Lee, Y. W., Kim, M. J. and Kim, S. J. (2003). Kinetics analysis of growth and lactic acid production in pH-controlled batch cultures of Lactobacillus casei KH-1 using yeast extract/corn steep liquor/glucose medium. **J. Biosci. Bioeng**., 96, 134-140.

Hama, S., Mizuno, S., Kihara, M., Tanaka, T., Ogino, C., Noda, H. and Kondo, A. (2015). Production of D-lactic acid from hardwood pulp by mechanical milling followed by simultaneous saccharification and fermentation using metabolically engineered Lactobacillus plantarum. **Bioresource Technology**, 187, 167-172.

Hassanzadazar, H. and Ehsani, A. (2013). Phenotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from koppeh cheese traditional. **Global Veterinaria**, 10(2), 148-152.

Hofvendahl, K. and Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme Microb. Tech.**, 26(2-4), 87-107.

Holten, C. H., Müller, A., Rehbinder, D., and Ilra, S. (1971). Lactic Acid: Properties and Chemistry of Lactic Acid and Derivatives, **Chemie, Weinheim**, Germany.

Idler, C., Venus, J. and Kamm, B. (2015). Microorganisms for the production of lactic acid and organic lactates. **Microbiology Monographs**, 26.

Ilmen, M., Koivuranta, K., Ruohonen, L., Suominen, P. and Penttila, M. (2007). Efficient production of (L) lactic acid from xylose by Pichia stipitis. **App. Environ. Microb.**, 73, 117-123.

Jain, A. (2004). Characterization of Pasteurella multocida isolates by their outer membrane protein profiles, RAPD patterns and Tox A gene detection. Master Thesis, **Anand Agricultural University**. Pp. 31.

Jay, J. M. (2002). A review of aerobic and psychrotrophic plate count procedures for fresh meat and poultry products. **J. Food Prot.**, 65, 1200-1206.

Jelen, P. (2003), Whey processing, In: Roginski, H., Fuquay, J. W. and Fox, P. F. (eds.). **Encylcopedia of Dairy Sciences**, Vol. 4, London: Academic press. pp. 2739-2751

Jimenez, S. M. and Salsi, M. S. (1997). Spoilage microflora in fresh chicken breast stored at 4 ºC. **J. Appl. Microbiol.**, 83, 613-618.

Johnston, R. W. and Tompkin, R. B. (1992). Meat and poultry products, "in compendium of methods for the microbiological examination of foods" **American Public Health Assoc**. "APHA". Pp. 821-835.

Kenawi, M. A. and Abd-Aal, H. A. (2005). Influence of potassium sorbate and sodium lactate in combination with modified atmosphere packaging on stability of refrigerated chicken breast muscle. **Biotechnol. In Anim. Husbandry**, 21, 337-347.

Kenawi, M. A., Salam, A. and Kenawi, M. N. (2009). Effect of antimicrobial agents on some chemical and microbiological characteristics of vacuum-packaged

ground buffalo meat stored under refrigerated condition. **Biotechnology Husbandry**, 25, 231-239

Khalafalla, F. A., Ali, F. H. M. and Hassan, A. H. A. (2016). Quality improvement of broiler chicken breasts by nisin and lactic acid. **J. World Poult. Res.**, 6(2), 37-47.

Kishida, H., Jin, F., Zhou, Z., Moriya, T. and Enomoto, H. (2005) Conversion of glycerin into lactic acid by alkaline hydrothermal reaction. **Chem. Lett.**, 34, 1560-1561.

Kitouni, M. and Oulmi, L. (2013). Optimization of cultural conditions for lactic acid production by lactobacillus bulgaricus attc 11842 grown on whey. **International Journal of Research in Engineering and Technology**, 02, 487-493.

Komesu, A., Martins, P. F., Lunelli, B. H., Oliveira, J., Filho, R. M. and Maciel, M. R. W. (2015). The effect of evaporator temperature on lactic acid purity and recovery by short path evaporation. **Separation Science and Technology**, 50, 10, 1548-1553

Komesu, A., Martins, P. F., Lunelli, B. H., Oliveira, J., Maciel Filho, R. and Wolf Maciel, M. R. (2014). Evaluation of lactic acid purification from fermentation broth by hybrid short path evaporation using factorial experimental design. **Separ. Purif. Technol.**, 136, 233-240.

