الفصل الثالث

بادئـات الجـبن
Cheese starters

١- مقدمـة :

تعتبر مزارع البادئات المحتوية على بكتريا حمض اللاكتيك من المـواد الأساسية فـى صناعة معظم أنواع الجبن وهذه المزارع يطلق عليها بادئات starters حيث أنها تبدأ أنتـاج حامض اللاكتيك وهو الهدف الرئيسى من أستخدامها فى صناعة الجبن . أنتـاج الحموضـة مع طبخ وتقليب الخثرة فى الشرش يجعل خثرة الكـازين تنكمـش وتطـرد الشـرش لأنتـاج جبن بمحتوى رطوبة أقل (حيث تنخفض الرطوبة من ٨٧٪ وهى نسـبة المـاء فـى اللـبن الى ٣٥-٦٠٪) و pH أقل (مـن pH ٦,٦ فـى اللـبن الى حـوالى ٤,٦-٥,٢) وبالتـالى تتميز بقوة حفظ أفضل من اللبن . أنتاج الحموضة خلال صناعة الجبن يكون لها تأثـيرات أخـرى بجانب أنكماش الخثرة وطرد الشرش syneresis حيث تؤثـر علـى نشـاط وتغيـر طبيعـة (دنترة) وأحتجاز المواد المجبنة (المنفحة) فى الجبن وكذلك تؤثر على صلابـة الخـثرة ودرجـة تحلل فوسفات الكالسيوم الغروية كما يثبط نمو كثير من الميكروبات المرضية وكذلك غـير المرغوبه المسببه للعيوب pathogenic and defect-producing bacteria .

٢- نبذة تاريخية

بدأ فى استخدام البادئات لأنتاج حموضة أثناء صناعة الجبن منذ فترة طويلة قبل أن يتم التعرف على البكتريا المسببة لذلك حيث كان يحفظ اللبن على درجة حرارة الغرفة لعدة ساعات يتم خلالها تكاثر بكتريا حمض اللاكتيك الموجودة فى اللبن طبيعياً مع أنتاج حمـض اللاكتيـك ويستخدم اللـبن الحـامض المتجـبن لحقـن اللـبن المستخدم فـى صناعـة الجـبن ، ومازالت هذه الطريقة مع بعض الأختلافات تستخدم فى سويسرا وإيطاليـا وفرنسـا حيـث مازالت توجد وحدات صغيرة للأنتاج بطريقة تقليدية . الشـرش النـاتج مـن صناعـة الجـبن عادة يحضن عند درجة حرارة مناسبة لأستخدامه فى اليوم التالى فى صناعـة الجـبن . جميـع البادئات المستخدمة حالياً فى صناعة الجبن نشأت بهذه الطريقة حيث أنتقلت بـين صنـاع الجبن من جيل الى آخر وأستمرت هذه الطريقة البدائية فى إنتاج البادئات حتى نهاية القرن

التاسع عشر حينما أوضح كل من Storch فى الدنمارك و Conn فى الولايات المتحدة الأمريكية أنه يمكن أنتاج زبد متخمرة ذات طعم جيد من قشدة تم تخميرها بواسطة مزرعة نقية من *L.lactis* subsp. *cremoris* أو *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ولكن الزبد الناتجه مازالت خالية من الطعم الحقيقى المميز للزبد التقليدى ، وقد تم التوصل إلى سبب هذا الأختلاف فى عام ١٩١٩ عندما أوضح كل من Hammer & Bailey فى الولايات المتحدة ، Storch فى الدنمارك ، Boekhout & de Vries فى هولندا منفرداً أن مزارع البادئات القادرة على انتاج زبد يتميز بالطعم التقليدى عبارة عن مخلوط من أنواع مختلفه من البكتريا أحدها قادرة على أنتاج حاض لاكتيك (Lactococci) والثانيه قادرة على أنتاج الطعم والنكهة (Leuconostocs) . وكان يعتقد فى البداية أن الأحماض الطيارة هى المسئولة عن الطعم والنكهة ولكن فيما بعد وجد أن ثنائى الأسيتيل diacetyl هو المكون الرئيسى للنكهة .

٣- أنواع البادئات

يستخدم بصفة أساسية نوعان من البادئات فى صناعة الجبن :

أ - بادئات محبة للحرارة المعتدلة Mesophilic . درجة الحرارة المثلى لها حوالى ٣٠°م .

ب - بادئات محبة للحرارة المرتفعه Thermophilic ودرجة الحرارة المثلى لها حوالى ٤٥°م.

ويتوقف أختيار البادىء على نوع الجبن المراد أنتاجه فمثلاً بادئات mesophilic تستخدم فى صناعة جبن التشدر والجودا والمعرقة بالفطر والكمبير بينما تستخدم بادئات thermophilic فى صناعة أنواع الجبن السويسرية والإيطالية . هذا الأختيار عادة يكون مرتبطاً بطريقة الصناعه حيث أن الأنواع السويسرية والايطالية تطبخ على درجة حرارة مرتفعه (٥٠-٥٥°م) لذلك يجب أن يكون البادىء المستخدم قادراً على مقاومة الحرارة المرتفعه وتتوفر معلومات أكثر عن بادئات الحرارة المعتدلة عن بادئات الحرارة المرتفعة مما يدل على أن الجبن التى تصنع ببادئات الحرارة المعتدلة تنتج بكميات أكبر .

الجدول (١-٣) يوضح بكتريا حمض اللاكتيك Lactic Acid Bacteria (LAB) وبعض صفاتها الهامة . وعادة تستخدم المقدرة على النمو عند درجة ١٠°م ، ٤٥°م لتمييز أنواع البكتريا المحبة للحرارة المعتدلة عن أنواع البكتريا المحبة للحرارة المرتفعه بينما الفحوص الميكروسكوبية وقياس كمية ونوع مشابهات isomers حامض اللاكتيك الناتج والمقدرة على تمثيل السترات (فى الأنواع المحبة للحرارة المعتدلة) تستخدم فى تمييز معظم الميكروبات داخل هاتين المجموعتين .

جدول ١-٣ : الصفات المميزة لبكريا حمض اللاكتيك الموجودة فى مزارع البادئات .

الميكروبات	الأسم القديم	الشكل	أحتزال عياد الشمس فى اللبن قبل التجبن	٪ حامض اللاكتيك الناتج فى اللبن	صور isomer اللاكتات	تخثير السكريات	إنتاج الأمونيا من الأرجنين	النمو عند (°م)			تخمير		
								١٠	٤٠	٤٥	جلوكوز	جلاكتوز	لاكتوز
Streptococcus salivarius subsp. *thermophilus*	*Str. thermophilus*	Cocci كروى	–	٠,٦	L	–	–	–	+	+	+	–	+
Lactobacillus helveticus	unchanged	Rods عصوى	–	٢,٠	DL	–	–	–	+	+	+	+	+
Lactobocillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*	*Lb. bulgaricus*	Rods عصوى	–	١,٨	D	–	–	–	+	+	+	–	+
Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis*	*Lb. lactis*	Rods عصوى	–	١,٨	D	–	±	–	+	+	+	±	+
Lactococcus lactis subsp. *cremoris*	*Str. cremoris*	Cocci كروى	+	٠,٨	L	–	–	+	–	–	+	+	+
Lactococcus lactis subsp. *lactis*	*Str. lactis*	Cocci كروى	+	٠,٨	L	±	+	+	+	–	+	+	+
Leuconostac lactis	unchanged	Cocci كروى	–	أقل من ٠,٥	D	+	–	+	–	–	+	+	+
Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris*	*Leuc. cremoris*	Cocci كروى	–	٠,٢	D	+	–	+	–	–	+	+	+

يمكن استخدام المقدرة على أنتاج الجلاكتوز من اللاكتوز بواسطة *Lb.delbruckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb.delbruckii* subsp. *lactis* وليس بواسطة *Lb.helveticus* في تمييز أنواع Lactobacilli . كما أن *S.salivarius* subsp. *thermophilus* ينتج جلاكتوز من اللاكتوز ويمكن تمييز Leuconostocs عن غيره من بكتريا البادئات بمقدرتها على تمثيل السكريات من خلال مسار phosphoketolase pathway وعدم مقدرتها على النمو في اللبن مالم يضاف مستخلص الخميرة (٠,٣٪) إلى اللبن كمادة منشطة stimulant وفي بعض الحالات يضاف ١,٠٪ جلوكوز. وتحت هذه الظروف فإن Leuconostocs يجبن اللبن في أقل من ٢٤ ساعة وينتج حوالى ٠,٦٪ حامض لاكتيك . ومع ذلك فإن *Leuc.lactis* ينمو بصورة جيدة نسبياً في اللبن (جدول ١-٣) . وقد تعكس الحاجة إلى مستخلص الخميرة إلى عدم مقدرة هذه البكتريا على إنتاج proteinase بدرجة كافية لتحليل بروتين اللبن إلى أحماض أمينية وببتيدات صغيرة ضرورية للنمو بينما تعكس الحاجة إلى الجلوكوز الى عدم مقدرتها على أستخدام اللاكتوز كمصدر للطاقة .

٣-١- بادئات الحرارة المعتدلة المختلطه السلالة

Mixed strain mesophilic cultures

ظهرت هذه البادئات في نهاية القرن التاسع عشر وبداية القرن العشرين وأستخدمت بكثرة في صناعة منتجات الألبان المتخمرة في شمال أوروبا . تتكون هذه البادئات بصفة رئيسية من *L.lactis* subsp. *cremoris* بالرغم من أنه في بعض الأحيان قد تحتوى على *L.Lactic* subsp. *lactis* . والأكثر أرتباطاً بها ويطلق على هذه الأنواع Lactococci (الأسماء القديمة Lactic streptococci) . بعض البادئات المحبة للحرارة المعتدلة والمختلطه السلالات قد تحتوى على نوع من *Lactococcus* يستطيع تمثيل السترات (Cit^+) إلى CO_2 ومكونات الطعم والنكهة والأسم القديم لهذا الميكروب هو *Streptococcus diacetylactis* والفرق الأساسى بينه وبين *L.lactis* subsp. *lactis* هو أحتوائه على بلازميد plasmid مسئول عن امتصاص السترات وتضمن الأنواع المحبة للحرارة المعتدلة Lactococci أنواع غيره قادرة على تخمر السترات (Cit^-) وأخرى قادرة على تخمر السترات (Cit^+) حيث تشارك الأولى في أنتاج الحموضة بينما الثانية في تكوين الطعم والنكهة . تشارك *Leuconostoc* spp. في أنتاج مكونات الطعم والنكهة من السترات في البادئات المختلطه . تقسم البادئات المحبة للحرارة المعتدلة والمختلطة السلالات طبقاً لطبيعة أنتاج مكونات الطعم والنكهة الى :

أ - L type ويحتوى على *Leuconostoc* spp. .

ب - D type ويحتوى على Cit$^+$ lactococci قادرة على تخمر السترات (diacetylactis).

جـ - DL type ويحتوى على النوعين السابقين (L & D types) .

د - O type ولايحتوى على أى نوع من الأنواع القادرة على أنتاج مكونات الطعم والنكهة.

ويطلق عادة على البكتريا المنتجة لمكونات النكهة aroma producer أو مستهلكة للسترات citrate utilzers أو مخمرة للسترات citrate fermenters . تكون كل من الأنواع المنتجة للحموضة ، الطعم والنكهة فى بادئات الحرارة المعتدلة حوالى ٩٠ ، ١٠٪ من اجمالى الأنواع الموجودة فى البادىء على التوالى ويطلق عليها مزارع مختلطه mixed cultures ليس لأنها تحتوى على أنواع مختلفة من البكتريا ولكن أيضاً لأنها تتضمن سلالات مختلفه لنفس النوع . ويلاحظ أنواع بكتريا المزارع المختلطه تحتوى خلاياها على أنواع مختلفه من البلازميدات وذلك للحصول على معدلات نمو مختلفه ومقاومة مختلفه للفاج بالأضافة إلى أن بعض السلالات تكون خالية من أنزيم proteinase (Prt$^-$) ونتيجة لذلك لاتستطيع أن تنمو بدرجة جيدة فى اللبن .

بعض مزارع البادئات تكون لها حساسية خاصة للفاج التى تقلل ، أو فى بعض الحالات الشديدة توقف أنتاج حامض اللاكتيك . فى هولندا فإن مزارع الحرارة المعتدلة المختلطه السلالات التى تم تنميتها تجارياً دون أخذ الأحتياطات اللازمة لحماية هذه المزارع من الفاجات التى مصدرها الهواء يطلق عليها مزارع P (P cultures) ويطلق (P) على المزارع التى تم أنتاجها تحت الظروف العادية لتمييزها عن المزارع المماثلة والتى تم اعدادها تحت ظروف معقمة فى المعمل والتى يطلق عليها L cultures حيث ترمز (L) لكلمة المعمل laboratory ويجب عدم الخلط بين هذه المزارع (L) التى تم إعدادها فى المعمل والمزارع (L) التى تحتوى على *Leuconostoc* والمنتجة لمكونات الطعم والنكهة ويطلق عليها L.cultures . ومزارع الـ (P) أكثر مقاومة للفاج عن مزارع (L) وقد تحتوى على أعداد مرتفعة من الفاج (قد يصل إلى ١٠ ^{8} /مل) دون أن تؤثر على مقدرة هذه المزارع على أنتاج الحموضة وهذه المزارع يطلق عليها phage "own" لتمييزها عن الأنواع المعروفة بالـ disturbing phage التى تثبط من أنتاج الحموضة . تحتوى مزارع (L) على سلالة واحدة أو أكثر ولذلك تكون أكثرعرضة للأصابة بالفاج وأفضل مزارع (P) هى التى يتم تحضيرها وتحفظ عند درجة حرارة (-٨٠°م) فى معهد بحوث الألبان بهولندا (NIZO) حيث يتم تنميتها تحت ظروف مراقبة بدقة وتوزع إلى مصانع الجبن .

٣-٢- بادئات الحرارة المعتدلة معرفة السلالة
Defined strain mesophilic culture

هذه البادئات أساساً عبارة عن مزارع نقية من *L.lactis* subsp. *cremoris* وقد بدأ فى استخدامها تجارياً فى نيوزيلندا عام ١٩٣٤وأول بكتريا تم تنقيتها كانت *L.lactis* subsp. *lactis* بواسطة العالم Lister عام ١٨٧٨ وقد كانت أول مزرعة ثم تعريفها وهناك بعض الخلط بين هذ المزارع والمزارع التى يطلق عليها مزارع احادية mono culturres ومزارع فردية single culture ومزارع ثنائية pairs ومزارع ثلاثية triple ومزارع عديدة multiple culture . كثير من هذه الأسماء يدل على أسلوب استخدامها أى كمزارع فردية أو كمزارع مختلطة تحتوى على ٢ إلى ٦ سلالات (فى أغلب الأحيان ٢ أو ٣) حيث تنمى مع بعضها فقط عند تحضير بادئ الأضافة (الصناعة) bulk cuture . أهم الفروق بين هذه البادئات والبائات المختلطة التقليدية هو أن عدد السلالات يكون معروفاً ولاتحتوى على سلالات منتجة لمكونات الطعم والنكهة .

فى الثلاثينات كانت مشكلة التركيب المفتوح open texture فى جبن التشدر على جانب كبير من الأهمية فى نيوزيلندا نتيجة تكوين غاز CO_2 من السترات بواسطة الأنواع المنتجة لمركبات الطعم والنكهة فى البادئات مختلطة السلالة mixed strain starters ، فالأنواع المنتجة للحموضة فى هذه البادئات قد عزلت وأستخدمت كلٍ على حده (بادىء وحيد السلالة) فى صناعة الجبن فكانت الجبن الناتجة ذات تركيب مقفول close-textured ولكن عندما استخدمت هذه السلالات تجاريا كانت بطيئة فى أنتاج الحموضة نتيجة تحلل مزارع البادئات بواسطة الفاج وقد أمكن التغلب على هذه المشكلة بأستخدام زوج من سلالات فى دورات أو نوبات كل منها ٤ أيام مع استخدام زوج مختلف فى كل دورة او نوبه والفكرة وراء ذلك كانت أن أعداد الفاج انخفضت بدرجة كبيرة فى اليوم الخامس عندما يستخدم أول زوج من السلالات مرة أخرى يكون هناك تأثير ضئيل على نمو وأنتاج الحموضة . بهذه الطريقة يمكن تجنب انتشار الفاج فى المصنع هذا بالأضافة الى أن أحد السلالات فى كل زوج تنمو وتنتج حموضة عند درجة حرارة الطبخ (سلالة سريعة fast أو مقاومة لدرجة الحرارة temp. resistant strain) بينما السلالة الأخرى لاتنمو ولكن تستمر فى أنتاج الحموضة بمعدل أبطأ (سلالة بطيئة slow أو حساسة لدرجة الحرارة temp. sensitive strain) . أستخدام السلالة البطيئة تقلل من ظهور المرارة فى الجبن الناتجة من النمو الزائد للسلالة السريعة.

وقد أستخدم نظام تدوير أو تناوب البادئات (تدوير زوج من السلالات) بنجاح

كبير لسنوات عديدة ولكن عندما أدمجت مصانع الجبن الصغيرة فى مصانع مركزية كبيرة أصبحت هذه الطريقة غير ملاءمة وزادت خطورة مشكلة الفاج نظراً لزيادة كميات البادئات المستخدمة حيث أن أحواض الجبن تملأ عدة مرات يومياً وتصنع الجبن بنظام الجدوله (التوقيت) أى الوقت المطلوب لكل خطوة وقد تم التغلب على هذه المشكلة بأستخدام البادئ عديد السلالة multiple strain starters والذى أنتشر استخدامه فى نيوزيلندا وأستراليا وأيرلندا والولايات المتحده وتستخدم هذه البادئات دون الحاجة إلى تدوير rotation . وفى البداية كان عدد السلالات المستخدمة فى هذه البادئات متعددة السلالة ستة سلالات ثم أنخفض هذا العدد فى السنوات القليلة الماضية إلى أثنين أو ثلاثة سلالات بدون حدوث أى تأثير على أنتاج الحموضة أو جودة الجبن وبالرغم من أن البادئات متعددة السلالة قد أنتخبت على أساس المقاومة للفاج إلا أنها مازالت عرضة لمهاجمة الفاج وعندما يحدث ذلك ترفع السلالة المصابة من هذا النظام وتستبدل بسلالة أخرى مقاومة للفاج .

٣-٣- بادئات الحرارة المرتفعة Thermophilic starters

تمثل البادئات المحبة للحرارة المرتفعة أهمية خاصة فى مصانع الجبن الصغيرة فى فرنسا وسويسرا وأيطاليا حيث يصنع جبن الجرويير والأمنتال والجرانا وغالبا مايتم أنتاج هذه المزارع بتحضين الشرش الناتج من اليوم السابق على درجة ٤٠-٤٥م طول الليل وتتكون الميكروبات الموجودة فى هذا الشرش أساسا من *S.salivarius* subsp. *thermophilus* (وقد يوجد Enterococci & Lactococci) وعدة أنواع من *Lactobacillus* مثل *Lb.helveticus, Lb.fermentum, Lb.delbrueckii* subsp. *lactis* and *Lb.acdophilus* . مزارع الشرش الطبيعية المنخفض الحموضة low-acid natural whey culture التى يسود فيها *S.salivarius* subsp. *thermophilus*. أستخدمت فى الماضى ولكن حديثاً يستخدم مزارع الشرش المرتفعة الحموضة high-acid whey cultures وتتكون أساساً من Lactobacilli وقد بذلت جهود كبيرة لتنقية هذه المزارع . جبن الأمنتال أكثر عرضه لظهور عيب يطلق عليه التخمرات الثانوية secondary fermentation التى تتميز بأنتاج غاز CO_2 بكميات زائدة ويسبب أنتفاخ الجبن بعد تخمر حمض البروبيونيك ويعتقد أن ذلك يعزى إلى النشاط الزائد لبكتريا حمض البروبيونيك (PAB) ولكن وجد فيما بعد أنه يرجع إلى استخدام *Lb.helveticus* ذات نشاط زائدة فى تحليل البروتين والذى يؤدى الى زيادة نمو بكتريا حمض البروبيونيك وأنتاج زائد من غاز CO_2 وقد أمكن الحد من هذه المشكلة فى الأنتخاب الدقيق لمزارع البادئ وتجميع المزارع

المختلطة من مصانع الجبن التى تنتج جبن أمنتال مرتفعه الجودة والتى تم أختيارها من حيث أنتاج الحموضة وتحليل البروتين والثبات أثناء التخزين وكفاءتها فى صناعة الجبن وتنمى هذه المزارع تحت ظروف مراقبة بدقة لتوزيعها على مصانع الجبن .

وفى المصانع الحديثة تستخدم عادة بادئات محبة للحرارة المرتفعة معرفة السلالة (مزارع أحادية أو عديدة السلالة) وعلى عكس المزارع المحبة للحرارة المعتدلة المعرفه السلالة تستخدم هذه المزارع بنظام الدورات أو النوبات ، وغالباً ماتحتوى المزارع المحبة للحرارة على :

أ - *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* .

