الفصل الأول

ميكروبيولوجيا بادئات الألبان

Microbiology of Dairy Starters

١- مقدمة

تستخدم المزارع cultures المحتوية على بكتريا حامض اللاكتيك Lactic acid bacteria (LAB) فى صناعة معظم أنواع الجبن والألبان المتخمرة المختلفة . تعرف هذه المزارع فى مجال صناعة الألبان بالبادئات starters ، حيث تبدأ هذه المزارع فى إنتاج حامض اللاكتيك عند نموها فى اللبن ، وهو الهدف الرئيسى من استخدام هذه البادئات فى صناعة هذه المنتجات اللبنية . تمثل LAB اللاكتوز مكوناً حامض لاكتيك بصفة رئيسية ، لكن قد يتطلب الأمر الحاجة إلى مزارع بادئات تتميز بصفات بيوكيماوية أخرى للحصول على صفات مرغوبة ومميزة لكل نوع من الأغذية المتخمرة . تساهم الأنواع والسلالات المختلفة من LAB ، بالإضافة إلى إنتاج حامض اللاكتيك ، فى الطعم flavor ، النكهة aroma ، التركيب النباتى texture نتيجة إنتاج مركبات وسطية intermediate أخرى مثل حامض الخليك ، حامض الفورميك ، الأسيتالدهيد ، ثنائى الأسيتيل ، CO_2 ، سكريات معقدة ، ببتيدات وأحماض أمينية . تعتمد صفات كثير من منتجات الألبان المتخمرة على بادئات تحتوى على عدة أنواع مختلفة من LAB ، كما تستخدم أنواع أخرى من البكتريا (مثل بكتريا حامض البروبيونيك Propionic acid bacteria, Bifidobacteria) وفطريات مثل (*Penicillum* spp., *Geotrichum*) وخمائر مثل (*Saccharomyces, Kluyveromyces*) فى تصنيع بعض أنواع من الجبن والألبان المتخمرة حيث تقوم بأنشطة أيضية metabolism تعمل على تحسين خواص الناتج المتخمر.

بدأ فى استخدام البادئات لإنتاج حموضة أثناء صناعة الجبن منذ فترة طويلة قبل أن يتم التعرف على البكتريا المسببة لذلك ، حيث كان يحفظ اللبن عند درجة حرارة الغرفة لعدة ساعات، يتم خلالها تكاثر LAB الموجودة فى اللبن طبيعياً مع

إنتاج حامض اللاكتيك ، يستخدم اللبن الحامض المتجبن لتلقيح اللبن المستخدم فى صناعة الجبن. ما زالت هذه الطريقة مع بعض الاختلافات تستخدم فى سويسرا وإيطاليا وفرنسا ، حيث توجد وحدات صغيرة للإنتاج بطريقة تقليدية . الشرش الناتج من صناعة الجبن عادة يحضن عند درجة حرارة مناسبة لاستخدامه فى اليوم التالى فى صناعة الجبن . جميع البادئات المستخدمة حالياً فى صناعة الجبن نشأت بهذه الطريقة ، حيث انتقلت بين صناع الجبن من جيل إلى آخر ، واستمرت 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 إنتاج زبد متخمر ذات طعم جيد من قشدة تم تخميرها بواسطة مزرعة نقية من *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* أو *Lc.lactis* ssp. *cremoris* ولكن الزبد الناتجة يكون خالياً من الطعم الحقيقى المميز للزبد التقليدى ، وقد تم التوصل إلى سبب هذا الاختلاف فى عام ١٩١٩ عندما أوضح كل من Hammer & Bailey فى الولايات المتحدة ، Storch فى الدنمارك ، Boekhout & de Vries فى هولندا أن مزارع البادئات القادرة على إنتاج زبد يتميز بالطعم التقليدى عبارة عن مخلوط من أنواع مختلفة من البكتريا ، أحدها قادرة على إنتاج حامض لاكتيك (Lactococci) والثانية قادرة على إنتاج الطعم والنكهة (Leuconostocs) . كلن يعتقد فى البداية أن الأحماض الطيارة هى المسئولة عن الطعم والنكهة ولكن فيما بعد وجد أن ثنائى الأسيتيل diacetly هو المكون الرئيسى للنكهة.

تعتبر بادئات LAB من المواد الأساسية فى صناعة معظم أنواع الجبن والألبان المتخمرة المختلفة . عادة تنمو هذه البادئات فى اللبن أو فى بيئات تتكون أساساً من اللبن ، وتضاف إلى اللبن المعد لصناعة الجبن أو الألبان المتخمرة . فى صناعة الجبن ، تختلف كمية البادئ المضافة ، طبقاً لنوع الجبن المراد تصنيعه ، من ٠,٢ إلى ٢ % من حجم اللبن المستخدم فى صناعة الجبن . يقدر إنتاج الجبن على مستوى العالم بحوالى ١٥ × ١٠^{٦} طن سنوياً (عام ١٩٩٤) ، حيث يتم إنتاجها من ١٥ × ١٠^{١٠} لتر لبن . وبفرض أن هذه الجبن يتم تصنيعها باستخدام بادئ بمعدل ٠,٥ % (حجم/حجم) ، فإن كمية البادئ المطلوبة تحت هذه الظروف تقدر بحوالى ٧٥ × ١٠^{٧} لتر بادئ ، وتعادل هذا الكمية حوالى ٧,٥ × ١٠^{٢٠}

خلية ، حيث أن بادئ الإضافة bulk starter يحتوى عادة على ١ × ١٠^{٩} خلية/مل . فى ضوء المعلومات المتوفرة فى عام ١٩٩٢ ، قدر إنتاج العالم من الألبان المتخمرة بحوالى ٢٣ مليون طن سنوياً (حوالى ٩ مليون طن يوجهورت ، ١١ مليون طن لبن خصن متخمر وحوالى ٣ مليون طن ألبان متخمرة أخرى) ، وإنتاج العالم من البادئات المستخدمة فى صناعة الألبان المتخمرة بما يتجاوز ٢ مليون طن .

٢- أنواع البادئات

كانت البادئات غير معروفة منذ مئات السنين ، ولكن خلال القرن التاسع عشر تمكن علماء ميكروبيولوجيا الألبان من التعرف على مخلوط الميكروبات المسئولة بدرجة كبيرة عن الطعم والنكهة . يوجد نوعان بصفة أساسية من البادئات:

أ- بادئات محبة للحرارة المعتدلة mesophilic starters حيث تتراوح درجة حرارة النمو المثلى حوالى ٢٠ – ٣٠°م ، وتشمل بكتريا أجناس *Lactococcus* ، *Leuconostoc* ، *Pediococcus* .

ب- بادئات محبة للحرارة المرتفعة thermophilic starters حيث تتراوح درجة حرارة النمو المثلى من ٣٧ – ٤٥°م ، وتشمل بكتريا أجناس *Lactobacillus, Streptococcus* ، *Enterococcus* ، *Bifidobacterium*

ويتوقف اختيار البادئ على نوع الجبن المراد إنتاجه ، فمثلاً بادئات mesophilic تستخدم فى صناعة جبن التشدر والجودا والمعرقة بالفطر والكممبير ، بينما تستخدم بادئات thermophilic فى صناعة أنواع الجبن السويسرية والإيطالية. هذا الاختيار عادة يكون مرتبطاً بطريقة الصناعة حيث أن الأنواع السويسرية والإيطالية تطبخ عند درجة حرارة مرتفعة (٥٠ – ٥٥°م) ، لذلك يجب أن يكون البادئ المستخدم قادراً على مقاومة الحرارة المرتفعة . تتوفر معلومات أكثر عن بادئات الحرارة المعتدلة عن بادئات الحرارة المرتفعة مما يدل على أن الجبن التى تصنع ببادئات الحرارة المعتدلة تنتج بكميات أكبر.

بادئات الحرارة المعتدلة مع البكتريا المنتجة للنكهة تستخدم فى إنتاج اللبن الخض المتخمر ، الزبد من قشدة متخمرة وبعض منتجات الألبان المتخمرة . تستخدم بادئات الحرارة المرتفعة فى تصنيع اليوجهورت ، لبن الأسيدوفلس والجبن التى تطبخ عند درجات حرارة مرتفعة (مثل أنواع الجبن السويسرية) . النشاط المشترك بين بكتريا حامض اللاكتيك المحبة للحرارة المعتدلة والحرارة المرتفعة والخمائر تنتج تخمراً حمضياً وكحولياً فى الألبان المتخمرة (مثل الكفير والكوميس). ينتج كحول الأيثانول أساساً ، وقد يصل إلى ١,٥ % ، أما مكونات النكهة فترجع إلى الأسيتالدهيد ، ثنائى الأسيتيل وحامض اللاكتيك .

الجدول (١-١) يوضح بكتريا حامض اللاكتيك Lactic acid bacteria (LAB) وبعض صفاتها الهامة . وعادة تستخدم القدرة على النمو عند ١٠°م ، ٤٥°م لتمييز أنواع البكتريا المحبة للحرارة المعتدلة عن أنواع البكتريا المحبة للحرارة المرتفعة ، بينما الفحوصات الميكروسكوبية وقياس كمية ونوع مشابهات isomers حامض اللاكتيك الناتج والقدرة على تمثيل السترات (فى الأنواع المحبة للحرارة المعتا لة) تستخدم فى تمييز معظم الميكروبات داخل هاتين المجموعتين.

يمكن استخدام القدرة على إنتاج الجلاكتوز من اللاكتوز بواسطة *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus, Lb.delbrueckii* ssp. *lactis* وليس بواسطة *Lb.helvelticus* فى تمييز أنواع Lactobacilli . كما أن *Str.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 فى اللبن ما لم يضاف مستخلص الخميرة (٠,٣ %) إلى اللبن كمادة منشطة stimulant ، وفى بعض الحالات يضاف ١,٠ % جلوكوز. تحت هذه الظروف فإن Leuconostocs يجبن اللبن فى أقل من ٢٤ ساعة وينتج حوالى ٠,٦ % حامض لاكتيك . ومع ذلك فإن *Leuc.lactis* ينمو بصورة جيدة نسبياً فى اللبن (جدول ١-١) . وقد تعكس الحاجة إلى مستخلص الخميرة إلى عدم قدرة هذه البكتريا على إنتاج إنزيم proteinase بدرجة كافية لتحليل بروتين اللبن إلى أحماض أمينية وببتيدات صغيرة ضرورية للنمو ، بينما تعكس الحاجة إلى الجلوكوز إلى عدم قدرتها على استخدام اللاكتوز كمصدر للطاقة .

جدول (١-١) : الصفات المميزة لبكتريا حامض اللاكتيك فى بادئات الألبان.

الميكروبات	G+C (%)	الشكل	% حامض اللاكتيك الناتج فى اللبن	صور isomer اللاكتات	تمثيل السترات	إنتاج الأمونيا من الأرجنين	النمو عند (°م) ١٠	٤٠	٤٥	تخمير جلوكوز	جلاكتوز	لاكتوز
Streptococcus thermophilus	٤٠-٣٧	كروى Cocci	٠,٦	L	-	-	-	+	+	+	-	+
Lactobacillus helveticus	٤٠-٣٨	عصوى Rods	٢,٠	DL	-	-	-	+	+	+	+	+
Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus*	٥١-٤٩	عصوى Rods	١,٨	D	-	-	-	+	+	+	-	+
Lactobacillus delbrueckii ssp. *lactis*	٥١-٤٩	عصوى Rods	١,٨	D	-	±	-	+	+	+	±	+
Lactococcus lactis ssp. *cremoris*	٣٦,٢-٣٥	كروى Cocci	٠,٨	L	-	-	+	-	-	+	+	+
Lactococcus lactis ssp. *lactis*	٣٦,٩-٣٣,٨	كروى Cocci	٠,٨	L	±	+	+	+	-	+	+	+
Leuconostoc lactis	٤٠-٣٧	كروى Cocci	أقل من ٠,٥	D	+	-	+	-	-	+	+	+
Leuconostoc mesenteroids ssp. *cremoris*	٤٠-٣٨	كروى Cocci	٠,٢	D	+	-	+	-	-	+	+	+

± معظم السلالات موجبة

٢-١- بادئات الحرارة المعتدلة المختلطة السلالة

Mixed strain mesophilic starters

ظهرت هذه البادئات فى نـــهاية القرن التاسع عشر وبداية القرن العشـرين واستخدمت بكثرة فى صناعة منتجات الألبان المتخمرة فى شمال أوروبا. تتكـــون هذه البادئات بصفة رئيسية من *Lc.lactis* ssp. *cremoris* بالرغم من أنه فى بعض الأحيان قد تحتوى على *Lc.lactic* ssp. *lactis* والأكثر أرتباطاً بـــها ، ويطلـــق على هذه الأنواع Lactococci (الأسم القديم Lactic streptococci) . بعـــض البادئات المحبة للحرارة المعتدلة والمختلطة السلالات قد تحتوى على نـــوع مـــن *Lactococcus* يستطيع تمثيل السترات (Cit^+) إلى CO_2 ومكونات الطعم والنكهة (*Lc.lactis* biovar *diacetylactis*) ، الأســـم القـــديم لهـــذا الميكـــروب هـــو *Streptococcus diacetylactis* . الفرق الأساسى بينه وبـــين *Lc.lactis* ssp. *lactis* هو أحتوائه على بلازميد plasmid مسئول عن أمتصـــاص الســـترات . تتضمن الأنواع المحبة للحرارة المعتدلة Lactococci أنواعاً غير قادرة على تخمـــر السترات (Cit^-) وأخرى قادرة على تخمر السترات (Cit^+) ، حيث تشـارك الأولى فى إنتاج الحموضة بينما الثانية فى تكوين الطعم والنكهة . تشـلوك *Leuconostoc* spp. فى إنتاج مكونات الطعم والنكهة من السترات فى البادئات المختلطة. تقسـم البادئات المحبة للحرارة المعتدلة والمختلطة السلالات (جدول ٩-٢) تبعاً لطبيعـــة إنتاج مكونات الطعم والنكهة إلى :

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

ب- D type ويحتوى على Lactococci Cit^+ قادرة علـــى تخمـــر السترات (*diacetylactis*) .

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

د- O type ولا يحتوى على أى نوع من الأنواع القادرة على إنتاج مكونات الطعم والنكهة.

ويطلق عادة على البكتريا المنتجة لمكونات النكهـــة aroma producers أو مستهلكة للسترات citrate utilizers أو مخمرة للســـترات citrate fermenters . تكّون كل من الأنواع المنتجة للحموضة ، الطعم والنكهة فى بادئـــات الحـــرارة

المعتدلة حوالى ٩٠ و ١٠ % من إجمالى الأنواع الموجودة فى البادئ ، على التوالى ، ويطلق عليها مزارع مختلطة mixed cultures ليس لأنها تحتوى على أنواع مختلفة من البكتريا ولكن أيضاً لأنها تتضمن سلالات مختلفة لنفس النوع ، ويلاحظ أن أنوع بكتريا المزارع المختلطة تحتوى خلاياها على أنواع مختلفة من البلازميدات وذلك للحصول على معدلات نمو مختلفة ومقاومة مختلفة للفاج ، بالإضافة إلى أن بعض السلالات تكون خالية من إنزيم proteinase (Prt^-) ونتيجة لذلك لا تستطيع أن تنمو بدرجة جيدة فى اللبن.

جدول (١-١) : البادئات المعتدلة الحرارة واستخدامها فى منتجات الألبان .

نوع البادئ	الميكروبات	المنتج
O	*Lc.lactis* ssp. *cremoris*	جبن التشدر ، جبن الفتا
	Lc.lactis ssp. *lactis*	والكوارج
L	*Lc.lactis* ssp. *cremoris*	الزبد من قشدة متخمرة
	Lc.lactis ssp. *lactis*	جبن الفتا وجبن التشدر
	Leuconostoc spp.	
D	*Lc.lactis* ssp. *cremoris*	الزبد من قشدة متخمرة
	Lc.lactis ssp. *lactis*	
	Cit^+ lactococci	
DL	*Lc.lactis* ssp. *cremoris*	جبن الأيدام والجودا
	Lc.lactis ssp. *lactis*	وجبن التشدر، الكوارج ،
	Cit^+ lactococci	الزبد من قشدة متخمرة ،
	Leuconostoc spp.	اللبن الخض المتخمر

بعض مزارع البادئات تكون لها حساسية خاصة للفاج التى تقلل من ، أو فى بعض الحالات الشديدة توقف إنتاج حامض اللاكتيك . فى هولندا ، فإن بادئات الحرارة المعتدلة المختلطة السلالة التى تم تنميتها تجارياً دون أخذ الاحتياطات اللازمة لحماية هذه المزارع من الفاجات التى مصدرها الهواء يطلق عليها مزارع P (P cultures)

ويطلق (P or practice starters) على المزارع التى يتم إنتاجها يومياً فى المصنع تحت الظروف العملية دون اتخاذ الاحتياطات اللازمة لاستبعاد الفاج لتمييزها عن المزارع المماثلة والتى تم إعدادها 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 . مزارع (P) أكثر مقاومة للفاج عن مزارع (L) وقد تحتوى على أعداد مرتفعة من الفاج (قد يصل إلى 10^{8}/مل) دون أن تؤثر على قدرة هذه المزارع على إنتاج الحموضة ، وهذه المزارع يطلق عليها own phage لتمييزها عن الأنواع المعروفة بالـ disturbing phage التى تثبط من إنتاج الحموضة . تحتوى مزارع (L) على سلالة واحدة أو أكثر ولذلك تكون أكثر عرضة للإصابة بالفاج ، وأفضل مزارع (P) هى التى ينم تحضيرها وتحفظ عند -٨٠°م فى معهد بحوث الألبان بهولندا (NIZO) ، حيث يتم تنميتها تحت ظروف مراقبة بدقة وتوزع على مصانع الجبن.

٢-٢- بادئات الحرارة المعتدلة معّرفة السلالة

Defined strain mesophilic starters

هذه البادئات أساساً عبارة عن مزارع نقية من *L.c.lactis* ssp. *cremoris* ، وقد بدأ فى استخدامها تجارياً فى نيوزيلندا عام ١٩٣٤ . أول بكتريا تم تنقيتها كانت *L.lactis* ssp. *lactis* بواسطة العالم Lister عام ١٨٧٨ وقد كانت أول مزرعة تم تعريفها. هناك بعض الخلط بين هذه المزارع والمزارع التى يطلق عليها مزارع أحادية mono cultures ، مزارع فردية single culture ، مزارع ثنائية pairs ، مزارع ثلاثية triple ومزارع عديدة multiple culture . كثير من هذه الأسماء يدل على أسلوب استخدامها ، أى كمزارع فردية أو كمزارع عديدة تحتوى على ٢ إلى ٦ سلالات (فى أغلب الأحيان ٢ أو ٣سلالة)، حيث تنمى مع بعضها فقط عند تحضير بادئ الإضافة (الصناعة) bulk culture. أهم الفروق بين هذه البادئات والبادئات المختلطة التقليدية هو أن عدد السلالات يكون معروفاً ولا تحتوى 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 واستخدمت كل على حده (بادئ وحيد السلالة) فى صناعة الجبن ، فكانت الجبن الناتجة ذات تركيب مقفول close-textured . ولكن عندما استخدمت هذه السلالات تجارياً كانت بطيئة فى إنتاج الحموضة نتيجة تحلل مزارع البادئات بواسطة الفاج. وقد أمكن التغلب على هذه المشكلة باستخدام زوج من السلالات معاً فى دورات كل منها ٤ أيام four-day rotation مع استخدام زوج آخر من السلالات فى كل دورة ، أى يستخدم سلالات A+B ، C+D ، E+F ، G+H ، A+B... الخ فى الدورة ، تختلف فى حساسيتها للفاج ولا تصاب بنفس الفاج ، وقد وجد أن أعداد الفاج قد انخفضت بدرجة كبيرة فى اليوم الخامس عندما يستخدم أول زوج من السلالات (A+B) مرة أخرى ، حيث يكون هناك تأثير ضئيل على نمو وإنتاج الحموضة . بهذه الطريقة يمكن تجنب انتشار الفاج فى المصنع ، هذا بالإضافة إلى أن أحد السلالات فى كل زوج تنمو وتنتج حموضة عند درجة حرارة الطبخ (سلالة سريعة fast أو مقاومة لدرجة الحرارة temperature resistant strain) ، بينما السلالة الأخرى لا تنمو ولكن تستمر فى إنتاج الحموضة بمعدل أبطأ (سلالة بطيئة slow أو حساسة لدرجة الحرارة temperture senstive strain) . استخدام السلالة البطيئة تقلل من ظهور المرارة فى الجبن الناتجة من النمو الزائد للسلالة السريعة.

وقد استخدم نظام تدوير rotation 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 الجدولة (التوقيت) أى الوقت المطلوب لكل خطوة. وقد تم التغلب على هذه المشكلة باستخدام بادئات عديد السلالة multiple strain starters ، الذى أنتشر استخدامه فى نيوزيلندا وأستراليا وأيرلندا

والولايات المتحدة ، تستخدم هذه البادئات دون الحاجة إلى تدوير rotation. فى البداية كان عدد السلالات المستخدمة فى هذه البادئات متعددة السلالة (٦ سلالات) ، ثم أنخفض هذا العدد فى السنوات القليلة الماضية إلى ٢-٣ سلالات ، بدون حدوث أى تأثير على إنتاج الحموضة أو جودة الجبن ، بالرغم من أن البادئات متعددة السلالة قد أنتخبت على أساس المقاومة للفاج إلا أنها ما زالت عرضة لمهاجمة الفاج ، وعندما يحدث ذلك ترفع السلالة المصابة من هذا النظام وتستبدل بسلالة أخرى مقاومة للفاج.