Komesu, A., Wolf Maciel, M. R., Oliveira, J., Martins, L. H. S. and Maciel Filho, R. (2016). Purification of lactic acid produced by fermentation: Focus on non-traditional distillation processes. **Separation & Purification Reviews**,.

Kotoulas, A., Agathou, D., Triantaphyllidou, I. E., Tatoulis, T. I., Akratos, C. S., Tekerlekopoulou, A. G. and Vayenas, D. V. (2019). Second Cheese Whey Treatment Using Zeolite under Continuous Flow Mode and Its Application on Wheat Growth. **Water**, 11, 928.

Koutsoumanis, K. P., Stamatiou, A. P., Drosinos, E. H. and Nychas, G. J. E. (2008). Control of spoilage microorganisms in minced pork by a self developed

modified atmosphere induced by respiratory activity of meat microflora. **Food Microb.**, 25, 915-921.

Kozacinski, L., HadZiosmanovic, M. and Zdolec, N. (2006) Microbiological Quality of Poultry Meat on the Croatian Market. **Veterinarski Arhiv**, 76, 305-313.

Krischke, W., Schroder, M. and Trosch, W. (1991). Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized Lactobacillus caseisubspcasei. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 34, 573-578.

Krzyżaniak, A., Leeman, M., Vossebeld, F., Visser, T. J., Schuur, B. and Haan, A. B. (2013). Novel extractants for the recovery of fermentation derived lactic acid. **Separ. Purif. Technol.**, 111, 82-89.

Kwak, H., Hwang, D. W., Hwang, Y. K. and Chang, J. (2012). Recovery of alkyl lactate from ammonium lactate by an advanced precipitation process**. Separ. Purif. Technol.**, 93, 25-32.

Laopaiboon, P., Thani, A., Leelavatcharamas, V. and Laopaiboon, L. (2010). Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. **Bioresour. Technol.**, 101(3), 1036-1043.

Lawless, H. T. and Heymann, H. (1999). The sensory evaluation of food principle and practice Gaithersburg-Maryland, **ANASDN puplication**.

Li, Z., Lu, J., Yang, Z., Han, L. and Tan, T. (2012). Utilization of white rice bran for production of L-lactic acid. **Biomass Bioenerg.**, 39, 53-58.

Lund, B., Nordahl, B. and Ahring, B. (1992). Production of Lactic Acid from Whey using Hydrolysed Whey Protein as Nitrogen source. **Biotechnology Letters.**, 14, 851-856.

Lunelli, B. H., Andrade, R. R., Atala, D. I. P., Wolf Maciel, M. R., Maugeri Filho, F. and Maciel Filho, R. (2010). Production of lactic acid from sucrose: Strain selection, fermentation and kinetic modeling. **Appl. Biochem. Biotech.**, 161(1), 227-237.

M'hir, S., Rtibi, K., Mejri, A., Ziadi, M., Aloui, H., Hamdi, M. and Ayed, L. (2019). Development of a novel whey date beverage fermented with kefir grains using response surface methodology. **Journal of Chemistry**, 2019, 1-13.

Maher, M., Roux, G. and Dahhou, B. (1995). A Method for Estimation the Sate Variables and Parameters of Fermentation System. **J. of Chemical Tech. Biotechnology.**, 63, 153-159.

Mahmoud, D. A. R. and Helmy, W. A. (2009). Potential Application of Immobilization Technology in Enzyme and Biomass Production. **Journal of Applied Sciences Research**, 5(12), 2466-2476.

Manandhar, A. and Shah, A. (2020). Techno-Economic Analysis of Bio-Based Lactic Acid Production Utilizing Corn Grain as Feedstock. **Processes**, 8, 1-15.

Maragkoudakis, P., Vendramin, V., Bovo, B., Treu, L., Corich, V. and Giacomini, A. (2016). Potential use of scotta, the by-product of the ricotta cheese manufacturing process, for the production of fermented drinks. **J. Dairy Res.**, 83, 104.