ب - بكتريا حمض لاكتيك عصوية محبة للحرارة المرتفعة a thermophilic lactobacillus :

Lb.delbruckii subsp. *bulgaricus* و *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis* أو *Lb.helveticus*

ويحدد نوع الجبن المراد انتاجه نوع *Lactobacillus* الذى يجب أستخدامه فمثلاً يستخدم *Lb.helveticus* and *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis* فى صناعة الجبن السويسريه Swiss cheese بينما يستخدم فى صناعة الزبادى *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lb.lactis* subsp. *lactis* ويجب الأهتمام وأتخاذ الأحتياطات اللازمة عند اختيار Lactobacilli فى صناعة الجبن السويسريه حيث أن عديد من سلالات *Lb.helveticus* تتميز بقدرة فائقة على تحلل البروتين وبالتالى قد تتسبب فى حدوث عيب التخمر الثانوى secondary fermentation defect . و *Lb.helveticus* عدد قليل من سلالات *Lb.delbrruckii* subsp. *lactis* يمكن أن تخمر الجلاكتوز الناتج من اللاكتوز (Gal^+) بينما *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ومعظم سلالات *Lb.delbrrueckii* subsp. *lactis*, *S.salivarius* subsp. *thermophilus* لاتخمر الجلاكتوز (Gal^-). لذلك يستخدم فقط سلالات Lactobacilli المحبة للحرارة والقادرة على تخمر الجلاكتوز (Gal^+) كمزارع بادئات فى الجبن حيث تقوم بتخمير الجلاكتوز الناتج بواسطة *S.salivarius* subsp. *thermophilus* فإذا أستخدمت سلالات غير قادرة على تخمر الجلاكتوز (Gal^-) فإن الجلاكتوز يتجمع فى الجبن وقد يستخدم كمصدر للطاقة لنمو البكتريا التى لاتنتمى للبادىء والتى تسبب أطعمه غير مرغوب فيها لذلك فإنه يعتقد أن عديد من سلالات *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* المستخدمة تجارياً فى صناعة الجبن السويسريه فى الولايات المتحدة من النوع (Gal^+). وقد يرجع ذلك إلى خطأ فى تصنيف *Lb.helveticus* يفسر سبب أستخدام *Lb.helveticus* subsp. *bulgaricus* فى

صناعة الجبن السويسريه فى الولايات المتحده بينما يفضل أستخدام *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis* Gal^+ فى أوروبا. يتم تنمية Streptococci و Lactobacilli معاً لصناعة اليوجهورت وتنمى كل منهما على حده لصناعة الجبن وتقدر كمية البادىء الذى يستخدم فى صناعة الجبن الجرويير والأمتال بـ ٣-١٠٪ من كمية البادىء المستخدم فى صناعة الجبن التشدر أو الأنواع الهولندية . عادة تضاف المزارع مباشرة إلى لبن الجبن فى الحوض وفى هذه الحالة تنمى هذه المزارع كلٍ على حده ثم تركز بالطرد المركزى أو بالترشيح بالأغشية membrane filtration وتجمد عند درجة-٣٠°م فى قارورات صغيرة حتى تستخدم فى التلقيح المباشر .

٣-٤- بيئات النمو والتمييز Media for growth & differentiation

تحتاج بادئات بكتريا حمض اللاكتيك إلى عدة أحماض أمنيه و فيتامينات وغيرها من الأحتياجات الغذائية للنمو لذلك فإن البيئات التى تستخدم فى عزلها ونموها تتضمن بصفة عام مستخلص الخمير مع/أو مستخلص اللحم وواحد أو أكثر من نواتج تحلل البروتين أنزيمياً مثل التيربتون . كما أن هذه البكتريا تحتاج الى كربوهيدريت قابلة للتخمر كمصدر للطاقة ونظراً لأن لها القدرة على التخمر فإنها تنتج كميات كبيرة من اللاكتات ، لذلك فإن هذه البيئات يجب أن ينظم فيها buffered الـ pH بطريقة مناسبة ، كما يضاف أيونات معدنيه مثل Mn^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+} بصفة منتظمة . وفى الماضى كانت تستخدم بيئة unbuffered lactic agar of Elliker بصفة عامة لنمو Lactococci بينما البيئة المستخدمة حالياً هى M17 التى تحتوى على قوة تنظيمية buffer بأستخدام بيتا جليسروفوسفات β-glycerophosphate وهذه البيئة أيضاً مفيدة جداً فى نمو subsp. *S.salivarius* *thermophilus* وفى تحضير وقياس وأختبار الفاج لكل من هذا الميكروب و Lactococci. البيئات المحتوية على بيتا جليسروفوسفات تكون غير مناسبة لنمو عديد من بكتريا حمض اللاكتيك العصويه المحبة للحرارة thermophilic Lactobacilli وخاصة *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis* *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, وتستخدم بيئة M17 كبيئة متخصصة لعد *Str. thermophilus* فى اليوجهورت وتعتبر بيئة MRS أفضل البيئات بصفة عامة لبكتريا حمض اللاكتيك العصويه Lactobacilli والكروية Streptococci كما أن Leuconostocs تنمو جيداً على هذه البيئة ويمكن أن تصبح بيئة متخصصة لـ Lactobacilli عند خفض الـ pH الى ٥,٤ . ويمكن عد *S.thermophilus* على بيئة M17 agar (بعد التحضين تحت ظروف هوائية على درجة ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة) وعد *Lb.bulgaricus* على بيئة MRS agar عند pH ٥,٤ (بعد التحضين تحت ظروف لاهوائية

عند درجة ٣٧°م لمدة ٧٢ ساعة) .

وقد أقترحت عدة بيئات للتمييز بين البكتريا المنتجة للحموضة والبكتريا المنتجة لمكونات الطعم فى مزارع البادئات المحبة لدرجة الحرارة المعتدلة mesophilic starter cultures . تحتوى كثير من هذه البيئات على سترات كالسيوم حيث تكون البكتريا المنتجة لمكونات الطعم flavour producer مستعمرات محاطه بمنطقة شفافه نتيجة لتمثيل سترات الكالسيوم غير الذائبة . هذه البيئات معتمة opaque لدرجة يصعب معها رؤية الأنواع المنتجة للحموضة . أضافة 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride بتركيز ٠,١ ملليجم / مل يساعد على رؤية مستعمرات الأنواع المنتجة للحموضة بسهولة . وفى المزارع المحبة للحرارة المعتدلة، تحتوى *Leuconostoc* على β-galactosidase (β-gal) بينما تحتوى الـ Lactococci على phospho-β-galactosidase (p-β-gal) . وقد تم تعديل بيئة KCA بإضافة مواد منتجة للصبغات أو الألوان 5-bormo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal) ، للكشف عن نشاط β-gal. فى هذه البيئة تكون لون مستعمرات Cit^+ lactococci أبيض محاطه بهاله شفافه نتيجة لاستهلاك السترات بينما تكون لون مستعمرات *Leuconostoc* أزرق ، نتيجة لتأثير β-gal على X-gal ، ومحاطه أيضاً بمنطقة شفافة .

وقد أقترح بيئتين أخريتين تعطى نتائج مقبوله ، ففى البيئة الأولى يمكن التعرف على Cit^+ lactococci بواسطة قدرتها على تمثيل السترات بينما يمكن تمييز *L.lactis* subsp. *cremoris* عن *L. lactis* subsp. *lactis* بعدم قدرتها على أنتاج الأمونيا (NH_3) من الأرجنين، والبيئة الثانية تكون مفيدة جداً فى التمييز بين أنواع Lactococci المخمرة للسترات (Cit^+) وغير المخمره للسترات (Cit^-) ولكن كثير من *Leuconostoc* spp. تنمو نمواً شحيحاً على هذه البيئة . يضاف potassium ferrocyanide مع خليط من سترات الصوديوم والحديديك إلى بيئة أجار اللبن المحتوى على تربتون وجلوكوز وتعتمد صفة التمييز فى هذه البيئة على ترسيب أيون الحديديك Fe^{3+} مكوناً صبغه ذات لون أزرق داكن prussian blue . وتكون Cit^+ lactococci (الأنواع المخمرة للسترات) مستعمرات زرقاء بينما تكون Cit^- lactococci (الأنواع غيرالمخمرة للسترات) مستعمرات بيضاء نظراً لأن السترات التى تمنع تفاعل ترسيب صبغة اللون الأزرق الداكن قد تم استهلاكها حول المستعمرات.

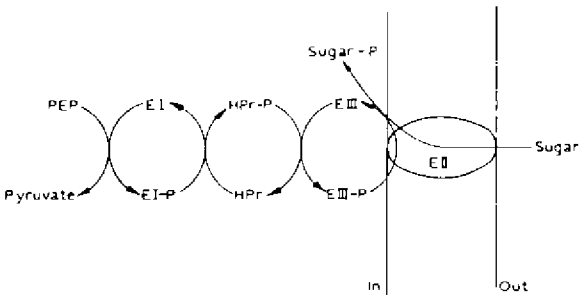
٤- التمثيل الغذائى Metabolism

٤-١- نظام أنتقال اللاكتوز Lactose transport

تحتاج بكتريا حمض اللاكتيك LAB الى كربوهيدريت قابلة للتخمر لأنتاج الطاقة والنمو. يوجد فى اللبن اللاكتوز ، سكر ثنائى يتكون من الجلوكوز والجلاكتوز، يحتاج انتقال اللاكتوز إلى طاقة ولكن ميكانيكية إنتقال اللاكتوز فى جميع بادئات LAB غير معروفة تماماً بالتحديد ، فبينما تستخدم *S.salivarus* subsp. *thermophilus* القوة المحركة للبروتونات proton motive force (PMF) تستخدم Lactococci مجموعة نظم انتقال translocation systems تتضمن نظام phosphoenolpyruvate (PEP), phospho-transferase system (PTS) . فى نظام PMF ينتقل اللاكتوز نتيجة فرق الجهد لأختلاف التركيز على جانبى غشاء الخلية بينما فى نظام PTS حيث يتحول اللاكتوز الى لاكتوز فوسفات lactose-P أثناء عملية الأنتقال ولاتوجد معلومات متوفرة عن نظم أنتقال اللاكتوز فى thermophilic lactobacilli أو Leuconostocs . يوجد نظام PTS فقط فى البكتريا التى تخمر السكر بأتباع مسارglycolysis ومن غير المحتمل أن يوجد فى *Leuconostoc* والتى تخمرالسكر بأتباع مسار phosphoketolase pathway حيث يوجد فرق فى تركيز أيونات الأيدروجين على جانبى غشاء الخلية ، فالـ pH داخل الخلية يميل الى القلوية مما يسبب فرق جهد كهربى electrical potential عند غشاء الخلية. وهذا الفرق فى الجهد الكهربى مع الفرق فى الـ pH داخل وخارج الخلية يكونان معاً نظام PMF . وغالباً مايتضمن نظم PMF انتقال جزىء ثان الى داخل أو خارج الخلية بصورة منتظمة بواسطة بروتينات حاملة توجد فى مواقع معينة على غشاء الخلية specific membrane-located carrier proteins ويطلق عليه peramease . وعموماً فإن اللاكتوز ينتقل كما هو فى *Lactobacillus,Leuconostoc* spp. المحبه للحراره المرتفعة بواسطة نظام permease system حيث يتحلل بواسطة β-galactosidase (β-gal) إلى جلوكوز وجلاكتوز. وطبقاً للميكروب فإن الجلوكوز يتحلل بإتباع سواء مسارglycolytic pathway كما فى *S.thermophilus, Lactobacillus* spp. أو مسار phosphoketolase pathway كما فى *Leuconostoc* spp. بينما يتحلل الجلاكتوز من خلال مسار Leloir pathway . و *Lb. lactis* لايخمر الجلاكتوز ولكن يفرزه خارج الخليه لذلك فإن من الضرورى أستخدام *Lb.helveticus* أو سلالات من *Lb.lactis* Gal^+ (قادرة على تخمر الجلاكتوز) فى بادئات الجبن السويسرية حيث تقوم هذه البكتريا بتخمر الجلاكتوز الناتج

بواسطة *S.thermophilus* بالأضافة إلى بقايا اللاكتوز وهذا يضمن خلو الجبن من السكر بعد التمليح الرطب ويساعد فى تجنب نمو البكتريا التى تسبب بعض العيوب فى الجبن .

وفى Lactococci ينتقل اللاكتوز بواسطة (PEP/PTS)حيث يتحول اللاكتوز إلى لاكتوز فوسفاتLactose-P وينتقل إلى داخل الخلية.وهذه العمليه معقدة (شكل١-٣) ويحتاج إلى Mg^{2+} وأربع بروتينات ، أثنين منهما (أنزيمات III, II) مرتبطة بغشاء الخلية ونوعية السكر بينما النوعين الأخرين (أنزيم I وبروتين مقاوم للحرارة ومنخفض الوزن الجزيئى HPr) بروتينات ذائبة وتوجد فى جميع نظم الأنتقال PEP/PTS . يتحلل اللاكتوز فوسفات داخل الخلية بواسطة p-β-gal إلى جلوكوز الذى يتحلل بأتباع مسار glycolytic بينما الجلاكتوز ٦-فوسفات بإتباع مسار tagatose (tagatose مشابه stereoisomer للفركتوز) .



شكل ١-٣ : نظام PEP/PTS لأنتقال السكر فى Lactococci
EI : أنزيم I ، EII : أنزيم II ، EIII : أنزيم III
HPr بروتين مقاوم للحرارة حامل للفوسفات

وقد أشار البعض إلى أن نظام الأنتقال PTS والـ p-β-gal ضرورى لتخمر اللاكتوز السريع حيث وجد أن سلالات البادىء التى تخمر اللاكتوز بمعدل سريع تحتوى على p-β-gal بمستوى مرتفع ولايوجد بها β-gal بينما السلالات التى تخمر اللاكتوز ببطء تحتوى على مستويات مرتفعة من β-gal ومستويات منخفضة من p-β-gal وقد وجد أن *L.lactis* subsp.*lactis* ATCC 7962 تنقل اللاكتوز بواسطة PTS ولا تحتوى على نشاط p-β-gal وتنمو ببطء فى اللبن وعلى العكس من ذلك فإن

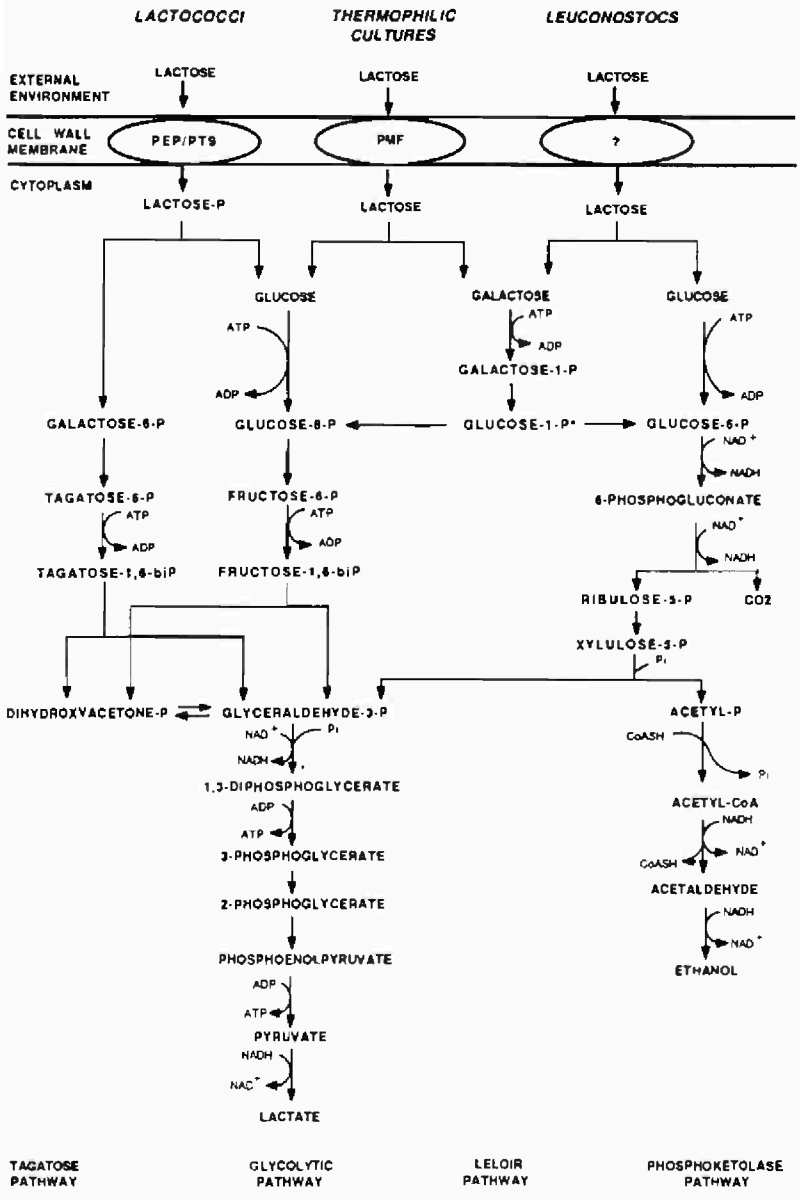
S.salivarius subsp. *thermophilus* لايوجد بها PTS ولا p-β-gal وتخمر اللاكتوز بسرعة . وفى نظام PMF ينتقل اللاكتوز كما هو بينما فى نظام PTS ينتقل اللاكتوز فى صورة لاكتوز فوسفات ويتحلل اللاكتوز بداية بواسطة β-gal إلى جلوكوز وجلاكتوز بينما لاكتوز فوسفات يتحلل بواسطة p-β-gal إلى جلوكوز وجلاكتوز -٦- فوسفات والشكل (٢-٣) يوضح ملخص لمسارات تمثيل اللاكتوز بواسطة بكتريا حمض اللاكتيك المختلف الموجودة فى مزارع البادئات .

٤-٢- تمثيل اللاكتوز Lactose metabolism

٤-٢-١- فى *Lactococci*

فى هذا النوع من البكتريا ينتقل اللاكتوز الى داخل الخلية بواسطة نظام PTS فى صورة لاكتوز فوسفات حيث يتحلل الى جلوكوز وجلاكتوز -٦- فوسفات بواسطة p-β-gal . يتخمر الجلوكوز بإتباع مسار glycolytic pathway بينما يتخمر الجلاكتوز من خلال عدة مشتقات tagatose: dihydroxy acetone-P & glyceraldehyde-3-P التى تدخل بعد ذلك فى التفاعلات النهائية لتحليل السكريات glycolysis (شكل ٢-٣) وبالرغم من أن tagatose مركب مشابه stereoisomer للفركتوز إلا أن أنزيمات مختلفه تشارك فى تكوين فركتوز-٦- فوسفات، تجتوز-٦-فوسفات وفركتوز -١ و ٦- ثنائى الفوسفات (FDP) وتجتوز -١و٦ ثنائى الفوسفات (TDP) . وأنزيم TDP aldolase له بعض النشاط على FDP ولكن FDP aldolase ليس له نشاط على TDP والتفاعلات النهائية لتمثيل كل من الجلوكوز والتجتوز متشابه وينتج عنها أختزال البيروفات إلى لاكتات وتتكون فقط L-lactate . وبصفة عامة يتكون L-lactate كناتج وحيد للتخمر ولكن عندما تنمو هذه البكتريا فى وجود الجلاكتوز ، المالتوز أو مستوى منخفض من الجلوكوز ، فإن نواتج أخرى تتكون من تمثيل البيروفات بالأضافة الى L-lactate مثل الفورمات fomate ، الأيثانول ethanol والخلات acetate والشكل (٣-٣) يبين مسارات تكوين هذه النواتج .

تلعب PEP دوراً رئيسياً فى تحديد التوازن بين أنتقال وتمثيل السكر . تنظيم تمثيل السكر عملية معقدة وتعتمد أساساً على أنزيم بيروفات كينيز pyruvate kinase (PK) وتركيز (FDP) والفوسفات غير العضوية (Pi) داخل الخلايا ، ففى الخلايا النامية يكون تركيز (FDP) مرتفع بينما تركيز (Pi) يكون منخفضاً حتى يحافظ على نشاط أنزيم PK وينتج البيروفات . وعلى العكس من ذلك ، فى حالة نقص العناصر الغذائية أى حدوث



شكل٢-٣:المسارات المختلفة لتمثيل اللاكتوز فى بكتريا حمض اللاكتيك

جوع للخلايا starvation فأن تركيز (FDP) يكون منخفضاً وتركيز (Pi) يكون مرتفعاً ويؤدى ذلك إلى إيقاف نشاط أنزيم PK وبالتالى زيادة فى تركيز فوسفواينول بيروفات (PEP) .