٢- ٣- بادئات الحرارة المرتفعة Thermophilic starters

تمثل البادئات المحبة للحرارة المرتفعة أهمية خاصة فى مصانع الجبن الصغيرة فى فرنسا وسويسرا وإيطاليا حيث يصنع جبن الجروير والأمينتال والجرانا ، غالباً ما يتم إنتاج هذه البادئات بتحضين الشرش الناتج من اليوم السابق عند ٤٠-٤٥°م طول الليل. تتكون البكتريا الموجودة فى هذا الشرش أساساً من *Str.thermopilus* (وقد يوجد Enterococci, Lactococci) وعدة أنواع من *Lactobacillus* ، مثل *Lb.helveticus, Lb.fermentum, Lb.delbrueckii* ssp. *lactis* and *Lb.acdophilus* . مزارع الشرش الطبيعية المنخفضة الحموضة low-acid natural whey cultures التى يسود فيها *Str.thermophilus* استخدمت فى الماضى ، ولكن حديثاً يستخدم مزارع الشرش المرتفعة الحموضة high-acid whey cultures وتتكون أساساً من Lactobacilli ، وقد بذلت جهوداً كبيرة لتنقية هذه المزارع. جبن الأمينتال أكثر عرضة لظهور عيب يطلق عليه التخمر الثانوي secondary fermentation ، الذى يتميز بإنتاج غاز CO_2 بكميات زائدة ويسبب انتفاخ الجبن بعد تخمر حامض البروبيونيك ، ويعتقد أن ذلك يعزى إلى النشاط الزائد لبكتريا حامض البروبيونيك (PAB) ، ولكن وجد فيما بعد أنه يرجع إلى استخدام *Lb.helveticus* ذات نشاط زائد فى تحليل البروتين والذى يؤدى إلى زيادة PAB وإنتاج زائد من غاز CO_2 ، وقد أمكن الحد من هذه المشكلة بالانتخاب الدقيق لمزارع البادئ وتجميع المزارع المختلطة من مصانع الجبن التى تنتج جبن أمينتال مرتفعة الجودة ، والتى تم اختيارها من حيث إنتاج الحموضة

وتحليل البروتين والثبات أثناء التخزين وكفاءتها فى صناعة الجبن ، ويتم تنمية هذه المزارع تحت ظروف مراقبة بدقة لتوزيعها على مصانع الجبن .

فى المصانع الحديثة ، تستخدم عادة بادئات محبة للحرارة المرتفعة معّرفة السلالة (مزارع أحادية أو عديدة السلالة) ، وعلى عكس المزارع المحبة للحرارة المعتدلة المعّرفة السلالة ، حيث تستخدم هذه المزارع بنظام الدورات ، وغالباً ما تحتوى المزارع المحبة للحرارة المرتفعة على :

أ- *Streptococcus thermophilus* .

ب- بكتريا حامض لاكتيك عصوية محبة للحرارة المرتفعة a thermophilic *Lactobacillus*: *Lb.delbrueckii* ssp. *lactis* و *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* أو *Lb.helveticus* .

ويحدد نوع الجبن المراد إنتاجه نوع *Lactobacillus* الذى يجب استخدامه ، فمثلاً ، يستخدم *Lb.delbrueckii* ssp. *lactis* و *Lb.helveticus* فى صناعة الجبن السويسرية Swiss cheese ، بينما يستخدم فى صناعة اليوجهورت والزبادى *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lb.lactis* ssp. *lactis* . يجب الاهتمام واتخاذ الاحتياجات اللازمة عند اختيار Lactobacilli فى صناعة الجبن السويسرية، حيث أن عديد من سلالات *Lb.helveticus* تتميز بقدرة فائقة على تحليل البروتين وبالتالى قد تتسبب فى حدوث عيب التخمر الثانوى *Lb.helveticus*. secondary fermentation وعدد قليل من سلالات *Lb.delbruecki* ssp. *lactis* يمكن أن تخمر الجلاكتوز الناتج من اللاكتوز (Gal^+)، بينما *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ومعظم سلالات *Lb.delbrruckii* ssp. *lactis, Str.thermophilus* لا تخمر الجلاكتوز (Gal^-)، لذلك يستخدم فقط سلالات Lactobacilli المحبة للحرارة والقادرة على تخمر الجلاكتوز (Gal^+) كبادئات فى الجبن، حيث تقوم بتخمير الجلاكتوز الناتج بواسطة *Str.thermophilus* ، فإذا استخدمت سلالات غير قادرة على تخمر الجلاكتوز (Gal^-) فإن الجلاكتوز يتجمع فى الجبن وقد يستخدم كمصدر للطاقة لنمو البكتريا التى لا تنتمى للبادئ والتى تسبب أطعمة غير مرغوب فيها ، لذلك فإنه يعتقد أن عديد من سلالات *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* المستخدمة تجارياً فى

صناعة الجبن السويسرية فى الولايات المتحدة من النوع (Gal^+) . وقد يرجع ذلك إلى خطأ فى تصنيف *Lb.helveticus* الذى يفسر سبب استخدام *Lb.helveticus* ssp. *bulgaricus* فى صناعة الجبن السويسرية فى الولايات المتحدة ، بينما يفضل استخدام Gal^+ *Lb.delbrueckii* ssp. *lactis* فى أوروبا . يتم تنمية Streptococci و Lactobacilli معاً لصناعة اليوجهورت ، وتنمى كل منهما على حده لصناعة الجبن . تقدر كمية البادئ الذى يستخدم فى صناعة جبن الجرويير والأمينتال بـ ٣-١٠ % من كمية البادئ المستخدم فى صناعة الجبن التشدر أو الأنواع الهولندية. عادة تضاف المزارع مباشرة إلى لبن الجبن فى الحوض ، وفى هذه الحالة يتم تنمية المزارع كل على حده ثم تركز بالطرد المركزى أو بالترشيح بالأغشية membrane filtration وتجمد عند -٣٠°م فى قارورات صغيرة حتى تستخدم فى التلقيح المباشر .

٢-٤- البادئات المساعدة (الثانوية) Adjunct starters

بالإضافة إلى بادئات بكتريا حامض اللاكتيك التى تستخدم فى صناعة الجبن لإنتاج الحموضة بمعدلات مرغوبة خلال مراحل التصنيع المختلفة مع تباين دورها المحدود فى تسوية الجبن فإنه قد يستخدم بادئات مساعدة (ثانوية) أخرى عند تصنيع أنواع معينة من الجبن بهدف إحداث تغير معين مرغوب فى الجبن أثناء التسوية حتى يمكن الحصول على الناتج النهائى بالصفات والجودة المميزة لهذا النوع من الجبن . كما تستخدم بادئات مساعدة خاصة بجانب بادئات بكتريا حمض اللاكتيك فى صناعة بعض الألبان المتخمرة لإنتاج صفات خاصة مميزة لهذه الأنواع من الألبان المتخمرة . قد تكون البادئات المساعدة بكتريا ، خمائر وفطريات أو خليط منهم حسب نوع الناتج . وفيما يلى أهم هذه البادئات فى مجال صناعة الجبن والألبان المتخمرة:

أ- البكتريا

١- *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* ، تستخدم على نطاق واسع فى صناعة أنواع الجبن السويسرية Swiss-type cheeses بهدف إنتاج غاز CO_2 لتكوين العيون فى هذه الجبن خلال التسوية.

٢- *Brevibacterium linens* ، ينمو على سطح بعض أنواع من الجبن مثل البريك Brick واللمبرجر Limburger مكوناً طبقاً ميكروبية لزجة smear ويعطى لسطح الجبن لون أحمر برتقالي ، ويساهم بدرجة كبيرة فى تسوية هذه الجبن لإعطاء الطعم والصفات المميزة لهذه الجبن.

٣- سلالات معينة من DK *Ent.durans, Ent.faecalis* ، تستخدم فى تصنيع بعض أنواع من الجبن التشدر فى الولايات المتحدة الأمريكية.

٤- *Bfidobacterium* spp. ، يستخدم فى صناعة بعض أنواع من الألبان المتخمرة لإنتاج ألبان متخمرة علاجية ووقائية therapeutic and probiotic ، وحالياً تجرى بعض المحاولات لإدخالها فى الجبن لأغراض علاجية ووقائية .

ب- الفطريات

تستخدم الفطريات أساساً فى صناعة بعض أنواع من الجبن الطرية والنصف طرية ، والهدف الرئيسى لاستخدام هذه الفطريات هى أعطاء الطعم والنكهة المرغوبة وكذلك صفات القوام والتركيب المميزة للجبن الناتج . يمكن تقسيم هذه الفطريات إلى قسمين من حيث اللون وصفات النمو:

١- الفطريات البيضاء ، وتشمل *Penicillium camemberti, P.caseiocolum* وتنمو على سطح جبن الكمبير Camembert والبراى Brie وتساهم بدرجة رئيسية فىالتسوية 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 Stliton والجروجرزولا Gorgonzola أثناء التسوية وتشارك بصفة رئيسية فى إعطاء الجبن الطعم الحريف peppery المرغوب وكذلك صفات القوام والتركيب المميزة لهذه الأنواع من الجبن.

وقد توجد أجناس أخرى من الفطريات ، التى تستخدم على نطاق محدود ، مثل *Mucor rasmusen* فى النرويج لصناعة جبن مسواه من لبن فرز ، *Aspergillus oryzae* ويستخدم فى اليابان لإنتاج جبن من فول الصويا . كما

تستخدم بعض الفطريات فى صناعة بعض أنواع من الألبان المتخمرة ، حيث يستخدم *Geotrichum candidum* فى صناعة اللبن المتخمر فيلى Viili فى الدول الأسكندنافية.

جـ- الخمائر

بعض أنواع من الخمائر السطحية تنمو على سطح الجبن ، وخاصة التى تسوى سطحياً بواسطة البكتريا (smear) مثل البريك واللمبرجر حيث تساهم فى تهيئة الظروف البيئية المناسبة وكذلك إفراز بعض عوامل النمو اللازمة لـ *B.linens* كما قد تستخدم بعض الخمائر المحللة للدهن *Candida lipolytica* فى إنتاج الجبن المعرقة بالفطر حيث تساهم مع الفطر فى إكساب الجبن الطعم الحريف peppery المميز لهذه الجبن.

وجود الخمائر فى اللبن بالإضافة إلى LAB يؤدى إلى تخمر لاكتيكى كحولى lactic- yeast fermentation ، حيث يستخدم هذا التخمر فى إنتاج بعض الألبان المتخمرة (مثل الكفير والكوميس فقط) . فى بادئ الكفير والذى يطلق عليه حبيبات الكفير ، حيث تسود الخمائر *Cryptococcus kefyr, Saccharomyces kefyr* وغيرها من الأنواع والتى تطابق *Cadida kefyr* . فى بادئ الكوميس ، فإنه يتكون من *Torulopsis* spp. و *Kluyveromyces lactis* و LAB .

٣- بيئات النمو والتمييز

Media for growth and differentiation

تحتاج بادئات بكتريا حامض اللاكتيك إلى عدد من الأحماض الأمينية والفيتامينات وغيرها من الاحتياجات الغذائية للنمو ، لذلك فإن البيئات التى تستخدم فى عزلها ونموها تتضمن عموماً مستخلص الخميرة مع/أو مستخلص اللحم وواحد أو أكثر من نواتج تحلل البروتين إنزيمياً مثل التربتون. كما أن هذه البكتريا تحتاج إلى كربوهيدريت قابلة للتخمر كمصدر للطاقة ، ونظراً لأن لها القدرة على التخمر فإنها تنتج كميات كبيرة من اللاكتات ، لذلك فإن هذه البيئات يجب أن ينظم buffered فيها pH بطريقة مناسبة ، كما يضاف أيونات

معدنية 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 باستخدام بيتا جليسروفوسفات β-glycerophosphate ، وهذه البيئة أيضاً مفيدة جداً فى نمو *Str.thermophilus* وفى تحضير وقياس واختبار الفاج لكل من هذا الميكروب و Lactococci. البيئات المحتوية على بيتا جليسروفوسفات تكون غير مناسبة لنمو عديد من بكتريا حامض اللاكتيك العصوية المحبة للحرارة thermophilic lactobacilli ، وخاصة *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus, Lb.delbrueckii* ssp. *lactis* . تستخدم بيئة M17 كبيئة إنتقائية لعد *Str.thermophilus* فى اليوجهورت ، وتعتبر بيئة MRS أفضل البيئات بصفة عامة لبكتريا حامض اللاكتيك العصوية Latobacilli والكروية Streptococci ، كما أن Leuconostocs تنمو جيداً على هذه البيئة ويمكن أن تصبح بيئة إنتقائية للـLactobacilli عند خفض pH إلى ٥,٤ . ويمكن عد *Str.thermophilus* على بيئة M17 agar (بعد التحضين تحت ظروف هوائية عند ٣٧°م لمدة ٤٨ ساعة) ، وعد *Lb.bulgaricus* على بيئة MRS agar عند pH ٥,٤ (بعد التحضين تحت ظروف لاهوائية عند ٣٧°م لمدة ٧٢ ساعة).

وقد أقترحت بيئات للتمييز بين البكتريا المنتجة للحموضة والبكتريا المنتجة لمكونات الطعم فى البادئات المحبة لدرجات الحرارة المعتدلة mesophilic starters. تحتوى كثير من هذه البيئات على سترات كالسيوم حيث تكون البكتريا المنتجة لمكونات الطعم flavor producer مستعمرات محاطة بمنطقة شفافة نتيجة لتمثيل سترات الكالسيوم غير الذائبة . هذه البيئات معتمة opaque لدرجة يصعب معها رؤية الأنواع المنتجة للحموضة . إضافة 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride بتركيز ٠,١ ملليجم/مل يساعد على رؤية مستعمرات الأنواع المنتجة للحموضة بسهولة . فى البادئات المحبة لدرجات الحرارة المعتدلة ، تحتوى Leuconostocs على β-galactosidase (β-gal) بينما تحتوى الـLactococci 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 محاطة بهالة شفافة نتيجة لاستهلاك السترات ، بينما تكون لون مستعمرات Leuconostocs أزرق ، نتيجة لتأثير β-gal على X-gal ، ومحاطة أيضاً بمنطقة شفافة .

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

٤- قياس النمو Measurement of growth

يتم الحصول على منحنى نمو البكتريا عادة باستخدام لوغاريتم الأمتصاص الضوئى الذى يقدر بواسطة أجهزة القياس الضوئى spectrophotometry عند موجة ٤٠٠-٦٥٠ nm (القياس عند 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 الامتصاص 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 ارتباطا مباشراً

بكتلة الخلايا cell mass ويمكن استخدامه فى الحصول على منحنى النمو . وعند رسم منحنى النمو فإنه من الضرورى تعديل القياسات وذلك بالنسبة للحموضة الطبيعية للبن غير الملقح (أى حساب الزيادة فى الحموضة المتكونة) ويفضل أن يرسم بطريقة نصف لوغاريتم semi-logarithmic بدلاً من الطريقة الحسابية . وطالما أن المنحنى قد تم تنفيذه semi-logarithmic فإن ميل (m) slope 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 الأتية :

$$GT = 0.693/k = 0.301/m$$

درجة الحرارة المثلى لبادئات الحرارة المعتدلة حوالى ٣٠°م وللمحبة للحرارة المرتفعة ٤٥°م لذلك فإن فترة الجيل (GT) فى البادئات المحبة للحرارة المعتدلة فى اللبن عند ٣٠°م ، ٢١°م (وهى درجة الحرارة الطبيعية لإنتاج بادئ الإضافة) هو ١ ، ٢,٣ ساعة ، على التوالى ، بينما للبكتريا المحبة للحرارة المرتفعة *Lb.helvetics* & *Str.thermophilus* (حيث تنمو بصفة عامة أسرع من البادئات المحبة للحرارة المعتدلة) تكون حوالى ٣٠ دقيقة ، ساعة واحدة ، على التوالى ، عند ٤٢°م.

يمكن قياس pH بسهولة ، وعادة يستخدم الانخفاض فى pH نتيجة لإنتاج حامض اللاكتيك فى قياس النمو . ومع ذلك ، فإن pH ليس مرتبطاً أرتباطاً مباشراً باعداد الخلايا أو إنتاج حامض اللاكتيك ولا يمكن استخدامه فى حساب GTs . بادئات LAB تنتج كميات كبيرة من حامض اللاكتيك ، لذلك فإن بيئات النمو يجب أن تنظم buffered بطريقة مناسبة . اللبن ، خاصة الذى يرفع فيه الجوامد اللادهنية إلى ١٠-١٢ % ، يحتوى عادة على قوة تنظيمية جيدة . ينخفض pH البادئات النامية فى اللبن نمواً كاملاً من ٦,٥ فى البداية إلى ٤,٥ ، ٤,٥ ، ٣,٥ فى النهاية ، وذلك للبادئات المحبة للحرارة المعتدلة ، *Str.thermophilus* والمحبة للحرارة المرتفعة من Lactobacilli ، على التوالى ، مثل هذه البادئات تحتوى عادة على ١٠^{٩} خلية /مل .

درجة النمو عند أى نقطة تتحدد بواسطة ٣ عوامل : معدل التلقيح ، درجة حرارة ومدة التحضين . فى بادئات الحرارة المعتدلة ، يكون معدل التلقيح ٠,٥% ودرجة حرارة التحضين ٢١°م لمدة ١٦ ساعة . تحت هذه الظروف يتجبن اللبن فى خلال 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 بحوالى ٠,٨٥ % ، فإن إنتاج حامض اللاكتيك يتوقف عند ٠,٤-٠,٥ % (pH ٤,٨-٥,٠). يحضن بادئات الحرارة المرتفعة بصفة عامة عند ٤٠-٤٥°م لمدة ٦ ساعات مع التلقيح بمعدل ٠,٥ % . تحت هذه الظروف ،فإن *Str.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) . يجب ملاحظة أن تجبن اللبن يحدث عند pH أعلى عند درجات حرارة أعلى ، لذلك فإن حموضة بادئات الحرارة المعتدلة والمرتفعة عند التجبن غير متساوية.

٥- النشاط الأيضى Metabolism

٥-١- تمثيل اللاكتوز Lactose metabolism

ترجع الأهمية التجارية للبكتريا المستخدمة فى صناعة معظم منتجات الألبان المتخمرة ، بدرجة كبيرة إلى تحويل سكر اللبن (اللاكتوز) وغيره من السكريات إلى حامض لاكتيك . وهذا الحامض بمفرده أو بالاشتراك مع عوامل أخرى ، مثل انخفاض الماء المتاح ، يثبط من نمو عديد من الميكروبات التى تسبب أمراضاً للإنسان أوفساد الأغذية . وقد أكتشف حامض اللاكتيك فى عام ١٧٨٢ بواسطة عالم الكيمياء السويدى Scheel ، كمركب كيماوى مسئول عن تحميض اللبن . وقد أوضح العالم الفرنسى لويس باستير Pasteur فيما بعد (بعد حوالى ٧٥ سنة) الدور الأساسى للبكتريا فى هذه العملية (تحميض اللبن) ، وفى عام ١٨٧٨ تمكن عالم الميكروبيولوجى Joseph Lister من عزل البكتريا المسببة فى مزرعة نقية ، وهى السلالة التى تعرف حالياً بـ *Lactococcus lactis* ssp.

lactis ، وهى من أهم بكتريا بادئات الألبان . ومنذ هذاالتاريخ وقد بدأ الأهتمام بدراسة تمثيل السكريات إلى حامض لاكتيك فى غيرها من بكتريا بادئات الألبان ، مثل *Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium, Lactobacillus, Leuconostoc* والتى يمكن اعتبارها بكتريا حامض اللاكيك Lactic acid bacteria (LAB) من حيث النشاط الأيضى . ويتكون فى التخمرات المختلفة حامض اللاكتيك فى صورة L & D بالإضافة إلى مكونات أخرى نهائية أمكن التعرف عليها.

بكتريا بادئات الألبان ، باستثناء Bifidobacteria ، متحملة للظروف الهوائية aerotolerant ، ولكن لا تحتوى على دورة Kerbs (دورة حامض ثلاثى الكربوكسيل "دورة حامض الستريك") ، وبالتالى لا ينتج ATP اللازم لتخليق البروتين وغيرها من الجزيئات الكبيرة خلال عملية التنفس الهوائى ، لذلك فإنها تدفع لكى تعتمد على الظروف اللاهوائية لإنتاج ATP . ونتيجة لذلك تقوم هذه البكتريا بتمثيل السكريات إلى حامض لاكتيك وغيرها من المكونات الضرورية فسيولوجياً ، حيث تنتج هذه العمليات ATP فى غياب الأكسجين تماماً. تعتبر هذه العمليات تخمرات حقيقية . بعض من هذه البكتريا تنتج أيضاً قليلاً من ATP من خلال تخمير الأرجنين أو تمثيل السترات أو تدفق البروتونات وغيرها من نواتج التخمر . ومن الأمور الجديرة بالذكر أن بادئات الألبان لا تنمو فى عدم وجود سكر قابل للتخمر ، مما يؤكد الأهمية الفسيولوجية لتخمر السكريات فى هذه البكتريا.

٥-١-١- الصفات العامة لمسارات تخمر اللاكتوز

تتضمن بكتريا بادئات الألبان ثلاث مسارات رئيسية لتمثيل اللاكتوز والسكريات المرتبطة (جدول ١-٣) ، وتعرف هذه المسارات عادة بالمسار المتجانس التخمر homolactate pathway (glycolysis-EMP) (شكل ١-٢) ، المسار المختلط التخمر (شكل ١-٢) heterolactate pathway (phosphoketolase) ومسار بيفيد وبكتريا bifidobacteria pathway . (شكل ١-٣) وتشترك هذه المسارات الثلاثة فى الصفات العامة التالية :

- ميكانيكية انتقال وتحلل اللاكتوز إلى سكريات أحادية سداسية الكربون (hexose sugars).
- سلسلة التفاعلات لتحويل السكريات الأحادية إلى مركبات فوسفات ثلاثية الكربون triose phosphate وغيرها من النواتج الوسطية.
- تشترك جميع مسارات تخمير السكر فى خمس تفاعلات متتابعة ، حيث يتحول triose phosphate إلى بيروفات pyruvate .
- تفاعلات تحويل البيروفات إلى لاكتات مع نواتج أخرى طبقاً لنوع التخمر.
- ميكانيكية إفراز النواتج النهائية للتخمر .
- ميكانيكية تنظيم عملية التخمر .

جدول (١-٣) : الصفات المميزة لتمثيل اللاكتوز فى بكتريا بادئات الألبان .

مشابهات اللاكتات isomer	النواتج النهائية mol/mol used	الإنزيمات المحللة	المسار Pathway	طريقة أنتقال اللاكتوز Transport	الميكروب
L	٤ لاكتات	pβ-gal	EMP	PEP- PTS	*Lactococcus*
D	٢ لاكتات + ٢ إيثانول +٢ ك أ$_٢$ (CO_2)	β-gal	PK	Permease	*Leuconostoc*
L	٢ لاكتات	β-gal	EMP	Permease	*Str.thermophilus*
D	٢ لاكتات	β-gal	EMP	Permease	*Lb.delbrueckii*
DL	٤ لاكتات	β-gal	EMP	Permease	*Lb.helveticus*
	٢ لاكتات + ٣ خلات	β-gal	Bifido	Permease	*Bifidobacterium*

PEP-PTS : phosphoenol pruvate phosphotransferase system.
EMP:Embden–Meyerhof-Parnas pathway; Pk: phosphoketolase (heteroactate) pathway
Bifido : Bifidobacterium; β-gal: β-galactosidase; pβ-gal : phospho β-galectosidase.