Min, D. J., Choi, K. H., Chang, Y. K. and Kim, J. H. (2011). Effect of operating parameters on precipitation for recovery of lactic acid from calcium lactate fermentation broth. **Korean Journal of Chemical Engineering**, 28(10), 1969-1974.

Mirdamadi, S., Atashgahi, S., Rajabi, A., Mohseni, F. A., Roayaei, M. and Hamedi, J. (2008). Cell entrapment of Lactobacillus casei subsp. casei ATCC 39392 for lactic acid production. **Iranian Journal of Biotechnology**, 6.

Nakano, S., Ugwu, C. U. and Tokiwa, Y. (2012). Efficient production od D-(-)-lactic acid from broken rice by Lactobacillus delbrueckii using Ca(OH)2 as a neutralizing agent. **Bioresour. Technol.**, 104, 791-794.

Nancib, A., Nancib, N., Meziane-Cherif, D., Boubendir, A., Fick, M. and Boudrant, J. (2005). Joint effect of nitrogen sources and B vit-amin supplementation of

date juice on lac-tic acid production by Lactobacillus casei subsp. rhamnosus. **Bioresource Technology**, 96(1), 63-67.

Narayanan, N., Roychoudhury, P. K. and Srivastava, A. (2004). L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. **Electronic Journal of Biotechnology**, 7, No. 2, Issue of August 15.

Naveena, B. J., Altaf, M., Bhadrayya, K. and Reddy, G. (2004). Production of L(+) Lactic acid by Lactobacillus amylophilus GV6 in Semi- Solid State Fermentation Using Wheat Bran. **Food Technol. Biotechnol.**, 42(3), 147-152.

Neuman, M. A. (1983). Sensorische Lebensmitteluntersuchung. **VEB, Fachbuch Verlag Leipzing**.

Nychas, G. J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C. and Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, 78, 77-89

Oskouei, D., Bekmen, N., Ellidokuz, H. and Yılmaz, O. (2010). Evaluation of different cryoprotective agents in maintenance of viability of Helicobacter pylori in stock culture media. **Brazilian Journal of Microbiology**, 41, 1038-1046

Ostlie, H. M., Treimo, J. and Narvhus, J. A. (2005). Effect of Temperature on Growth and Metabolism of Probiotic Bacteria In Milk. **International Dairy Journal**, 15, 989-997.

Ouyang, J., Ma, R., Zheng, Z., Cai, C., Zhang, M. and Jiang, T. (2013). Open fermentative production of L-lactic acid by Bacillus sp. strain NL01 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material. **Bioresour. Technol.**, 135, 475-480.

Pal, P. and Dey, P. (2013). Process intensification in lactic acid production by three stage membrane integrated hybrid reactor system. **Chem. Eng. Process. Intens.**, 64, 1-9.

Pal, P., Sikder, J., Roy, S. and Giorno, L. (2009). Process intensification in lactic acid production: A review of membrane based processes. **Chem. Eng. Process. Intens.**, 48, 1549-1559.

Patel, B. and Patel, V. (2016). Optimization of whey-based media components for lactic acid production by Lactobacillus casei,using response surface methodology. **International Journal of Development Research**, 06, 6884-6890.

Pintado, M. E., Macedo, A. and Malcata, F. (2001). Technology, chemistry and microbiology of whey cheeses. **Food Sci. Technol. Int.**, 7, 105–116.

Prückler, M., Lorenz, C., Endo, A., Kraler, M., Dürrschmid, K., Hendriks, K., Da Silva, F.S., Auterith, E., Kneifel, W. and Michlmayr, H. (2015). Comparison of homo- and heterofermentative lactic acid bacteria for implementation of fermented wheat bran in bread. **Food Microbiology**, 49, 211-219

Pyo, S. H., Park, H. B., Song, B. K., Han, B. H and Kim, J. H. (2004). A large-scale purification of paclitaxel from cell cultures of Taxus chinensis. **Process Biochemistry**, 39, 1985-1991.