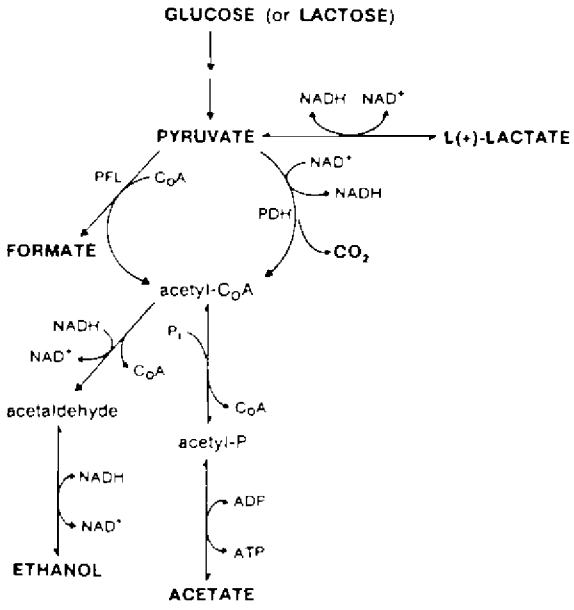
٤-٢-٢- فى *Leuconostoc*

فى هذا النوع من البكتريا يتحلل اللاكتوز إلى جلوكوز وجلاكتوز بواسطةβ-gal ويتخمر الجلوكوز بأتباع مسار phosphoketolase pathway ليكون اللاكتات والأيثانول وغاز CO_2 بكميات مولية متساوية بينما يتحول الجلاكتوز بأتباع مسار Leloir الى جلوكوز-٦-فوسفات بأستخدام أنزيمات galactokinase (GK), galactose-1 puridyl transferase, UDP-4-epimerase (شكل ٢-٣) . يتكون لاكتات وأيثانول نظراً للحاجة إلى توليد NAD^+ لأستمرار عملية التخمر . وعلى عكس بكتريا Lactococci ، يتكون D-lactate . وفى حالة تمثيل الجلوكوز والسترات معاً فإنه يؤدى إلى التحويل من أنتاج الأيثانول إلى أنتاج خلات وانتاج كمية أكبر من اللاكتات عن المتوقع بالنسبة لكمية الجلوكوز المستخدمه ويعزى ذلك إلى تحويل كل البيروفات الناتجة من كل من السترات والجلوكوز إلى لاكتات لتوليد NAD^+ .

٤-٢-٣- فى *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

ينتقل اللاكتوز فى هذا الميكروب عن طريق نظام PMF ويتحلل اللاكتوز بواسطة β-gal والذى يتكون فى الخلايا النامية فى وجود الجلوكوز ولكن يزداد إلى ضعفين ، ٤ أضعاف بواسطة اللاكتوز والجلاكتوز على التوالى . ومع ذلك فإن جزيئات الجلوكوز فقط يحدث لها تمثيل ويفرز الجلاكتوز بكميات متساوية موليا مع اللاكتوز المستخدم. معظم سلالات هذا الميكروب لاتستخدم الجلاكتوز (Gal) ، كما أن الأنواع القادرة على أستخدام الجلاكتوز Gal^+ wild-type تفرز الجلاكتوز عندما تنمو فى وجود اللاكتوز ولكنها تخمر الجلاكتوز فى وجود تركيز منخفض من اللاكتوز (٣,٥ ملليمول) ويتم تخمير الجلوكوز بأتباع مسار glycolytic pathway .

بالأضافة إلى هذا فإن هذا الميكروب لايستخدم PEP فى أنتقال اللاكتوز وبالتالى فإن الدور المنظم لأنزيم (PK) قد لايكون مهماً فى هذا الميكروب كما هو الحال فى Lactococci . وعلى عكس Lactococci ، فإن هذا الميكروب يخمر السكريات تخميراً متجانساً homofermentative حتى عندما ينمو فى وجود تركيزات منخفضة من الجلوكوز أو اللاكتوز ومع ذلك فإن كميات صغيرة من الفورمات (أقل من ١٪ من السكر الكلى المتخمر) تتكون من السكر .



شكل ٣-٣: تمثيل البيروفات فى Lactococci

PFL: pyruvate-formate lyase, PDH: pyruvate dehydrogenase

٤-٢-٤- فى Thermophilic Lactobacilli

هذه البكتريا تحتوى على كل من p-β-gal, β-gal ولكن هناك كثير من المعلومات تدل على أحتمال وجود β-gal فقط فى هذه البكتريا . وقد وجد أن *Lb.helveticus* فقط وعدد قليل من سلالات *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis* تخمر الجلاكتوز. جميع سلالات *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ومعظم سلالات *Lb.dulbrueckii* subsp. *lactis* لاتخمر الجلاكتوز والميكروبات الأخيرة ، تشبه *S.salivarius* subsp. *thermophilus* ، تفرز الجلاكتوز بكميات موليه مساوية للاكتوز المستخدم عندما تنمو فى وجود اللاكتوز ، وبعض السلالات تخمر الجلاكتوز ولكن فقط فى حالة وجود تركيز منخفض من اللاكتوز (٤,٠ ملليمول) وتخمير السكر فى هذه الميكروبات يتم بأتباع مسار glycolysis مع تكوين مشابهات مختلفه isomers من اللاكتات والتى تكون مفيدة فى التعرف على الميكروبات وأنتاج كل من الصورتين isomers قد يعزى الى وجود أنزيمين

من LDH لهاتين الصورتين أو وجود أنزيم واحد من LDH وأنزيم recemase الذى يحول أحدى هاتين الصورتين إلى الصورة الآخرى. وقد وجدت أنزيمات racemases فى عدد قليل من سلالات LAB ولكن لاتوجد فى مزارع البادئات وبالتالى فإن أنتاج D- & L- Lactate يعزى بصفة عامة الى وجود أنزيمين متخصصين من LDH والجدول (٢-٣) يبين ملخص لنظم أنتقال وتمثيل اللاكتوز فى بادىء LAB.

٤-٢-٥- التخمر تحت ظروف هوائية Aerobic metabolism

كثير من بادئات LAB عندما تتعرض للأكسجين تنتج فوق أكسيد الأيدروجين (H_2O_2) الذى يثبط نمو هذه الميكروبات . يعزى أنتاج H_2O_2 ألى زيادة نشاط عدة أنزيمات ، وتشمل pyrdine nucleotide oxidases و peroxidases و pyruvate oxidase و α-glycerophosphate oxidase وعادة يمكن إيقاف تأثير H_2O_2 بإضافة الكتاليز catalase .

Leuconostocs النامية تحت ظروف هوائية تنتج خلات بدلا من الأيثانول نتيجة إلى زيادة بناء acetate kinase, NADH oxidase مع انخفاض نشاط alcohol dehydrogenae, phosphotransferase . و Lactococci التى تنمو فى بيئات معقدة مع وجود الجلوكوز كمصدر للطاقة تكون أساساً متجانسة التخمر homofermentative تحت الظروف الهوائية واللاهوائية . ومع ذلك فى البيئات المحددة التركيب لايحدث نمو هوائى إلا فى وجود lipoic acid أو الخلات حيث أن lipoic acid جزء مكمل لمعقد انزيم pyruvate dehydrogenase (PDH) الذى يشارك فى بناء acetyl CoA . تحت الظروف الهوائية يتكون acetyl CoA من مركب PDH (أو الخلات) بينما تحت الظروف اللاهوائية فإنه يتكون من خلال نشاط pyruvate-formate lyase (PFL) وهذا الأنزيم حساس للأكسجين ويثبط ويصبح غير نشط تحت الظروف الهوائية للنمو .

تتكون الخلات واللاكتات من المكونات الرئيسية الناتجة من تمثيل السكر فى وجود كميات زائدة من lipoate بينما يحل acetoin محل الخلات فى وجود محدود من lipoate . ويمكن زيادة أنتاج ثنائى الأسيتيل بإضافة hemin إلى Cit^+ lactococci .

فوق أكسيد الأيدروجين (H_2O_2) مرتبط مع SCN^- و lactoperoxidase (LP) مثبط قوى لبعض Lactococci. ويوجد كل من LP, SCN^- طبيعياً فى اللبن ويمكن أن ينتج H_2O_2 نتيجة تهوية اللبن أثناء النمو . يتلف LP عند درجة حرارة حوالى ٨٠°م لذلك فإن التثبيط لايحدث عادة فى اللبن المستخدم لأنتاج البادىء .

جدول ٢-٣: الصفات المميزة لتمثيل اللاكتوز فى بادئات بكتريا حمض اللاكتيك

صور اللاكتات **Isomer of lactate**	نواتج التحلل **Products (mol/ mol lactose)**	أنزيم التحلل **Cleavage enzyme**	مسار التحلل (b) **Pathway**	نظام إنتقال (a) اللاكتوز **Transport**	الميكروب **Organisms**
L	4 Lactate	p-ß-gal	GLY	PTS	Lactococcus
D	2Lactate+2Ethanol+2 CO_2	ß-gal	PK	?	Leuconostoc
L	2Lactate[C]	ß-gal	GLY	PMF	*S.salivarius* subsp. *thermophilus*
D	2Lactate[C]	ß-gal	GLY	PMF?	*Lb.delbrueckii* subsp.*lactis*
D	2Lactate[C]	ß-gal	GLY	PMF?	*Lb.delbrueckii* subsp.*bulgaricus*
L+D	4Lactate	ß-gal	GLY	PMF?	*Lb.helveticus*

(a) PEP, phosphotransferase system;PMF, proton motive force (b) Gly, glycolysis; PK , phosphoketolase . (C) هذه الأنواع تحلل فقط شق الجلوكوز من اللاكتوز

٤-٢-٦- اللاكتات فى الجبن Lactate levels i`n cheese

يبلغ محتوى جبن الكممبير ، السويسريه ، النشدر والرومانو من اللاكتات بعد الصناعة ١,٠ ، ١,٤ ، ١,٥ ، ١,٧٪ على التوالى والصور السائدة من اللاكتات فى الجبن هى L-lactate . في الأصناف الهولندية يصل تركيز اللاكتوز عند الكبس حوالى ١,٤٪ والذى يكون نظرياً حوالى ١,٤٪ حامض لاكتيك . ونتيجة لفقد اللاكتات فى الشرش وخلال عملية التمليح الرطب فإن تركيز اللاكتات قد يصل الى حوالى ١,٢٪ . يحدث تمثيل للاكتات فى الجبن إلى مكونات أخرى ، ففى جبن الكممبير تتحول إلى H_2O, CO_2 بواسطة الفطريات التى تنمو على سطح الجبن ، وفى الجبن السويسرية فإن كل من L & D-lactate تتحول إلى بروبيونات وخلات ، CO_2 بينما فى الجبن التشدر فإن L-lactate قد تتحول إلى D-lactate أو إلى خلات بواسطة بكتريا حمض اللاكتيك من غير البادىء (NSLAB) .

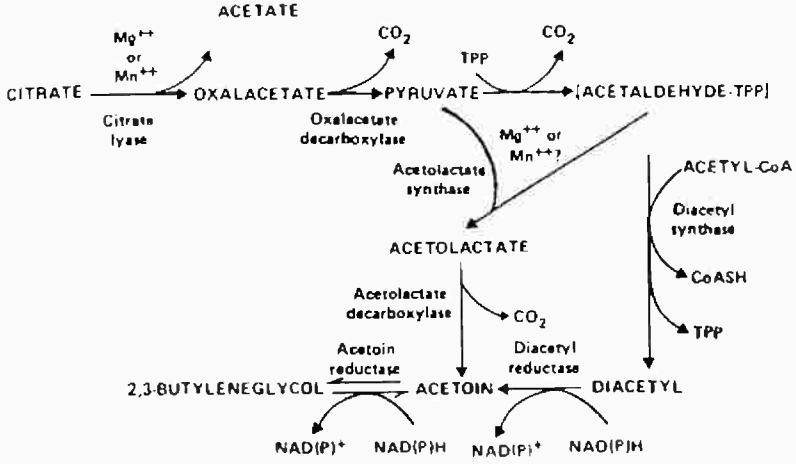
٤-٣- تمثيل السترات Citrate metabolism

بالرغم من أن تركيز السترات فى اللبن منخفض (٨ ملليمول) فإن تمثيل هذا الحامض على جانب كبير من الأهمية فى تحديد التركيب البنائى والطعم فى الجبن الناتج، فإنتاج غاز CO_2 مسئول عن تكوين العيون فى الجبن الهولندية بينما إنتاج ثنائى الأستيل diacetyl والخلات acetate مسئولان عن طعم ونكهة الجبن الطازج (غير المسواه) . كما يعتقد أن ثنائى الأستيل مكون هام فى طعم جبن التشدر . وفى بعض الأحيان يكون أنتاج غازCO_2 غير مرغوب فيه حيث يعتقد أنه مسئول عن طفو خثرة جبن Cottage والتركيب المفتوح فى الجبن التشدر كما أنه يتكون أيضاً من تخمر اللاكتوز بواسطة *Leuconostoc* spp. .

من بين بادئات LAB فإن البكتريا المنتجة لمكونات الطعم فقط (*L.lactis* subsp. *lactis* Cit$^+$ وكذلك *Leuconostoc* spp.) فى المزارع المجة لدرجات الحرارة المعتدلة تخمر السترات ، حيث لايستخدم السترات كمصدر للطاقة ولكن يتخمر بسرعة فى وجود كربوهيدريت قابلة للتخمر بأتباع المسار الموضح فى الشكل (رقم٤-٣). وينتقل السترات إلى داخل الخلايا بواسطة أنزيمpermease ويتحلل إلى oxalacetate بواسطة citrate lyase (CL). ويتكون هذا الأنزيم (CL) فى خلايا Cit$^+$ lactococci ويمكن حثه فى *Leuconostoc* spp. حيث يحتاج إلى عملية acetylation بواسطة أنزيم آخر (citrate lyase ligase) لتنشيطه :

Diacetyl-citrate lyase + Acetate + ATP ⟶ Citrate lyase + AMP + PPi
(Inactive enzyme) (Active enzyme)

درجة pH المثلى لأنزيم (CL) حوالى ٧,٢ وتتكون البيئة من مركب من السترات والمغنسيوم (Mg^{2+}) أو المنجنيز (Mn^{2+}) بكميات مولية متساويه . يتحول oxalacetate بعد نزع مجموعة الكربوكسيل إلى pyruvate الذى بدوره يفقد مجموعة الكربوكسيل ويتحول الى actaldehyde-TPP ، يتحد المركب الأخير مع acetyl CoA ليكون ثنائى الأسيتيل أو مع جزىء آخر من البيروفات ليكون α-aceto lactate (ALA) الذى يفقد بعد ذلك مجموعة كربوكسيل ليكون acetoin . أنزيم α-aceto lactate (ALA) synthase لميكروب *Leuc. lactis* لايحتاج Mn^{2+} ولكن الكميات الكبيرة من الكاتيون التى توجد فى مستخلص الخلايا تغطى أى تأثير أضافى للمنجنيز Mn^{2+} . جزئى ALA غير ثابت ويتحلل بسهولة كيماوياً بدون أكسدة إلى actoin وبالأكسدة إلى diacetyl ونظراً لعدم ثبات ALA ، فإنه قد يتداخل عند تقدير كل من diacetyl and acetoin وكثير من عمليات التحضير (مثل التقطير بالبخار steam distillation) التى تتعرض لها البادئات قبل تقدير هذه المكونات تؤدى إلى فقد مجموعة الكربوكسيل من ALA وبذلك يرتفع تقدير كل من diacetyl and acetoin عما هو معروف .



شكل ٤-٣: تمثيل السترات فى Lactococci, Leuconostocs

كما يمكن أنتاج الـ acetoin من ثنائى الأسيتيل بواسطة أنزيم acetoin dehydrogenase (الأسم القديم diacetyl reductase) و 2,3-butylene glycol (BG) من الـ acetoin بواسطة أنزيم BG dehydrogenase (الأسم القديم acetoin reductase). وقد وجد أن هذه التفاعلات تتم بواسطة أنزيم واحد فى *Enterobacter aerogenes* و*Saccharomyces cerevisiae* وبواسطة أنزيمين فى *E.coli* . فى *L.lactis* subsp. *lactis* Cit$^+$ أمكن عزل وتنقية أنزيمين من BG dehydrogenas وكلا منهما يؤثر على acetoin & diacetyl . بالرغم من أن التأثير على diacetyl أكبر بكثير منه على acetoin فى مخلوط منهما إلا أن الـ acetoin له الأسبقية فى الأختزال . درجة pH المثلى للأنزيم I ١٠,٠ والأنزيم II ٨,٥ عندما يختبر مع BG ، ٦,١ ، ٧,٠ عندما يختبر مع acetoin ، ٨,٥ ، ٦,١ عندما يختبر مع diacetyl على الترتيب. والنواتج التى تتكون من diacetyl بواسطة أنزيم I كانت meso-BG, acetoin والتى تتكون بواسطة أنزيم II كانت BG, acetoin نشط ضوئياً . وقد يتكون مشابهين من acetoin (L & D)وثلاث مشابهات من BG (L,D & meso) ويعتقد أن الأنزيم II, I مسئولين عن أنتاج مشابهات مختلفه من الـ acetoin .

وجود السترات يحد من تكوين acetoin, BG dehydrogenase فى Cit$^+$ lactococci التى تساعد فى شرح تراكم diacetyl & acetoin فى هذه المزارع . وعندما تستهلك السترات يحدث زيادة فى بناء الأنزيمات مع أنخفاض مصاحب فى مستويات كل من diacetyl & acetoin . والأنخفاض يكون بمعدل أسرع عندما تحفظ المزارع عند pH أعلا وهذه النتائج تشير إلى أن هذه الأنزيمات توجد خارج جدار الخلية أو أن مواد التفاعل (substrates) تنتقل بسهولة وبدون عوائق عبر جدار الخلية .

المزارع النقية من Cit$^+$ lactococci والـ Leuconostocs تختلف تماماً فى سلوكها فى تمثيل السترات . الميكروب الأول (Cit$^+$ lactococci) لاينتج diacetyl وينتج كمية ضئيلة من acetoin من السكريات فى غياب السترات ومع ذلك فإنه من الضرورى أن تتوفر الأنزيمات ومادة التفاعل (البيروفات) ويعزى ذلك إلى حاجة الميكروب إلى تحويل كل البيروفات إلى لاكتات حتى يمكن أنتاج NAD$^+$ اللازم لأستمرار تحليل السكريات glycolysis . عندما تستهلك السترات فإن Cit$^+$ lactococci تنتج كميات كبيرة من acetoin والخلات وكميات ضئيلة من diacetyl و BG . وجود hemin$^+$, Fe^{2+}, Cu^{2+} أيضاً يزيد من أنتاج diacetyl بواسطة Cit$^+$ lactococci بينما فى نفس الوقت يحدث أنخفاض فى استهلاك السترات . وعلى العكس ينتج Leuconostocs اللاكتات والأيثانول

وغاز CO_2 بكميات مولية متساوية من الجلوكوز ولاتنتج أيثانول ، acetoin, diacetyl أو 2,3-BG من تمثيل الجلوكوز والسترات معاً ونتيجة لذلك فإن الخلات واللاكتات تنتج بكميات أكبر من المتوقع بالنسبة للسترات والسكر المستخدم. والبيروفات الناتجة من السترات وكذلك الناتجة من الجلوكوز يختزلان إلى لاكتات مع زيادة فى إنتاج اللاكتات و NAD^+.

٤-٣-١- تمثيل السترات فى الجبن Citrate metabolism in cheese

يتوفر قدر محدود من المعلومات عن تمثيل السترات فى الجبن ويعتقد أن diacetyl، يساهم فى طعم جبن التشدر ولكن هناك قليل من النتائج تؤك أنتاج ثنائى الأستيل ، acetoin, BG فى الجبن و لم تشير الى أختفاء السترات وقد وجد حوالى ١ ميكروجرام ثنائى الأستيل/ جرام فى الجبن الناتجة بأستخدام Cit^- lactococci . وقد وجد أن الجبن المصنعه بأستخدام Cit^- *L. lactis* subsp. *cremoris* AM2 تحتوى فى البداية على كميات كبيرة من acetoin (تصل إلى ٨٠ ميكروجرام/جرام) ولكن سرعان مايختفى acetoin خلال التسوية والذى يكون مصحوبا بزيادة مقابلة فى تركيز BG وفى الجبن الناتجة بأستخدام Cit^+ *L.lactis* subsp. *cremoris* HP يتكون مستوى منخفض من acetoin (حوالى ٣٠ ميكروجرام / جرام) الذى ينخفض بدرجة بطيئة جداً خلال التسوية و لم يتكون BG . وعندما تصنع الجبن بأستخدام Cit^+ *L.lactis* subsp. *lactis* DRCI فإن تركيز diacetyl يصل إلى ١١,٣ ميكروجرام/جرام بعد ٥ أيام من التسوية ثم ينخفض إلى حوالى جزء واحد فى المليون بعد ١٠٠ يوم وقد كان مستوى الـ acetoin ثابت عند حوالى ١٥ ميكروجرام / جرام خلال فترة التسوية بينما مستوى BG يختلف من ١٠٠ الى ١٨٠ ميكروجرام/جرام . ومن غير الطبيعى لسلالات Cit^- lactococci أن تنتج كميات كبيرة من acetoin ومع ذلك فإن بكتريا حمض اللاكتيك من غير البادىء (NSLAB) مثل mesophilic Lactobacilli & Pediococci يمكن أن تصل إلى أعداد كبيرة (حوالى ١٠ ^{8}/جرام) فى الجبن وتكون قادرة على تمثيل السترات .