تعتبر مسارات التخمر تفاعلات أكسدة كاملة ، حيث أن النواتج النهائية للتخمر تكون مؤكسدة بدرجة أكبر من سكريات البيئة الناتجة منها. الطاقة الناتجة خلال الأكسدة تحفظ جزئياً بتكوين ATP ، وجزئياً بتوليد حرارة heat . يتكون ATP بصفة أساسية نتيجة تفاعلات معينة فى مسارات التخمر تعرف

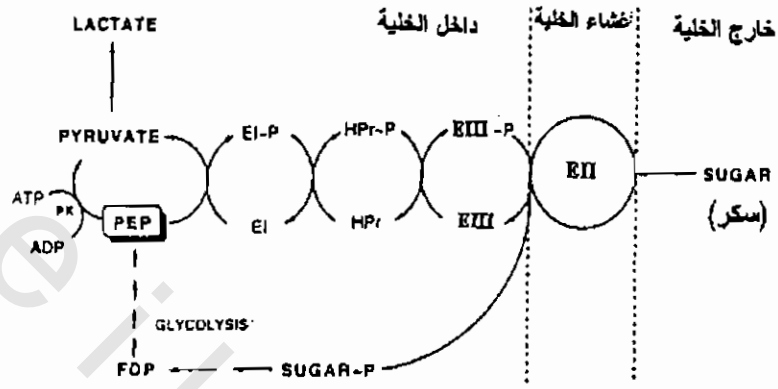
بـــsubstrate-level phosphorylation . كما يمكن حفظ الطاقة من خلال تدفق النواتج النهائية لمسارات التخمر .

٥-١-٢- انتقال وتحلل اللاكتوز

ينتقل اللاكتوز إلى داخل خلايا بكتريا بادئات الألبان من خلال نظـــامين (جدول ١-٣) ، يعرف أحدهما بنظـــام الانتقـــال translocation mechanism حيث يتم فسفرة جزئى من السكر أثناء مـــروره خـــلال غشـــاء الســـيتوبلازم cytoplasmic membrane. المصـــدر الأولى للفوســـفات هـــو phosphoenol pyruvate (PEP)، وهو ناتج وسطي غنى بالطاقة وعادة يطلق على هذا النظـــام PEP-PTS (Phosphoenol pyruvate phosphotransferase system) ، وعـادة يتضمن هذا النظام ٤ بروتينات (شكل ١-١) ، أحدها أنزيم II (EII) وهو بروتين فى غشاء السيتوبلازم ، ، ويقوم بنقل سكر معين specific sugar من خـــارج إلى داخل الغشاء السيتوبلازم ، حيث يتم فسفرته بواسطة بروتين متخصص لسكر ثان a second sugar-specific protein وإنزيم III (EIII) ويوجد فى الســيتوبلازم . النوعان الآخران من البروتين ، إنزيم I(EI) وبروتين HPr (بروتين يحتـــوى علـــى هستدين ، مقاوم للحرارة ومنخفض الوزن الجزئى) ، عبارة عن بروتنيات غـــير متخصصة فى السيتوبلازم ، وتشتركان فى انتقال بقايا الفوسفات مـــن PEP إلى EIII . نتيجة لهذه التفاعلات ، يتراكم لاكتوز فوســـفات lactose phosphate داخل الخلية ، حيث يتحلل إلى جلوكوز وجلاكتوز -٦- فوسفات بواسطة أنزيم phospho-β-galactosidase (pβ-gal). يتحول الجلوكوز إلى جلاكتـــوز -٦- فوسفات بواسطة انزيم glucokinase (بأستخدام ATP كمصدر للفوســـفات) أو بواسطة مكون الغشاء (EII) لنظام PEP-PTS المتخصص فى انتقال الجلوكـــوز ، الفركتوز والمانوز (ويعـــرف بـــEII mannose) . يوجـــد PEP-PTS فى Lactococci ولكن يوجد أحياناً فى بكتريا أخرى من LAB .

النظام الثانى لأنتقال السكريات إلى داخل خلايا بكتريا بادئـــات الألبـــان يتضمن بروتينات سيتوبلازمية cytoplasmic proteins (permeases) التى تقـــوم بنقل سكريات معينة إلى سيتوبلازم الخلية بدون حدوث تغيرات كيماوية (جـــدول

١-٣) . يتحلل اللاكتوز بواسطة β-galactosidase (β-gal) إلى جلوكوز وجلاكتوز ، حيث يتم فسفرة كل منهما بعد ذلك وتمثيلها باتباع مسار Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ومسار Leloir ، على الترتيب .



شكل (١-١) :رسم تخطيطي لنظام PEP-PTS لانتقال السكر فى Lactococci .

EI : إنزيم I EII : إنزيم II EIII : إنزيم III

HPr : بروتين مقاوم للحرارة وحامل للفوسفات

ويوجد نظام lactose permease فى معظم بكتريا بادئات الألبان ، ما عدا Lactococci ، ومماثل للنظام الموجود فى *E.coli* . عندما تنمو *Str.thermophilus* ، *Lb.delbrueckii* ssp. *lactis, Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* فى وجود اللاكتوز ، فإن هذه البكتريا تفرز شق الجلاكتوز من جزئى اللاكتوز بدرجة تتناسب مع كمية اللاكتوز المستهلكة ، ومعظم السلالات تكون (Gal^-) ، أى غير قادرة على استهلاك الجلاكتوز (جدول ١-٣).

يتم تحلل اللاكتوز إلى جلوكوز وجلاكتوز فى بكتريا بادئات الألبان بواسطة β-gal مماثل للموجود فى *E.coli* . يتحول الجلوكوز إلى جلوكوز -٦- فوسفات بواسطة glucokinase ، وفى البكتريا التى تقوم بتمثيل الجلاكتوز بدلاً من إفرازه ، فإنه من المحتمل أن يتحول الجلاكتوز أيضاً إلى جلوكوز-٦-فوسفات من خلال مسار Leloir.

وعموماً ، فإن بكتريا بادئات الألبان تمثل اللاكتوز عن طريق PEP-PTS pβ-gal, (جدول ١-٣) ، بالرغم من أن بعض السلالات المماثلة والمعزولة من بيئات غير لبنية تستخدم أساساً β-gal, lactose permease . عدد قليل من السلالات تستخدم كلا النظامين ، ولكن يعتقد بصفة عامة أن نظام lactose- PTS هو النظام السائد فى هذه السلالات التى تنتج حامض بأستثناء Lactococci ، فإن بكتريا بادئات الألبان الأخرى *Str.thermophilus* ، Leuconostocs ، Lactobacilli ، Bifidobacteria تمثل اللاكتوز عن طريق β-gal, lactose permease (جدول ١-٣) وقد وجد أن β-gal هو الأنزيم الأساسى أو الوحيد المحلل للاكتوز ، مما يدل على أن اللاكتوز ينتقل بواسطة permease فى هذه البكتريا . وقد أكدت الدراسات على وجود lactose permease وعدم وجود lactose-PTS فقط فى *Str.thermophilus* . *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus,*

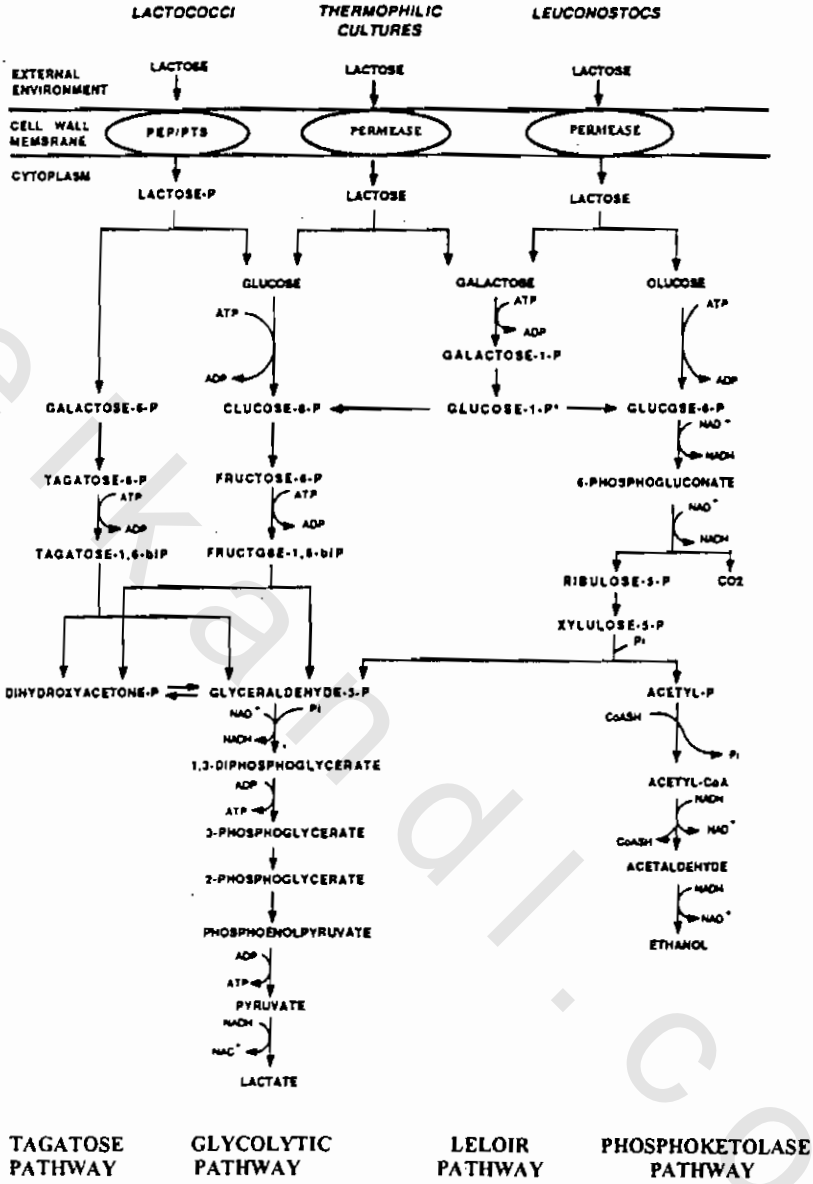
وقد أشار البعض إلى أن نظام الانتقال pβ-gal, PTS ضرورى لتخمر اللاكتوز بمعدل سريع ، حيث وجد أن سلالات البادئ التى تخمر اللاكتوز بمعدل سريع تحتوى على pβ-gal بمستوى مرتفع ولا يوجد بها β-gal ، بينما السلالات التى تخمر اللاكتوز ببطء تحتوى على مستويات مرتفعة من β-gal ، ومستويات منخفضة من pβ-gal . وقد وجد أن *Lc.lactis* ssp. *lactis* ATCC 7962 تنقل اللاكتوز بواسطة PTS ولا تحتوى على نشاط pβ-gal وتنمو ببطء فى اللبن ، وعلى العكس من ذلك فإن *Str.thermophilus* لا يوجد بها PTS ولا pβ-gal وتخمر اللاكتوز بمعدل سريع.

٥-١-٣- تحويل السكريات الأحادية Hexose إلى Triose phosphate ونواتج وسطية أخرى

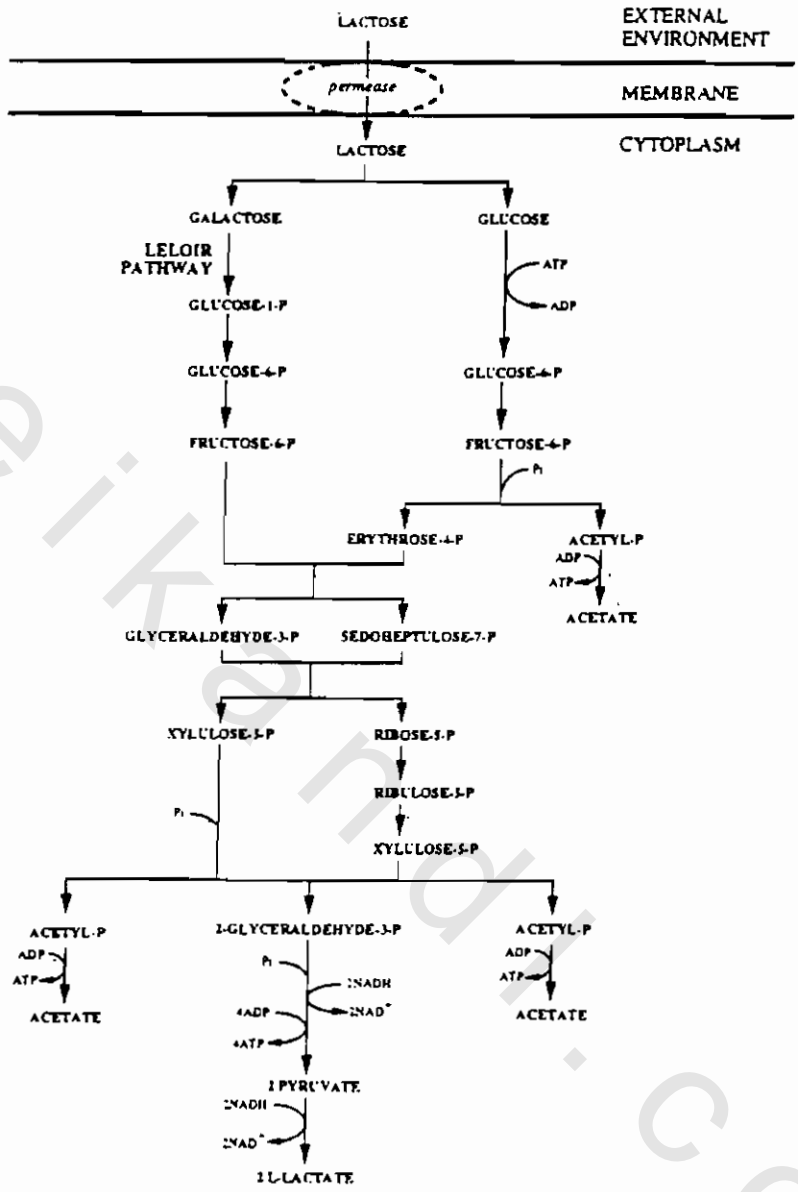
يتحول اللاكتوز إلى جلوكوز وجلاكتوز -٦- فوسفات (مسار PTS) أو جلوكوز وجلاكتوز (مسار permease) بواسطة بكتريا بادئات الألبان . يتحول الجلوكوز دائماً إلى جلوكوز -٦- فوسفات (G6P) بواسطة glucokinase باستخدام ATP ولكن قد يستخدم أيضاً EII mannose ، حيث يكون PEP

مصدراً للفوسفات . يتحول G6P إلى triose phosphate ونواتج وسطية أخرى بواسطة واحد من ٣ تفاعلات متتابعة طبقاً لنوع بكتريا البادئ (جدول ١-٣) .

التفاعل الأول جزء من مسار من EMP (شكل ١-٢) حيث يتم تمثيل G6P إلى dihydroxyacetone phosphate, glyceraldehyde-3-phosphate عن طريق fructose-1,6 diphosohate, fructose-6-phosphate (FDP) . يوجد هذا المسار فى *Lb.dulbrueckii* ، *Str.thermophilus*, Lactococci . التفاعل الثانى جزء من مسار phosphoketolase (heterolactate) ، والذى يوجد فى Leuconostocs الألبان ، حيث يتم تمثيل G6P إلى glyceraldehyde- 3- phophate ، CO_2, acetylphosphate عن طريق 6-phosphogluconate ، xylulose-5-phosphate, ribulose- 5-phosphate . يتحلل xylulose-5- phosphate بواسطة phosphoketolase معين إلى acetyl phosphate, glyceraldhyde-3-phosphate (شكل ١-٣) . يتحول acetyl phosphate إلى أيثانول ethanol ليتولد جزيئات NAD الذى يستخدم أساساً فى أكسدة G6P إلى pentose-5-phosphate . عندما يوجد مستقبل الكترون electron acceptor بديل ، مثل الأكسجين أو السترات لإنتاج NAD^+ من NADH ، فإن acetyl phosphate قد يتحول إلى خلات acetate مع إنتاج ATP. فى التفاعل الثالث والذى يتميز به Bifidobacteria حيث يتحول G6P إلى acetylphosphate, glyceraldehyde-3-phosphate دون فقد فى الكربون فى صورة CO_2 (شكل ١-٣) . يتم تمثيل جزئين من G6P عن طريق fructose-6-phosphate بواسطة fructose-6-phosphoketolase ، transaldolase ، transketolase ، pentose-5- phosphate -epimerase ، 5-phosphate-isomerase إلى جزئين من xylulose-5- phosphate وجزئى من acetyl phosphate. يتحلل xylulose-5- phosphate إلى glyceraldehyde-3- acetylphosphate, phosphate بواسطة xylulose-5-phosphate phosphoketolase . يتحول جزيئات acetylphosphate المتكونة بدون انتقال إلكترونات إلى NAD^+ إلى خلات acetate مع انطلاق ATP .



شكل (١-٢) : المسارات المختلفة لتمثيل اللاكتوز فى بادئات الألبان .



شكل (١-٣) : مسار تمثيل اللاكتوز فى **(Bifidus pathway) Bifidobacteria**

توجد فى بكتريا بادئات الألبان مساران لتخمر شق الجلاكتوز الناتج من اللاكتوز ، يعرف أحدهما بمسار Tagatose pathway ، ويعمل أساساً فى Lactococci الألبان ، حيث يتم تمثيل اللاكتوز عن طريق pβ- lactose PTS gal, بينما يعرف الثانى بمسار Leloir pathway ، الذى يوجد فى بكتريا بادئات الألبان التى تستخدم β-gal, lactose permease لتبدأ تخمر اللاكتوز .

مسار Tagatose مماثل لمسار EMP ، حيث يتحول fructose-6-phosphate إلى dihydroxyacetonephosphate, glyceraldehyde-3- phosphate، كما يتكون هذين المركبين أيضاً فى مسار Tagatose ، ولكن الإنزيمات المشاركة تكون متخصصة للنواتج الوسطية فى مسار Tagatose . كما يستخدم مسار Tagatose أيضاً فى تمثيل galactose-6-phosphte المتكون من خلال انتقال الجلاكتوز فى Lactococci بواسطة نظام galactose PTS .

المسار الثانى لتمثيل الجلاكتوز فى بكتريا بادئات الألبان هو مسار Leloir ، المسئول عن تحويل الجلاكتوز إلى G6P (شكل ١-٢) . يتم فسفرة الجلاكتوز بواسطة galactokinase باستخدام ATP ، وتحويله إلى galactose-1-phosphate الذى يتحول بعد ذلك إلى glucose-1-phosphate من خلال مشتقات galactose, UDP-glucose,UDP-uridine diphospho derivatives . تنتقل مجموعة الفوسفات فى glucose-1-phosphate من ذرة الكربون الأولى إلى ذرة الكربون السادسة فى تفاعل يتم بواسطة phosphoglucomutase .

٥-١-٤- تحويل Triose phosphate إلى بيروفات

سلسلة التفاعلات التى تتضمن ٥ إنزيمات لتحويل glyceraldehy-3-phosphate إلى بيروفات (شكل ١-٢) متشابه فى تخمرات السكريات الثلاثة فى LAB ، ويعتبر ذلك جزءاً من مسارات التخمر ، التى يتم فيها الاحتفاظ بالطاقة الناتجة من التمثيل التأكسدى oxidative metabolism فى صورة ATP ، الذى يعمل كوقود فى تخليق مكونات الخلايا . تبدأ سلسلة التفاعلات بتفاعل معقد بمساعدة أنزيم triosephosphate dehydrogenase المتضمن كل من أكسدة ألدهيد إلى حامض وتخليق رابطة فوسفات غنية بالطاقة an energy - rich

phosphate bond . الالكترونات (والبروتونات) المفقودة فى عملية الأكسدة تنتقل إلى NAD^+ . فى الخطوة التالية ، فإن نزع الفوسفات من 1,3 diphosphoglycerate تكون مرتبطة بفسفرة ADP وتحويله إلى ATP ، ويتبع ذلك مرحلتين تؤدى إلى تكوين PEP ، الذى يفقد الفوسفات ويتحول إلى بيروفات فى تفاعل مرتبط بتكوين ATP من ADP . بديلاً عن ذلك ، يستخدم PEP كمصدر رئيسي للفوسفات الغنى بالطاقة فى انتقال السكر فى أنظمة PTS.

٥-١-٥- تحويل البيروفات إلى لاكتات ونواتج نهائية أخرى.

تمثيل السكريات إلى بيروفات ينتج عنه عدم اتزان فى حالة الأكسدة - الإختزال فى الخلية الذى ينعكس على إتزان NAD^+/NADH. يحتاج تفاعل triose phosphate dehydrogenase إلى NAD^+ ، وقد ينتهى هذا التفاعل سريعاً ما لم يحدث إعادة أكسدة للـ NADH المتكون فى التفاعل . بكتريا البادئ تقوم أساساً بأنتاج NAD^+ باختزال البيروفات إلى لاكتات بواسطة lactate dehydrogenase (LDH) . قد توجد اللاكتات فى صورة D أو L ، حيث يوجد LDH متخصص لكل من هذه الصور فى بكتريا بادئات الألبان . بكتريا Lactococci ، Bifidobacteria, *Str.thermophilus* تنتج L-lactate، بينما Leuconostocs الألبان, *Lb.delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* تنتج D-lactate . تحتوى *Lb.helveticus* على كلا النوعين من LDH ولكن ينتج أساساً L-lactate (جدول ١-٣) . إنزيم LDH فى Lactococci الألبان ، بعض بكتريا حامض اللاكتيك العصوية المحبة للحرارة المعتدلة Bifidobacteria, mesophilic lactobacilli يحتاج FDP للتنشيط ويثبط بالفوسفات غير العضوية (Pi).