Rao, C. S., Prakasham, R. S., Lakshmi, C. H. and Rao, B. (2009). Effect of Various Immobilization Matrices on Lactobacillus delbrueckii Cells For Optically Pure L (+) Lactic Acid Production. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, 3(3), 311-319.

Ray, R. C., Sharma, P. and Smita, H. P.(2009). Lactic acid production from Cassava fibrous residue using Lactobacillus plantarum MTCC 1407. **Journal of Enviromental Biology**, 30(5), 847-852.

Reddy, C. A., Henderson, H. E. and Erdman, M. D. (1976). Bacterial fermentation of cheese whey for production of a ruminant feed supplement rich in crude protein. **Applied and Environmental Microbiology**, (32), 769-776.

Romani, A., Yanez, R., Garrote, G. and Alonso, J. L. (2008). SSF production of lactic acid from Cellulosic biosluges. **Bioresour. Technol.**, (99), 4247-4254.

Roukas, T. and Kotzekidou, P. (1998). Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized Lactobacillus casei and Lactococcus lactis cells using fedbatch culture. **Enzyme Microb Technol.**, 22, 199-204.

Ryan, M. P. and Walsh, G. (2016). The biotechnological potential of whey. **Rev. Environ. Sci. Bio Technol.**, 15, 479–498.

Saito, K., Hasa, Y. and Abe, H. (2012). Production of lactic acid from xylose and wheat straw by Rhizopus oryzae. **J. Biosci. Bioeng.**, 114(2), 166-169.

Sajewicz, M., John, E., Kronenbach, D., Gontarska, M. and Kowalska, T. (2008). TLC Study of the Separation of The Enantiomers of Lactic Acid. **Acta Chromatographica**, 20(3), 367-382.

Sallam, K. I. and Samejima, M. (2004). Effects of trisodium phosphates and sodium chloride dipping on the microbial quality and shelf life of refrigerated tray-packaged chicken breasts. **Food Science and Biotechnology**, 13, 425-429.

Sarkar, D. and Paul, G. (2019). A study on optimization of lactic acid production from whey by lactobacillus sp isolated form curd sample. **Research Journal of Life Science, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Science**, 5(2), 816-824

Saucier, L. and Gendronl, C. (2000). Shelf life of ground poultry meat stored under modified atmosphere. **Poult. Sci.**, 79:1851-1856.

Sayed, W. F., Salem, W. M., Sayed, Z. A. and Abdalla, A. K. (2020). Production of lactic acid from whey permeate using lactic acid bacteria isolat-ed from cheese. **International Journal of Veterinary Sciences**, 3(2), 78-95.

Schmedes, A. and Holmer, G. (1989). A new thiobarbituric acid (TBA) method for determination of free malonaldehyde (MDA) and hydroperoxides selectivity as a measure of lipid peroxidation. **Journal of American Chemisrty Society**, 66, 813-817.

Sekar, K. V., Hitha, C. S., Hima, C. S., Yogesh, B. J. and and Bharathi, S. (2014). Microbial Utilization of Dairy Waste for Lactic acid Production by

Immobilized Bacterial Isolates on Sodium Alginate Beads**. Int. J. Pure App. Biosci.**, 2(4), 55-60.

Senthuran, A., Senthuran, V., Hatti-Kaul, R. and Mattiasson, B. (1999). Lactic acid production by immobilized Lactobacillus casei in recycle batch reactor: a step towards optimization. **Journal of Biotechnology**, 73, 61–70.

Sheet, S. A. and Mahmood, W. A. (2020). Production of Lactic Acid from Whey Using Immobilized Mixed Culture of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus. **Syrian Journal of Agricultural Research – SJAR**, 7(3), 137-152.

Siham, N. and Taha, M. (2009). Superficial Bacterial Contamination Of Ovine And Bovine Carcasses At El-Harrach Slaughterhouse, Algeria. **European Journal Of Scientific Research**, 38(3), 474-485.

Skjâk-Bræk, G. (1992). Alginates: biosyntheses and some structure–function relationships relevant to biomedical and biotechnological applications. **Biochem Soc Trans.**, 20, 27-33.