وهناك قدر محدود من المعلومات عن تراكم الخلات فى الجبن ومع ذلك فإنه يعتقد أن هذه المركبات تساهم فى الطعم . والجبن الناتجة بأستخدام بادئات قادرة على أستخدام السترات (Cit^+) قد تحتوى على كميات كبيرة من الخلات بينما الجبن الناتجة بأستخدام بادئات لاتستهلك السترات (Cit^-) لاتحتوى على خلات وقد وجد أن جبن التشدر عمرها ٦ شهور تحتوى على ٣,٥ إلى ٢٤ ملليمول خلات/كجم وكثير من بكتريا NSLAB

يمكن أن تحول اللاكتات إلى خلات وتتوقف الكمية الناتجة على أعداد ونوع البكتريا وعلى معدل أنتقال الأكسجين خلال أغشية التغليف ويبدو أن الأكسجين ضرورى لتكوين الخلات بواسطة Pediococci وليس ضرورياً لـ Lactobacilli .

٤-٤- تمثيل البروتين Protein metabolism

من المعروف أن نمو سلالات Lactococci المختلفه تحتاج الى ٤-١٥ حمض أمينى مختلف سواء فى صورة حرة أو ببتيدات قابلة للهضم . وتركيز الأحماض الأمينية الحرة والببتيدات فى اللبن لاتكفى إلا للحصول على ٢٥٪ فقط من كتلة الخلايا الكلية التى يمكن الحصول عليها فى المزارع العادية كاملة النمو .

بادئات LAB لها قدرات محدودة فى بناء الأحماض الأمينية فمن المعروف أن Lactococci تحتاج إلى glutamate, methionine, valine, leucine and histidine بينما سلالات عديدة لها أحتياجات أضافية من phenylalanine, alanine, lysine, tyrosine. وأحتياجات *S.salivarius* subsp. *thermophilus* من الأحماض الأمينية مماثلة بدرجة كبيرة لأحتياجات Lactococci حيث تحتاج إلى histidine leucine, valine, glutamate بالأضافة إلى tryptophan, cysteine واحتياجات Leuconostocs من الأحماض الأمينية تختلف بأختلاف السلالات حيث تحتاج جميع السلالات إلى glutamate & valine بينما methionine ينشط معظم هذه السلالات . لاتوجد معلومات كافية عن احتياجات thermophilic lactobacilli من الأحماض الأمينية .

يحتوى اللبن على كميات غير كافية من الأحماض الأمينية والببتيدات منخفضة الوزن الجزيئى اللازمة لنمو LAB والحصول على أعداد كبيرة من الخلايا ضرورية فى البادىء وفى صناعة الجبن لذلك يجب أن تحتوى مزارع LAB على نظام بروتينيز قادر على تحلل بروتينات اللبن إلى أحماض أمينية وببتيدات . والكازين هو البروتين الرئيسى فى اللبن وأكثر عرضة للتحلل عن بروتينات الشرش وهناك أربعة متطلبات أولية يجب أن تتوفر للحصول على نمو جيد لـ LAB فى اللبن :

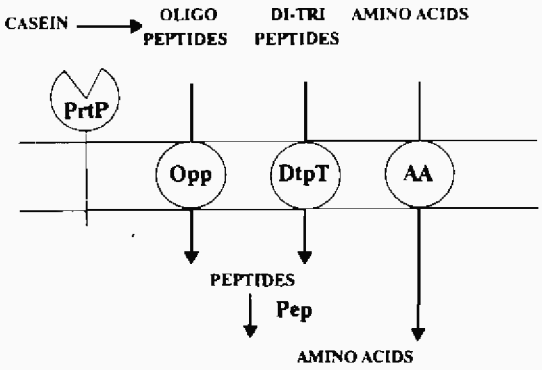
١- نظام بروتينيز والذى يحلل الكازين إلى ببتيدات عديدة .

٢- نظام ببتديز قادر على تحليل الببتيدات العديدة إلى أحماض أمينية وببتيدات صغيرة .

٣- أنظمة أنتقال transport systems لأمتصاص الأحماض الأمينية والببتيدات .

٤- أنزيمات ببتديز خلوية (داخلية) intracellular peptidases لتحليل الببتيدات إلى الأحماض الأمينية المكونه لها .

والشكل (٥-٣) يبين تخطيطاً لتحلل الكازين خارج الخلية وأنتقال نواتج التحلل وتحللها داخل الخلية فى الـ Lactococci .



شكل ٥-٣ : رسم تخطيطى للخطوات المختلفة لتحلل الكازين فى Lactococci

PrtP : أنزيم بروتينيز موجود فى غلاف الخلية

Opp : نظام انتقال الببتيدات العديدة oligopeptides

DtpT: حامل انتقال ثنائى- ثلاثى الببتيدات

AA : أنظمة انتقال لمختلف الأحماض الأمينية

Pep : أنزيمات ببتديز

٤-٤-١- أنزيمات بروتينيز Proteinases

ترتبط أنزيمات البروتينيز بسطح الخلية cell surface أو بغشاء الخلية cell membrane وقد أمكن عزل وتنقية عدة أنواع من أنزيمات البروتينيز ذات وزن جزيئى مرتفع(٨٠-١٤٠ kD) ودرجة pH المثلى لها حوالى ٦ ونقطة التعادل الكهربى حوالى ٤,٥ كما يتم تنشيطها بواسطة أيونات الكالسيوم (Ca^{2+}) وهى عبارة serine protinases ويمكن تقسيم هذه الأنزيمات على أساس درجة pH ودرجة الحرارة المثلى لها إلى نوعين :

١- PI ويكون درجة pH المثلى ٥,٨ ودرجة الحرارة المثلى ٤٠°م ويحلل على β-casein مع تحلل بطىء جدا لـ α_s-casein .

٢- PIII ويكون درجة pH المثلى ٥,٤ ودرجة الحرارة المثلى ٣٠°م ويحلل كل من

α_{s1} - and β-caseins بالأضافة إلى k-casein .

٣- PII (PI/PIII) . درجة pH المثلى قريبة من التعادل (٦,٥) ودرجة الحرارة المثلى ٣٠°م ونشاطه النوعى بين النوعين السابقين ويعتقد أن نشاط PII قد يعزى إلى التباين فى ثبات PI تحت ظروف التفاعل المستخدم لتمييز PI و PIII .

يوجد تكافل بين *S.salivarius* subsp. *thermophilus, Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* فى بادئات الحرارة المرتفعة حيث ينتج Lactobacilli أحماض أمينية وخاصة glycine, valine, histidine والتى تنشط Streptococci وخاصة نشاط أنزيم proteinase. تنتج Streptococci غاز CO_2 وفورمات من السكر الذى ينشط Lactobacilli .

٤-٤-٢- السلالات غير المحللة للبروتين Prt⁻ strains

عديد من البادئات المختلطة mixed starters تحتوى على سلالات قادرة على تحلل بروتينات اللبن (Prt^+) وسلالات أخرى غير قادرة على تحلل البروتين (Prt^-) والأخيرة تكون خالية من البلازميد المسئول عن proteinase وتعتمد على مقدرة تحلل البروتين للسلالات المحللة للبروتين (Prt^+) للنمو فى اللبن ، وكان يطلق على هذه السلالات "سلالات بطيئة التجبن "slow coagulating variants" حيث أنها تفشل فى تجبن اللبن بدرجة سريعة .

تنمو السلالات غير المحللة للبروتين (Prt^-) بسرعة فى اللبن مثل السلالات المحللة للبروتين (Prt^+) ولكن يقف نموها عندما يستهلك الأحماض الأمينية الحرة والببتيدات . ويمكن زيادة أعداد السلالات غير المحللة للبروتين (Prt^-) بعد عدة تنشيطات قد تصل الى ١٠٠ تنشيطية حيث يمكن أن تصل أعداد هذه السلالات إلى ٩٠-٩٨٪ من الأعداد الكلية للسلالات فى البادىء . كما يمكن زيادة أعداد هذه السلالات (Prt^-) بحفظ pH البيئة مرتفعا نسبياً (٥ أو ٦,٥) ولكن قد تسبب هذه الظروف بعض المشاكل فى البيئات المثبطة للفاج .

أستخدام سلالات (Prt^-) فى صناعة الجبن يقلل من ظهور المرارة فى الجبن الناتج كما أنه يعطى محصول جبن أعلا ولكن تحتاج عملية صناعة الجبن الى كمية بادىء من هذه السلالات أكبر وتأخذ الصناعة وقت أطول كما أن الجبن الناتج يحتوى على تركيز أعلا من النيتروجين الذائب عند pH ٤,٦ عن الجبن الناتج بسلالات (Prt^+) الذى قد يعزى إلى تنشيط نمو السلالات (Prt^-) نتيجة استهلاك مستخلص الخميرة المستخدم فى أنتاج بادىء الأضافة (الصناعة) bulk culture .

٤-٤-٣- أنزيمات الببتيديز Peptidases

تتضمن الخطوة الثانية فى الاستفادة من الكازين لتحليل الببتيدات العديدة الكبيرة نسبياً إلى مركبات أصغر بواسطة أنزيمات peptidases . ولايوجد نشاط لأنزيم carboxypeptidase فى بادئات LAB ولكن أمكن تنقية أنزيمات amino peptidases وعدة أنزيمات أخرى تقوم بتحليل الببتيدات المحتوية على برولين di-and tri-peptidases .

ونظراً لأرتفاع محتوى الكازين من البرولين فقد أهتم الباحثون بالتعرف على أنزيمات peptidases التى تعمل على بيئات محتوية على برولين وقد أمكن تنقية ٥ أنواع من الأنزيمات : a proline imino peptidase, an amino peptidase P, an imidodipeptidase(prolidase), an imidodipeptidase(prolinase), X-prolydipeptidyl aminopeptidase(XPDAP). بعض هذه الأنزيمات توجد فى غلاف الخلية ولكن XPADP يوجد داخل الخلية وتختلف انزيمات peptidases فى الوزن الجزيئى من ٣٦ الى ٩٥ kD كما أنها قد تكون من نوع serine أو metallo . وقد أمكن عزل وتنقية أنزيمات XPDAPs من عدة بادئات LAB وتشمل Lactococci *Lb.delbrueckii* subsp.*bulgaricus* *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb.helveticus*, وكذلك *S.salivarius* subsp. *thermophilus*.

٤-٤-٤- أنتقال الأحماض الأمينية والببتيدات

Amino acid and peptide transport

تتضمن الخطوة الثالثة فى الأستفادة من الكازين هو أنتقال الببتيدات والأحماض الأمينية ويوجد فى Lactococci أنظمة أنتقال منفصلة لأمتصاص الببتيدات والأحماض الأمينية . الببتيدات المحتوية على عدد من الأحماض الأمينية تصل حتى ٦ أحماض يمكن أنتقالها إلى داخل الخلية ثم تتحلل بعد ذلك إلى الأحماض الأمينية المكونة لها بواسطة أنزيمات الببتيدات الخلوية (الداخلية) intracellular peptidases .

فى Lactococci فإن الأحماض الأمينية الميثانوئين والأحماض الأمينية المتفرعة (الليوسين وأيسوليوسين والفالين) جميعها ضرورية لنمو هذه البادئات ، والأحماض الأمينية المتعادلة (سيرين ، ثيرونين ، جليسين وألانين) والأحماض الأمينية القاعدية (الليسين) تنتقل جميعها بواسطة نظام PMF . وعادة يمتص البرولين فى صورة ببتيد بينما يمتص الجلوتامين ، والجلوتاميت والأسباراجين بواسطة تفاعل بمساعدة ATPase بينما الأرجنين يمتص بواسطة

نظام PMF . ويتم تمثيل الأرجنين فى خطوات متتابعة بإتباع مسار deiminase pathway.

$$\text{Arginine} + H_2O \longrightarrow \text{Citrulline} + NH_3$$

$$\text{Citrulline} + Pi \longrightarrow \text{Ornithine} + \text{Carbamyl Phosphate}$$

$$\text{Carbamyl phosphate} + ADP \longrightarrow ATP + CO_2 + NH_3$$

والأنزيمات المشتركة هى : arginine deiminase, ornithine transcarbamylase, carbamate kinase, على التوالى مع أنتاج ATP . وأحد الصفات الرئيسية التى تميز *L.lactis* subsp. *lactis* من *L.lactis* subsp. *cremoris* هو القدرة على تمثيل الأرجنين . جميع سلالات *L.lactis* subsp. *cremoris* خالية من نشاط أنزيم deiminase كما أن البعض خالى من أنزيم transcarbamylase . جميع السلالات تحتوى على نشاط أنزيم carbamate kinase .

٤-٤-٥- المرارة Bitterness

تعتبر المرارة مشكلة فى بعض أنواع من الجبن التى تصنع بأستخدام بادئات الحرارة المرتفعة وقد يعزى ذلك إلى أنتاج ببتيدات مرة bitter peptides ، التى يسود فيها الأحماض الأمينيةالكارهه للماء hydrophobic amino acids، بفعل المنفحة وبكتريا البادئ.

تشير كثير من النتائج أن جميع سلالات البادىء تسبب مرارة ويمكن أن لاتسبب مرارة إذ تم مراقبة معدل تكاثرها أثناء صناعة الجبن (مثلاً بأستخدام درجات حرارة عالية فى الطبخ أو فى وجود الفاج) حتى تصبح أعداد الخلايا فى الخثرة قليلة نسبياً . تظهر المرارة نتيجة زيادة تحليل الببتيدات المرة وغير المرة بواسطة الأعداد المرتفعة من الخلايا .

يوجد عدد من البادئات تنتج ببتيدات مرة فقط ولكن يمكنها أن تحلل هذه الببتيدات . الملح يقلل نفاذية خلايا بكتريا البادىء وتزيد من الأرتباط بين الببتيدات المرة. كل من هذين العاملين يؤدى الى تقليل الببتيدات المتاحه لأنزيمات البروتينيز المرتبط بغشاء الخلية . ويؤدى تراكمها إلى أنتاج جبن ذات طعم مر . المصادر الرئيسية للببتيدات المرة تكون فى المنطقة الواقعة من ٨٤-٨٩ و ١٩٣-٢٠٩ فى السلسلةالببتيدية لـ β-casein.

٤-٥- الأسيتالدهيد Acetaldehyde

ينتج الأسيتالدهيد بواسطة كل من بادئات الحرارة المعتدلة mesophilic والحرارة المرتفعة thermophilic ولكن تنتج بادئات النوع الثانى كميات أكبر (تصل إلى حوالى ٢٠ ميكروجرام/مل) ويعتبر الأسيتالدهيد مكون هام من مكونات الطعم فى اليوجهورت ولكن قد يسبب طعم غير مرغوب فيه off-flavors فى الألبان المتخمرة الناتجة بأستخدام البادئات

المحبة للحرارة المعتدلة وخاصة إذا إنخفضت النسبة بين ثنائى الأسيتيل والأسيتالدهيد إلى ١:٣ . والنسبة المثالية بينهما يجب أن تكون ١:٤ .

فى البادئات المحبة للحرارة المعتدلة ينتج الأسيتالدهيد أساساً من threonine بواسطة thereonine aldalose حيث يتحلل الثيرونين إلى جلايسين وأسيتالدهيد . لذلك فإن سلالات Lactococci التي لاتحتوى على threonine aldolase تكون فى حاجة إلى جلايسين . لذلك فإن الوظيفة الرئيسية لأنزيم threonine aldolase هو توفير الجلايسين للنمو . وأحد وظائف *Leuconostoc* spp. فى البادئات المختلطة المحبة للحرارة المعتدلة هو اختزال الأسيتالدهيد ، الناتج بواسطة الأعداد الزائدة من Lactic streptococci ، إلى إيثانول . وفى المزارع المحبة للحرارة المرتفعه فإن *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ينتج كمية أكبر من الأسيتالدهيد عما ينتجه *S.salivarius* subsp. *thermophilus* ولكن نظراً للعلاقة التكافلية بين هذه الأنواع فإن كمية أكبر من الأسيتالدهيد تنتج عندما تنمو هذه المزارع معاً . مصدر الأسيتالدهيد فى البادئات المحبة للحرارة المرتفعة من المحتمل أن يكون السكر. يحتوى *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* على نشاط threonine aldolase ولكن لاتنتج أو تنتج كميات ضئيلة من الأسيتالدهيد من الثيرونين ، وقد أوضح البعض أن أسباب تعارض هذه النتائج مازالت غير واضحة .

٤-٦- قياس النمو Measurement of growth

يتم الحصول على منحنى نمو البكتريا عادة بأستخدام لوغاريتم الأمتصاص الضوئى، الذى يقدر بواسطة أجهزة القياس الضوئى spectrophotometry عند موجه ٤٠٠-٦٥٠ nm (القياس غند موجات ضوئية أقصر تكون أكثر حساسية وخاصة مع أنخفاض أعداد الخلايا) أو لوغاريتم الوزن الجاف للخلايا مع الوقت . ونظراً لعدم شفافية اللبن فإنه من الصعب قياس قيم الأمتصاص absorbance values لذلك فإن المعاملة بأيدروكسيد البوتاسيوم KOH و EDTA يجعل اللبن شفافاً وصالحاً لقياس درجة الأمتصاص الضوئى . ومن السهل تقدير حمض اللاكتيك بواسطة المعايرة بالصودا الكاوية NaOH والذى يرتبط أرتباطاً مباشراً بكتلة الخلايا cell mass ويمكن أستخدامه فى الحصول على منحنى النمو . وعند رسم منحنى النمو فإن من الضرورى تعديل القياسات وذلك بالنسبة للحموضة الطبيعية للبن غير الملقح (أى حساب الزيادة فى الحموضة المتكونه) ويفضل أن يرسم بطريقة نصف لوغاريتم semi-logarithmic بدلاً من الطريقة الحسابية . وطالما أن المنحنى قد تم تنفيذه semi-logarithemic فإن ميل slope *(m)* الجزء المستقيم

من المنحنى يرتبط بمعدل النمو النوعى (*K*) specific growth rate فى ضوء المعادلة التالية:

$$m = K/2.303$$

وفترة الجيل generation time(GT) أو فترة تضاعف أعداد الخلايا doubling time ترتبط بمعدل النمو النوعى (*K*) طبقاً للمعادلة الآتية :

$$GT = 0.693/K = 0.301/m$$

ودرجة الحرارة المثلى لمزارع الحرارة المعتدلة هى حوالى ٣٠°م وللمحبة للحرارة المرتفعة هى ٤٥°م لذلك فإن فترة الجيل (GT) فى المزارع المحبة للحرارة المعتدلة فى اللبن عند ٣٠° م ، ٢١°م (وهى درجة الحرارة الطبيعية لأنتاج بادىء الاضافة) هو ١، ٢,٣ ساعة على التوالى بينما للبكتريا المحبة للحرارة المرتفعة *Lb.helveticus* & *S. salivarius* subsp. *thermophilus* (حيث تنمو بصفة عامه أسرع من المزارع المحبة للحرارة المعتدلة) هى حوالى ٣٠ دقيقة ، ساعة واحدة على التوالى عند درجة ٤٢°م .

يمكن قياس قيم pH بسهولة وعادة يستخدم الأنخفاض فى pH نتيجة لأنتاج حمض اللاكتيك فى قياس النمو . ومع ذلك فإن pH ليس مرتبطاً أرتباطاً مباشراً بأعداد الخلايا أو أنتاج حمض اللاكتيك ولايمكن أستخدامه فى حساب GTs . وبادئات LAB تنتج كميات كبيرة من حامض اللاكتيك لذلك فإن بيئات النمو يجب أن تنظم buffered بطريقة مناسبة . اللبن وخاصة الذى يرفع فيه الجوامد اللادهنية إلى ١٠-١٢٪ يحتوى عادة على قوة تنظيمية جيدة . وينخفض pH المزارع النامية فى اللبن نمواً كاملاً من ٦ر٥ فى البداية إلى ٤,٥، ٤,٥ ، ٣,٥ فى النهاية وذلك للمزارع المحبة للحرارة المعتدلة ، *S.salivarius* subsp. *thermophilus* والمحبة للحرارة المرتفعه من Lactobacilli على التوالى ومثل هذه المزارع تحتوى على عدد من الخلايا حوالى ١٠ ^{٩}/مل .