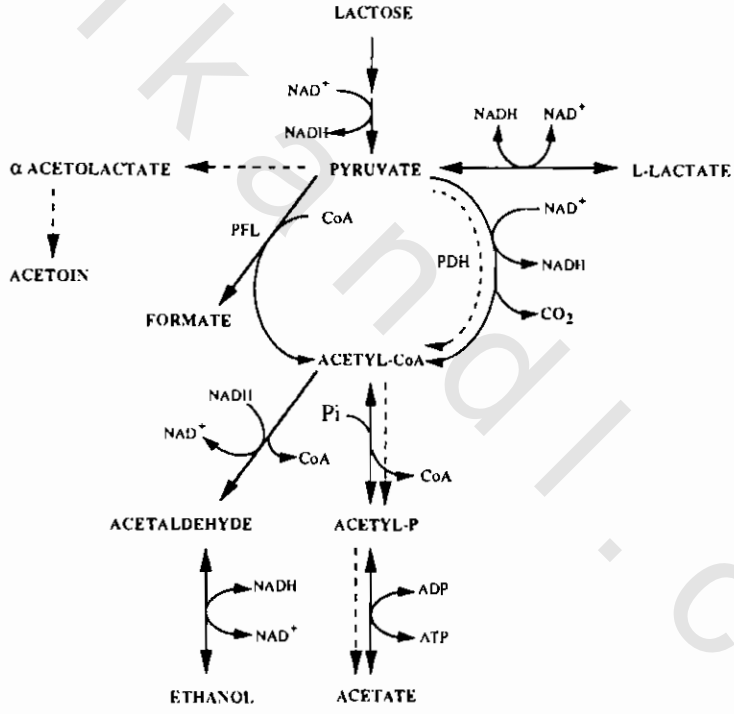
يعتبر اللاكتات الناتج الرئيسى المتكون من البيروفات بواسطة Lactococci فى تخمرات اللبن ومنتجاته (مثل جبن التشدر) حيث يكون تركيز البيئة (اللاكتوز) بصفة عامة مرتفعاً . كما يعتبر ذلك صحيحاً فى التخمرات التى تتضمن تركيزات مرتفعة من الجلوكوز . بالنسبة لكل من السكرين (اللاكتوز والجلوكوز) قد يتكون آثار من نواتج نهائية أخرى فى بعض الأحيان، مثل الفورمات، الخلات، الأيثانول (صفات التخمر المختلط فى *E.coli*) والأسيتيون actoin. ومع ذلك ،

عندما تنمو معظم Lactococci فى تركيزات مرتفعة من الجلاكتوز أو تركيزات منخفضة جداً من الجلوكوز أو اللاكتوز ، فإن هذه النواتج النهائية تمثل نسبة كبيرة من الكمية الكلية للنواتج النهائية للتخمر . ويرجع السبب فى ذلك إلى أن المسارات توجد فى Lactococci لتكوين نواتج نهائية غير اللاكتات ، ولكن انسياب نواتج التمثيل metobolites خلال هذه المسارات تكون غير محسوسة خلال التخمر الطبيعى للجلوكوز أو اللاكتوز .

الخطوة الأولى فى السلسلة البديلة لتمثيل البيروفات (شكل ٩-٤) ، هو تحويل البيروفات إلى acetyl CoA (Ac CoA) ، ويتم ذلك بواسطة أنزيم حساس للأكسجين oxygen-sensitive enzyme وهو pyruvate formate lyase (PFL)، الذى ينتج الفورمات و AcCoA ، أو بواسطة تفاعل pyruvate dehydrogenase (PDH) حيث يتكون CO_2, Ac CoA ويختزل NAD^+ إلى NADH. قد يتحول AcCoA إلى خلات عن طريق تكوين acetyl phosphate لتوليد ATP إضافية أو إلى أيثانول عن طريق تكوين acetaldehyde لتعديل عدم التوازن بين NAD^+/NADH الناتج مبكراً فى triose phosphate dehydrogenase ، لذلك قد يتراكم الفورمات والأيثانول و/أو الخلات كنواتج نهائية ، على عكس ما يحدث فى التخمر المختلط للـLactococci.

عادة تعتبر مسارات التخمر مسارات لاهوائية anaerobic ، حيث يتم إنتاج ATP فى غياب كامل للأكسجين . بكتريا بادئات الألبان ، ، باستثناء معظم Bifidobacteria ، (شحيحة الاحتياجات الهوائية) ، حيث تستطيع هذه البكتريا بصفة عامة التغلب على مشاكل السمية الناتجة من الأكسجين أو نواتج تمثيل الأكسجين مثل فوق أكسيد الأيدروجين (H_2O_2) أو superoxide . عادة يختزل الأكسجين إلى ماء فى هذه البكتريا بأحد الأسلوبين التاليتين : فى الأسلوب الأول ، يقوم فلافوبروتين واحد NADH oxidase بالعمل على تسهيل انتقال ٤ إلكترونات إلى الأكسجين مكوناً ماء ، بينما فى الأسلوب الثانى يستخدم نوعان من الفلافوبروتين ، NADH oxidase الذى يساعد على انتقال ٢ إلكترون مكوناً H_2O_2 و NADH per-oxidase ، الذى يعمل على اختزال H_2O_2 إلى ماء. من ذلك يتضح أن هذين الأسلوبين يساعدان على إزالة التأثير السام للأكسجين

والنواتج الوسيطة الناتجة من تمثيله ، كما أنـــها تؤثر أيضاً على سلوك تخمر السكر تحت ظروف هوائية ، حيث تسمح للأكسجين للعمل كمستقبل للالكترونـــات وتوفير ميكانيكية بديلة لتوليد NAD^+ من NADH ، ويمكـــن ملاحظـــة ذلـــك بوضوح فى تخمرات phosphoketolase بواسطة Leuconostocs الألبان ، حيث يتم تمثيل acetylphosphate الغنى بالطاقة إلى إيثانول عن طريـــق الأســيتالدهيد لتصحيح عدم إتزان NAD^+ الناتج من تكوين pentose phophates مـــن G6P (شكل ١-٢) . تحت الظروف الهوائية يقوم NADH بإنتاج NAD^+ باســـتخدام الأكسجين كمستقبل خارجى للإلكترونات ، كما يقوم acetate kinase بتحويل acetylphosphate إلى خلات acetate ويكون ذلك مرتبطاً بتكوين ATP .



شكل (١-٤) :المسارات البديلة لتمثيل البيروفات فى **Lactococci** .

⟵ : ظروف لاهوائية. ......➤ : ظروف هوائية .

PDH : Pyruvate dehydrogenase, PFL : Pyruvate formate lyase

هذا التفاعل يؤدى إلى مضاعفة ATP الناتج من مسلو phosphoketolase ، وبالتالى فإن معدلات نمو ومحصول خلايا Leuconostocs الألبان تصل إلى الضعف عندما تنمو هوائياً مقارنة بالتخمرات اللاهوائية . التمثيل اللاهوائى للسترات بواسطة *Leuconostoc* spp. يحدث تغيرات مماثلة.

النمو تحت ظروف هوائية يؤثر أيضاً على النواتج النهائية لتخمرات السكر بواسطة Lactococci ، ولكن فقط تحت الظروف التى تسمح بتحويل البيروفات إلى نواتج نهائية أخرى غير اللاكتات (شكل ١-٤) . فى غياب الأكسجين ، تتكون الفورمات عن طريق PFL ، ولكن نظراً لأنه حساس جداً للأكسجين ، فإن الفورمات لا تتكون من البيروفات فى وجود الأكسجين ، عوضاً عن ذلك تتحول البيروفات إلى CO_2 بواسطة PDH ، حيث يتكون NADH من NAD^+ . ونظراً لتوفر الأكسجين و NADH oxidase ، فإنه ليس من الضرورى تحويل Ac CoA إلى إيثانول لإعادة أكسدة NDH ، وبالتالى فإن جميع Ac CoA يتحول إلى خلات عن طريق acetyl phosphate مع توليد كمية إضافية من ATP . كما أن بعض Lactococci يمكن أن تكون كميات كبيرة من الأسيتيون acetoin تحت هذه الظروف إذا فقد حامض الليبويك lipolic acid ، وهو عامل مساعد cofactor ضرورى للـPDH ، وفى هذه الحالة تتحول البيروفات إلى α-aceto lactatc ، الذى يفقد مجموعة الكربوكسيل ويتحول إلى أسيتيون acetoin (شكل ١-٤) .

٥-١-٦- إفراز النواتج النهائية للتخمر

النواتج النهائية لتخمر السكر بواسطة بكتريا بادئات الألبان تكون أساساً حامضية ، وتميل إلى زيادة حموضة سيتوبلازم الخلية . بكتريا بادئات الألبان تحتوى على أليات mechanisms التى تفرز بروتونات من الخلايا ، وذلك للتغلب على هذا الأنخفاض فى pH . أحد هذه الأليات الانتقال الرجعى خلال الغشاء $F_o F_1$ - ATPase (transmembrane reversible) ، حيث يتميز بوظيفة فسيولوجية أساسية فى تخمرات البكتريا تتركز فى انتقال البرتونات إلى خارج الخلية وتحتاج هذه الآلية إلى وجود توازن فى البرتونات بالإضافة إلى المحافظة على ثبات

pH داخل الخلية . وقد تم التعرف على دور $F_0 F_1$ – ATPase فى ثبات pH فى Enterococci ، كما تدل النتائج المتاحة عن أهمية دور هذه الآلية فى بكتريا Lactococci .

فى الآلية الثانية يكون إفراز أنيونات اللاكتات مصحوباً بإفراز بروتونات فى نفس الوقت . نفاذية غشاء الخلية لأنيونات اللاكتات تكون ضعيفة نسبياً ، وأفراز هذه الأنيونات يحتاج إلى بروتين ناقل protein carrier . عندما يكون تركيز اللاكتات الخارجى منخفضاً (حوالى ١٠ ملليمول) فإن التركيز المرتفع داخل الخلية المتكونة نتيجة تخمر السكر يكون مصدراً كامناً للطاقة . فى بعض Lactococci ، تنتقل أنيونات اللاكتات والبروتونات إلى خارج الخلية بواسطة حامل ناقل عبر غشاء الخلية . تساعد هذه الآلية فى المحافظة على ثبات pH . تدفق البرتونات (H^+) وأنيونات اللاكتات عبر غشاء الخلية يؤدى إلى توليد فرق جهد Δp ويقل أهمية هذا المصدر من الطاقة عندما يرتفع تركيز اللاكتات الخارجى ، حيث أن ذلك يعتمد على الفرق بين تركيز اللاكتات داخل وخارج الخلية.

وتتكون Δp من مكونين ، جهد كهربائى ($\Delta\psi$) electrical potential (ويكون سالباً داخل الخلية وموجباً خارج الخلية) ، اختلاف pH (ΔpH) يكون قلوياً داخل الخلية وحامضياً خارج الخلية) ويرتبط هذين المكونين بالمعادلة التالية :

$$\Delta pi = \Delta\psi + Z\,\Delta pH$$

حيث تكون $\Delta\psi$ الجهد الناتج نتيجة الانتقال خلال الغشاء

ΔpH = الفرق بين pH الخارجى والداخلى

Z = 2.303 RT/F

حيث أن R = ثابت الغاز gas constant

T = درجة الحرارة المطلقة absolute temperature

F = ثابت فرادى Faraday constant

أى أن Z = ٧٥٩ mv عند ٢٥°م

كما أن Δp تساعد Lactococci على نقل الأحماض الأمينية والببتيدات اللازمة لعملية النمو.

٥-٢- تمثيل حامض الستريك Citric acid metabolism

محتوى اللبن من السترات منخفض (حوالى ٨ ملليمول) ويختلف لحد ما خلال فصل الحليب ، ومع ذلك فإن تمثيل السترات تعتبر صفة هامة لبعض البادئات المحبة للحرارة المعتدلة ، حيث أن البادئات المحبة للحرارة المرتفعة thermophilic culture لا تخمر السترات . تشمل البكتريا التى تخمر السترات : *Leuconostoc* spp., Cit^+ *Lc.lactic* ssp. *lactis* ، ويطلق عليها أسماء مختلفة مثل منتجات الطعم flavor producers ، منتجهات النكهة aroma producer ، مستهلكات السترات citrate utilizers ومخمرات السترات citrate fermenters، وتمثل نسبة صغيرة تتراوح بين ١-١٠ % فى البادئات المختلطة السلالة .

تتكون نواتج تمثيل السترات من الخلات ، ثنائى الأسيتيل ، أسيتيون CO_2, 2,3 butanediol, acetoin. يعتبر مركب ثنائى الأسيتيل من مكونات الطعم الهامة فى لبن الخض المتخمر cultured butter milk ، زبد القشدة المتخمرة ripened cream butter ، القشدة الحامضية sour cream ، جبن القريش وجبن الكوارج Quarg . كما أنه يساهم فى تكوين طعم جبن التشدر وذلك بإنتاج methanethiol ، dimethyl sulfide, hydrogen sulphide . كما تلعب الخلات دوراً فى طعم أنواع الجبن الهولندية ويعتبر CO_2 مسئولاً عن تكوين العيون فى هذه الجبن ، ولا يساهم الأسيتيون butanediol, acetoin فى الطعم حيث أن هذه المكونات عديمة المذاق tasteless . إنتاج CO_2 بكميات زائدة من السترات قد تسبب طفو خثرة جبن Cottage فى حوض التصنيع ، والتركيب المفتوح open texture فى جبن التشدر ، وبالرغم من ذلك فإن مزارع مختلطة السلالة DL ما زالت تستخدم على نطاق واسع فى إنتاج هذين النوعين من الجبن.

٥-٢-١- انتقال السترات Citrate transport

لم يتم دراسة انتقال السترات فى بادئات LAB على أى مستوى ، ومع ذلك فإن معظم البكتريا تستخدم نظام Δp الذى يتضمن الكاتيونات أحادية التكافؤ . تنتقل السترات بواسطة بروتين مرتبط بالغشاء a membrane-associated protein تعرف بالـ citrate permease (CitP) .

٥-٢-٢- تمثيل السترات Citrate metabolism

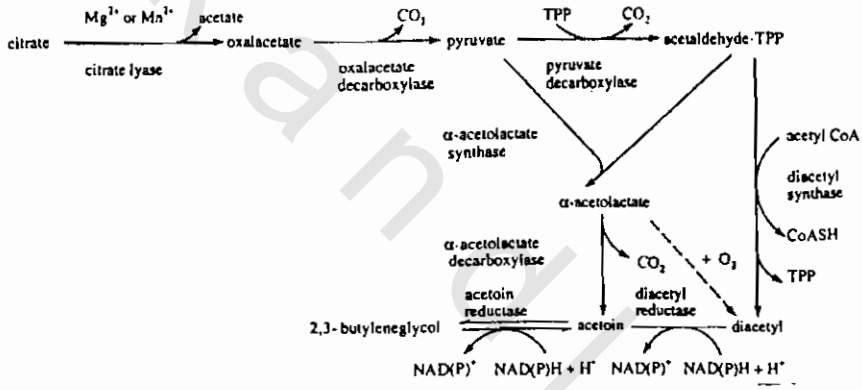
عادة لا تستخدم LAB السترات كمصدر وحيد للطاقة ، لذلك فإن هذه البكتريا التى تمثل السترات يجب ألا يطلق عليها مخمرات للسترات citrate ferm enters. ومع ذلك ، فإن تخمر السترات مع سكر قابل للتخمر ، خاصة بواسطة *Leuconostoc* spp. ، يؤدى إلى تنشيط معدلات النمو بدرجة كبيرة تفوق تلك المعدلات مع السكر بمفرده ، مما يدل على أن جزء من الطاقة تتولد من السترات . تدل النتائج الحديثة على أن Cit^+ *Lc.lactis* ssp. *lactis* تستخدم السترات كمصدر للطاقة تحت ظروف محددة ، مثل محدودية اللاكتوز عند pH ٥,٧ . معدلات النمو تكون منخفضة بدرجة كبيرة وتصل إلى الحدود المثلى عند pH ٥,٧ ، ولا يحدث نمو عند pH أعلى من ٦,٣ أو أقل من ٥,٤ .

يتم تمثيل السترات بدرجة سريعة فى وجود سكريات قابلة للتخمر إلى خلات ، ثنائى الأسيتيل ، أسيتيون acetion ، butanediol, CO_2 بأتباع المسار الموضح فى شكل (١-٥) . تتحلل السترات داخل الخلية بواسطة citrate lyase (CL) إلى خلات و oxalacetate ، الذى يفقد مجموعة الكربوكسيل ويتحول إلى بيروفات pyruvate, CO_2 . كما أن البيروفات تفقد مجموعة الكربوكسيل ويتحول إلى acetaldehyde-TPP ، الذى يتحد مع جزئى آخر من البيروفات ليكون (α-acetolactate (AL ، الذى بدوره يفقد مجموعة الكربوكسيل بواسطة acetolactate decarboxylase (ALD) ويتحول إلى أسيتيون acetoin ، الذى يمكن أن يختزل إلى butanediol من خلال تأثير butanediol dehydrogenase وقد أقترح أن acetadehyde-TPP يتفاعل مع AcCoA ليكون diacetyl مباشرة. ويعتقد أن أنزيم diacetyl synthase (DS) هو المسئول عن هذا التفاعل ، لكن DS لا يوجد فى LAB .

تمثل diacetyl ، butanediol, acetion ثلاث مراحل أكسدة مختلفة لمركب يحتوى على ٤ ذرات كربون . يمكن أن يختزل ثنائى الأسيتيل diacety إلى أسيتيون acetoin بواسطة acetoin dehydrogenase (يطلق عليه أيضاً diacetyl reductase) والأسيتيون إلى butanediol بواسطة butanedoil dehydrogenase (يطلق عليه أيضاً acetoin reductase) . يعتبر NADH العامل المساعد فى Cit^+

Lc.lactis ssp. *lactis* و NADH فى *Leuconostoc* spp. تم تنقيـــة acetion dehydrogenase من *Lc.lactis* ssp. *lactis* Cit^+ مع استخدام كل من الأسيتيون وثنائى الأسيتيل كبيئة تفاعل .

وقد وجد أن إختزال الأسيتيون acetoin إلى butanediol هـــو النشـــاط الأكثر أهمية فى الخلية ، وأن الأنزيم هو butandiol dehydrogenase أكثر منـــه acetion dehydrogenase. وقد يشترك إنزيم آخر فى إختزال ثنائى الأســـيتيل إلى أسيتيون actoin ، لكن ليس ذلك واضحاً تماماً. وجود السترات فى بيئـــة النمـــو يثبـــط جزئيـــاً تكويـــن butanediol dehydrogenase فى Cit^+ Lactococci *Leuconostoc* spp., . عندما تستهلك السترات ، فإن نشاط الأنزيم يزداد عـــدة أضعاف .



شكل (١–٥) : تمثيل السترات فى *Lc.lactis* biovar *diacetylactis* و *Leuconostoc* spp.,

جزئى AL غير ثابت ومن السهل أن يفقد مجموعة الكربوكســـيل تحـــت ظروف مؤكسدة ويتحول إلى أسيتيون acetoin ، ويتحول إلى ثنـــائى الأســـيتيل تحت ظروف مؤكسدة . نتيجة لذلك يعتقد بعض الباحثين أن ثنـــائى الأســـيتيل يتكون كيميائياً وليس إنزيمياً من AL وليس من خلال نشاط DS . ما زال هـــذا الاستنتاج لم يتم توضيحه بدرجة مرضية ، حيث أن هناك بعـــض الصعوبـــات

تساهم فى هذه المشكلة . فمثلاً ، لا يوجد نشاط DS فى LAB ، كما أن قياس ثنائى الأسيتيل ، الأسيتيون acetoin و AL غير مرتبطة ببعضها . جميع هذه المكونات تقدر عادة بطريقة Westerfeld ، التى تتضمن الكرياتين creatine و α-naphthol . يجب أن يفقد AL مجموعة الكربوكسيل قبل تقديره . وغالباً ما يحدث ذلك خلال عمليات التقدير ، وغالباً لا يتم التمييز بين ثنائى الأسيتيل أو الأسيتيون acetoin الذى يتكون من خلال النشاط الأيضى والذى يتكون من AL خلال عمليات التقدير.

تم تنقية عدة إنزيمات من مسار تمثيل السترات ، تشمل citrate lyase (CL) ، oxalacetate, butanediol dehydrogenase, AL synthase (ALS) decarboxylase, (OAD) . يحتاج CL مركب من Mg^{+2} أو Mn^{+2} مع السترات (١ : ١) كمادة تفاعل substrate . تنتقل السترات إلى داخل الخلايا بواسطة أنزيم permease ، ويتحلل إلى oxalacetate بواسطة CL . يتكون هذا الأنزيم (CL) فى خلايا Cit^{+} Lactococci ويمكن حثه فى *Leuconostoc* spp. حيث يحتاج إلى عملية acelylation بواسطة أنزيم آخر (citrate lyase ligase) لتنشيطه:

Dacetyl citrate lyase + ATP + acetate ⟶ S-acetyl-citrate lyase + AMP+ PPi

(Inactive enzyme) (Active enzyme)

درجة pH المثلى لأنزيم CL حوالى ٧,٢ ، بينما تكون ٦,٤ لأنزيم butanedoil dehydrogenase ويكون نشطاً فى نطاق pH ٥,٠ إلى ٨,٣ ، ويستخدم كل من ثنائى الأسيتيل والأسيتيون acetoin كمادة تفاعل substrate . يتكون أنزيم OAD من ٣ وحدات ذات أوزان جزيئية ٥٢ ، ٣٤ ,١٢ kDa. الوزن الجزيئى للأنزيم ٣٠٠ kDa ، ويحتاج Mg^{+2} لنشاطه .

٥-٢-٣- إنتاج الأسيتيون ، ثنائى الأسيتيل وحامض اللاكتيك فى اللبن

البادئات المختلطة من أنواع D (*diacetylactis*) ، DL (*diacetylactis/Leuconostoc*) L, (*Leuconostoc*) ومزارع نقية من Cit^{+} Lactococci تنتج بدرجات متفاوتة كميات أكبر من الأسيتيون عن ثنائى الأسيتيل من السترات أثناء النمو. وعلى العكس من ذلك ، فإن المزارع النقية من

Leuconostoc spp. بصفة عامة لا تنتج ثنائى الأسيتيل أو الأسيتيون . كما تختلف كميات الأسيتيون الناتجة ، فمثلاً مزارع DL,D تنتج حوالى ٣ ملليمول أسيتيون/ لتر من اللبن ومزارع L تنتج حوالى ١ ملليمول /لتر من اللبن ، هذه المزارع عموماً تنتج كميات مماثلة من ثنائى الأسيتيل ، حوالى ٠,٠٥ ملليمول/اللتر.

يطلق على مزارع D ، 4/25 وتستخدم فى إنتاج الزبد من قشدة متخمرة، وتختلف عن مزارع D الأخرى فى إنتاج AL وكميات أكبر من الأسيتيون (حوالى ٤ ملليمول/لتر) وثنائى الأسيتيل (حوالى ٠,٢ ملليمول/لتر). يرجع سبب إنتاج AL إلى أن سلالة Cit^+ الموجودة فى هذه المزرعة مختلفة عن Cit^+ Lactococci أخرى الخالية من نشاط ALD . نتيجة لذلك يتراكم AL ، ونظراً لأن AL غير ثابت ، فإنه يتحول كيماوياً إلى أسيتيون وثنائى الأسيتيل .