Smaoui, S., Ben Hlima, H. and Ghorbel, R. (2012). The effect of sodium lactate and lactic acid combinations on the microbial, sensory, and chemical attributes of marinated chicken thigh. **Poultry Science**, 91, 1473.

Smith, E. A., Myburgh, J., Osthoff, G. and de Wit, M. (2014). Acceleration of yoghurt fermenta-tion time by yeast extract and partial char-acterization of the active components. **The Journal of Dairy Research**, 81(4), 417.

Smithers, G. W., Ballard, F. J., Copeland, A. D., De Silva, K. J., Dionysius, D. A. and Francis, G. L. (1996). New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. **Journal of Dairy Science**, 79(8), 1454-1459.

Soccol, M. and M. Oetterer. (2005). Effects of modified atmosphere and vacuum on the shelf life of talipia (Oreochromis niloticus) fillets. **Brazilian J. Food Techno.**, 8, 7-15.

Sommella, E., Pepe, G., Ventre, G., Pagano, F., Conte, G. M., Ostacolo, C., Manfra, M., Tenore, G. C.; Russo, M. and Novellino, E. (2016). Detailed peptide

profiling of “Scotta”: From a dairy waste to a source of potential health-promoting compounds. **Dairy Sci. Technol.**, 96, 763–771.

Sweta A. P. and Samir C. P. (2016). Production of Lactic Acid from Whey by Lactobacillus sp. Isolated from Local Dairy Products. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.**, 5(5), 734-741.

Tang, J., Wang, X., Hu, Y., Zhang, Y. and Li, Y. (2016). Lactic acid fermentation from food waste with indigenous microbiota: Effects of pH, temperature and high OLR. **Waste Management**, 52, 278-285.

Tashiro, Y., Matsumoto, H., Miyamoto, H., Okugawa, Y., Pramod, P., Miyamoto, H. and Sakai, K. (2013). A novel production process for optically pure L-lactic acid from kitchen refuse using a bacterial consortium at high temperatures. **Bioresour. Technol.**, 146, 672-681.

Tejayadi, S. and Cheryan, M. (1994). Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. **Appl Microbiol Biotechnol.**, 43, 242-248.

Tomankovaet, J., Borilova, J., Steinhauserova, I. and Gallas, L. (2012). Volatile organic compounds as biomarkers of the freshness of poultry meat packaged in modified atmosphere. **Czech Journal of Food Science**, 30, 395-403.

Trindade, M. C. (2002). Estudo da Recuperação de Ácido Lático Proveniente Do Soro De Queijo pela Técnica de Membranas Líquidas Surfactantes, MSc Thesis, **Universidade Federal de Minas Gerais**, Minas Gerais, Brazil.

Tripathi, A. D., Srivastava, S. K., Singh, P., Singh, R. P., Singh, S. P., Jha, A. and Yadav, P. (2015). Optimization of process variables for enhanced lactic acid production utilizing paneer whey as substrate in SMF. **Applied Food Biotechnology**, 2(2), 46-55.

Vaidya, A. N., Pandey, R. A., Mudliar, S., Suresh Kumar, M., Chakrabarti, T. and Devotta, S. (2005). Production and recovery of lactic acid for polylactide—An overview. **Crit. Rev. Env. Sci. Technol.**, 35, 429-467.

Vidra, A. and Nemeth, A. (2017). Whey utilization in a two-stage fermentation process. **Liquid Waste Recovery**, 2, 17–20.

Vijayakumar, J., Aravindan, R. and Viruthagriri, T. (2008). Recent Trends in the Production, Purification and Application of Lactic Acid. **Chem. Biochem. Eng. Q.**, 22 (2), 245-264.

Vincenzi, A., Maciel, M. J., Burlani, E., Oliveira, E., Volpato, G., Lehn, D. N. and de Souza, C. V. (2014). Ethanol bio-production from ricotta cheese whey by several strains of the yeast Kluyveromyces. **Am. J. Food Technol.**, 9, 281–291.