درجة النمو عند أى نقطة تتحدد بواسطة ٣ عوامل : معدل التلقيح ، درجة حرارة ومدة التحضين . ففى بادئات الحرارة المعتدلة يكون معدل التلقيح ٠,٥٪ ودرجة حرارة التحضين ٢١°م لمدة ١٦ ساعة . تحت هذه الظروف يتجبن اللبن فى ١٦ ساعة حيث ينخفض خلالها pH إلى ٤,٥ ويرتفع تركيز اللاكتات إلى حوالى ٠,٧٪ . بفرض أن الحموضة فى البداية فى اللبن كانت ٠,١٥٪ وهذا يعادل حموضة كلية تقدر بـ ٠,٨٥٪ فإن أنتاج حمض اللاكتيك يتوقف عند ٠,٤-٠,٥٪ (٤,٨ pH-٥,٠) .

ضن بادئات الحرارة المرتفعة بصفة عامه عند ٤٠-٤٥°م لمدة ٦ ساعات مع التلقيح بمعدل ٠,٥٪ . تحت هذه الظروف *S.thermophilus* تنتج حوالى ٠,٥٪ حامض لاكتيك

(pH حوالى ٥,٠) thermophilic lactobacilli حوالى ٠,٥-٠,٨٪ (pH ٤,٢-٤,٥) فإذا أستمر التحضين فإن الميكروبات الأخيرة قد تنتج حموضة تصل إلى ٢٪ حامض لاكتيك (pH حوالى ٣,٥) . ويجب ملاحظة أن تجبن اللبن يحدث عند pH أعلا عند درجات حرارة أعلا لذلك فإن حموضة بادئات الحرارة المعتدلة والمرتفعة عند التجبن غير متساوية .

٥- مثبطات نمو البادئات Inhibitors of culture growth

يوجد عدد من العوامل تؤثر بشدة على نشاط البادئات ، تتضمن التباين فى تركيب اللبن نتيجة الأصابة بمرض التهاب الضرع mastitis أو العوامل الموسمية ، وعمليات صناعة الجبن مثل درجة حرارة الطبخ و/أو نسبة الملح . هذا بالأضافة الى المواد المثبطة التى قد توجد فى اللبن مثل المضادات الحيوية ، الأجلوتنين agglutinins والأكسجين الذائب ، الفاج phage ، الأحماض الدهنية الحرة ، البكتريا المثبطه ونظام LP (lactoperoxidase) ، وبقايا المواد المطهرة sanitizers والبكتريوسينات bacteriocins . الألتزام بطرق مراقبة الجودة وطرق التصنيع الجيدة تساعد فى تقليل تأثير معظم هذه العوامل الى الحد الأدنى فى صناعة الجبن بالطريقة الحديثه ومع ذلك فمازال هناك بعض الصعوبات قد تنشأ من بقايا المضادات الحيوية والبكتريوسينات والفاج .

٥-١- المضادات الحيوية Antibiotics

توجد بقايا المضادات الحيوية فى اللبن بصفة أساسية نتيجة أستخدامها فى معالجة الحيوانات المصابه بمرض التهاب الضرع mastitis . والعقوبات الصارمه على المنتجين قد أدت الى تخفيض تأثير المضادات الحيوية بدرجة كبيرة . وهناك قليل من المعلومات متوفرة بالنسبة إلى مستويات المضادات الحيوية اللازمة لتثبيط Leuconostocs ولكن بالنسبة لبادئات LAB الأخرى يوجد تباين فى درجة حساسيتها للمضادات الحيوية الشائعة الأستخدام فى علاج مرض التهاب الضرع (جدول ٣-٣) ومن هذه النتائج يتضح أن بادئات الحرارة المعتدلة mesophiles أقل حساسية للبنسلين وأكثر حساسية للستربتوميسين عن بادئات الحرارة المرتفعه thermophiles .

٥- ٢- البكتريوسينات Bacteriocins

البكتريوسينات عبارة عن بروتينات لها تأثير مثبط bacteriostatic أو قاتل bactericidal ضد البكتريا المرتبطة وهذه البكتريوسينات التى تفرزها بكتريا حمض اللاكتيك ثم تنقيتها ودراسة أهم صفاتها (جدول٤-٣) . وجميع هذه البكتريوسينات

جدول ٤-٣ : بعض صفات البكتريوسينات الناتجة من بكتريا حمض اللاكتيك .

الميكروب	البكتريوسين	البكتريا الحساسة	البكتريا المقاومة	أسلوب التأثير	الوزن الجزيئي	المقاومة الحرارية
سلالات مختلفة من *Lb. acidophilus*	Lactacin B & F	Thermophilic Lactobacilli Enterococci	Mesophilic Lactobacilli Clostridia Enterobacteria *Ps. aeruginosa* *S. aureus* Lactococci *En. faecalis*	Bactericidal and Bacteriostatic	٦٠٠٠-٢٥٠٠	١٠٠م × ١ ساعة ١٢١م × ١٥ دقيقة
سلالات مختلفة من *Lb. helveticus*	Lactocin & Helveticin	Thermophilic Lactobacilli	Mesophilic Lactobacilli	Bacteriostatic and Bactericidal	٣٧٠٠٠ - ١٢٤٠٠	أقل من ١٠٠م × ٠,٥ ساعة
L. lactis spp. *lactis*	Nisin	Lactococci Clostridia Staphylococci Listeria	–	Bactericidal	٣٥٠٠	١٢١م × ١٥ دقيقة
L. lactis spp. *lactis* biov. *diacetylactis*	Bacteriocin	Other Lactococci *Str. thermophlus* Pseudomonas *S. aureus* Enterococci Bacilli Enterobacteria	Thermophilic Lactobacilli *S. aureus* *B. subtilis* Streptococci	–	–	١٠٠-١٢٥م × ١ ساعة
سلالات مختلفة من *L. lactis* spp. *cremoris*	Lactococcin, Diplococcin & Lactostrepcin	Other Lactococci	Gram negative Bacilli Micrococci Enterococci Pseudomonas Falvobacteria	Bactericidal	–	أقل من ١٠٠م × ١ ساعة
سلالات مختلفة من *Ped acidilactici*	Pediocin & Bacterocin	Other pediococci *L. monocytogenes* Leuconostocs Mesophilic Lactobacilli *S. aureus* *Cl. perfringens* *Ps. putida*	Lactococci Staphylococci Micrococci Thermophilic Lactobacilli, Salmonella *E. coli*, Yersinia	Bactericidal and Bacteriostate	١٦٥٠٠-٢٧٠٠	١٢١م × ١٥ دقيقة

عبارة عن بروتينات مختلفة الوزن الجزيئى ومقاومة للحرارة و pH. البكتريوسينات التى تثبط البكتريا المرضية والبكتريا المسببة للفساد مفيدة بالرغم من أنه حتى الآن فإن النيسين nisin فقط الناتج بواسطة *L.lactis* subsp. *lactis* يستخدم على نطاق تجارى فى صناعة الأغذية ويتميز بأتساع مجال تأثيره (*Clostridium, Staphylococcus, Listeria*) والنياسين عبارة عن ببتيد عديد polypeptide يحتوى على ٣٤ حمض أمينى ومقاومة للحرارة عند pH حامضى ووزنه الجزيئى ٣,٥ kD وينتمى لمجموعة المضادات الحيوية المعروفة بالـ Lantibiotics أومعظمها تنتج بواسطة بكتريا غير بكتريا حمض اللاكتيك non-LAB ويتميز بأحتوائه على أحماض أمينية غير عادية مثل lanthionine, (3,3'-thiodialanine) β-methyl lanthionine . يعتقد أن أسلوب تأثير النياسين يتضمن إتلاف غشاء الخلية الذى يؤدى إلى إنهيار جهد الغشاء وتدفق المكونات ذات الوزن الجزيئى المنخفض (يرجع الى ٢-٢-الفصل الثانى) .

جدول ٣-٣: تركيز المضادات الحيوية (ميكروجرام/مل) الذى يثبط نمو بكتريا البادئات فى اللبن بمعدل ٥٠٪ .

الميكروب	عدد السلالات	المضاد الحيوى		
		بنسلين	تتراسيكلين	استربتوميسين
L. lactis subsp. *cremoris*	٤	٠,١١	٠,١٤	٠,٦٧
L. lactis subsp. *lactis*	٤	٠,١٢	٠,١٥	٠,٥٣
S. salivarius subsp. *thermophilus*	٣	٠,٠١	٠,١٩	١٠,٥
Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus*	٢	٠,٠٣	٠,٣٧	٣,٠
Lb. delbrueckii subsp *lactis*	١	٠,٠٢٤	٠,٦	٢,٢٩

وقد دلت النتائج المتحصل عليها من دراسة مسحية لمزارع معرفة السلالة أن مابين ١-١٠٪ من سلالات Lactococci تنتج بكتريوسينات وتتوقف القدرةعلى الكشف على بكتريوسين على السلالة الدليل المستخدمه indicator strain لذلك فإن هذ الأرقام لاتمثل أعلا نسبة محتملة للسلالات المنتجة للبكتريوسين . بالرغم من مقدرة بكتريا حمض اللاكتيك الواسعة على أنتاج بكتريوسينات فإن النيسين هو الوحيد الذى وجد له قيمة تجارية ، وقد تم اعتماده فى عام ١٩٦٩ بواسطة منظمة الصحة العالمية WHO كمادة مضافه للغذاء food additive وقد أستخدمت على نطاق واسع لهذا الغرض فى أوربا .

وفى عام ١٩٨٨ وافقت إدارة الأغذية والأدوية FDA فى الولايات المتحدة الأمريكية على أستخدام النيسين فى عدد محدود من مفرودات الجبن المبستر pasteurized cheese spreads حيث أن المحتوى المرتفع من الرطوبة والمحتوى المنخفض من الصوديوم لايمنع مخاطرة تكوين سم البوتيلين botulinal toxin فى الناتج .

٥-٣- البكتريوفاج (الفاج) Bacteriophage (Phage)

الفاج عبارة عن دقائق أو جسيمات particles بالغة الصغر فى الحجم بدرجة لايمكن رؤيتها إلا بالميكروسكوب الألكترونى بعد أستخدام طرق صبغ مناسبة . وجميع الفاجات لها رأس منشورية متعدد الأوجه يتراوح طول مقطعها العرضى بين ٥٠-١٠٠ ملليميكرون عبارة عن غلاف بروتينى يوجد بداخلها جزىء مفرد من DNA ويماثل فى حجمه العديد من البلازميدات . وفى معظم هذه الفاجات يلحق بالرأس ذيل يتكون من أنبوبة مركزية حلزونية (التى يمر من خلالها DNA الفاج عند غزو الخلية البكتيرية) محاطه بطبقة حلزونية قابلة للتقلص متصلة من أسفلها بصحيفة قاعدية base plate تتصل بألياف ذيلية رفيعة وطويلة ، وهذه الألياف هى أعضاء الأتصال بالخلية العائل.

يسبب الفاج مشكلة خطيرة فى صناعة الجبن حيث يهاجم ويحلل خلايا البادىء ومن الشائع أن يوجد الفاج فى بيئة مصانع الجبن أو فى مزارع البادىء نفسه (own phage) الذى لايؤثر على قدرة المزارع على أنتاج الحموضة . وقد أكتشف فاج بكتريا حمض اللاكتيك الكروية فى نيوزيلندا فى عام ١٩٣٥ ومنذ هذا الوقت بذلت جهود كبيرة للتغلب على المشاكل التى يسببها الفاج . ويوجد نوعان من الفاجات - الفاجات الضاربة virulant phages والفاجات المعتدلة temperate phages ويمكن أن ندخل هذه الفاجات الى بكتريا العائل من خلال علاقتين مختلفتين ، دورة التحلل lytic cycle والدورة اللايسوجينية (الدورة المولدة للتحلل) lysogenic cycle

أ - دورة التحلل : Lytic cycle

تحدث دورة التحلل فى ٤ خطوات رئيسية : (١) أمتزاز الفاج phage adsorption ، (٢) حقن DNA injection, DNA ، (٣) تضاعف الفاج phage multiplication ، (٤) أنطلاق الفاج phage release .

حيث تبدأ هذه الدورة (شكل ٦-٣) بإمتزاز ذيل الفاج عند مراكز أستقبال معينة على سطح الخلية البكتيرية حيث يتقلص غلاف الذيل ويدخل الأنبوبة المركزية للذيل خلال جدار الخلية ويحقن DNA الفاج قريبا من غشاء الخلية. وفى خلال دقائق فإن DNA الفاج

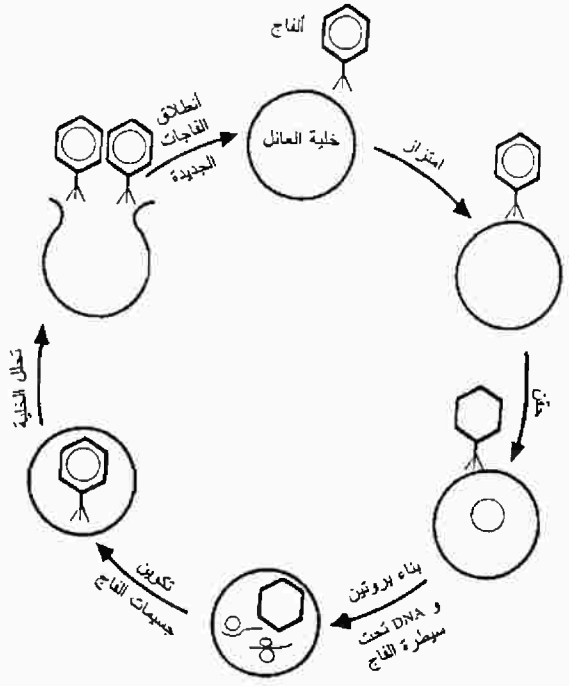
يتولى السيطرة على وظائف الخلية لكى يقوم ببناء DNA وبروتينات الفاج لمضاعفة نفسه بمعدل أكبر من خلايا العائل وأخيراً تنفجر الخلايا وينطلق منها جسيمات فاج حر يمكن أن تصيب خلايا جديدة لذلك يطلق على هذه الفاجات "الفاجات الضاريه virulent phages" وتعرف الفترة من الأصابة بالفاج حتى أنطلاق الفاج بفترة التحضير latent period وعادة تكون قصيرة (٤٥-٦٠ دقيقة) ويكون عدد الفاجات الناتجة عند الأنفجار مرتفعاً حيث يصل إلى ٢٠٠/خلية لذلك فإن أصابة الخلايا بمثل هذه الفاجات يمكن أن تؤدى إلى أتلاف قدرة خلايا البادىء تماماً على النمو وأنتاج حامض اللاكتيك وقد وجد أن فترة دورة التحلل للفاج Pl-1 الذى يصيب *Lb.casei* ٢٧٠ دقيقة وعدد الفاجات الناتجة ٢٠٠/خلية بينما للفاج LL-N الذى يصيب *Lb.lactis* فهى ٢٤٠ دقيقة وعدد الفاجات الناتجة ١٠٠/خلية أما بالنسبة Lactococci فإن متوسط دورة التحلل ٤٥ دقيقه (تتراوح من ٣٢-٥٦ دقيقة)وعدد الفاجات الناتجة ٣٥/خلية(تتراوح من٢-١٠٥).

التباين فى معدلات نمو الفاج وخلايا العائل يوضح حساسية المزارع النامية للأصابة بالفاج . الأنزيمات المحللة المرتبطة بالفاج (lysins) قد تكون مسئولة عن تثبيط المزارع المختلطة التى يكون فيها أحد السلالات المكونة قد أصيبت بفاج محلل lytic phage يؤدى إلى أنتاج كميات كبيرة من lysin الذى قد يؤثر على غيرها من السلالات .

ب - الدورة اللايسوجينية (الدورة المولدة للتحلل) Lysogenic cycle

عندما يهاجم فاج معتدل temperate or lysogenic phage خلايا العائل أحياناً لاتكون اصابتها ضاريه كما فى النوع الأول المحلل للبكتريا حيث يتكامل DNA الفاج عند موقع معين مع كروموسوم خليةالعائل بعد الأصابة (يكون مايعرف بالفاج الأولى prophage) ولايسبب تحلل للخلية وتعرف الخلية البكتيرية المحتوية على نسخة من الفاج الأولى بالـ lysogenic bacteria وقد يبقى DNA الفاج مستقلا بذاته مثل أى من البلازميدات فى السيتوبلازم وقد يبقى هذا الفاج كامناً dormant فى الخلية لذلك فإن المزارع اللايسوجينية المحتوية على فاجات حرة لاتؤثر على نمو أو قدرة هذه المزارع على انتاج الحموضة . ومع ذلك فإنه يمكن حثه فى معظم الخلايا بواسطة الأشعة فوق البنفسجية UV أو المعاملة بمضاد حيوى mitomycin C كما يمكن أن يحدث تلقائى عند ترددات منخفضة . ويمكن الكشف عن الفاج أو المنطلق من الخلايا على فترات بأستخدام سلالات دليل indicator strains أو بفحص السائل الرائق بالميكروسكوب الاليكترونى وقد وجد أن جميع بكتريا حمض اللاكتيك بصفة أساسية لايسوجينية lysogenic والبعض

الآخر متعدد اللايسوجينية multilysogenic أى يفرز أثنين أو أكثر من الفاجات المختلفه وعموماً فإن الفاجات عادة ما تصيب نوع واحد فقط من الكبتريا وأن كان من الممكن أن يصيب عدد من الفاجات نوعاً واحداً من البكتريا .



شكل ٦-٣: دورة تحلل خلية العائل المصابه بالفاج

الطبيعة اللايسوجينية lysogenic nature لمعظم السلالات قد تؤدى إلى الأعتقاد أن مثل هذه السلالات هى المصدر الرئيسى للفاجات الضارية virulent phage فى تخمرات الألبان وأن التخلص من السلالات التى تفرزالفاج تلقائياً من بادئات الجبن تساهم فى خفض مستويات الفاج فى البيئة . كما وجد آخرون أنه لايوجد تشابه بين فاجات اللايسوجينية lysogenic وفاجات التحلل lytic لعدد من سلالات Lactococci مما يدل على أن الفاجات المعتدل temperate ليست مصدراً لفاجات التحلل (الضارية) وبالرغم من أن الفاجات قد وجدت فى بعض البادئات مختلطة السلالة إلا أن مصدرها الأساسى مازال يحتاج إلى تحديد .

مازالت المعلومات محدودة فيما يتعلق بأعداد الفاج التى تسبب مشاكل فى صناعة الجبن .تلوث المزرعة نفسها بالفاج تعتبر أكثر أهمية من تلوث لبن الجبن . وقد أشار البعض إلى أن مابين ٦٠٠ إلى ٦٠٠٠ فاج/مل يكون ضرورياً لإبطاء صناعة الجبن بينما أوضح البعض أن عدد ١٠٠ فاج/مل فى البداية مع معدل تكاثر ١ × ١٠ ^{٧} قد يؤثر بشدة على أنتاج الحموضة أثناء صناعة الجبن كما وجد الباحثين أن متوسط أعداد الفاج ١ × ١٠ ^{٥}/مل ، ٢,٤ × ١٠ ^{٨}/مل فى الشرش الناتج عند صرف الشرش وعند الطحن على التوالى . هذه المستويات تدل على أن العدد الأولى يتراوح بين ٥-٥٠٠٠ فاج/مل وعند المستوى الأقل فإن ذلك يعادل حوالى ٠,٠١ مل من الشرش الناتج عند مرحلة الطحن لكل ٦٠٠٠ لتر من اللبن. ومن الواضح أن هذا المعدل يعتبر مستوى منخفض جداً من التلوث والأمر يحتاج إلى أتخاذ إجراءات وقائية مناسبة للحد من هذا التلوث .

٥-٣-١- كشف وعد الفاج Detection and enumeration of phage

هناك طريقتان مختلفتان لكشف وعد الفاج لبكتريا حمض اللاكتيك المصابه وتثبيط أنتاج الحموضة وبصرف النظر عن الطريقة المستخدمة فأن مصدر الفاج يجب أن يتم ترشيحه من خلال مرشحات معقمة (٠,٤٥ um) قبل أختبارها . وتجرى عملية طرد مركزى لبادىء الصناعة bulk starter قبل أن يتم ترشيح الرائق ، بينما الشرش عادة يرشح مباشرة ومثل هذا الشرش قد يسد غشاء المرشحات ولكن يمكن التغلب على ذلك بإجراء طرد مركزى أو ترشيح أولى للشرش خلال مرشح عادى قبل مرشح التعقيم . يعتبر أيونات الكالسيوم (Ca^{2+}) ضرورياً لعملية ألتصاق الفاج بسطح خلايا العائل ولكن يرسب فى بيئات تحتوى على منظم فوسفات phosphate buffer وقد أمكن التغلب على ترسيب (Ca^{2+}) بأستخدام بيئات تحتوى على منظم glycerophosphate التى تستخدم لـ Lactococci ، *S.salivarius* subsp. *thermophilus* ولكنها مثبطة لعديد من أنواع thermophilic lactobacilli ويفضل بيئة MRS لهذه الأنواع من البكتريا.