وهناك نتائج متعارضة بالنسبة لإنتاج AL بواسطة المزارع ، وقد وجد أن Cit^+ Lactococci عموماً لا تنتج AL ، لكن بعض الباحثين أشار إلى إنتاج كميات ضئيلة (أقل من ١ ملليمول) ، قد يرجع هذا التباين نتيجة الاختلاف فى تركيز السترات المستخدمة فى هاتين الدراستين . استخدمت الدراسة الأولى لبن يحتوى على حوالى ٨ ملليمول سترات ، بينما الدراسة الثانية استخدمت لبن أضيف إليه كميات إضافية من السترات (٢٠ ملليمول) بعد النمو . فى كلا الدراستين فإن Cit^+ Lactococci المعزولة من مزرعة مختلطة 4/25 تنتج كميات كبيرة من AL نظراً لأنها خالية من نشاط ALD . وقد أوضحت بعض الدراسات الحديثة أن مزرعة واحدة فقط من ٧ مزارع مختلطة تم اختيارها لإنتاج AL . هذه المزرعة كانت مزرعة 4/25 وأن الكمية القصوى المنتجة كانت حوالى ١ ملليمول /لتر.

تكوين ثنائى الأسيتيل ، الأسيتيون ,AL ، عندما يحدث ، يكون لوغاريتمياً exponential ويصل إلى الحد الأقصى عند نقطة يتم عندها تمثيل جميع السترات . تمثيل السترات يتم بدرجة أسرع فى مزارع DL,D عنه فى مزارع L ، ويرجع ذلك إلى أنواع وأعداد بكتريا Cit^+ الموجودة ومعدلات نموها النسبية . تنمو *Leuconostoc* spp. عموماً بمعدل أبطأ وتنقل سترات أقل عن Cit^+ Lactococci،

لذلك فإن معدل تمثيل السترات بواسطة *Leuconostoc* spp. يكون أبطأ . يثبط السترات تكوين acetoin dehydrogenase ، والانخفاض فى مستويات ثنائى الأسيتيل الذى يحدث بعد استهلاك السترات يعزى إلىالزيادة فى تكوين هذا الأنزيم . هذا الأنخفاض يكون له تطبيقات تجارية هامة . المنتجات الطازجة (غير المسواه) مثل جبن الكوارج Quarg ولبن الخض المتخمر وغيرها يجب أن تحفظ تحت درجات حرارة منخفضة بأسرع ما يمكن بعد أن يتم تمثيل السترات ، وذلك لإيقاف الزيادة فى تكوين butanediol dehydrogenase والانخفاض المترتب على ذلك فى ثنائى الاسيتيل وفقد الطعم . يمكن أن يحدث فقد فى الطعم نتيجة للتلوث ونمو البكتريا المسببة للفساد spoilage bacteria (مثل *Enterobacter aerogenes, Pseudomonas fluorescens*) التى تحتوى أيضاً على نشاط acetoin dehydrogenase.

هناك نقص فى نتائج إنتاج butanediol بواسطة المزراع . قبل استخدام gas chromatography (GC) فى تقدير هذا المكون ، كان يتم أكسدة هذا المكون إلى ثنائى الأسيتيل وأسيتيون عند إجراء التقدير ، مما يؤدى إلى فقد فى butanediol وتداخل ثنائى الأسيتيل والأسيتيون الموجودة فى المزارع فى عملية التقدير . يمكن تقدير هذه المكونات الثلاثة بصورة منفصلة بواسطة GLC . وقد سجلت مستويات مرتفعة من butanediol (٨٠-١٨٠ ميكروجرام/مل) عند نهاية مرحلة نمو بعض المزارع النقية من Cit^+ *Lc.lactis* ssp. *lactis* . ويدل ذلك على نشاط butanediol dehydrogenase فى هذه المزارع ، حيث توجد علاقة عكسية بين مستويات الأسيتيون و butanediol .

الخلات أيضاً من نواتج تمثيل السترات فى بادئات LAB . إنتاج الخلات متماثل فى جميع أنواع المزارع ويقف إنتاجه ، مثل الأسيتيون وثنائى الأسيتيل وAL ، عندما يتم استهلاك جميع السترات . وقد دلت نتائج بعض البحوث أن العلاقة بين إنتاج الخلات وأستهلاك السترات علاقة خطية linear وأن كمية الخلات الناتجة كانت حوالى ٠,٦ مول لكل مول من السترات المستخدمة . وهذه الكمية أقل بكثير من الكمية المتوقعة النظرية ، مول واحد من الخلات لكل مول من السترات ، وقد يرجع هذا الأختلاف إلى أن بعض الخلات قد تستخدم

بواسطة Lactococci Cit^- الذى ، يكون عادة حوالى ٩٠ – ٩٩ % من البكتريا الموجودة فى المزارع المختلطة .

إنتاج اللاكتات من اللاكتوز يكون لوغايتمياً exponentially وخاصة بواسطة بكتريا Cit^- فى هذه المزارع ، ويصل إلى الحد الأقصى الذى يبلغ ١٠٠ ملليمول /لتر.

نواتج تمثيل السترات والسكر بواسطة مزارع نقية من *Lc.lactis* Cit^+ مماثلة للنواتج المتكونة بواسطة مزارع L,DL . على العكس من ذلك ، فإنه لا يتكون ثنائى الأسيتيل ، الأسيتيون أو butanediol من تمثيل السترات والسكر بواسطة مزارع نقية من *Leuconostoc* spp. ، وبدلاً من ذلك فإنها تكون لاكتات وخلات بكميات أكبر عن المتوقع تكوينها من السكر والسترات كيميائياً (مول لاكتات/ مول سكر أحادى hexose ومول من الخلات / مول من السترات ، مع عدم تكوين إيثانول) . بالإضافة إلى ذلك ، فإن الميكروبات تنمو بدرجة أسرع على السترات مع السكر عن السكر بمفرده. ويمكن شرح هذه النتائج على النحو التالى : فى *Leuconostoc* spp. النامية على السكر يتكون اللاكتات والأيثانول لتوليد NAD^+ لكى تستمر عملية التخمر . وعندما تنمو الميكروبات على السكر والسترات ، فإن البيروفات المتكونة من كل من السترات والسكر تستخدم لإعادة أكسدة NADH ، وهذا يعلل الكميات الزائدة المتكونة من اللاكتات . توليد NAD^+ من NADH عن طريق الإسيتالدهيد وإنزيمات alcohol dehydrogenases تكون غير ضرورية ، وهذا يعلل عدم إنتاج الأيثانول. وبديلاً عن ذلك فإن acetyl phosphate (الناتج من تمثيل السكر) يتحول إلى خلات مع إنتاج ATP ، وهذا يفسر زيادة معدل نمو الخلايا . عندما يستهلك جميع السترات فإن معدل النمو وإنتاج اللاكتات ينخفض إلى معدلات النمو على السكر بمفرده ، ويبدأ إنتاج الأيثانول . وقد تم الحصول على هذه النتائج تحت ظروف نمو عادية ، أى تركيز زائد من السكر وتركيز محدود من السترات .

فى وجود تركيز زائد من السترات وتركيز محدود من السكر ، تحدث زيادة فى كميات اللاكتات والخلات الناتجة ، لكن عندما يستهلك جميع كمية السكر

فإن ذلك يؤدى إلى إنتاج AL ، أسيتيون وكميات قليلة من ثنائى الأسيتيل . بعض السلالات قد تكوّن هذه المكونات عند وجود كميات قليلة من السكر ، مما يدل على وجود الإنزيمات الضرورية لإنتاج هذه المكونات فى الخلايا ولكن فى صورة غير نشطة . تنمو هذه البكتريا ببطء فى المزارع المختلطة ، وبالتالى فإن تمثيل السترات يكون بطيئاً ، وتوجد كميات كافية منه فى اللبن عند pH منخفض لتعمل كبيئة تفاعل substrate . قد توجد كميات زائدة من اللاكتوز تحت هذه الظروف ، ومن المحتمل أن يستهلك قليل من اللاكتوز عند pH منخفض ، وهذا يحتاج إلى مزيد من الدراسة والبحث.

٥-٢-٤- تأثير pH

يؤثر pH على امتصاص وتمثيل السترات .فى Cit^+ Lactococci, *Leuconostoc* يبدأ الامتصاص بدرجة واضحة عند pH حوالى ٦,٠ ويستمر فى الزيادة ، إلى أن ينخفض pH إلى ٤,٥ ، وهو أقل قيمة pH تم دراستها. عموماً يعتقد أن *Leuconostoc* spp. ينتج فقط ثنائى الأسيتيل والأسيتيون عند pH أقل من ٥,٠ ، مما يدل على أن السترات يتم تمثيله فقط بدرجة واضحة عند pH ٥,٠. تدل بعض نتائج البحوث الحديثة أن امتصاص السترات بواسطة *Leuc.lactis* يصل إلى أقصاه عند pH ٥,٤ ، لكن إنتاج الأسيتيون كنتيجة لكمية السترات التى تم تمثيلها يستمر فى الزيادة كلما أنخفض pH .

قد يلعب pH الداخلى (pH_{in}) دوراً هاماً فى هذا الصدد . فى معظم البكتريا المخمرة ، يحث توازن فى H^+ داخل وخارج الخلية ، حيث يكون pH داخل الخلية أكثر قلوية ، على الأقل عند قيم pH أقل من ٧,٥ ، ويكون ذلك جزءاً من نظام Δp لأنتقال بيئة التفاعل . لا تستثنى LAB من ذلك ، ولكن بعض هذه البكتريا ، مثل Enterococci, Loctococci ، تكون قيم pH_{in} مرتفعة نسبياً عند قيم pH الخارجى ($pH_{ex.}$) ، بينما فى أنواع أخرى من LAB مثل Lactobacilli ، Leuconostocs تحافظ على قيم pH_{in} أقل عن $pH_{ex.}$ ، قيم pH_{in} تؤثر حتمياً على النشاط الأنزيمى . قيم ثابت ميكاليس Km و السرعة القصوى Vmax لأنزيم LDH ، الأنزيم الرئيسى فى تمثيل البيروفات فى *Leuconostoc* spp.

، تنخفض بإنخفاض pH ، وهذا يعنى أن الأنزيم يكون أقل نشاطاً عند قيم pH_{in} أكثر انخفاضاً ، الذى يسمح باستخدام البيروفات كبيئة تفاعل لإنزيمات أخرى ، مثل ALS ، ويؤدى إلى تكوين AL والأسيتيون . قيم Km للـ ALS فى Lactococci و *Leuconostoc* spp. هى ٥٠ و ١٠ ملليمول ، على الترتيب ، ويصبح نشطاً فقط تحت ظروف يتوفر فيها مستويات مرتفعة من البيروفات نتيجة تخمر السترات والسكر معاً . وهذا يساند وجهة النظر التى تعتبر إنتاج الأسيتيون طريقة للتخلص من كميات البيروفات السامة من الخلية .

٥-٢-٥- عوامل أخرى تؤثر على إنتاج ثنائى الأسيتيل

يعتبر ثنائى الأسيتيل و CO_2 أهم النواتج التجارية لتمثيل السترات ، ولزيادة إنتاج هذه المكونات يضاف سترات مصرح باستخدامها فى الأغذية food-grade إلى اللبن . عادة يستخدم فى هذا المجال السترات بدلاً من حامض الستريك ، الذى قد يجبن اللبن . إضافة ٠,٣ % (وزن /حجم) سترات ثلاثى الصوديوم trisodium citrate يؤدى إلى زيادة مستوى السترات فى اللبن بحوالى ١٠ ملليمول أى تصل الزيادة إلى ١٠٠ %.

تختلف قدرة مزارع L فى تمثيل السترات خلال فصل السنة ، حيث تكون منخفضة فى لبن الربيع ومرتفعة فى لبن الخريف ، وقد يرجع ذلك إلى الاختلاف فى محتوى اللبن من Mn^{2+} ، الذى يكون منخفضاً فى الربيع ومرتفعاً فى الخريف . إضافة كميات قليلة من Mn^{+2} إلى مزارع L النامية فى اللبن لا يكون لها تأثير على معدل إنتاج الحامض ولكن يزيد بدرجة كبيرة من استهلاك السترات وإنتاج الأسيتيون . إضافة Mn^{+2} يكون له أيضاً أضراراً ، حيث يؤدى إلى إختزال الأسيتيون وثنائى الأسيتيل بدرجة أسرع عندما يتكونان .

تهوية المزارع aeration أثناء النمو قد يؤدى أيضاً إلى زيادة كبيرة فى كميات ثنائى الأسيتيل والأسيتيون الناتجة بواسطة *Lc.lactis* ssp. *lactis* Cit^+ ، مع زيادة فى ثنائى الأسيتيل بدرجة أكبر عن الأسيتيون . كما أن الأسيتيون مركب رئيسى للتمثيل الهوائى للجلاكتوز بواسطة كثير من Lactococci Cit^- ، ولكن يتوقف الحد الأقصى للإنتاج على تحديد كمية حمض اللبيويك lipoic acid

فى البيئة . وقد وجد أن نمو *Lc.lactis* ssp. *lactis* Cit^+ فى وجود الجلوكوز تحت ظروف هوائية فى غياب السترات يؤدى إلى زيادة الكتلة الحيوية biomass وكمية ثنائى الأسيتيل والأسيتيون الناتجة ، ويؤدى إلى تحويل اللاكتات إلى خلات ، وذلك عندما يستهلك جميع الجلوكوز . وقد أقترح أن زيادة إنتاج ثنائى الأسيتيل قد يعزى إلى زيادة إنتاج AcCoA ، الذى يؤدى إلى زيادة تكوين ثنائى الأسيتيل ، الذى أختزل إلى أسيتيون نتيجة نشاط acetoin dehydrogenase . يبدو أن هذا الأنزيم يكون أكثر أهمية فى توليد NAD^+ عن LDH تحت الظروف الهوائية المستخدمة.

٥-٣-٦- مزارع 4/25 وإنتاج الزبد من قشدة مسواه

الناتج الثانوى by-product الرئيسي للزبد المصنعة من قشدة مسواه أو متخمرة ripened بالطريقة التقليدية هو اللبن الخض الحامضى sour buttermilk ، الذى يمثل مشكلة خطيرة نظراً لأن اللبن الخض الحامضى له استخدامات محدودة . الطريقة التى يتم فيها إنتاج لبن خص من قشدة طازجة (غير مسواه) sweet cream قد حدث له تطوير فى معهد أبحاث الألبان فى هولندا وتستخدم فى إنتاج كميات كبيرة من الزبد الحامضى lactic butter فى أوروبا.

فى هذه الطريقة ، يستخدم نوعين من المزارع : مزرعة L ويطلق عليها P-19 ومزرعة D ويطلق عليها 4/25 وتحتوى على سلالة *Lc.lactis* ssp. Cit^+ *lactis* التى لا تحتوى على نشاط ALD ، ونتيجة لذلك ينتج كمية كبيرة من AL. يتم تنمية كل من المزرعتين لمدة ١٨-٢٢ ساعة عند ٢١°م فى ١٦ % لبن فرز مسترجع. بعد النمو فإن مزرعة 4/25 تخلط مع راشح الحامض lactic permeate بنسبة ٢ :٣ ، الذى يؤدى إلى خفض pH من حوالى ٤,٩ إلى ٣,٢ . ويتم إنتاج هذا الراشح بواسطة تخمير اللاكتوز فى الشرش إلى حامض لاكتيك بواسطة *Lb.helveticus* ، ثم تجرى له عملية طرد مركزى ويركز الرائق إلى حوالى ١٢% حامض لاكتيك . يتم بعد ذلك تهوية مخلوط مزرعة 4/25 والراشح بشدة لمدة ٣٠ دقيقة ، يتم خلالها تحويل AL الناتج أثناء النمو إلى كميات كبيرة من ثنائى الأسيتيل (حوالى ١٥٠ ملليجم/مل) .

تخص القشدة غير المسواه sweet cream بالطريقة التقليدية إلى مرحلة تكوين حبيبات الزبد مكوناً لبن خض غير حامضى sweet buttermilk . يضاف بعد ذلك مزرعة L وكمية كافية من مخلوط مزرعة 4/25 والراشح إلى حبيبات الزبد للحصول على التركيز الطبيعي لثنائى الأسيتيل (حوالى ٢ ميكروجرام/جرام) فى الزبد . كما أن مزرعة 4/25 تنتج أسيتالدهيد ، الذى يعطى للزبد طعم مشابه لطعم اليوجهورت . وظيفة *Leuconostoc* الموجود فى مزرعة L هو إختزال الأسيتالدهيد إلى إيثانول الذى لا يكون له تأثير على طعم الزبد.

٥-٣- النشاط الأيضى تحت الظروف الهوائية Aerobic metabolism

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

Leuconostocs النامية تحت ظروف هوائية تنتج خلات بدلاً من الإيثانول نتيجة إلى زيادة تكوين acetate kinase, NADH oxidase مع انخفاض نشاط alcohol dehydrogenase, phosphotransferase . وLactococci 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 لا يحدث نمو هوائى إلا فى وجود lipoic acid أو الخلات ، حيث أن lipoic acid جزء مكمل لمعقد أنزيم 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.

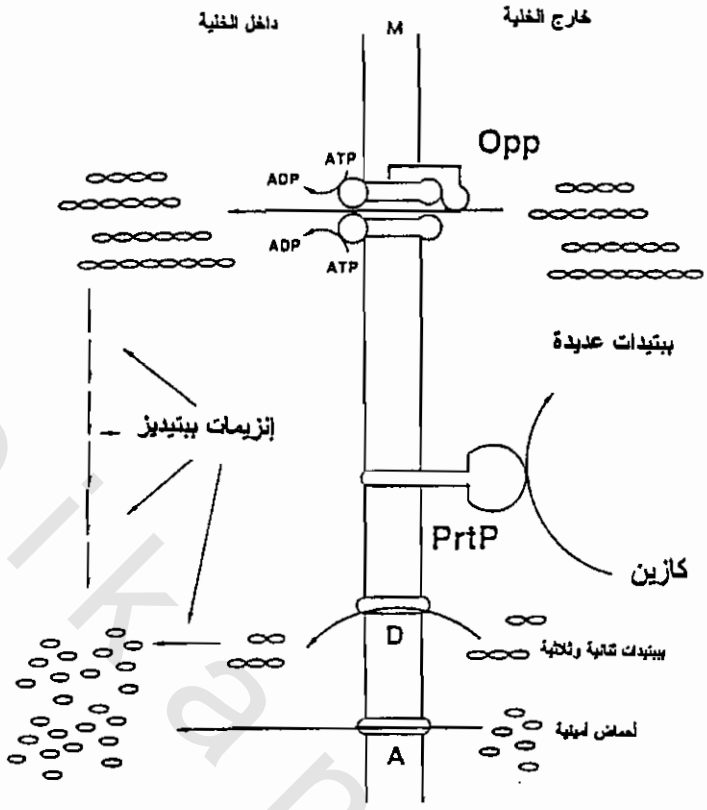
تتكون الخلات واللاكتات من المكونات الرئيسية الناتجة من تمثيل السكر فى وجود كميات زائدة من lipoate بينما يحل acetion محل الخلات فى وجود محدود

من lipoate . ويمكن زيادة إنتاج ثنائى الأسيتيل بإضافة hemin إلى Cit^+ Lactococci .

فوق أكسيد الأيدروجين (H_2O_2) 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 لا يحدث عادة فى اللبن المستخدم لإنتاج البادئ.

٥-٤- تمثيل النتروجين Nitrogen metabolism

LAB ليس لها القدرة على تخليق عديد من الأحماض الأمينية أو الفيتامينات، لذلك فإن احتياجاتها الغذائية تعتبر معقدة . تحتاج هذه البكتريا، بالإضافة إلى وجود سكر قابل للتخمر ، إلى مصادر خارجية للفيتامينات، النيوكلوتيدات nucleotides والأحماض الأمينية . تحتاج Lactococci أحماض أمينية متفرعة السلسلة branched chain amino acids (ايسوليوسين isoleucin ، ليوسين leucine وفالين valine) وهستدين histidine لكى تنمو . كما تحتاج بعض السلالات إلى أرجنين arginine وميثونين methionine ، وأن بعض أحماض أمينية أخرى نادراً ما تكون ضرورية . بالرغم من أن أحماض أمينية أخرى مثل الألانين alanine ، ليسين lysine وسيرين serine ليست أساسية إلا أنها تنشط من نمو بعض السلالات . احتياج Lactobacilli من الأحماض الأمينية يكون أكثر من احتياجات Lactococci ، فمثلاً *Lb.helveticus* ATCC 15009 تحتاج أيسوليوسين ، فالين ، ليوسين ، هستدين ، ميثيونين ، أرجنين ، برولين ، فينيل ألانين ، جلوتامين ، ثيرونين ، ليسين ، أسبارتات aspartate ، تيروسين وتربتوفان . متطلبات *Str.thermophilus* مماثلة لمتطلبات Lactococci ، بينما متطلبات Leuconostocs تختلف باختلاف السلالة . تحتاج جميع Leuconostocs فالين وجلوتامين ، الأحماض الأمينية الأخرى قد تنشط أو تكون ضرورية لسلالة أو أخرى.



شكل (١-٦) : رسم تخطيطي لمسار تحلل البروتين فى Lactococci

PrtP : إنزيم بروتينيز موجود فى غشاء الخلية

Opp : نظام انتقال الببتيدات العديدة oligopeptide

D : أنظمة انتقال ثنائي وثلاثي الببتيدات

A : أنظمة انتقال الأحماض الأمينية

M : الغشاء السيتوبلازمي

يوجد النتروجين الأميني amino nitrogen فى اللبن فى صورة بروتين (حوالى ٣٣ جم/لتر) ومكونات منخفضة الوزن الجزئى (أحماض امينية وببتيدات صغيرة) ، التى توجد بكميات قليلة . وفى دراسة مقارنة بين محتوى اللبن من الأحماض الأمينية الحرة والاحتياجات المقدرة لـ AM_2 *Lc.lactis cremoris*

ssp.، وجد أن هذه السلالة تحتاج للوصول إلى الحد الأقصى من النمو كميات أكبر من الأحماض الأمينية الأساسية عن الموجودة فى اللبن . وبفرض أن جميع الأحماض الأمينية الموجودة فى صورة ببتيدات صغيرة (ذائبة فى ١٢ % حامض الخليك ثلاثى الكلور trichloro acetic acid) يمكن استخدامها ، فإن الكميات الموجودة لا تغطى الاحتياجات ، الليوسين بصفة خاصة تكون غير كافية . لذلك فإن LAB يجب أن تحتوى على نظام محلل للبروتين proteolytic system لكى تستطيع أن تنمو جيداً فى اللبن.

وقد دلت الدراسات على النمو فى اللبن المدعم بكازيتات أو أحماض أمينية مشعة labeled أن الأحماض الأمينية الحرة والببتيدات الصغيرة تستخدم أولاً ، ولكن تدعم هذه المكونات ١٠-٢٠ % فقط من الكتلة الحيوية biomass الناتجة بواسطة مزارع Lactococci . تحصل البكتريا بعد ذلك على احتياجاتها من النتروجين نتيجة تحلل الكازين . معدل النمو خلال المرحلة الأولى (استخدام الأحماض الأمينية الحرة) يكون أسرع بدرجة ضئيلة عن معدل النمو فى المرحلة الثانية (تحلل الكازين).