Wang, L., Zhao, B., Liu, B., Yu, B., Ma, C., Su, F., Hua, D., Li, Q., Ma, Y. and Xu, P. (2010). Efficient production of L-lactic acid from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production, by a newly isolated xylose utilizing Bacillus sp. Strain. **Bioresour. Technol.**, 101(20), 7908-7915.

Wang, C., Li, Q., Wang, D. and Xing, J. (2014). Improving the lactic acid production of Actinobacillus succinogenes by using a novel fermentation and separation integration system. **Process Biochem.**, 49(8), 1245-1250.

Wang, Y., Meng, H., Cai, D., Wang, B., Qin, P., Wang, Z. and Tan, T. (2016) Improvement of L-lactic acid productivity from sweet sorghum juice by repeated batch fermentation coupled with membrane separation, **Bioresour. Technol.**, 211, 291-297.

Wee, Y., Kim, J. and Ryu, H. (2006). Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technol. Biotech.**, 44(2), 163-172.

Wee, Y., Yun, J., Park, D. and Ryu, H. (2004). Biotechnological production of L(+) lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of Enterococcus faecalis. **Biotechnol. Lett.**, 26(1), 71-74.

Yin, H., Zhang, C., Yin, H., Gao, D., Shen, L. and Wang, A. (2015). Hydrothermal conversion of glycerol to lactic acid catalyzed by Cu/hydroxyapatite, Cu/MgO, and Cu/ZrO2 and reaction kinetics. **Chemical Engineering Journal**, 288, 332-343.

Zadow, J. G. (1994). Utilization of milk components whey in: Robinson, R. K. (ed). **Modern Dairy Technology**, Chapman and Hall London. Pp. 313-317.

Zeitoun, A.A.M. and Debevere, J.M. (1990). The effect of treatment with buffered lactic acid on microbial decontamination and shelf life of poultry. ***International Journal of Food Microbiology***, 11: 305-312.

Abstract

In this research, lactic acid-producing bacteria were isolated from various foods, and the results showed that the Y7 isolate was superior to other isolates in the production of lactic acid, as it produced (28.12 g/L), and the diagnosis results by API 50 CHL strip, as well as the RT-PCR test results showed that this isolate belonged to the *Lactobacillus paracasei*. Cheese whey was used as a fermentation medium to produce lactic acid because it contained 4.5% lactose, and the Minitab Optimization Method Program was used to optimize the fermentation process conditions to produce lactic acid from cheese whey by *Lactobacillus paracasei*. The results were as follows: incubation temperature 37 ºC, pH 5.5, the incubation period 50 hours and the ideal rotation speed in the shaking incubator 150 rpm, and the results showed the production of (32.59 g/L) of lactic acid. Moreover, the optimization of nutrients addition to the fermentation medium to produce lactic acid was conducted, and the results were as follows: yeast extract 10 g/L, dipotassium phosphate 0.5 g/L, magnesium sulfate 0.2 g/L and manganese sulfate 0.04 g/L, and the results showed the production of (37.6 g/L) of lactic acid. It was found that the production of lactic acid from free-form *Lactobacillus paracasei* was (37.9 g/L), and when these cells were immobilized in sodium alginate, its production was (42 g/L), i.e. the lactic acid production increased by 10.82%. The chemical, sensory and microbiological tests of chicken breast treated with lactic acid and stored for 15 days at a temperature of 4 ± 1 ° C showed that treatment 3 (3% lactic acid concentration) maintained good sensory characteristics, permissible microbial content and reduced the lipid oxidation degree during the refrigerated storage for 15 days.

Keywords: Lactic acid, cheese whey, *Lactobacillus paracasei*, sodium alginate, chicken breast.

Syrian Arab Republic
Damascus University
Faculty of Agriculture
Dep. Of Food Science

Production of Lactic Acid from Local Bacterial Stains and its Potential Use in some Food Industries

Thesis submitted for obtaining a PhD degree in Agricultural Engineering
(Food Science)

By

Adnan Mohammad Alkazah

Supervisor
Prof.Dr. Abdulwahab Merai
Faculty of Agriculture
Dep. of Food Science

Co-supervisor
Dr. Bassam Aloklah
National Commission for Biotechnology
Damascus, Syria

2023