فى طريقة plaque يضاف التخفيف المناسب للمصدر المراد تحليله والذى سبق ترشيحه بمرشحات تعقيم مع Ca^{2+} والبكتريا العائل إلى بيئة آجار معلق (معلق M17 أو MRS تحتوى على ٠,٧٪ آجار) الذى يصب بسرعة على آجار صلب فى طبق بترى . وبعض أنواع الفاج المحب للحرارة المعتدلة mesophilic phage يتضاعف بدرجة أسرع عند ٢١°م بينما البعض الآخر عند ٣٥°م لذلك فإن الأطباق يجب أن تحضن عند ٢١، ٣٠، ٣٧م . عند درجة ٣٠ ، ٣٧°م يمكن رؤية البلاك plaque بعد ٥ ساعات تحضين (ويعنى

بالـ plaque منطقة شفافة تتكون نتيجة وجود الفاج أو خلية مصابة بالفاج) ويمكن عد هذه البلاكات لمعرفة عدد جسيمات الفاج فى التخفيف المستعمل) وعادة ماتحضن الأطباق طول الليل.تحضن الأطباق الخاصة بالفاجات المحبة للحرارة المرتفعة عموماً على درجة ٣٧-٤٠°م تحت ظروف هوائية للـ *S.salivarius* subsp. *thermophilus* وتحت ظروف هوائية أو لاهوائية للـ Lactobacilli. الفاجات المحبة للحرارة المعتدلة التى تتضاعف بسرعة عند درجة ٣٥°م يعرف بـ "فاج اللبن الخام" "raw milk phage" لأنه يتضاعف أفضل فى اللبن الخام أو المبستر عنه فى اللبن المعقم ويؤثر فقط على أنتاج الحموضة أثناء المراحل النهائية لصناعة الجبن .

فى طريقة تثبيط الحموضة acid inhibition method يضاف التخفيف المناسب للمصدر المراد أختباره والذى سبق ترشيحه بمرشحات تعقيم الى عينات من اللبن المبستر واللبن المعقم ويلقح ببكتريا العائل المناسب . ومن الأمور المهمة التحضين على درجات حرارة مختلفة ، كما سبق الأشارة ، وعادة يحضن عند ٢١°م لمدة ١٢ ساعة ، ٣٠°م لمدة ٦ ساعات وعند درجات الحرارة المستخدمة فى صناعة الجبن لمدة ٦ ساعات (٩٠ دقيقة عند ٣٠°م يتبعها رفع درجة الحرارة الى ٣٩°م فى خلال ٤٥ دقيقة ويحافظ على هذه الدرجة للفترة المتبقية وهى ٣ ساعات و ٤٥ دقيقة) وذلك للمزارع المحبة للحرارة المعتدلة. وتحضن المزارع المحبة للحرارة المرتفعة عند ٤٢°م لمدة ٤ ساعات . وبعد التحضين يقدر pH ويقارن بـ pH فى عينه المقارنه والتى لاتحتوى على شرش . الأختلاف فى حدود ٠,٣ وحدة pH أو أكثر عن عينة المقارنة يدل على أحتمال الأصابة بالفاج .

ويمكن الكشف عن فاج الحرارة المعتدلة الذى لايكون plaque فى الأطباق بواسطة أختبار تثبيط الحموضة . ولتحديد ماإذا كان هذا الأنخفاض فى الحموضة يرجع إلى الأصابة بالفاج أو إلى بعض المثبطات الأخرى فإن الشرش الناتج من اللبن ، الذى قد يحتوى على مثبطات ، يرشح من خلال الأغشية ويخفف التخفيف المناسب ويجرى عليه أختبار التثبيط فى اللبن ونظراً لأن أنتاج الحموضة بواسطة البادئ فى اللبن هو التفاعل الأساسى فى صناعة الجبن فإنه يفضل متابعة الفاج بطرق تتضمن تثبيط أنتاج الحموضة فى اللبن بالرغم من أنها لاتعطى نتائج مؤكدة تدل على وجود الفاج مثل طريقة plaque .

٥-٣-٢- الوقاية من الفاج Control of phage

تدوير rotation سلالات غير مرتبطة بالفاج تعتبر عملية هامة فى السيطرة على الفاج فى البادئات المعرفه السلالة . تحتوى البادئات المختلطة على سلالات تختلف فى

درجة حساسيتها للفاج . عند أصابة بادىء مختلط بالفاج فأنه قد يستعيد نشاطه بسرعة نتيجة نمو السلالات المقاومة للفاج . ولهذا السبب فإن تدوير سلالات البادئات لايستخدم بصورة منتظمة مع البادئات المختلطة . ومع ذلك فإن بادئات مختلطة السلالة التى نشطت تحت ظروف معقمة فى المعمل (L cultures) تكون حساسة للفاج .

عادة يوجد الفاج فى بيئة صناعة الجبن وخاصة فى الشرش . وتعتبر البسترة (٧٢°م / ١٥ ثانية) طريقة فعالة فى السيطرة على نمو الميكروبات فى صناعة الألبان ولكن النتائج المتوفرة تدل على أن المعاملة الحرارية غير فعالة فى تثبيط الفاج لذلك فإن اللبن المستخدم فى أنتاج بادىء الأضافة يسخن عموماً لدرجة ٩٠°م لمدة ٢٠ دقيقة .

أصابة بادىء الاضافة بالفاج يكون أكثر خطورة من أصابة لبن الجبن بالفاج لذلك فإنه يجب أستخدام كل الأحتياطات الواجبه التى تضمن تلقيح بيئة بادىء الأضافة تحت ظروف معقمة او شبه معقمة بما يضمن تقليل أو منع التلوث بالفاج مثل أستخدام مرشحات للهواء الذى يدخل الى أحواض لبن البادىء أو أستخدام معدات تلقيح معقمة للبن البادىء. تستخدم بيئات مثبطه للفاج phage inhibitory media (PIM) التى تشمل زيادة العناصر الغذائية (مثل مستخلص الخميرة) والفوسفات مع أو بدون السترات للأرتباط بأيونات الكالسيوم (Ca^{2+}) واللازم لأمتزاز الفاج phage adsorption . تستخدم PIM بكثرة فى أوربا عنها فى الولايات المتحدة ونظراً لوجود بعض الملاحظات على تكاليف ، فاعلية ، وأتلاف وتثبيط Leconostocs المشاركة فى المزارع المختلطة فقد قام بعض الباحثين بتطوير هذه البيئات (PIM) على أساس السيطرة على معدل النمو بواسطة ضبط pH ، تحديد اللاكتوز ، وأنخفاض تركيز الفوسفات والشرش . تحضن المزارع حتى يستهلك اللاكتوز والحصول على أعداد أكبر بكثير من الخلايا عن المزارع التقليدية ويطلق على هذه البيئات بالبيئات المنظمة بعوامل خارجية externally buffered media وتوجد طريقة أخرى تعتمد على أستخدام بيئات محتوية على مواد منظمة غير ذائبة insoluble buffering agent التى تذوب عندما ينخفض pH وتساعد على الأحتفاظ بـ pH أعلا من ٥,٣ وهذه البيئات تعرف بالبيئات المنظمة داخلياً internally buffered media ولاتحتاج إلى الكترودات لقياس pH ووسائل حقن المواد المتعادلة neutralizer مع الحموضة أو أجهزة تسجيل recorders . هذه البيئات لها قوة تنظيمية أكبر من اللبن ويرجع ذلك إلى أرتفاع تركيز الفوسفات والسترات فيها وتكون فعالة ضد الفاج الذى يصيب كل من البادئات المحبة للحرارة المعتدلة والمرتفعة ومن مزايا كل من هذين النوعين من البيئات (المنظمة خارجياً أو داخلياً) هو أنخفاض معدلات التلقيح ، أنخفاض متطلبات بادىء

الأضافة ، أطالة فترة التخزين والتى خلالها يحتفظ البادىء بنشاطه وكذلك أنخفاض تكاليف العمالة . أستبعاد فترة تسوية اللبن (أى الفترة بين أضافة البادىء وأضافة المنفحه) تعتبر مفيدة فى الوقاية من الأصابة بالفاج حيث أنه عند حدوث التجبن فإن الفاج يكون غير قادر على النفاذ إلى جزيئات الخثرة . فى المصانع التى تملأ فيها أحواض الجبن عدة مرات يومياً فإن أعداد الفاج يرتفع بأضطراد ويمكن السيطرة على ذلك بكلورة chlorination الأحواض بين كل ملئة وأخرى لمدة ١٠ دقائق مع أستخدام ٢٠٠ جزء فى المليون كلورين available chlorine . ومن الأمور التى يجب الأهتمام بها عدم شطف بقايا الكلور من الأحواض كما أن أستخدام بادئات مقاومة للفاج ، أعداد محدودة من السلالات ، فصل أماكن تحضير البادىء عن أماكن تصنيع الجبن يؤدى أيضاً إلى تقليل مستوى الفاج فى المصانع .

ومن الواضح أن وجود الفاج يخلق بعض المشاكل فى صناعة الجبن لذلك يجب مراعاة الأحتياطات التالية :

١- يجب تنشيط مزارع البادىء تحت ظروف معقمة .

٢- المعامله الحرارية للبن البادىء النهائى يجب أن تكون كافية للقضاء على الفاج ، كما يجب أن يملأ خزان البادىء تماما (سعته القصوى) وإلا فأنه من الضرورى إجراء معاملة حرارية لمدة طويلة للتخلص من الفاج فى الحيز الهوائى .

٣- يجب استخدام التناوب اليومى daily rotation لسلالات البادىء التى لاترتبط بالفاج أو السلالات المقاومة للفاج فى صناعة الجبن .

٤- الترشيح الجيد للهواء فى غرفة تحضير البادىء وفى صالة الانتاج يساعد على السيطرة على مشكلة الفاج .

٥- يجب تطهير المعدات بطريقة ملائمة مثل أستعمال الحرارة أو المواد الكيماوية المطهرة .

٦- موقع غرفة البادىء يجب أن يكون بعيداً عن منطقة الأنتاج وصالة تداول الشرش مما يقلل من أحتمال التلوث عن طريق الهواء .

٧- يجب التأكد من أن عمال المصنع خصوصاً العاملون فى صالة الجبن لايسمح لهم بدخول غرفة تحضير البادىء .

٨- تنشيط مزرعة البادىء فى البيئات المثبطة للفاج .

٩- يجب عدم أستخدام سلالات مزارع البادىء الحساسة للفاج والتى صنفت بأن لها فترة سكون قصيرة ولها حجم انفجار كبير.

١٠- رش الحيز الهوائى لغرف تحضير البادىء بمحلول الهيبوكلورايت وأستخدام الأشعة

فوق البنفسجية للحد من الفاج فى الجو المحيط .

١١- أنتاج تطوير سلالات مقاومة للفاج .

١٢- يجب استخدام البادئات المختلطة للسلالة .

٥-٤- بقايا المواد المنظفة والمطهرة

تستخدم المنظفات والمطهرات لأغراض تنظيف وتطهير معدات الأنتاج . تؤثر بقايا هذه المركبات (المنظفات القاعدية ، مركبات الكلورين ، مركبات اليود ، مركبات الأمونيوم الرباعية) على نشاط مزرعة البادىء . وقد وجد أن بعض سلالات Lactococci قد تم تثبيط نموها فى وجود ٢-٤ ملجم من مركبات الأمونيوم الرباعية/ لتر ، عدا سلالة واحدة استطاعت أن تقاوم حتى ١٢ ملجم من هذه المركبات / لتر. بادئات اليوجهورت أكثر مقاومة، والمستويات المثبطه لنمو *S.salivarius* subsp. *thermophilus, Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* من مركبات الكلورين ومركبات الأمونيا الرباعية ومركبات اليود يبلغ ١٠٠ ، ١٠٠-٥٠٠ ، ٦٠ ، ١٠٠ ، ٥٠ -١٠٠ و ٦٠ ملجم / لتر على الترتيب .

تلوث لبن البادىء بهذه المركبات يرجع لأخطاء بشرية أو عطل فى دورة الغسيل الأتوماتيكية. لذلك يجب التأكد من أن دورة الشطف تستغرق وقتاً كافياً لإزالة هذه المركبات الكيماوية من حزان البادىء النهائى .

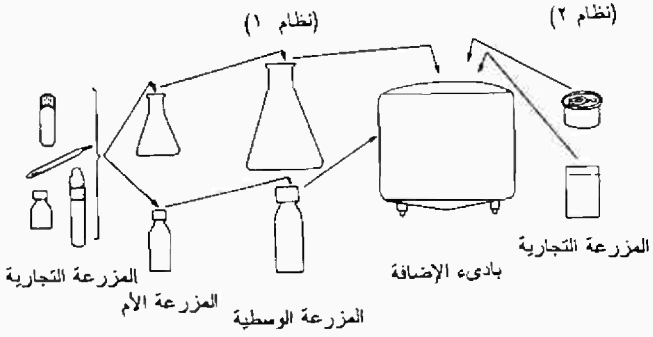
٥-٥- مواد أخرى مثبطة للنمو

يحتوى اللبن على مضادات حيوية طبيعية (لاكتنين lactenins/ اجلوتنين agglutinins) يمكنها وقف نمو مزارع البادىء . هذه المضادات حساسة للحرارة وتؤدى معاملة اللبن حرارياً الى القضاء عليها . تبتلع كريات الدم البيضاء الموجودة فى لبن المواشى المصابه بمرض التهاب الضرع بكتريا البادىء ولاتؤدى المعاملة الحرارية الى تحسن ملحوظ. وقد وجد أنه بالرغم من أن مزارع بادىء اليوجهورت قد يحدث له تثبيط إذا كان ٣٥٪ من اللبن يحتوى على عدد كبير من الخلايا الجسمية somatic cells ، إلا أن غلى اللبن لمدة ٢ ق أو تسخينه عند درجة ٩٠°م لمدة ٢٠ ق يؤدى الى ايقاف فعل المواد المثبطة ويساعد على التكوين الطبيعى للحموضة.

لبن نهاية موسم الأدرارله بعض التأثير على نشاط مزرعة البادىء ، ولكن لم يعرف السبب أو الأسباب بعد ، ومن المحتمل أن يكون thiocynates هو المسؤول عن ذلك .

قد يوجد مثبطات أخرى فى اللبن ترجع الى التلوث البيئى مثل المبيدات والتى يمكن تثبيط نمو ميكروبات البادىء .

المركبات الطيارة وغير الطيارة (الأحماض الدهنية ، حمض الفورميك ، الفورمالدهيد ، الكلوروفورم ، الايثر ، وغيرها) بتركيزات تصل الى ١٠٠ جزء فى المليون يثبط نمو بكتريا حمض اللاكتيك الكروية, وقد وجد أن وجود ٣ ملليجم/مل من مخلوط الأحماض الدهنية الحرة فى اللبن المعقم يخفض بدرجة كبيرة نمو *S.salivaricus* subsp. *thermophilus*، وتركيز ٥ ملليجم/مل يثبط من نمو *L.lactis* subsp. *lactis* biov *diacetylactis*, *L.lactis* subsp. *lactis*, *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. helveticus* .



شكل ٧-٣: تحضير بادىء الاضافة Bulk starter culture

نظام (١): المزرعة التجارية (سائلة أومجففة أو مجمدة عند -١٩٦°م)

نظام (٢): المزرعة التجارية (مجففه أو مركزة مجمدة عند -١٩٦°م)

٦- أنتاج مزارع البادىء : Production of starter cultures

يقدر عدد خلايا LAB التى تستخدم فى صناعة الجبن بحوالى ١٠ ^{٢٣} خلية سنوياً مما يؤكد أهميتها كصناعة بكتيرية عالمياً . تعتمد عملية تخمر أى نوع من منتجات الألبان المتخمرة بصورة رئيسية على نقاوة ونشاط مزرعة البادىء ، وذلك إذا كان اللبن أو بيئة النمو خالية من العوامل المثبطة مثل المضادات الحيوية أو الفاج . ويوضح شكل (٧-٣) (نظام ١) الطريقة التقليدية لأنتاج البادىء بكميات كبيرة ، وبالرغم من أن طريقة التنشيط قد تستهلك وقتاً طويلاً وتتطلب عمالة ماهرة فإنه قد يحدث تلوث البادىء بالفاج والتى

تعتبر من مصادر الخطر الرئيسية فى الصناعة إلا أنها تستخدم على نطاق واسع .

حتى بداية هذا القرن كانت صناعة الجبن تمارس على مستوى المزارع farms وكانت تنتج المزارع بالسماح لبكتريا حمض اللاكتيك الموجودة عرضاً فى اللبن لتتكاثر وتنتج كمية كافية من الحموضة لتجنبه . وعندما أصبح أنتاج الجبن على مستوى المصانع فقد انشئت الشركات والمعامل التى تقوم بأنتاج المزارع والأنزيمات وغيرها من مستلزمات أنتاج صناعة الجبن وفى البداية كانت تجهز المزارع فى اللبن المضاف عليه كربونات كالسيوم $CaCO_3$ ليتعادل جزيئا مع الحمض المتكون . هذه المزارع السائلة يكون لها فترة حفظ قصيرة (أقل من أسبوع) وأستبدلت تدريجياً بواسطة المزارع المجففة تحت تفريغ والتى تتميز بفترة حفظ أطول ولكن تحتاج إلى عدة تنشيطات لتحضير الكميات الضرورية والمطلوبه لأنتاج بادئات الأضافة (الصناعة) . وعادة تستخدم المزارع بمعدل ١-٢٪ لذلك فإن المصنع الذى يقوم بتصنيع ٥٠٠,٠٠٠ لتر لبن فى اليوم إلى جبن يحتاج إلى ٥٠٠٠ لتر بادىء أضافة فى اليوم (أى ٥٠ لتر من اللقاح) . وفى منتصف الستينات أستبدلت المزارع المجففة تحت تفريغ vacuum dried cultures بالمزارع المجمدة المركزه frozen concentrated cultures وهذه المزارع تحتفظ بنشاطها لفترة طويلة تصل الى عدة شهور بالتخزين تحت ظروف التجميد ولاتحتاج عملية تنشيط subculturing وأنما تستخدم مباشرة لتلقيح بيئة بادىء الأضافة . فى خلال العشر سنوات الماضية وجد أن التجفيد freeze drying له تأثير مماثل للتخز ين المجمد فى المحافظة على أعداد كبيرة من الخلايا مع قدرات جيدة لأنتاج الحموضة ولكن لسوء الحظ فإن جميع المزارع ليست مقاومة للتجفيد وعادة تضاف المواد الواقية من التجميد cryoprotective agent إلى المزارع قبل التجفيد وتتميز المزارع المجفدة بسهولة النقل والتخزين . البيئات التى تتكون أساساً من اللبن أو الشرش والمحتوية على مصادر أخرى من العناصر الغذائية (مثل مستخلص الخميرة) تستخدم للنمو. تضبط درجة الحرارة عند ٣٠°م pH ٦,٠ لـ *S.salivarius* subsp. *thermophilus* وعند ٤٢°م و pH ٥,٥ لبكتريا حمض اللاكتيك العصوية المحبة للحرارة المرتفعة thermophilic lactobacilli وتستخدم الصودا الكاوية NaOH وأيدروكسيد الأمونيوم NH_4OH فى معادلة الحموضة وتحصد الخلايا من المزارع بواسطة الطرد المركزى أو بالترشيح الغشائى membrane filteration . يستخدم التخمير على دفعات مع التقليب الخفيف لخلط القلوى ويمكن أن يؤدى ذلك الى تثبيط أنتاج فوق أكسيد الأيدروجين H_2O_2 كما قد يحافظ على جو النتروجين أعلا المزارع لتمنع من دخول الأكسجين إلى البيئة ويجب الأهتمام بتنمية المزارع عند pH ثابت حيث أنه عند pH أعلا من ٦,٠ فإن

مزارع Prt⁻ (غيرالقادرة على تحلل البروتين) تتراكم بمعدلات مرتفعة وتؤدى الى عدم أتزان بين السلالات.

كما أمكن إنتاج مزارع فائقة التركيز superconcentrated cultures لأستخدامها فى التلقيح المباشر للبن الجبن بطريقة مماثلة وهذه المزارع مرتفعة التكاليف ولكنها تستخدم بكثرة فى المصانع الصغيرة حيث لاتحتاج إلى وسائل أنتاج بادئات الأضافة. يحتوى بادىء الأضافة على أعداد من البكتريا حوالى ١٠ ^{٩}/مل حيث أن المزارع المركزه والفائقة التركيز تحتوى على حوالى ١٠ ^{١٠} خلية/جرام ، ١٠ ^{١٣} خلية/جرام على التوالى .

٦-١- طرق حفظ المزارع Methods of cultures preservation

من الضرورى حفظ مزارع البادىء للمحافظة على مزارع أصلية يمكن الرجوع إليها فى حالة فشل البادىء أو النقل المستمر لهذه البادئات الذى قد يؤدى الى حدوث طفرات فى السلالات قد تغير من السلوك والصفات العامه للبادىء .