فى خلال العشر سنوات الماضية تجمعت معلومات بدرجة كبيرة عن أنظمة تحلل البروتين وأنظمة انتقال الببتيدات والأحماض الأمينية فى بكتريا حامض اللاكتيك . شكل (١-٦) يوضح تخطيطياً عن ميكانيكية التغذية بالنتروجين nitrogen nutrition . يوجد إنزيم بروتينيز proteinase على سطح الخلية ، يكون مرتبطاً بغلاف الخلية cell envelope . إنزيمات الببتديز تكون مرتبطة جزئياً بغلاف الخلية وجزئياً بالسيتوبلازم . فى المراحل الأولى من النمو ، تنتشر الأحماض الأمينية الحرة خلال جدار الخلية وتنتقل إلى السيتوبلازم بواسطة أنظمة انتقال نشطة من خلال الغشاء active membrane transport systems . بعد ذلك يقوم البروتينيز المرتبط بغلاف الخلية بتحليل الكازين إلى ببتيدات صغيرة بدرجة تساعدها على الأنتشار من خلال جدار الخلية . إذا كانت هذه الببتيدات صغيرة بدرجة كافية ، فإنها تنتقل مباشرة من خلال غشاء البلازما plasma membrane بواسطة أنظمة انتقال الببتيدات العديدة oligopeptide transport system ، فى حالة عدم وجود هذه الأنظمة ، فإنها تتحلل بدرجة أكبر بواسطة إنزيمات

البتديز المرتبطة بغلاف الخلية لتنتج أحماض أمينية حرة وببتيدات أصغر ، التى يمكن انتقالها. ومع ذلك ، فإن وجود إنزيمات البتديز المرتبطة بغلاف الخلية لم يتأكد منها بعد . وقد دلت الدراسات الحديثة على أن إنزيمات بروتينيز جدار الخلية تنتج كميات كافية من الببتيدات الصغيرة تسمح بنمو Lactococci . تقوم بعد ذلك إنزيمات البتديز فى السيتوبلازم بتحليل هذه الببتيدات إلى أحماض أمينية حرة لاستخدامها فى تكوين البروتين . هذه الميكانيكية قد تم تأكيدها بدراسة نمو سلالات من Prt⁻ Lactococci (سلالات خالية من البروتينيز المرتبط بغلاف الخلية) . فى البداية تنمو هذه السلالات فى اللبن بمعدل مماثل للسلالات Prt^+ (المحتوية على البروتينيز المرتبط بغلاف الخلية) ، مما يدل بوضوح على أن البروتينيز الخارجى ليس مهماً للنمو عند كثافة منخفضة من الخلايا، ولكن تصل فقط إلى ١٠-٢٠ % من الكتلة الحيوية biomass التى تصل إليها سلالات Prt^+ . إذا أضيف محلل الكازين hydrolysate of casein إلى اللبن ، فإن نمو هذه السلالات تصبح مماثلة للسلالات Prt^+ .

٥-٤-١- إنزيمات البروتينيز Proteinases

أ- Lactococcal proteinase

تم دراسة إنزيمات البروتينيز باستفاضة أكبر فى Lactococci عنها فى بادئات بكتريا حامض اللاكتيك الأخرى . تتم المرحلة الأولى من تحلل الكازين بواسطة إنزيم مرتبط بسطح الخلية ، الذى يحلل الكازين إلى ببتيدات عديدة oligopeptides . وعلى عكس البكتريا الموجبة لجرام الأخرى ، فإنه من الصعب التأكد من أن Lactococci يفرز إنزيمات بروتينيز فى بيئة النمو. وقد تأكد من وجود هذا الأنزيم منذ حوالى ٢٠ سنة مضت بواسطة تحضين الخلايا الكاملة فى منظم خال من Ca^{2+} ، للحث على إفراز الأنزيم فى المنظم buffer . هذا النشاط يمثل النشاط الرئيسى لتحلل الكازين فى Lactococci ، ويكون ضعيفاً بالمقارنة بنشاط تحلل البروتين فى بعض Bacilli ، لكن يكون مناسباً لأمداد Lactococci بكميات كافية من النتروجين اللازم للتغذية .

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

١- PI . pH المثلى ٥,٨ ودرجة الحرارة المثلى ٤٠°م ويحلل β-casein مع تحلل بطئ جداً للـ α_s-casein .

٢- PIII . pH المثلى ٥,٤ ودرجة الحرارة المثلى ٣٠°م ويحلل كل من α_s -and β-caseins بالإضافة إلى $_k$-casein .

٣- PII (PI/PIII) . 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.

عديد من البادئات المختلطة mixed starters تحتوى على سلالات قادرة على تحلل بروتينيات 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^+) ، لكن يقف نموها عندما تستهلك الأحماض الأمينية الحرة والببتيدات. ويمكن زيادة أعداد السلالات غير المحللة للبروتين (Prt^-) بعد عدة تنشيطات ، قد تصل إلى ١٠٠ تنشيطية ، حيث يمكن أن تصل أعداد هذه السلالات إلى ٩٠-٩٨ % من الأعداد الكلية للسلالات فى البادئ . كما يمكن زيادة أعداد هذه السلالات (Prt^-) بحفظ pH البيئة مرتفعاً نسبياً (٥ أو ٦,٥) ، لكن قد تسبب هذه الظروف بعض المشاكل فى البيئات المثبطة للفاج .

استخدام سلالات (Prt^-) فى صناعة الجبن يقلل من ظهور المرارة فى الجبن الناتج ، كما أنه يعطى محصول جبن أعلى ، لكن تحتاج عملية صناعة الجبن إلى كمية بادئ من هذه السلالات أكبر ، وتأخذ الصناعة وقتاً أطول ، كما أن الجبن الناتج يحتوى على تركيز أعلى 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 إنتاج بادئ الإضافة (الصناعة) bulk culture .

ب- Lactobacilli proteinases

ينطلق نشاط تحلل البروتين من غلاف خلايا سلالات *Lb.helveticus*, *Lb.casei* بواسطة غسل الخلايا باستخدام منظم خال من Ca^{2+} . النشاط المتحصل عليه من *Lb.casei* له القدرة على تحلل β-casein بطريقة مماثلة لإنزيمات البروتينيز من النوع PI فى Lactococci .

وقد تم أيضاً عزل إنزيم بروتينيز مرتبط بغلاف الخلية من *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* . يبلغ الوزن الجزيئى لهذا الأنزيم ١٧٠ kDa ويصل إلى أقصى نشاط له عند pH ٥,٦ و ٤٥°م . ويدل تأثير مثبطات البروتينيز على أن الأنزيم هو a cysteine protease .

جـ- *Streptococcus thermophilus* proteinase

السلالات الوحيدة من *Str.thermophilus* التى تحتوى على نشاط مرتبط بالغلاف ويقوم بتحليل الكازين والتى أمكن إكتشافها حديثاً ، هى ثلاث سلالات أسيوية Asian strains نشأت من مانجوليا الخارجية Outer Mongolia ، الهند India واليابان Jaban. يعزى هذا النشاط إلى إنزيم serine proteinase ويختلف عن proteinase الناتج من Lactococci ، حيث أنه لا يفرز فى منظم خال من Ca^{2+} .

ما عدا هذه السلالات الثلاثة ، فإن *Str.thermophilus* لا تحتوى على إنزيمات بروتينيز مرتبطة بغلاف الخلايا . فى مزارع اليوجهورت ، توجد علاقة تكافلية symbiotic بين *Str.thermophilus* و *Lb.delbrueckii* ssp.

buglaricus ، حيث يرجع زيادة نشاط *Str.thermophilus* إلى إنتاج الببتيدات والأحماض الأمينية ، خاصة الهستدين والجلايسين نتيجة لنشاط تحلل البروتين بواسطة *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ، بينما يرجع زيادة نشاط الميكروب الأخير إلى إنتاج الفورمات formate من اللاكتوز بواسطة *Str.thermophilus*.

٥-٤-٢- إنزيمات الببتيز Peptidases

توجد عديد من الدراسات على نظم الببتيز فى LAB فى السنوات الأخيرة ، التى تبين بوضوح أنها نظم معقدة . وقد أمكن عزل عدد من الإنزيمات ، معظمها من Lactococci ، مع تحديد صفاتها الرئيسية ، وخاصة تخصصها . بعض هذه الإنزيمات تكون amino peptidases (التى تفرز أحماض أمينية حرة من الطرف الأميني N-terminus للسلسلة) وبعضها تكون نشطة على الببتيدات الثنائية أو الثلاثية ، والبعض الآخر يكون endopeptidases يعمل على تحلل الببتيدات العديدة oligopeptides . وأخيراً فإن بعض الإنزيمات التى تنتمى للأنواع السابقة وتكون متخصصة فى تأثيرها حيث تؤثر على protyl residues. لا يوجد إنزيمات carboxypeptidase فى LAB التى تعمل على الطرف الكربوكسيلي C-terminal للببتيدات ، باستثناء *Lb.casei* . إنزيمات الببتيز تكون ضرورية لتحلل الببتيدات العديدة والثلاثية والثنائية الناتجة من الكازين أثناء النمو فى اللبن (شكل ١-٦) .

أ- إنزيمات أمينو ببتيز العامة General aminopeptidases

• **Aminopeptidase N (Pep N)**. عبارة عن بتيز معدني metallopeptidase يبلغ وزنه الجزيئى ٩٥ kDa الذى يتلف بواسطة المواد المخلبية مثل ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) أو 1,10-phenanthroline . يتميز الإنزيم بمدى واسع من التخصص ، حيث أنه يفرز كل من الأحماض الأمينية الكارهة للماء hydrophobic (الليوسين والآلانين والفينيل آلانين) والأحماض الأمينية القاعدية (الليسين والأرجنين) من ببتيدات الكازين.

يصل نشاط هذا الأنزيم إلى الحد الأقصى عند pH حوالى ٧,٠ ويوجد هذا الأنزيم داحل الخلية أى يعتبر من الإنزيمات الخلوية (intracellular location) .

• **Amino peptidase (Pep C)**. عبارة عن hexameric thiolamino peptidase ووزنه الجزيئى ٣٠٠ kDa ويتميز بمدى واسع من التخصص ، حيث أنه له القدرة على إفراز جميع الأحماض الأمينية ما عدا البرولين من البيتيدات . درجة pH المثلى لنشاطه حوالى ٧,٠ ويوجد هذا الأنزيم داخل الخلية أى من الإنزيمات الخلوية .

ب- إنزيمات أمينوببتديز المتخصصة

Amino peptidases with restricted specificity

• **Amino peptidase A** . هذا الأنزيم يفرز فقط الأسبارتيك Asp والجلوتامين Glu من البيتيدات من الطرف الأمينى N-terminus للسلسلة ، وهو إنزيم مقاوم للحرارة ومن النوع المعدني metalloenzyme ، ويبلغ وزنه الجزيئى ٤٠ kDa .

• **Pyroglutamyl aminopeptidase** . تحتوى Lactococci على هذا الأنزيم وهو عبارة عن dimeric serine peptidase وزنه الجزيئى ٨٠ kDa ودرجة pH المثلى له ٨,٥ .

جـ- إنزيمات Di- and tripeptidases

• **Dipeptidase** : تم الحصول حالياً على إنزيمات dipeptidases فى صورة نقية من سلالتين من *Lc.lactis* ssp. *cremoris* Wg2 & H61 . هذان الأنزيمان من النوع المعدني metallo ezymes ودرجة pH المثلى لهما ٧,٥ ولهما مدى واسع من التخصص فى تحليل البيتيدات الثنائية إلى مكوناتها من الأحماض الأمينية. أحد هذه الإنزيمات يكون إحادى الوحدات monomer ووزنه الجزيئى ٥٠ kDa،بينما الآخر يكون ثنائي الوحدات dimer. ووزنه الجزيئ ١٠٠ kDa.

• **Tripeptidase** : وهو إنزيم ببتديز معدني ثنائي الوحدات dimeric metallopeptidase ووزنه الجزيئى ١٠٥ kDa ، ويتميز بمدى واسع من

التخصص ، لكن لا يحلل الببتيدات الثلاثية التى تحتوى على prolyl فى مركزهـا . ويحلل الببتيدات الثنائية والببتيدات التى تحتوى على أربعة أو أكثر من الأحمـاض الأمينية.

د- Proline – Specific Peptidases

يوجد البرولين بكميات أكبر فى الكازين عن غيره من البروتينيات . ونظـراً لتركيبه البنائى الخاص ، فإنه يحتاج إلى أنزيم متخصص لتحليل الروابط الببتيدية التى تحتوى عليه.

- **X-Prolyl Dipeptidyl Aminopeptidase (PepX)** : هذا الأنـزيم يفرز X-Pro-dipeptides من السلسلة الببتدية من الطرف الأمينى N-terminus، وهو من الإنزيمات الخلوية من نوع serine enzyme ويبلغ وزنه الجزيئـى ١٧٠ kDa .

- **Prolidase** : هذا الأنزيم مكمل لأنزيم aminopeptidase السابق وهـو من النوع المعدني metalloenzyme وزنه الجزيئ ٤٢ kDa ومتخصص للببتيدات من نـوع X-Prodipeptides النـاتج بواسـطة PepX بأسـتثناء Gly-Pro dipeptides. هذا الأنزيم لا يحلل الببتيدات الثلاثية.

- **Proline Iminopeptidase** :هذا الأنزيم متخصص ويفـرز البـرولين proline من الطرف الأمينى N-terminus للسلسلة الببتدية وهو مـن النـوع المعدني metallo peptidase ووزنه الجزيئى ١١٠ kDa . يكون هذا الأنزيم نشط بمفرده على الببتيدات الثنائية والثلاثية وليس له تأثير على الببتيدات الأطول مـن ذلك ، وبالتالى يعتبر هذا الأنزيم di-tripeptidase .

- **Aminopeptidase P** : هذا الأنزيم من النوع المعدني إحادي الوحدات monomeric metallopeptidase ووزنه الجزيئـى ٤٤ kDa ، وهـو إنـزيم متخصص ويحلل الرابطة الببتدية لنوع X-Pro من الطرف الأميـنى N-terminus

للسلسلة ولكن الأحماض الأمينية البعيدة عن رابطة التحلل cleavage bond يبدو أن لها تأثير رئيسي على سرعة التحلل .

هـ-Endopeptidases

يوجد على الأقل نوعين من إنزيمات endopeptidases التى تحلل الببتيدات قصيرة السلسلة ولكن لا تحلل البروتين . تتميز هذه الإنزيمات بمدى واسع من التخصص وتختلف عن بعضها فى حجم بيئة التفاعل التى تستطيع أن تحللها . إنزيم LEP1 endopeptidase يحلل فقط الببتيدات التى تتكون من ٥ إلى ٢٥ حامض أمينى . من ناحية أخرى فإن إنزيمات LEPIII, LEPII تنتج من سلالات مختلفة ، ولكن يحتمل أن تكون إنزيمات متشابهة . هذه الإنزيمات تكون أقل تخصصية وتستطيع أن تحلل الببتيدات المتكونة من ٥ – ٣٠ حامض أمينى. هذه الإنزيمات عبارة عن metalloenzymes وpH المثلى لها حوالى ٦,٠ ووزنها الجزيئ ٧٠ kDa . تنمو Lactococci الخالية من LEPIII (PepO) بمعدل مماثل للطراز البرى wild-type فى اللبن ، مما يدل على أن الأنزيم ليس ضرورياً للنمو ويحتمل أن تحل محلها إنزيمات الببتديز الأخرى مثل LEPI وتقوم بعملها.

و- موقع ودور إنزيمات الببتديز Locatation and role of peptidases

تحتوى Lactococci على مجموعة كبيرة متكاملة من إنزيمات الببتديز يمكن أن تحلل جميع الببتيدات الناتجة من الكازين بواسطة البروتينيز الناتج منها ، بواسطة المنفحة المستخدمة فى صناعة الجبن ، أو بلازمين اللبن إلى أحماض أمينية حرة . توجد جميع إنزيمات الببتديز فى السيتوبلازم. تستطيع Lactococci أن تنمو على الببتيدات الصغيرة الناتجة بواسطة البروتينيز ، دون الحاجة إلى ببتديز خارج الخلية exocellular . جميع إنزيمات الببتديز السابقة تشارك فى تسوية الجبن ، منتجة أحماض أمينية حرة فى الجبن ، التى يمكن أن تعمل كمصدر لمكونات النكهة .

التحلل التدريجى لخلايا البكتريا أثناء عملية التسوية تساعد الإنزيمات الخلوية (الموجودة داخل الخلايا) على الأتصال المباشر بالببتيدات الناتجة بفعل بقايا المنفحة التى ما زالت موجودة فى الجبن أو بواسطة إنزيمات بروتنيز أخرى نشطة أثناء التسوية ، مثل بلازمين اللبن.

ز- نظم الببتديز peptidase systems فى بكتريا حامض اللاكتيك العصوية المحبة للحرارة المرتفعة *Str. thermophilic*,

المعلومات المتوفرة عن *Str.thermophilus*, Lactobacilli أقل من مثيلتها المتوفرة عن Lactococci ، التى تدل على أن هناك تشابه قوى مع أنظمة االببتديز فى Lactococci . عموماً إنزيمات ببتديز Lactobacilli تتشابه بشدة مع إنزيم أو آخر من إنزيمات ببتديز Lactococci . وقد تم دراسة إنزيمات ببتديز *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* باستفاضة وتوصيف ثلاثة إنزيمات aminopeptidases ، أثنان منهما مماثلة لإنزيمات Pep C ، Pep N من Lactococci ، بينما الأنزيم الثالث يتميز بصفات metallominopeptidase مع مدى واسع من التخصص ولكن أقل من Pep N الناتج من Lactococci (الوزن الجزيئى ٣٢ kDa) . وتدل بعض الدراسات على أن الأنزيم مشابه للـ Pep N الذى يوجد فى غلاف الخلية ولذلك فإنه يكون فى موقع يسمح له بتحليل الببتيدات الناتجة بواسطة البروتينيز خارج الغشاء. وقد تم عزل وتوصيف إنزيم dipetidase ، an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase ، وإنزيم iminopeptidase . يبلغ الوزن الجزيئى للأنزيم الأخير ١٠٠ kDa ويحلل فقط الببتيدات الثنائية والثلاثية والتى يكون طرفها الأمينى N-terminus برولين . وقد أمكن توصيف أنزيم aminopeptidase من نوع PepN من ثلاث سلالات مختلفة من *Lb.helveticus* . كما فى حالة *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ، يبدو أن هذا الأنزيم مرتبط بغلاف الخلية . وقد وجد أن *Lb.helveticus* يحتوى على aminopeptidases ، dipeptidases ، an iminopeptidase ، an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase, an aminopeptidase P ، كما تم عزل PepN-type aminopeptidases من *Lb.casei* ، *lactis* ssp. *Lb.delbrueckii* . ويحتوى *Lb.casei* على نشاط a carboxypeptidase-type (يفرز أحماض أمينية حرة من الطرف الأمينى الكربوكسيلى C-terminus للببتيد) . يتميز هذا الأنزيم بمدى محدود من التخصص حيث يكون قاصراً فقط على إفراز arginyl ، ويعتبر ذلك المثال الوحيد لنشاط carboxypeptidase الذى يوجد حتى آلان فى LAB .

يعتبر التخمر الثانوى secondary fermentation عيب فى جبن الأمينتال والذى يتميز بتكوين شقوق طولية وعيون صغيرة . وقد دلت الدراسات عن الأنشطة المحللة للبروتين للبادئات المحبة للحرارة المرتفعة (*Rohmischkulturen*, RMK) المستخدمة فى هذه الجبن أن هذا التخمر الثانوى مرتبط بنشاط أكبر لأنزيم aminopeptidase فى RMK المحتوية *Lb.helveticus* مقارنة بـRMK المحتوية على *Lb.delbrueckii* ssp. *lactis* . يؤدى زيادة نشاط aminopeptidase فى *Lb.helveticus* إلى إنتاج أحماض أمينية حرة بكمية أكبر ، التى تزيد من نشاط بكتريا حامض البروبيونيك PAB ، والتى بدورها تؤدى إلى إنتاج CO_2 بكميات زائدة فى المراحل المتأخرة من التسوية عندما تكون مطاطية الخثرة غير كافية للمحافظة على شكل العيون.

تحتوى *Str.thermophilus* على إنزيمات PepN-type aminopeptidase, dipeptidase كما تحتوى على عديد من إنزيمات الببتديز الأخرى ، وقد أمكن الكشف عن ثلاث aminopeptidases أخرى (وتشمل أنزيم من نوع PepC وأنزيم من نوع A aminopeptidase) وإنزيم X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase ، tripeptidase وأنزيمين من endopeptidases .

مما سبق يتضح أن جميع بادئات LAB تحتوى على أنظمة ببتديز معقدة تساعدها فى تحليل الببتيدات مباشرة إلى مرحلة الأحماض الأمينية الحرة.

٥-٤-٣- انتقال الببتيدات والأحماض الأمينية

Transport of peptides and amino acids

يتوقف الاستفادة من الأحماض الأمينية والببتيدات بواسطة البكتريا تماماً على انتقال هذه الجزيئات خلال غشاء البلازما . يوجد فى البكتريا أنظمة انتقال مختلفة للأحماض الأمينية والببتيدات ، ولم يلاحظ تفاعلات تنافسية بين هذه الأنظمة ، وقد تم الحصول على طفرات mutants لا تحتوى على نظم انتقال الأحماض الأمينية أو الببتيدات.

البحوث التى أجريت على نظم أنتقال الأحماض الأمينية والببتيدات فى LAB ترتبط أساساً بالـLactococci . وقد أوضحت هذه الدراسات إلى أن

أنتقال الشحنات السالبة من خارج الخلية إلى الداخل يكـــون مرتبطـــاً بانتقـــال البرتونات من الداخل إلى الخارج مما يؤدى إلى قلوية داخل الخلية.

وقد وجد ثلاثة أنظمة لأنتقال الأحماض الأمينية فى Lactococci :

١- Antiport system.

٢- أنظمة تنشأ من فرق الجهد (Δp) Systems driven by the Δp.