تعتمد مصانع الألبان على مزارع البادئات التجارية عند تحضيرها للبادىء بكميات كبيرة أى البادىء الذى يدخل عادة فى الأنتاج الفعلى (بادىء الأضافة أو الصناعة bulk culture) ويمكن الحصول على هذه المزارع التجارية من معامل الأبحاث وبنوك حفظ المزرع أو المعامل والشركات التجارية وقد تتضمن عملية التحضير أكثر من مرحلة وتعرف المزارع فى مختلف مراحل التحضير بالتسميات التالية :

- **المزرعة التجارية Stock culture** وهى المزرعة التى يحصل عليها مصنع الألبان من معمل معتمد أو بنوك حفظ المزارع .
- **المزرعة الأم Mother culture** وهى مزرعة تحضر فى مصنع الألبان من المزرعة التجارية . وتنشط المزرعة الأم يومياً وتعتبر مصدرا لكل المزارع التى تحضر فى مصنع الألبان .
- **المزرعة الوسطية Intermediate culture** وهى مرحلة وسطية ضمن مراحل تحضير كميات كبيرة من مزارع بادىء الأضافة .
- **بادىء الأضافة (الصناعة) Bulk culture** وهى البادئ المستخدم فى الإنتاج. ويمكن حفظ مزارع البادئات فى أحد الصور التالية :

١- مزارع البادىء السائل Liqud starter cultures .

٢- مزارع البادىء المجفف Dried starter cultures .

أ - غير مركزة (مجففة بطريقة الرذاذ spray-dried أو مجفده freeze-dried) .

ب - مركزة (مجفدة freeze-dried) .

٣- مزارع البادىء المجمدة Frozen starter cultures

أ - غير مركزة (بمجمدة عند - ١٨ إلى - ٢٠° م)

ب - مركزة (بمجمدة عند - ٤٠ إلى -١٩٦°م)

مزارع البادئات (١) ، (٢-أ) و (٣-أ) تستخدم عادة لأنتاج بادىء الأضافة بالطريقة التقليدية (شكل ٧-٣ نظام ١) . مزارع (٢ب) و (٣ب) تضاف مباشرة الى حوض بادىء الأضافة (شكل ٧-٣ نظام ٢) أو يضاف مباشرة إلى حوض الصناعة .

٦-١-١- مزارع البادىء السائل

وهى أكثر صور مزارع البادىء الشائعة والمستخدمة فى صناعة الألبان . يحفظ البادىء عادة فى كميات صغيرة ، ولكن للحصول على الحجم المطلوب لأى خط أنتاج فإنه تجرى عملية تنشيط بأتباع النظام التالى :

المزرعة التجارية ← المزرعة الأم ← المزرعة الوسطية ← بادىء الاضافة (الصناعة).

فعلى سبيل المثال ، تصنيع ١٠٠٠٠ لتر من اللبن الى جبن فى اليوم بأستخدام معدل تلقيح ٢٪ ، يتطلب تنشيط تدريجى على النحو التالى :

المزرعة التجارية ١٪← المزرعة الأم ١٪← المزرعة الوسطية ٢٪← بادىء الأضافة(الصناعة)

٠,٤ مل ٤٠ مل ٤ لتر ٢٠٠ لتر

تحفظ المزارع الأصلية المستعملة فى لبن فرز مسترجع (١٠-١٢٪ SNF) وخال من المضادات الحيوية ومعقم (١٥ رطل/ بوصة^2 لمدة ١٥ دقيقة) مع تنشيطه يومياً أو أسبوعياً . يمكن تنشيط المزارع المحبة للحرارة المعتدلة المستخدمة فى الجبن حتى ٥٠ مرة مع عدم الخوف من حدوث طفرة وتلقح البيئة المعقمة بمعدل ١٪ وتحضن على ٢٢ أو ٣٠°م لمدة ١٨ أو ٦ ساعات على الترتيب. بينما المزارع المحبة لدرجات الحرارة المرتفعة يتم تنشيطها ١٥-٢٠ مرة فقط وذلك لضمان عدم حدوث الطفرة والمحافظة على التوازن المطلوب بين البكتريا الكروية والعصوية . يجرى التحضين على ٤٢°م لمدة ٣-٤ ساعات أو على ٣٠°م لمدة ١٦-١٨ ساعة مع التلقيح بمعدل ٢ أو ١٪ على الترتيب .

يتأثر نشاط مزرعة البادىء بمعدل التبريد بعد التحضين وبمستوى الحموضة عند نهاية فترة التحضين وبدرجة الحرارة وفترة التخزين . يعتبر التبريد عاملاً هاماً فى الحد من نشاط مزرعة البادىء وعادة تحفظ مزرعة احتياطية من مزرعة الأم فى صورة سائلة فى بيئة النمو التالية والتى تعتبر مثالية لمعظم بكتريا حمض اللاكتيك : لبن فرز ١٠-١٢٪ جوامد لادهنية، ٢٪ محلول عباد شمس (٥٪) ، ٠,٣٪ مستخلص خميرة ، ١,٠٪ جلوكوز أو

لاكتوز ، كمية كافية من كربونات الكالسيوم لتغطية أسفل أنبوبة الختبار ، ٠,٢٥٪ panmede ، ١,٠٪ ليثيسين وتعقم البيئة على ١٠ رطل /بوصة^2 لمدة ١٠ دقائق مع التحضين لمدة أسبوع على ٣٠°م للتأكد من كفاءة عملية التعقيم . تحضن البيئة الملقحة لفترة قصيرة وتخزن تحت ظروف الثلاجة العادية ومن الضرورى أعادة تنشيطها مرة واحدة كل ٣ شهور.

٦-١-٢- مزارع البادىء المجفف

حفظ مزارع البادىء بالتجفيف تعتبر طريقة بديلة للمحافظة على المزرعة الأصلية، كما يسهل أيضاً من نقل المزارع المجففة بواسطة البريد من دون أن يحدث فقد فى نشاطها. كان الاجراء العادى المتبع فى الماضى هو التجفيف تحت تفريغ ، وتتضمن هذه العملية خلط المزرعة السائلة مع اللاكتوز ثم معادلة الحموضة الزائدة بكربونات الكالسيوم ، يركز المخلوط جزئياً عن طريق الفرز أو التخلص من الشرش أو الأثنين معاً مما ينتج حبيبات يجرى تجفيفها تحت تفريغ ، يحتوى البادىء المجفف على ١-٢٪ بكتريا حية وقد يتطلب الأمر تنشيطه عدة مرات قبل أن يستعيد نشاطه الأقصى .

يحلل بروتين اللبن بأنزيم التريبسين Trypsin لمدة ٤ ساعات على ٣٧°م

↓

يعامل اللبن بالبخار

↓

يبرد اللبن ويلقح بمزرعة البادىء ويحضن على ٢٠°م مع ضبط pH
(يستخدم هيدروكسيد الكالسيوم كمادة معادلة)

↓

يجفف عند ٢٧°م حتى ٢٢٪ مواد جافة بعد الحصول على
الحد الأقصى من تركيز الخلايا

↓

يجفف بطريقة الرذاذ بهواء ساخن على ٧٠°م الى ٩٪ رطوبة
(درجة حرارة المسحوق لاتتجاوز ٣٢°م)

↓

يجفف تحت تفريغ على ٢٧°م و ١-٢ ملم زئبق
(تحتوى المزرعة المجففة على ٥-٦٪ رطوبة)

شكل ٨-٣ : طريقة لانتاج مزارع بادىء مجفف بطريقة الرذاذ .

ويمكن الحصول على معدل مرتفع من الخلايا والمتبقية فى البادئات المجففة بأستخدام طريقة التجفيف الرذاذ وهى طريقة نشأت فى هولندا . يوضح شكل (٨-٣) خطوات هذه العملية ويعتقد أن البادىء المجفف يكون مماثلا فى نشاطه لبادىء سائل عمره ٢٤ ساعة . وبالرغم من أن هذا التطور فى صناعة البادىء برهن على امكانية استخدامه بنجاح إلا أن هذا النظام لم يستخدم على نطاق تجارى حيث أن نسبة الخلايا المتبقية عادة تكون منخفضة فى المزارع المجففة ، ١٠٪ لمعظم بكتريا حمض اللاكتيك المحبة للحرارة المعتدلة و ٤٤٪ لـ *L.lactis* subsp. *lactis* biov. *diacetylactis* . ومع ذلك فإن أضافة جلوتاميت أحادى الصوديوم mono-Na-glutmate وحمض الاسكوربيك الى مزرعة البادىء التى يجرى تنشيطها فى بيئة تحتوى على منظم buffer يحمى الخلايا البكتيرية الى حد ما وتحتفظ المزرعة المجففة بطريقة الرذاذ بنشاطها لمدة ٦ شهور على ٢١°م .

تحضر مزارع البادىء المجفدة freeze-dried بتجفيف البادىء وهو فى الحالة المجمدة حيث تحسن هذه الطريقة من معدل الخلايا المتبقية فى المزرعة المجفدة وكانت النتائج أفضل بالمقارنة بالبادئات المجففة بطريقة الرذاذ . ولقد لوحظ أن عملية التجميد والتجفيف تؤدى الى أتلاف غشاء الخلية البكتيرية ولكن يمكن تقليل هذا الضرر بإضافة مواد مبردة واقية معينة قبل أجراء التجميد والتجفيف وهذه المواد الواقية عبارة عن روابط هيدروجين و/أو مجموعات متأينة تساعد على منع الأضرار بالخلية وذلك بتثبيت مكونات غشاء الخلية خلال عملية الحفظ.

وفى ضوء المعلومات المتوفرة فى مجال أنتاج مزارع البادئات بالتجفيد فإنه يمكن الأشارة الى مايلى :

١- يتم حفظ معظم بكتريا حمض اللاكتيك بنجاح ماعدا *Lb.helveticus,Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* والتى تعتبر حساسة للتجميد والتجفيف .

٢- تنشيط مزرعة البادىء فى لبن مدعم بمستخلص الخميرة والبروتين المحلل يحسن من معدل الخلايا المتبقية كما أن رفع تركيز الخلايا فى مزرعة لأكثر من $١٠^{١٠}$ خلية/ مل يؤدى إلى زيادة عدد الخلايا الحية فى المزرعة المجفدة .

٣- تكون مزارع البادىء أقل حساسية للتجميد والتجفيف إذا تم حصاد الخلايا فى الجزء الأخير من مرحلة النمو اللوغاريتمى ماعدا *L.lactis* subsp. *cremoris*, *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* حيث يتم حصد الخلايا فى المراحل الأولى من مرحلة الثبات stationary وذلك للحصول على أعلا حيوية.

٤- تعتبر pH البيئة فى نطاق ٥-٦ أكثر ملاءمة للحصول على معدل أعلا من الخلايا المتبقية. ومن الضرورى ضبط pH كل من بيئة النمو والتعليق.

٥- تختلف بيئة التعليق التى تضمن الحصول على أفضل معدل للخلايا المتبقية طبقاً للأنواع المختلفة من البكتريا ، فمثلاً لبن فرز مضاف إليه مالات الصوديوم Na-malate تعتبر مناسب لبكتريا *S.salivarius* subsp. *thermophilus* ، ومحلول اللاكتوز وهيدروكلوريد الارجنين يعطى حماية للـ *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* وحمض الجلوتاميك للـ *Leuconostoc* .

٦- يجب أن يكون محتوى الرطوبة للمزرعة المجففة أقل من ٣٪ .

٧- أظهرت المزارع المجففة المخزنة على ٥-١٠°م معدلات أعلى للخلايا المتبقية خلال التخزين لفترات طويلة مقارنة بتلك المخزنة على درجة حرارة الغرفة .

٨- يفضل تعبئة المزارع المجففة تحت تفريغ لأن الميكروبات المحفوظة تكون حساسة للأكسجين .

٩- تعتبر الأنابيب الزجاجية الصغيرة افضل أنواع مواد التعبئة وأكثرها شيوعاً للمزارع المجفدة ويليها أكياس من رقائق الألومنيوم المتعددة الطبقات ، كما وجد أن استخدام عبوات من النايلون ، تسبب أنخفاض معدل الخلايا المتبقية نتيجة لنفاذيتها للأكسجين من خلال مواد العبوة .

١٠- تجميد المزرعة عند -٢٠ إلى -٣٠°م والتجفيف على درجة حرارة بين -١٠ الى -٣٠°م يؤدى إلى أرتفاع نشاط البكتريا فى المزارع المجفدة .

١١- مركبات الكربونيل carbonyl مثل البيروفات وثنائى الاستيل اللذان يتفاعلا مع مجموعات الأمين فى الخلايا المحفوظة قد تؤدى الى الاسراع من موت هذه الخلايا . ويفضل فصل هذه المركبات من الخلايا التى تم حصادها . ولحفظ المزارع المجفدة لفترات طويلة يجب أن تدعم بيئة التعليق بسكريات غير مختزلة وأحماض أمينية مع/أو semicarbazide .

٦-١-٣- البادئات المجمدة

تم حفظ مزارع البائات بنجاح بالتجميد عند درجات حرارة تتراوح من -٢٠ ، -٤٠ الى -٨٠ أو -١٩٦°م ويطلق عليها المزارع المجمدة frozen cultures أو المزارع المجمدة تحت درجات حرارة شديدة الأنخفاض deep frozen cultures أو مزارع مجمدة تحت درجات حرارة فائقة الأنخفاض ultra low-temp. frozen cultures على الترتيب .

مزارع البادىء السائلة (الأم أو الوسطية) يمكن حفظها بالتجميد على -٢٠ الى -٤٠°م لعدة شهور . وتتبع حفظ البادىء بهذه الطريقة فى المعامل المركزية وتوزع المزارع المجمدة على مصانع الألبان عند الحاجة كملقحات مباشرة لبادىء الأضافة . قد يؤدى التجميد والتخزين لفترة طويلة على -٤٠°م الى تلف نشاط مزرعة البادىء وقد يؤدى الى أتلاف أنواع معينة من Lactobacilli ولكن استخدام بيئة تحتوى على ١٠٪ لبن فرز ، ٥٪ سكروز ، قشدة طازجة ، ٠,٩٪ كلوريد الصوديوم أو ١٪ جيلاتين يمكن أن يؤدى الى تحسين معدل الخلايا المتبقية ، بالأضافة إلى أن الخلايا المركزه (10^{10}-10^{12} cfu/مل) المجمدة عند -٣٠°م فى وجود خليط من مواد مبردة معينة (سترات الصوديوم ، جليسرول ، صوديوم بيتا - جليسروفوسفات ، مستخلص خميره ، سكروز ، لبن فرز معقم أو لاكتوز) تحتفظ بنشاطها فى حالة مزارع البكتريا المحبة للحرارة المعتدلة ومزارع بكتريا حمض اللاكتيك العصوية أو مزارع بكتريا حمض البروبيونيك .

وبالرغم من أن عملية التجميد عند -٤٠°م تعتبر عملية ناجحة لحفظ مزارع البادىء إلا أن التخزين عند -٨٠ إلى -١٠٠°م فى النتروجين السائل يحسن من معدل الخلايا المتبقية فى المزارع المجمدة خلال التخزين ويمكن حفظ مزارع البادئات بالتجميد عند -١٩٦°م فى النتروجين السائل لمدة قد تصل إلى عامين . وقد وجد أن تجميد المزارع بهذه الطريقة جعل بالأمكان استخدامها فى التلقيح المباشر للبن المستخدم فى صناعة الجبن أو لبادىء الأضافة (شكل ٧-٣ نظام ٢) وتعتبر هذه الطريقة سهلة وتحسن من كفاءة العمل اليومى وتوازن السلالات مع سيطرة أفضل على الفاج وتحسن جودة الناتج إلا أنها تعتبرطريقة مرتفعة التكاليف مع ضرورة توفير الوسائل اللازمة للنتروجين السائل .

يلاحظ مما سبق أن معدل الخلايا المتبقية فى مزارع البادىء المحفوظة يعتمد على ظروف التصنيع (بيئة النمو ، وجود مواد مبردة ، التجميد والتجفيف) وعلى طريقة تركيز الخلايا.وباختصارفأن الأنظمة المختلفة المستعملة فى تركيز كتلة الخلايا الحية تكون كالتالى:

أولاً : طرق ميكانيكية (مثل فرازات عالية الكفاءة ٥٥٠٠ × g ، طرد مركزى فائق عند ١٥٠٠٠ - ٢٠٠٠٠ × g) التى قد تسبب بعض الضرر الفيزيائى للخلايا البكتيرية .

ثانيا: معادلة مستمرة لبيئة النمو لضبط الـ pH إلى حوالى ٥,٨-٦ للحصول على مزرعة تحتوى على عدد مرتفع من الخلايا التى تعرض بعد ذلك لعملية الطرد المركزى ليكون مزرعة مركزة الخلايا . تكوين اللاكتات قد يكون مثبطا وبالتالى يحد من درجة التركيز .

ثالثاً: تقنية المزرعة بالأنتشار diffusion culture tech وهى طريقة متطورة للتخلص من اللاكتات من بيئة النمو حتى يمكن بهذا النظام أنتاج مزارع مركزه بها ١٠ ^{11} خلية/مل

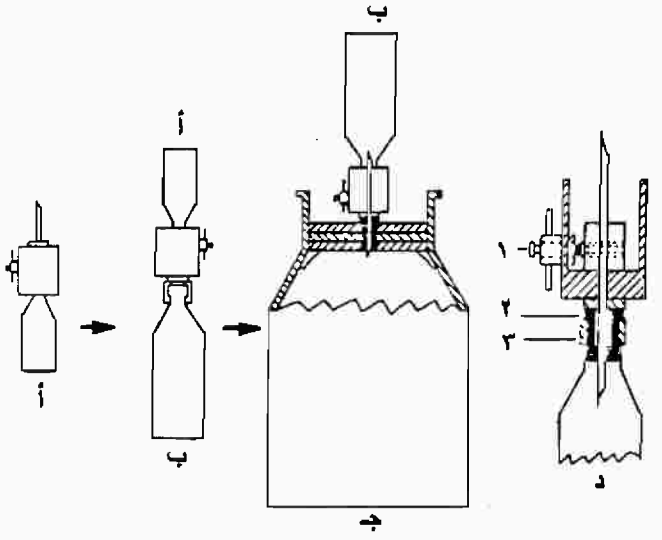
وتعرف هذه المزارع بالمزارع فائقة التركيز superconcentrated cultures ويمكن استخدامها فى التلقيح المباشر للبن الجبن (شكل ٧-٣ نظام ٢) وبالرغم من أن هذه المزارع مرتفعة التكاليف إلا أنها تستخدم بكثرة فى المصانع الصغيرة حيث لاتحتاج إلى وسائل أنتاج بادئات الأضافة (الصناعة) bulk .

٦-٢- إنتاج بادئ الأضافة Production of bulk starter

أنتاج بادىء الأضافة (الصناعة) ، وهو البادىء الذى يستخدم مباشرة فى الصناعة، يستلزم عدة مراحل من التنشيط من أجل الحصول على الكمية المطلوبة أو التلقيح المباشر فى خزانات بادىء الأضافة بأستخدام المزارع المركزة (شكل رقم ٧-٣ نظام ٢،١).

ويعتبر توفير بادىء الأضافة (الصناعة) خال من الفاج العامل الرئيسى فى أنتاج جبن مرتفع الجودة . وقد تستخدم بيئات مختلفة فى تحضير هذا البادىء مثل البيئات المثبطه للفاج phage inhibitory medium (PIM) أو البيئات المقاومة للفاج phage-resistant medium (PRM) ، اللبن الكامل ، اللبن الفرز ، اللبن الفرز المدعم بجوامد أضافية. عادة يستخدم لبن فرز مجفف مسترجع خال من المضادات الحيوية ويحتوى على ١٠-١٤٪ جوامد . تسخن البيئة (وكذلك حيز الفراغ head spaces فى الحوض) لدرجة حرارة لاتقل عن ٩٠°م لمدة ٢٠ دقيقة على الأقل . ويفضل بعض المنتجين تسخين البيئة فى مبادل حرارى (٩٠°م لمدة ٢٠ ثانية) قبل الأضافة إلى حوض اعداد بادىء الاضافة والذى سبق تنظيفه وتعقيمه . وهذه الطريقة غير مفضلة نظراً لأن عمليا Š التنظيف والتعقيم قد لاتتلف الفاج . المعاملة الحرارية لها عدة مزايا: (١) القضاء على البكتريا الملوثة التى قد تتنافس فى نموها مع نمو بكتريا البادىء وبالتالى تسبب بعض المشاكل اثناء صناعة الجبن . (٢) زيادة معدل نمو بكتريا البادىء نتيجة زيادة النتروجين الناتج من التحلل الجزئى لبروتين اللبن . (٣) إتلاف المواد المثبطة الطبيعية الموجودة فى اللبن وكذلك أى فاج قد يكون موجود فى البيئة . ولرفع كفاءة القضاء على الفاج فيجب تسخين حيز الفراغ الموجود أعلا البيئة بالبخار خلال فترة التسخين حيث أن الفاج قد يدخل إلى خزانات اعداد بادىء الصناعة خلال عملية تبريد بيئة البادىء لذلك يجب بسترة خزان التحضير أو ترشيح الهواء الداخل للخزان أثناء عملية التبريد خلال مرشحات خاصة بذلك . ويعتبر التلقيح عملية حيوية فى تحضير بادىء الصناعة لذلك يجب استخدام معدات تلقيح خاصة تعمل تحت ظروف معقمة .