٣- أنظمة تعتمد على روابط الفوســـفات الغنيـــة بالطاقـــة Energy-rich phosphate bonds

يوجد فى Lactococci أنظمة انتقـــال منفصلـــة لأمتصـــاص الببتيـــدات والأحماض الأمينية . الببتيدات المحتوية على عدد من الأحماض الأمينية تصل حتى ٦ أحماض تنتقل إلى داخل الخلية حيث تتحلل بعد ذلك إلى الأحماض الأمينية المكونـة لها بواسطة إنزيمات الببتيدات الخلوية (الداخليـــة) intracellular peptidases . الميثيونين والأحماض الأمينية المتفرعة (الليوسن وأيسوليوسين والفـــالين) جميعـــها ضرورية لنمو بادئات Lactococci . الأحماض الأمينية المتعادلة (سيرين ، ثيرونين، جلايسين وآلانين) والأحماض الأمينية القاعدية (الليسين) تنتقل جميعها بواســـطة نظام فرق الجهد . وعادة يمتص البرولين فى صورة ببتيد بينما يمتص الجلوتـــامين ، والجلوتاميت والأسبارجين بواسطة تفاعل بمساعدة ATPase ، بينما الأرجنـــين يمتص بواسطة نظام فرق الجهد .

أ- انتقال الأرجنين Transport of arginine

تبادل الأرجنين مع الأورنيثين ornithine فى نظام antiport system نـاتج من تدفق الأرجنين من الخارج إلى الداخل وتدفق الأورنيثـــين مـــن الداخـــل إلى الخارج ، ولا يحتاج إلى طاقة أيضية metobolic energy . داخل الخلية يتم تمثيـل الأرجنين بإتباع مسار arginine deiminase مكوناً أورنيثين مـــع إنتـــاج ATP الذى يساعد على وجود فائض من الطاقة فى هذا النظام من نظم الانتقال . يوجـد مسـار arginine deiminase فى *Lc.lactis* ssp. *lactis* ولكـــن لا يوجـــد فى *Lc.lactis* ssp. *cremoris* .

ب- انتقال الأحماض الأمينية نتيجة فرق الجهد (Δp)

يوجد فى Lactococci على الأقل أربعة أنظمة مختلفة لأنتقال الأحماض الأمينية نتيجة Δp ويشارك H^+ كجزئى symport على النحو التالى :

١- نظام لليوسين ، أيسوليوسين والفالين.
٢- نظام للألانين والجلايسين .
٣- نظام للسيرين والثيرونين .
٤- نظام لليسين .

وقد توجد أنظمة مماثلة للهستدين ، البرولين ، ميثيونين ، سستئين cysteine ، تيروسين وفينيل آلانين ، ولكن لم يتم تحديدها بدرجة واضحة . كما دلت بعض الدراسات على أن نظام انتقال الفينيل آلانين قد يتم تثبيطه بواسطة التيروسين والتربتوفان ، مما قد يدل على أن الأحماض الأمينية العطرية aromatic تساهم فى نظام مشترك . يمكن أن ينتقل الميثيونين بواسطة نظام ليوسين- فالين- أيسوليوسين ، بالرغم بأن درجة تجاوبه affinity تكون ضعيفة.

جـ- انتقال الأحماض الأمينية بواسطة روابط الفوسفات الغنية بالطاقة

يمكن أن يتم انتقال بعض الأحماض الأمينية مثل الجلوتاميت ، الجلوتامين ، الأسبراجين ويحتمل الأسبارتات بدون Δp ، ولكن تحتاج إلى طاقة مثل ATP . ينتقل حامض الجلوتاميك فى صورة غير متحللة undissocitacd form ، وبالتالى تعتمد بدرجة كبيرة على pH الخارجى ، الذى يحد من استخدام حامض الجلوتاميك بواسطة الخلايا عندما يكون pH قلوى . وقد يبدو أن حامض الأسبارتيك ينتقل بطريقة مماثلة لحامض الجلوتاميك . خلايا *Lc.lactis* الخالية من الطاقة تكون قادرة على تجميع الأسبرتات aspartate ، بينما تحت ظروف مماثلة لا يمتص الجلوتاميت والجلوتامين والأسبراجين . ينتقل الأسبراجين بواسطة نظام خاص به.

د- انتقال الببتيدات Transport of peptides

أوضحت الأبحاث المبكرة السابقة أن الببتيدات غالباً ما تكون مؤثرة عن الأحماض الأمينية الحرة كعوامل نمو growth factor لبكتريا LAB . يجب أن يتم تحليل الببتيدات سواء أثناء أو بعد عملية الانتقال ويعتقد أن تحليل الببتيدات بعد عملية الانتقال أكثر حدوثاً ، حيث لم يتم التعرف حتى الآن على إنزيمات ببتيديز خارج الخلية extracellular peptidase في بكتريا LAB . بالإضافة إلى ذلك ، فإذا كانت الطاقة اللازمة لأنتقال ببتيد مماثلة للطاقة اللازمة لنقل حامض أميني واحد ، فإن الخلية توفر طاقة نتيجة انتقال الببتيدات. وقد أقترح أخيراً أن الكميات الزائدة من الأحماض الأمينية الناتجة من الببتيدات داخل الخلية يمكن أن تدفع إلى الخارج في symport مع البروتون بطريقة مماثلة لما يحدث في حالة اللاكتات ، وبالتالى تحصل الخلية على طاقة إضافية .

وقد تم وصف نظام انتقال ببتيدات ثنائية يعتمد على Δp ، هذا النظام يعتبر ضرورياً لنمو نوع من *Lactococcus* على الأقل في بيئة تحتوى على β-casein . هذا النظام من أنظمة الانتقال له تجاوب قوى للببتيدات المحتوية على برولين ، التى تكون مفيدة جداً للبكتريا النامية في اللبن ، حيث أن الكازينات غنية بصفة خاصة في البرولين . هذا النظام يقوم بنقل ببتيدات ثنائية وثلاثية محتوية على نطاق واسع من الأحماض الأمينية ، ما عدا الببتيدات المحتوية على أحماض أمينية قاعدية مثل الليسين . هذا النظام لا ينقل الببتيدات المحتوية على أكثر من أربعة أحماض أمينية . تحتوى Lactococci أيضاً على نظام انتقال للببتيدات العديدة oligopeptides والمحتمل أن تكون ناتجة بواسطة ATP أو مكون آخر من الفوسفات الغنى بالطاقة. هذا النظام مماثل للنظام الذى لوحظ في بكتريا أخرى موجبة لجرام وسالبة لجرام. ويشمل هذا النظام خمس بروتينات ، أثنان منهما عبارة عن بروتينيات مرتبطة بالـATP ، أثنان آخران عبارة عن بروتينيات لها القدرة على الانتقال خلال الغشاء ، والبروتين الخامس عبارة عن بروتين مرتبط بمادة التفاعل substrate . هذا النظام يكون قادراً على نقل الببتيدات المحتوية على ٤-٨ أحماض أمينية ويكون ضرورياً للنمو في اللبن.

٥-٤-٤- تمثيل الأحماض الأمينية

تمثيل الأحماض الأمينية بواسطة بكتريا البادئ وغيرها من البكتريا التي لا تنتمى للبادئ تنتج نطاق واسع من المركبات العطرية aromatic compounds ولذلك يلعب دوراً هاماً فى تكوين الطعم فى الجبن . تعمل الأحماض الأمينية كمادة تفاعل substrate لنشاط deaminase ، transaminase, decarboxylase والإنزيمات التى تؤثر بصفة خاصة على السلاسل الجانبية قد تم التعرف عليها.

بالرغم من التعرف على مسارات تمثيل بعض هذه الأحماض الأمينية فى عدد من LAB فى تسوية الجبن ، إلا أن قليلاً من المعلومات متوفرة عن هذه المسارات . بجانب مسار الآرجنين المعروف جيداً ، فإنه أحد الاختلافات الرئيسية بين *Lc.lactis* ssp.*lactis*, *Lc.lactis* ssp. *cremoris* ، إلا أنه لا توجد معلومات كافية عن الإنزيمات الأخرى . يتم تمثيل الآرجنين بواسطة *Lc.lactis* ssp. *lactis* بإتباع مسار arginine deiminase pathway ، الذى يتضمن نشاط ثلاث إنزيمات: arginine deiminase ، carbamate ornithine transcarbmylase kinase, ، التى تساعد التفاعلات التالية ، على التوالى

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

$$\text{L-Citrulline} + Pi \longrightarrow \text{L-Orinithine} + \text{Carbamyl phosphate}$$

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

يعتمد النشاط التخصصى لكل من ornithine transcarbamylase, arginine deiminase على السكر الموجود فى البيئة (الجلاكتوز أكثر ملاءمة من الجلوكوز أو اللاكتوز) وعلى تركيز الآرجنين . ترجع عدم قدرة .*Lc.lactis* ssp *cremoris* على تحليل الآرجنين بصفة عامة إلى غياب arginine deiminase ، بالرغم من أن بعض السلالات لا تحتوى أيضاً على ornithine transcarbamylase . الإنزيمات التى تشارك فى تحليل الآرجنين ، توجد أيضاً بصفة عامة فى Lactobacilli المختلطة التخمر وفى *Str.thermophilus* وغير موجودة عادة فى Lactobcilli المتجانسة التخمر والمحبة للحرارة المرتفعة thermophilic homofermentative lactobacilli . وقد أوضحت الأبحاث أن

إنتاج الأمونيا ينشأ من نزع مجموعة الأمين deamination من السيرين ، السستئين cysteine والآسبارجين فى *Lb.casei* . يختلف هـذا النشـاط طبقـاً للحالـة الفسيولوجية للخلية ، كما يبدو أن الخلايا تحتوى على نوعين مختلفين من الأنظمـة الأنزيمية.

يمكن أن تتكون أحماض دهنية طيارة من الأحماض الأمينية الحرة بواسـطة Lactobacilli, Lactococci ، ويعتقد أن ذلك يعزى أساساً إلى تفاعلات نـزع مجموعة الأمين deamination والكربوكسيل decarboxylation ، التى تـؤدى إلى تكوين الخـلات والبروبيونـات والأيسـوبروبيونات والفلاريـت valerate أو الأيسوفلاريت isovalerate من الأحماض الأمينية المقابلة .

يؤدى نزع مجموعة الكربوكسيل من بعض الأحماض الأمينيـة إلىتكويـن أمينات حيوية biogenic amines ، التى تكون غير مرغوبة فى الجبن حيث تشارك فى تكوين نيتروز أمين nitrosamines (مـواد مسـرطنة carcinogenic) أو فى تفاعلات الحساسـية فى الأفـراد الذيـن يعـانون مـن الحساسـية الزائـدة hypersensitive. تحد البسترة والنواحى الصحية الجيدة من تكوين هذه الأمينـات فى كثير من الجبن ، مما يدل على أن LAB فى مزارع البادئات لا تحتـوى علـى نشاط decarboxylase . ومع ذلك فإن بعض Lactobacilli لا تنتمى للبـادئ يمكن أن تكوّن كميات كبيرة من الأمينات فى الجبن .

٥-٤-٥- إنتاج الآسيتالدهيد

تنتج بكتريا البادئ الأسيتالدهيد acetaldehyde بكميات صغيرة . تنتـج البادئات المحبة للحرارة المرتفعة thermophilic الأستيالدهيد بكميات أكـبر مـن البادئـات المحبـة للحـرارة المعتدلـة mesophilic (تصـل إلى حـوالى ٢٠ ميكروجرام/مل) والأسيتالدهيد له أهمية خاصة فى طعـم اليوجـهورت . يعتـبر الأسيتالدهيد عادة ناتج من تمثيل الكربوهيدريت ، لكن فى Lactococci فإنه يتـم إنتاجه من الثيرونين threonine من خلال نشاط theronine aldolase.

Threonine ⟶ Acetaldehyde + Glycine

يعتقد أن الوظيفة الحقيقية لهذا التفاعل هو توفير الجليسين للنمو ، حيث أن السلالة الوحيدة من Lactococci التي تحتاج جليسين للنمو خالية من هذا الأنزيم . يعتبر الأسيتالدهيد مكوناً هاماً من مكونات الطعم في اليوجهورت ، ولكن قد يسبب طعماً غير مرغوباً فيه off-flavors في الألبان المتخمرة الناتجة باستخدام البادئات المحبة للحرارة المعتدلة ، وخاصة إذا انخفضت النسبة بين ثنائي الأسيتيل والأسيتالدهيد إلى ٣ : ١ والنسبة المثالية بينهما يجب أن تكون ٤ : ١ .

في البادئات المحبة للحرارة المعتدلة ، ينتج الأسيتالدهيد أساساً من threonine بواسطة thereonine aldolasc ، حيث يتحلل الثيرونين إلى جليسين وأسيتالدهيد . لذلك فإن سلالات Lactococci التي لا تحتوى على thrconinc aldolase تكون في حاجة إلى جليسين . لذلك فإن الوظيفة الرئيسية لأنزيم threonine aldolase هو توفير الجليسين للنمو . أحد وظائف *Leuconostoc* ssp. في البادئات المختلطة المحبة للحرارة المعتدلة هو إختزال الأسيتالدهيد ، الناتج بواسطة الأعداد الزائدة من Lactic streptococci ، إلى إيثانول . وفي المزارع المحبة للحرارة المرتفعة ، فإن *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ينتج كمية أكبر من الأسيتالدهيد عما ينتجه *Str.thermophilus* ، لكن نظراً للعلاقة التكافلية بين هذه الأنواع فإن كمية أكبر من الأسيتالدهيد تنتج عندما تنمو هذه البكتريا معاً . مصدر الأسيتالدهيد في البادئات المحبة للحرارة المرتفعة من المحتمل أن يكون السكر. يحتوى *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* على نشاط threonine aldolase ، لكن لا تنتج أو تنتج كميات ضئيلة من الأسيتالدهيد من الثيرونين ، وقد أوضح البعض أن أسباب تعارض هذه النتائج ما زالت غير واضحة .

٦- مثبطات نمو البادئات

يوجد عدد من العوامل تؤثر بشدة على نشاط البادئات ، تتضمن التباين في تركيب اللبن نتيجة الإصابة بمرض التهاب الضرع mastitis أو العوامل الموسمية ، وعمليات صناعة الجبن مثل درجة حرارة الطبخ و/أو نسبة الملح . هذا بالإضافة إلى المواد المثبطة inhibitors التي قد توجد في اللبن مثل المضادات الحيوية ، الأجلوتينات agglutinins والأكسجين الذائب ، الفاج phagc ، الأحماض

الدهنية الحرة ، البكتريا المثبطة ونظام lactoperoxidase (LP) ، وبقايا المواد المطهرة sanitizers والبكتريوسينات bacteriocins . الألتزام بطرق مراقبة الجودة وطرق التصنيع الجيدة تساعد فى تقليل تأثير معظم هذه العوامل إلى الحد الأدنى فى صناعة الجبن بالطريقة الحديثة ، ومع ذلك فما زال هناك بعض الصعوبات قد تنشأ من بقايا المضادات الحيوية والبكتريوسينات والفاج .

٦-١- المضادات الحيوية Anitbiotics

توجد بقايا المضادات الحيوية فى اللبن ، نتيجة استخدامها فى معالجة الحيوانات المصابة بمرض التهاب الضرع mastitis . العقوبات الصارمة على المنتجين قد أدت إلى تقليل تأثير المضادات الحيوية بدرجة كبيرة . يصيب مرض التهاب الضرع mastitis ضرع الحيوان ، الذى يسببه عادة *Streptococcus agalactiae* أو *Staphylococcus aureus* ، ويسبب خسارة اقتصادية كبيرة فى صناعة الألبان حيث يؤدى إلى خفض محصول اللبن . وعادة يمكن السيطرة على هذا المرض بحقن الضرع بالمضادات الحيوية ، الذى يؤدى بدوره إلى تلوث اللبن ببقايا المضادات الحيوية التى قد تثبط نمو بادئات LAB .

أدخلت المضادات الحيوية فى الأربعينات لعلاج مرض التهاب الضرع فى ماشية اللبن . حالياً يعتبر مرض التهاب الضرع من أخطر المشاكل التى تؤثر على ماشية اللبن ، بالإضافة إلى الخسائر الاقتصادية لمصانع الألبان ، فإن هناك أيضاً عدد من النواحى الصحية المرتبطة بهذه المشكلة ، مثل تفاعلات الحساسية ، اضطرابات معوية وظهور بكتريا مقاومة . عدد المضادات الحيوية المستخدمة كبير، ويختلف الطلب على المضادات الحيوية من دولة إلى أخرى . من المضادات الحيوية الشائعة الاستخدام aminoglycosides, pencilillin ، tetracycline ، sulfa drugs, marrolides . مستويات المضادات الحيوية اللازمة لتثبيط السلالات المختلفة للبادئ تعتمد بدرجة كبيرة على السلالة (جدول ١-٤). مزارع بادئات الحرارة المعتدلة mesophilic أقل حساسية للبنسلين و spiramycin وأكثر حساسية للستربتوميسين cloramphenicol, streptomycin عن مزارع بادئات

الحرارة المرتفعة thermophilic ، لكن وجدت سلالات من بادئ *Str.thermophilus* حساسة للستربتوميسين .

وعموماً يمكن القول من نتائج البحوث المتوفرة فى هذا الشأن ، أن المستويات المنخفضة من المضادات الحيوية تسبب أنواعاً مختلفة من العيوب فى الجبن: أطعمة غير مرغوبة off-flavors ، تركيب بنائي غير متجانس ، تكوين عيون غير متجانسة وحدوث تخمر حامض البيوتريك . يمكن ملاحظة التأثير على بكتريا حامض البروبيونيك فى تكوين العيون فى جبن الأمينتال وعيب البقع بنية اللون brown spot التى تسببها الستربتوميسين فى منتجات الألبان المتخمرة ، ينحصر تأثير المضادات الحيوية فى بطء أو منع تكوين الحامض وكذلك فى عدم تكوين النكهة .

جدول (١-٤) : حساسية البادئات المحبة للحرارة المعتدلة والمرتفعة للمضادات الحيوية المختلفة.

المضاد الحيوى	التركيز	مزارع البادئات	
		الحرارة المتوسطة (٢)	الحرارة المرتفعة (١)
Penicillin	IU/ml	٠,٠١-٠,٠٠٥	٠,٠١-٠,٠٠٤
Tetracyclin	µg/ml	٠,٢-٠,٠٥	٠,٥-٠,٣
Streptomycin	µg /ml	١,٠-٠,٥	٥,٠-٠,٥
Cloramphenicol	µg /ml	٠,٣-٠,٢	١,٠-٠,٥
Spiramycin	IU/ml	٤,٠-٢,٠	٠,٥-٠,٣

(١) ٣٢ سلالة من *Str.thermophilus*

(٢) سلالات فردية من *Lc.lactis* ssp. l*actis / cremoris / diacetylactis* و ٣ مزارع مختلطة (DL) .

تختلف حساسية هذه البكتريا للمضادات الحيوية الشائعة الأستخدام فى معالجة مرض التهاب الضرع كما يتضح فى الجدول (١-٥) . جميع LAB أكثر حساسية للبنسلين عن cloxacillin ، الذى يستخدم عادة فى علاج مرض التهاب الضرع فى فترة الجفاف dry perriod . Lactococci أكثر حساسية للأستربتوميسين والتتراسيكلين وأكثر مقاومة للبنسلين عن *Str.thermophilus* و

Lactobacilli المحبة للحرارة المرتفعة . هناك قليل من المعلومات متوفرة بالنسبة إلى مستويات المضادات الحيوية اللازمة لتثبيط Leuconostocs وبكتريا حامض البروبيونيك المستخدمة فى صناعة الجبن السويسرية ، لكن بالنسبة لبادئات LAB الأخرى ، يوجد تباين فى درجة حساسيتها للمضادات الحيوية الشائعة الاستخدام فى علاج مرض التهاب الضرع (جدول ١-٤) ، من هذه النتائج يتضح أن بادئات الحرارة المعتدلة mesophilcs أقل حساسية للبنسلين وأكثر حساسية للستربتوميسين عن بادئات الحرارة المرتفعة thermophilcs .

جدول (١-٥) : تركيز المضادات الحيوية (ميكروجرام/مل) الذى يثبط نمو بكتريا البادئات فى اللبن بمعدل ٥٠ %.

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

هذه المضادات الحيوية يتم تقديرها بصفة روتينية عند تصنيع الألبان ، خاصة إذا كان اللبن يستخدم فى صناعة منتجات الألبان المتخمرة التى تعتمد على عمليات تخمر مرغوبة . عادة تستخدم طريقة agar diffusion باستخدام *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (كميكروب اختبار) نظراً لأرتفاع حساسيته للمضادات الحيوية . كما يستخدم أيضاً تثبيط تقدم الحموضة بواسطة LAB حساسة للمضادات الحيوية للكشف عن بقايا المضادات الحيوية فى اللبن . عادة يضاف دليل pH (bromcresol purple) أو دليل أكسدة وإختزال redox (triphenyl tetrazolium chloride, methylene blue ، resazurin) مع المزرعة culture إلى اللبن ، الذى يحضن عند ٤٥°م لعدة ساعات . الألبان المحتوية

على بقايا مضادات حيوية لا يطرأ عليها تغيير مرئى على لون الدليل المضلف . فى فرنسا ، يستخدم دليل bromcresolpurple مع *Str.thermophilus* كميكروب اختبار فى هذا المجال.

٦-٢- المواد المنظفة والمطهرة

بالإضافة للمضادات الحيوية ، تحدث أحياناً صعوبات فى عمليات التخمر ترجع إلى وجود آثار من المواد المنظفة والمطهرة فى اللبن . قد تنشأ هذه البقايا من عدم الشطف الجيد لخطوط الأنابيب ، خزانات التخزين وغيرها ، أو من الإضافة عن عمد بواسطة المنتج لتقليل الحمولة الميكروبية فى اللبن وتحسين جودته الميكروبيولوجية . إذا لم يتم فى المصنع ، لأى سبب ، عدم الشطف بعد عملية التنظيف cleaning والتطهير disinfection، فإن كمية المواد المطهرة التى تصل إلى اللبن قد يكون لها تأثير ضعيف ، إذا وجدت ، على عملية التخمر . عموماً ، فإن تركيز الكلور النشط الذى يثبط Lactococci يختلف من ١٠ إلى ٥٠ ميكروجرام/مل . المواد المطهرة الأخرى الشائعة الأستعمال H_2O_2 ، أيدوفور iodophors ، مركبات الأمونيوم الرباعية quaternary ammonium compounds (QAC) تستخدم بتركيزات أقل (١-١٠ ميكروجرام/مل) . للحصول على هذه التركيزات من المطهرات فى اللبن فإنه يجب إضافة كميات كبيرة إلى اللبن . *Str.thermophilus* أقل حساسية لتأثير هذه المواد المطهرة عن Lactococci ولكن *Leuconostoc* spp. تكون حساسة بصفة خاصة لمركبات QAC.