وهناك أنظمة تستخدم فى تحضير مزارع بادىء الأضافة تهدف أساساً إلى حماية المزرعة من الأصابة بالفاج.من الأمور الهامة فى هذه النظم أنه يتم معامل بيئة النمو ونمو البادىء فى خزان محكم الغلق ويتم التلقيح من خلال حاجز يمنع دخول الهواء الملوث ومن أمثلة هذه النظم :



شكل ٩-٣ : رسم تخطيطى لنظام لويس لنقل مزرعة البادىء

أ) المزرعة الأم ب) المزرعة الوسطية جـ) بادىء الاضافة
د) تركيب تفصيلى للأبرة (١) صنبور (٢) لحام استل
(٣) محلول الهيبوكلورايت الصوديوم

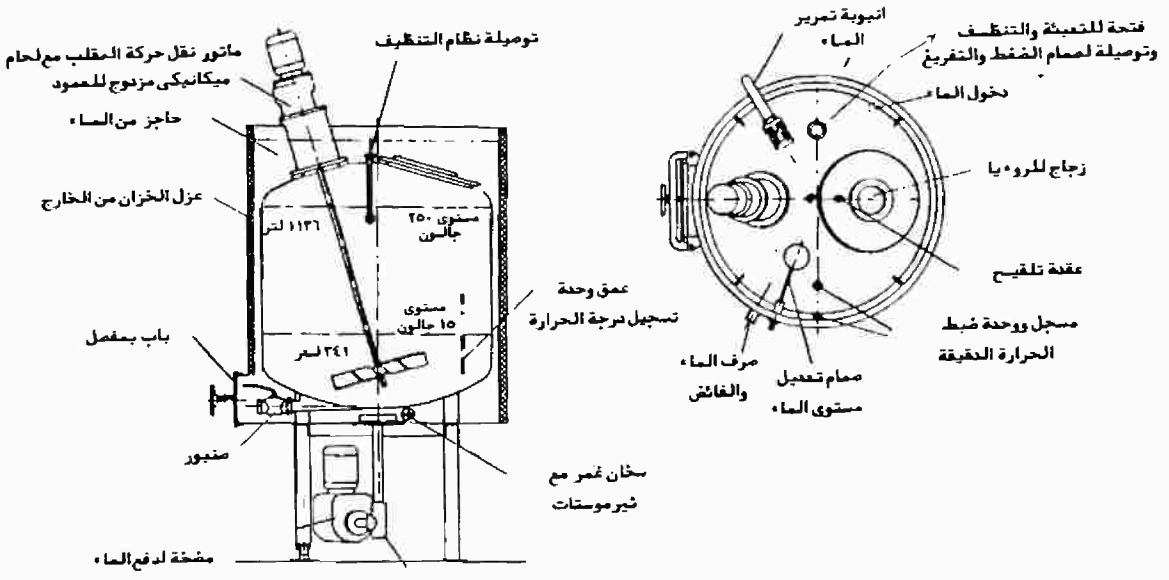
أ - نظام لويس The Lewis system

فى هذا النظام تستخدم زجاجات بوليثين التى يمكن استخدامها مرة أخرى (سعة ١١٥ و ٨٥٠ جرام) للمزرعة الأم والمزرعة الوسطية على الترتيب هذه الزجاجات مزودة بلحامات مطاطية) وبيئة النمو (مثل ١٠-١٢٪ لبن فرز مسترجع وخال من المضادات الحيوية) يتم تعقيمها فى هذه الزجاجات . يجرى عملية نقل مزرعة البادىء بأستخدام ابرة معدة للحقن ثنائية الفتحات ويوضح شكل (٩-٣) الشكل العام للطريقة . يتطلب نظام لويس خزان يعمل تحت ضغط لبادىء الاضافة حيث تعامل بيئة النمو حرارياً فى داخل الوعاء المحكم الغلق . يجب التأكد من عدم دخول أو خروج الهواء خلال تسخين أو تبريد

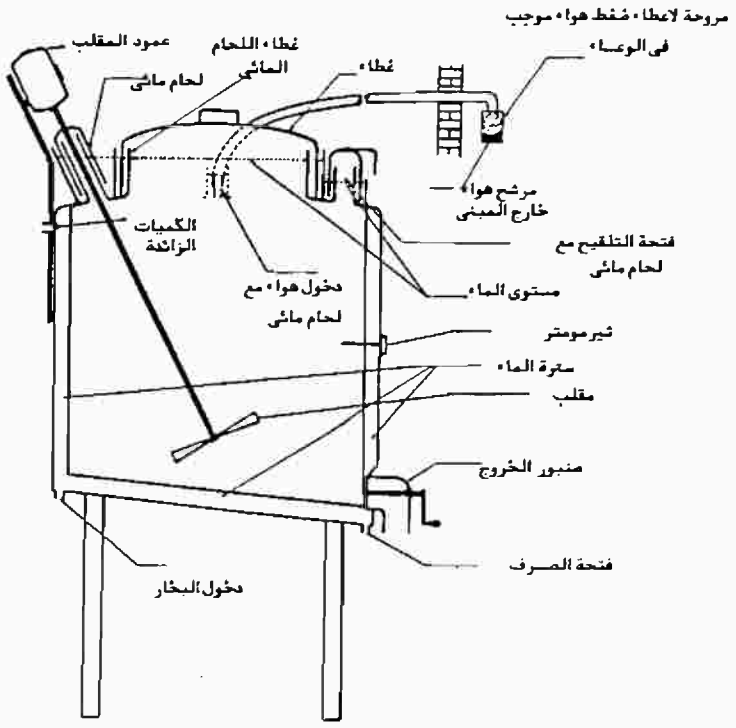
اللبن . يغطى سطح الخزان بمحلول هيبوكلورايت الصوديوم (١٠٠ ملجم /لتر) حتى يتم نقل بادىء التلقيح فى المزرعة الوسطية الى بيئة بادىء الاضافة خلال حاجز معقم . يوضح شكل (١٠-٣) مثال لهذا الخزان . ويعتمد فى نقل البادىء من وعاء لآخر فى نظام لويس على ضغط زجاجة البوليثلين لضخ المزرعة ويمكن استخدام نظام لويس بنجاح فى أنتاج كميات أصغر من البادئ.

ب - نظام جونز The Jones system

يوضح شكل (١١-٣) مواصفات الخزان المستخدم فى هذا النظام . يتم دخول أو خروج الهواء الى وعاء البادىء خلال تسخين أو تبريد اللبن حيث أن الخزان لايعمل تحت ضغط . خلال المعاملة الحرارية للبن فإن الهواء الموجود فى فراغ الخزان يدفع إلى الخارج ثم يعاد دخوله أثناء مراحل التبريد حيث يتم تعقيم الهواء بأستخدام الحرارة والترشيح من خلال مرشحات من الصوف والقطن . يصب بادىء التلقيح فى الخزان خلال فتحة خاصة ضيقة مع أستخدام حلقة لهب أو بخار للتعقيم عند نقطة الدخول ومن الأمور الجديرة بالذكر ، أن وحدة ترشيح الهواء يتم تنشيطها أثناء تسخين وتبريد اللبن وتبريد المزرعة النشطة وذلك للتأكد من أن الهواء الداخل إلى الخزان دائماً معقم . الشكل (١٢-٣) يوضح نظام مماثل لخزان بادىء الأضافة ومحتوى على وحدة خاصة لترشيح الهواء . كما تستخدم بيئات مثبطة للفاج (PIM) وقد يطلق عليها بيئات مقاومة للفاج (PRM) فى تحضير مزارع بادئات الأضافة حيث يعتمد تكاثر الفاج فى مزارع البادئات على وجود أيونات كالسيوم حرة فى بيئة النمو وعادة يستخدم الفوسفات للأرتباط بأيونات الكالسيوم الحرة فى اللبن الفرز المستخدم في أنتاج بادىء الأضافة وقد حدث تطورات كثيرة فى تركيب هذه البيئات وتوجد حالياً فى الأسواق وتتكون من حوامد لبنية ، سكر، عوامل منشطة للنمو ، ومواد منظمة مثل الفوسفات والسترات ومع ذلك فإن تأثير هذ البيئات فى حماية وتنشيط نمو البادئات محدودة كما أشار البعض إلى فشل نمو بعض سلالات بكتريا حمض اللاكتيك فى هذه البيئات .



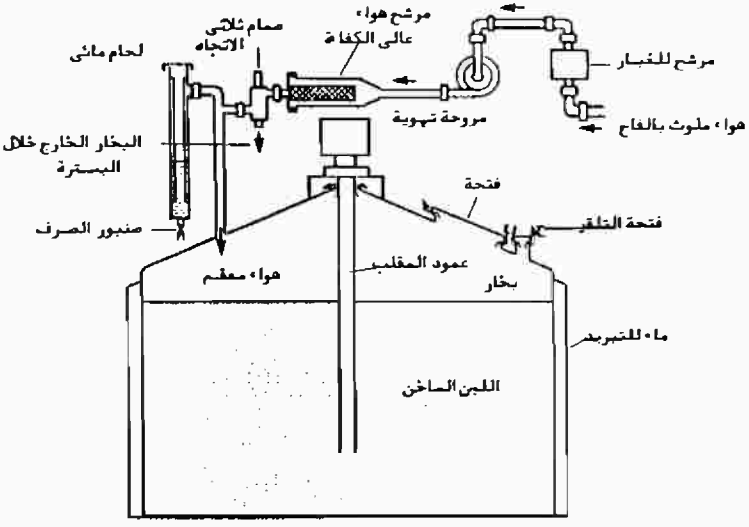
شكل ١٠-٣ : رسم تخطيطى لخزان بادئ الإضافة فى نظام لويس لتحضير البادئ



شكل ١١-٣ : رسم تخطيطى لخزان بادىء الاضافة من نوع جونز

يفضل عادة تنظيم الـ pH أثناء نمو المزارع للسيطرة على الفاج وزيادة أعداد الخلايا الحية. كما وجد أن معادلة الحموضة بحقن مواد متعادلة (قلوية) بعد النمو ثم التحضين يزيد من محصول الخلايا الحية إلى الضعف كما أن حجم اللقاح اللازم فى حوض الجبن ينخفض إلى النصف . عادة يحضن مزارع الحرارة المعتدلة على درجة ٢١°م بالرغم من أن درجة الحرارة المثلى لنموها هى ٣٠°م ومعظم هذه الأنواع لها معدل نمو متماثل عند درجة ٢٧°م ولكن عند درجات حرارة أخرى ، خاصة ٢١°م ، يحدث أختلافات كبيرة . وهذا يعنى سيطرة السلالات التى تنمو بمعدل أسرع عند درجة حرارة التحضين التقليدية فى المزارع المختلطة. هناك ٣ عوامل تحدد سرعة نمو المزارع وهى : معدل التلقيح ، درجة حرارة التحضين وفترة التحضين . فى المزارع المحبة للحرارة المعتدلة يكون حجم اللقاح ٠,٥-١٪ (حجم/حجم) ودرجة حرارة تحضين ٢١°م لمدة ١٦ ساعة وتحت هذه الظروف

فإن هذه المزارع تنتج فى اللبن حموضة قدرها ٠,٨٥٪ كحامض لاكتيك وينخفض الـ pH من ٦,٥ إلى ٤,٥ . التحضين على درجة ٢١°م يعتبر من العوامل الهامة حيث أن ذلك يعنى أن البادىء الذى يلقح عند الساعة الرابعة مساء عند درجة حرارة الغرفة (٢١°م) يكون جاهزا للأستخدام فى الصناعة بعد ١٦ ساعة أى عند الساعة الثامنة صباح اليوم التالى . عند درجة ٢١°م فإن فترة الجيل (GT) فى البادئات المختلطة والمعرفة السلالة فى اللبن تكون ٢,٢ ساعة .



شكل ١٢-٣ : رسم تخطيطى لخزان بادىء الاضافة المحتوى على وحدة خاصة لترشيح الهواء

عند التحضين عند درجة حرارة ٢١°م إذا كان فترة الجيل (GT) ٢,٢ ساعة فإن عدد الأجيال التى تتكون حسابياً فى ١٦ ساعة هو ٧,٢ جيل ، إذا كان (GT) ٢,٢ ساعة وحجم اللقاح ٠,٥٪ فإن مزرعة كاملة النمو تعادل ٧,٥ جيل والحسابات بهاتين الطريقتين تعطى عدد أجيال متساوية تقريباً. عادة تحضن المزارع المحبة للحرارة المرتفعة عند درجة ٤٢°م لمدة ٨-١٢ ساعة بالرغم من تباين درجة الحرارة المثلى للسلالات المختلفة من *S.salvarium* subsp. *thermophilus* وكذلك thermophilic lactobacilli : ٣٩-٤٦°م ، ٤٢-٤٨°م على التوالى . خلال فترة التحضين ، ينخفض الـ pH إلى حوالى ٣,٥ ، ٤,٥ للـ Lactobacilli ، Streptococciعلى التوالى منتجة حموضة قدرها ١,٢، ٠,٦٪

كحامض لاكتيك . أستمرار تحضين thermophlic lactobacilli يـؤدى إلى أنتـاج حموضـة قدرها ٢٪ كحامض لاكتيك ويمكن حفظ كل من المزارع المحبة للحرارة المعتدلة والمرتفعة لعدة أيام عند درجة ٤°م بدون حدوث فقد كبير فى نشاطها أو قدرتها على أنتاج حامض لاكتيك .

٦-٣- البادئات المساعدة (الثانوية) Adjunct starter cultures

بالأضافة إلى بادئات بكتريا حمض اللاكتيك التى تستخدم فى صناعة الجبن لأنتـاج الحموضة بمعدلات مرغوبة خلال مراحل التصنيـع المختلفـة مـع تبـاين دورهـا المحـدود فـى تسوية الجبن فإنه قد يستخدم بادئات مساعدة (ثانوية) أخرى عند تصنيع أنواع معينـة مـن الجبن بهدف إحداث تغير معين مرغوب فى الجبن أثناء التسوية حتى يمكـن الحصـول علـى الناتج النهائى بالصفات والجودة المميزة لهذا النوع من الجبن . البادئات المساعدة قد تكـون بكتريا ، خمائر ، فطريات أو خليط منهم حسب نوع الجبن . ويمكن الأشارة إلى أهم هـذه البادئات فى صناعة الجبن :

أ - البكتريا

١- *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* وتستخدم على نطاق واسع فى صناعة أنواع الجبن السويسرية Swiss-type cheeses بهدف أنتاج غـاز CO_2 لتكوين العيون فى هذه الجبن خلال التسوية .

٢- *Brevibacterium linens* ينمو على سطح بعض أنواع من الجبن مثـل البريك Brick واللامبرجر Limburgerr ويعطى لسطح الجبن لونا برتقالياً إلى أحمـر ويسـاهم بدرجـة كبيرة فى تسوية هذه الجبن لإعطاء الطعم والصفات المميزة لهذه الجبن .

٣- سلالات خاصة من *En. durans, En.faecalis* DK تستخدم فى تصنيع بعض أنـواع من الجبن التشدر فى الولايات المتحدة الأمريكية .

٤- *Bfidobacterium spp.* يستخدم فى صناعة بعض أنواع من الألبان المتخمـرة لأنتـاج ألبـان متخمرةعلاجيـة وحاليـاً تجـرى بعـض المحـاولات لادخالهـا فـى الجـبن لأغـراض علاجية.

ب - الفطريات

تستخدم الفطريات أساساً فى صناعة بعض أنواع من الجبن الطرية والنصف طريـه والهدف الرئيسى لأستخدام هذه الفطريات هى أعطـاء الطعـم والنكهـة المرغوبـة وكذلـك صفات القوام والتركيب المميزة للجبن الناتج ويمكن تقسيم هذه الفطريات إلى قسـمين مـن حيث اللون وصفات النمو :

١ - الفطريات البيضاء وتشمل *Penicillium camemberti, P.caseiocolum* وتنمو على سطح جبن الكممبير Camembert والبراى Brie وتساهم بدرجة رئيسية فى التسوية لأعطاء الصفات المرغوبة للجبن الناتج من حيث الطعم والنكهة والقوام والتركيب .

٢ - الفطريات الزرقاء مثل *P.roqueforti* والتى تنمو داخل الجبن مثل جبن الركفور Roquefort والستيلتون Stlilton والجروجنزولا Gorgonzola أثناء التسوية وتشارك بصفة رئيسية فى أعطاء الجبن الطعم الحريف المرغوب وكذلك صفات القوام والتركيب المميزة لهذه الأنواع من الجبن .

وقد توجد أجناس أخرى من الفطريات الأخرى والتى تستخدم على نطاق محدود *Mucor rasmusen* فى النرويج لصناعة جبن مسواه من لبن فرز وفطر *Aspergillus oryzae* ويستخدم فى اليابان لأنتاج جبن من فول الصويا .

جـ -الخمائر

بعض أنواع من الخمائر السطحية تنمو على سطح الجبن وخاصة التى تسوى سطحياً بواسطة البكتريا smear مثل البريك واللامبرجر حيث تساهم فى تهيئة الظروف البيئية المناسبة وكذلك أفراز بعض عوامل النمو اللازمة لـ *B. linens* . كما قد تستخدم بعض الخمائر المحللة للدهن فى أنتاج الجبن المعرقة بالفطر حيث تساهم مع الفطر فى اكساب الجبن الطعم الحريف المميز لهذه الجبن .

٦-٤- تنظيف وتطهير المعدات

تغسل معدات المزرعة الأم والمزرعة الوسطية باليد بأستخدام مواد تنظيف مناسبة ثم يجرى التطهير بعد الغسيل بأستخدام البخار أو الكيماويات (مثل محلول هيبوكلورايت يحتوى على ٢٠٠ ملجم / لتر من الكلورين المتوفر) ثم تشطف بماء بارد .

معظم أوعية مزرعة بادىء الاضافة مجهزة بوسائل لأستخدام نظام التنظيف المكانى(CIP). وطرق التنظيف والتطهير كالتالى : شطف بالماء البارد لإزالة بقايا اللبن ، الغسل بالمنظفات الساخنة لإزالة بقايا اللبن من سطح الخزان ، الشطف بالماء ثم التطهير بالحرارة . إذا استخدمت الكيماويات المعقمة فان خزان البادىء يشطف بالماء لازالة البقايا ، وحيث أن لبن البادىء يعامل حرارياً لدرجة حرارة أعلى من ٨٨°م فى الخزان فإن تطهير الخزان بعد الغسيل ليس ضرورياً .

٦-٥- مراقبة جودة مزارع البادئات Quality control of starter cultures

مقدرة مزرعة البادىء على أداء عملها بكفاءة خلال عمليات التصنيع يعتمد على نشاطها ونقاوتها ، ويمكن تلخيص الخطوات الروتينية لاختبارات مراقبةجودة مزارع البادىء فميا يلى:

١- مزارع بادئات بكتيريا حمض اللاكتيك والبكتيريا الأخرى :

أ- فحص مجهرى بأستخدام صبغة جرام أو طريقة صبغة نيومان Neuman ، بكتيريا البادىء موجبة لصبغة جرام وتستخدم الطريقة الأخيرة لضبط نسبة البكتريا الكروية الى العصوية فى مزارع اليوجهورت .

ب - الكشف عن الملوثات :

١- يكشف عن النقاوة بأستخدام اختبار الكتاليز ، وتعتبر بكتيريا حمض اللاكتيك سالبة للكتاليز والتفاعل الموجب يدل على التلوث .

٢- يدل الأختبار الموجب لبكتريا القولون على تلوث عام .

٣- يجب ألا تحتوى مزارع بكتيريا حمض اللاكتيك على الخميرة والفطريات

٤- الكشف عن الفاج .

جـ - أختبار النشاط أو الحيوية activity test يساعد على تقدير معدل تكوين الحموضة بمزرعة البادىء قبل استعمالها فى حوض التصنيع ، مثل إجراء تصنيع للجبن فى المعمل على نطاق صغير أو تجريبى .

د- مقاومة درجات حرارة الطبخ يعتبر أختباراً مهماً لبادئات الجبن .

هـ - اختبار فوجس - بروسكر Voges-Proskauer أو الكريتين creatine اختبارا بيوكيماويا لفحص مزارع البادئات المنتجة للنكهة ، وقد يستعمل هذا الاختبار فى بعض الأحيان للكشف عن الميكروبات المنتجة للغاز فى المزارع غير المنتجة للغاز .

٢- مزارع الفطريات :

أ - يقدر النشاط بعد الجراثيم فى معلق معقم .

ب - يجرى فى بعض الأحيان أختبار بكتريا القولون للكشف عن التلوث العام .

٣- أختبارات المسحة swab test لمعدات مزرعة البادىء وأوعية التنشيط والأعداد تعتبر ضرورية للدلالة على فعالية الغسيل والظروف الصحية فى المصنع .