وقد وجد أن بعض سلالات Lactococci قد تم تثبيط نموها فى وجود ٢-٤ ملليجم من مركبات QAC /لتر ، عدا سلالة واحدة استطاعت أن تقاوم حتى ١٢ ملليجم من هذه المركبات /لتر . بادئات اليوجهورت أكثر مقاومة ، والمستويات المثبطة لنمو *Str.thermophilus, Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* من مركبات الكلورين ومركبات QAC ومركبات اليود يبلغ ١٠٠ ، ١٠٠-٥٠٠ ، ٦٠ ملليجم/لتر على الترتيب.

تلوث لبن البادئ بـــهذه المركبات يرجع لأخطاء بشرية أو فنيـــة فىدورة الغسيل الأتوماتيكية . لذلك يجب التأكد من أن دورة الشطف تستغرق وقتاً كافياً لإزالة هذه المركبات الكيماوية من خزان البادئ النهائى.

٦-٣- البكتريوسينات

البكتريوسينات bacteriocins عبارة عن بروتينات تنتجها البكتريا ، لهـــا تأثير قاتل bactericidal أو مثبط bacteriostatic ضد البكتريا المرتبطة (متشـــابه الصفات) . كما أن بعض هذه البكتريوسينات قد تكون ليبوبروتـين lipoprotein أو جليكوبروتين glycoprptein . يرجع اكتشـــاف المـــواد المضـــادة للبكتريـــا antibacterial substances ، التى تعرف بالكوليسينات colicins ، التى تنتجـــها *E.coli* ، إلى العشرينات . المواد المثبطة الشبيه بالكولســـينات ، تنتجـــها أيضـــاً البكتريا الموجبة لجرام وتشمل جميع أجناس بكتريا الألبان والأغذية المتخمرة مـــن بكتريا LAB.

وقد أقترح لفظ بكتريوسين bacteriocin بواسطة العالم Jacob ومسـلعديه فى بداية الخمسينات . وقد تم تعريف البكتريوسينات على أنـــها مضادات حيويـة بروتينية protein antibiotics ذات وزن جزيئى مرتفع نسبياً ، وتؤثر أساساً على البكتريا من نفس النوع أو أنواع متشابه . بالرغم من أن هذه الصفات تســـتخدم بواسطة كثير من الباحثين لتمييز البكتريوسينات الناتجة بواسطة LAB ، فإن قليـــل من البروتينات المضادة للميكروبات ينطبق عليها هذه الصفات .

التضاد الميكروبى لبعض سلالات من مجموعـة N streptococci (تعـــرف حالياً بـــLactococci) ، التى تثبط نمو Lactobacilli ، تم التعرف عليه لأول مـرة بواسطة العالم Rogers فى عام ١٩٢٨ ، وبعد ذلك بواسطة العالم Whitehead فى عام ١٩٣٣ ، وتحديد طبيعة هذه المواد المثبطة على أنـــها مواد بروتينيـــة . بعـــد أكثر من عشر سنوات فيما بعد ، وجد أن فشل أو بطء سير الحموضـــة أثنـــاء صناعة جبن التشدر يرجـــع إلى مـــزارع البـــادئ أكـــثر منـــه للبكتريوفـــاج bacteriophage و/أو وجود المضادات الحيوية antibiotics . وقد تم عزل المـــواد الميكروبية وتركيزها، ووجد أن لها نشاط مثبط ضد أنواع من الميكروبات المرضية،

حيث قسمت كمضاد حيوى أطلق عليه نيسين nisin . وقد أشتق أسم النيسين من N streptococci In hibitory Substance (الحرف الأول من كل كلمة أى nis) مع إضافة in إليها ، وهى النهاية المعروفة لأسماء المضادات الحيوية ، ويصبح الأسم nisin .

ويعتبر النيسين وهو البكتريوسين الوحيد من LAB الذى وجد له أهمية تجارية ، وقد تم اعتماده فى عام ١٩٦٩ بواسطة منظمة الصحة العالمية WHO كمادة مضافة للغذاء food additive ، وقد استخدمت على نطاق واسع لهذا الغرض فى أوروبا . فى عام ١٩٨٨ ، وافقت إدارة الأغذية والأدوية FDA فى الولايات المتحدة الأمريكية على استخدام النيسين فى عدد محدود من مفرودات الجبن المبستر pasteurized cheese spreads ، حيث أن المحتوى المرتفع من الرطوبة والمنخفض من الصوديوم ، لا يمنع من مخاطرة تكوين سم البوتيولين botulinal toxin فى الناتج .

باستثناء النيسين وعدد قليل جداً من المواد المثبطة ، فإن تسمية البكتريوسينات تشبه لحد ما تسمية الإنزيمات ، حيث يضاف مقطع "ase" لنشاط أنزيم محلل للبروتين ، عادة يلحق مقطع "cin" -بأسم جنس أو نوع الميكروب الذى يعطى البكتريوسين .جدول (١-٦) يبين مجال نشاط بعض البكتريوسينات الناتجة بواسطة LAB . يرجع إلى الفصل الثاني عشر لمزيد من المعلومات عن بكتريوسينات بكتريا حامض اللاكتيك .

٦-٤- اللاكتينات Lactenins

ظهر هذا التعبير "لاكتنين Lactenin" عام ١٩٣٠ ، لوصف تثبيط LAB فى اللبن . كان يعتقد لفترة طويلة أن لاكتنين L2, L1 يكون نشطاً ضد *Str.pyogenes* ، ولاكتنين L3, L2 يكون نشطاً ضد Lactococci . ومن المعروف حالياً أن عدة مجموعات من المواد تساهم فى هذا النشاط ، حيث وجد أن لاكتنين L3, L1 عبارة جلوبيولينات مناعية immunoglobulins أو أجلوتينات agglutinins وأن لاكتنين L2 عبارة عن نظام Lactoperoxidase-thiocyanate- H_2O_2 system .

جدول (١-٦) : مجال نشاط بعض بكتريوسينات LAB.

البكتريوسين	الميكروب المنتج	مجال النشاط
Nisin	*Lc. lactis*	*Lactococcus, Lactobacillus,Clostridium, Bacillus,Listeria.*
Diplococcin	*Lc.lactis* ssp. *cremoris*	*Lactococcus*
Lactostrepcin	*Lc. lactis*	*Lactococcus, Enterococcus, Lb. helveticus, Leuconostoc, Clostridum*
Bac	*Lactococcus*	*Lactococcus, Lactobacillus, Ent. faecalis, Pediococcus, Leuconostoc, Clostridum*
Bac	*Lc. lactis*	*L.b. helveticus, Lis. monocytogenes*
Lacticin 481	*Lc. lactis*	*Lactococcus, Lb. bulgaricus, Lb. helveticus Leuconostoc, Str. thermophilus, Cl.tyrobutyricum*
Lactococcin A	*Lc. lactis* ssp. *cremoris*	*Lactococcus* spp.
Lactocin 27	*Lb. helveticus*	*Lb. helveticus, Lb. acidophilus*
Helveticin J	*Lb. helveticus*	*Lb. helveticus, Lb. bulgaricus, Lb. casei*
Bac	*Lb. fermentum*	*Lactobacillus* spp.
Lactacin B	*Lb. acidophilus*	*Lb. leichmanii, Lb. bulgaricus, Lb. helveticus, Lb. Casei*
Lactacin F	*Lb. acidophilus*	*Lb.leichmanii, Lb. bulgaricus, Lb. helveticus, Lb. casei, Lb.fermentum, Ent. faecalis.*
Plantaricin A	*Lb. plantarum*	*Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, Ent. faecalis*
Plantaricin B	*Lb. plantarum*	*Lb. plantarum, Leuc. mesenteroides, Ped. damnosus*
Plantaricin S	*Lb. plantarum*	*Lactobacillus, Leuconostoc, Lactococcus, Pediococcus*
Sakacin A	*Lb. sake*	*Lactobacillus, Lis. monocytogenes*
Lactocin S	*Lb. sake*	*Lactobacillus, Leuc. mesenteroides, Ped. acidilactici Ped. pentosaceus*
Caseicin 80	*Lb. casei*	*Lb. casei*
Brevicin 37	*Lb. brevis*	*Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus*
Pediocin A	*Ped. pentosaceus*	*Lactococcus, Lactobacillus, Closridium, S. aureus, B. cereus, Lis. monocytogenes*
Pediocin AcH	*Ped. acidilactici*	*Lactococcus, Lactobacillus, Clostridum, S. aureus, B cereus, Lis monocytogenes.*
Pediocin PA-1	*Ped. acidilactici*	*Lactococcus, Lactobacillus, Lis. monocytogenes*
Bac	*Ped. acidilactici*	*Pediococcus, Ent. faecalis, Lis. monocytogenes*
Mesentericin Y 105	*Leuc. mesenteroides*	*Lis. monocytogenes, Lis. ivanovii, Lis. innocua, Lis. seeligeri, Lis. welshimeri*
Mesentericin 5	*Leuc. mesenteroides*	*Lis. monocytogenes, Lis. ivanovii*

obeikandl.com

٦-٤-١- الجلوبيولينات المناعية Immunoglobulins

يوجد خمس أقسام للجلوبيولينات المناعية (Ig) : IgA ، IgG ، IgM ، IgD ، IgE ، يمكن تمييزها عن بعضها على أساس محتوى الأحماض الأمينية والتركيب البنائى . يوجد IgA ، IgG, IgM فقط فى اللبن . يختلف تركيز الجلوبيولينات المناعية بدرجة كبيرة بين السرسوب واللبن (جدول ١-٧) . جميع الجلوبيولينات المناعية بروتينات ، والتركيب البنائى الأساسى لها يماثل التركيب البنائى للـIgG ، الذى يتكون من سلسلتين خفيفتين light متماثلتين (الوزن الجزيئى ٢٣ kDa) وسلسلتين ثقيلتين heavy ومتماثلتين (الوزن الجزيئ ٥٣ kDa) . ترتبط الأربع سلاسل بواسطة روابط أو كبارى bridges من disulfide، والجزئى الكامل يصل وزنه الجزيئى إلى ١٨٠ kDa .

يتكون الموقعين المتماثلين لارتباط الأنتجين antigen binding sites من أجزاء الطرف الأمينى N-terminal من سلسلة واحدة ثقيلة وسلسلة أخرى خفيفة. تنقسم IgG البقرى إلى قسمين IgG2, IgG1 طبقاً للهجرة الكهربائية وكذلك قدرتها الأنتجنية antigenicity .

جدول (١-٧) : تركيز الجلوبيولينات المناعية فى لبن وسرسوب البقر والإنسان .

الجنس	نوع الجلوبيولين	التركيز (ملليجم/مل)	
		السرسوب	اللبن
الأم	IgG	٠,٤	٠,٠٤
	IgA	١٧,٤	١,٠
	IgM	١,٦	٠,١
البقر	IgG1	٤٧,٦	٠,٥٩
	IgG2	٢,٩	٠,٢٠
	IgA	٣,٩	٠,١٠
	IgM	٤,٢	٠,٠٥

لفترة طويلة كان غير واضحاً كيف يحتوى اللبن على أجسام مضادة نشطة ضد بعض لبكتريا . وكان معروفاً أن الأجسام المضادة فى اللبن متماثلة للأجسام المضادة الموجودة فى السيرم وغيرها من أفرازات الجسم ، لكن تركيزات هذه الأجسام فى اللبن أعلى من الموجودة فى السيرم ، وهذا يوضح إفراز IgG من السيرم إلى اللبن . يتكون IgM, IgA من IgG فى الغدة الثديية بواسطة خلايا البلازما plasma cells التى هاجرت إلى الضرع.

أ- التأثير على بادئات بكتريا حامض اللاكتيك

قسم واحد من الجلوبيولينات المناعية ،.الأجلوتينات agglutinins ، يكون له تأثير ضار على بعض البادئات . يحتوى البادئ عادة على ١٠^{9} بكتريا /مل ، التى تكون منتشرة بصورة متجانسة فى اللبن . فى وجود الأجلوتنيات ، يحتجز بعض Lactococci فى حبيبات الدهن ويصعد إلى سطح اللبن مع طبقة القشدة عندما يترك اللبن ساكناً ، مسبباً تثبيط ظاهرى للحموضة . ترتبط الأجلوتينات بدرجة هشة مع الدهن مما يدل على أن دور الدهن يكون أساساً طبيعياً physicaI. السلالات الحساسة للأجلوتنينات يتم تثبيطها أيضاً بواسطة اللبن الفرز بمعدل مماثل تقريباً لما يحدث فى اللبن الكامل ، لكن فى هذه الحالة تترسب تجمعات خلايا البكتريا إلى قاع وعاء النمو .

الدراسات الطبيعية الكيماوية على الشقوق المختلفة المتحصل عليها بواسطة geI filtration للجوبيولين الحقيقى الخام crude euglobulin تدل على أن عامل التجمع agglutinating factor يكون مرتبطاً مع IgM ، ويتضمن ذلك ثلاث مجموعات من الجلوبيولينات المناعية . المجموعة الأولى عبارة cryoglobulin ، الذى يعمل على تجميع حبيبات الدهن. المجموعة الثانية وهى أيضاً cryoglobulin، والذى يساعد على إلتصاق البكتريا بحبيبات الدهن . عند درجة حرارة منخفضة ، فإن كل من هاتين المجموعتين من الأجسام المضادة تدمص بدرجة كبيرة على حبيبات الدهن وتكون أكثر نشاطاً . المجموعة الثالثة من الأجسام المضادة تعمل على تجميع البكتريا ، هذه المجموعة لا يمكن فصلها من الجلوبيولين الحقيقى eugbdulin بواسطة الترسيب البارد أو عند درجات حرارة منخفضة ، لذلك لا

يعتقد أن يكون شق cryoglobulin ، عند درجات حرارة أقل لا يسبب زيادة فى نشاط هذه الأجسام . تختلف جميع سلالات البادئ فى درجة حساسيتها للأجلوتينات ، حيث أن بعض هذه السلالات تكون مقاومة فى ضوء دراسات الأدمصاص ، هذه الأجسام المضادة يبدو أنها نوعية ، حيث أن السلالات المختلفة تتجمع بواسطة أجسام مضادة مختلفة . وتنطبق هذه الحقيقة على الأجسام المضادة التى تربط البكتريا بحبيبات الدهن.

ب- تأثير العوامل التكنولوجية

تأثير المعاملة الحرارية للبن أو تجنيس اللبن على البادئات معروف منذ فترة طويلة . فمثلاً تسخين اللبن عند ٧٨°م لمدة ١٥ ثانية يمنع تكوين طبقة القشدة وبالتالى تجميع البكتريا ، كما يقل التثبيط بتجنيس الدهن أو بواسطة التقليب الشديد .

كما يحدث تثبيط للتجمع agglutination بواسطة المنفحة ، حيث أن التجبن يمنع طبيعياً القشدة وكذلك البكتريا من الصعود إلى السطح . لذلك فإن الجلوبيولينات المناعية لا تستطيع تثبيط بكتريا البادئات إذا أضيفت المنفحة مباشرة بعد إضافة البادئ . وهذه الملاحظات تعضد إستبعاد فترة تسوية اللبن فى صناعة الجبن قبل إضافة المنفحة .

صناعة جبن Cottage بصفة خاصة حساسة للتثبيط بالأجلوتينات . يصنع هذا الجبن من لبن فرز مبستر عند درجات حرارة منخفضة ، وتستخدم فقط كميات صغيرة من المنفحة . وقد لاحظ بعض الباحثين تكوين حبيبات مترسبة فى قاع الأحواض عندما تستخدم سلالات بادئ معين . تتميز هذه الرواسب بتركيزات مرتفعة من البكتريا ، قيم pH منخفضة وحموضات مرتفعة . أثناء عملية الطبخ التالية للخثرة ، فإن الرواسب تتفتت إلى جزيئات دقيقة مع تركيب رملى sandy texture ، مسبباً انخفاضاً فى محصول وجودة الجبن.

الطريقة المفضلة للتغلب على هذه المشاكل هو استخدام سلالات مقاومة للأجلوتنينات . يمكن استخدام أختبار بسيط لكشف الفعل المحتمل للأجلوتنيات ضد البادئ ، حيث تلقح أنبوبتي أختبار ، أحدهما تحتوى على لبن فرز خام

والأخرى تحتوى على لبن فرز معقم (للمقارنة) ، بالمزرعة المراد اختبارها ، يضاف دليل عباد الشمس إلى كل من الأنبوبتين . السلالات المقاومة للأجلوتنين تخـــتزل وتكون حموضة فى لبن عباد الشمس فى كلا من المزرعتين ، بينمـــــا الســـلالات الحساسة للأجلوتنين تختزل وتحمض لبن عباد الشمس المعقم فقط ، يمكن أن تختزل عباد الشمس فى أنبوبة لبن الفرز ، لكن عند قاع الأنبوبة فقط حيث أن تجمعـلت خلايا البادئ تترسب.

٦-٤-٢- نظام اللاكتوبيروكسيديز / ثيوسيانات / فوق أكسيد الأيدروجين

Lactoperoxidase-thiocyanate – H_2O_2 system

يرجع هذا النظام المثبط إلىتفاعل ثلاث مكونـــــات : lactoperoxidase (LP), H_2O_2, SCN^- . يوجد LP فى اللبن بتركيزات حوالى ٣٠ ملليجـــم/لـــتر . عموماً فإن إنزيمات peroxidase يساعد التفاعلات التى يتم فيها إختـــزال H_2O_2 وأكسدة مولد الكترون electron donor مناسب (SCN^-) . يقاوم LP قيـــم pH الحامضية (pH ٣,٠) ويقاوم الأفرازات المعوية ، كما أنه مقاوم للحرارة نسبياً ولا يتلف عند درجات حرارة بسترة HTST . LP ليس مثبط بذاته ، ولكنه يكـــون مثبطاً فى وجود SCN^- كمولد إلكترون . ينتشر هذا الأنيون على نطاق واســع فى أفرازات وأنسجة الحيوان ، يختلف تركيزه فى اللبن من ١ إلى ١٠ ميكروجرام/مـل الذى يعكس نوع العليقة التى يتناولها الحيـــوان. ينتـــج SCN^- فى الكبـــد مـــن الجلوكسيدات glycosides المحتوية على سيانيد فى عليقة ماشية اللـــبن ، خاصـــة العائلة الصليبية (مثل الكرنب) . فوق أكسيد الأيدروجين (H_2O_2) ليـــس مـــن المكونات الطبيعية فى اللبن ، يمكن إنتاجه فى اللبن بواسطة LAB ، حيث أن اللبن يحتوى على أكسجين ذائب . تؤدى عدة تفاعلات إلى تراكم H_2O_2 فى LAB ، ولكن جميع هذه التفاعلات لا توجد فى كل سلالة . يجب ملاحظـــة أن H_2O_2 نفسه قد يكون مثبطاً لبكتريا البادئ ، وخاصة بكتريا حامض اللاكتيك العصويـــة Lactobacilli والكروية Streptococci المحبة للحرارة المرتفعة thermophilic.

أ- آلية التأثير Mechanism of action

فى وجود H_2O_2 يقوم LP بأكسدة SNC^- ، أساساً إلى نواتج غير مثبطة (SO_4^{2-}, CO_2, NH_3). من خلال هذه التفاعلات ، يتم أيضاً إنتاج مكونات وسطية سامة ، مثل (hypothiocyanate) $OSCN^-$ أو O_3SCN^-, O_2SCN^- (oxyacids). هذه الأنيونات تكون نشطة جداً وتستطيع أن تؤكسد مجاميع سلفادريل SH groups فى الإنزيمات المشاركة فى النشاط الأيضى للميكروبات . لذلك ، يتم تثبيط hexokinase تماماً ، بينما تثبط إنزيمات 6-phosphoglyconate, dehydrogenases, aldolases جزئياً . يسبب نظام LP خلل أو تلف غشاء السيتوبلازم ، مما يسبب فقد أيونات K^+ ، الأحماض الأمينية والببتيدات . بالإضافة إلى ذلك ، يتم تثبيط أنظمة أنتقال السكر والأحماض الأمينية وكذلك تكوين DNA ، RNA والبروتين . يعتبر نظام LP مثبط bacteriostatic للـ *Lc.lactis* ولكن قاتل bactericidal للـ *E.coli* وكثير من البكتريا السالبة لجرام ، مما يوضح أهمية تركيب غلاف الخلية فى أسلوب تأثير هذا النظام . تحتوى بعض سلالات Lactococci على إنزيم يعمل على إختزال المكونات الوسطية المثبطة ، مثل هذه السلالات تكون مقاومة للنظام المثبط . فى اللبن الخام ، يمكن أن يكون النظام مثبط قوى إذا كان H_2O_2 موجوداً أيضاً ، حيث أنه يزيد من تأثير H_2O_2 بحوالى ١٠٠ ضعف . لذلك فإن H_2O_2 ذاته مثبطاً للـ Lactococci عند تركيز ١ مول /لتر ، لكن ١٠ مول/لتر يكون كافياً ليحدث تثبيط مع نظام LP .

ب- الأهمية التكنولوجية

اللبن الخام الذى تعرض إلى معاملة حرارية معتدلة ، مثل البسترة (٧٢°م/١٥ثانية) ، قد يكون مثبطاً لنمو البادئ مقارنة باللبن الذى تعرض لمعاملات حرارية أقوى . يستخدم اللبن المبستر عادة فى صناعة الجبن ، لذلك فإنه من المهم اختيار البادئات من حيث قدرتها على النمو بدرجة جيدة فى اللبن .

وقد أشارت بعض الدراسات إلى تثبيط نمو بعض البادئات المختلطة السلالة والمحبة لدرجات الحرارة المعتدلة فى اللبن الذى تعرض لمعاملة حرارية منخفضة ،

ولكن ليس فى لبن معامل حرارياً لدرجات حرارة مرتفعة ، ومع ذلك يحدث تثبيط مرة ثانية عندما يدعم اللبن المعامل حرارياً لدرجات حرارة مرتفعة بنظام LP المثبط.

نتيجة للأستجابة المختلفة للسلالات لنظام LP المثبط ، فإن النقل المتعاقب فى اللبن يمكن أن يؤثر على قدرة البادئات المختلطة السلالة على إنتاج الحموضة مع الوقت . وقد أوضحت نتائج دراسة مقارنة سلوك عدة بادئات مختلطة السلالة تنقل يومياً لمدة ٥,٥ أسبوعاً فى اللبن المبستر أو لبن معامل بالبخار steamed milk، أن النقل فى اللبن المبستر عموماً يؤدى إلى بادئ أفضل نشاطاً .

وقد أشار بعض الباحثين إلى تأثير فصل السنة على تثبيط البادئات فى اللبن، حيث وجد تثبيط أكبر فى الشتاء عنه فى الصيف . قد تعزى هذه الظاهرة إلى اختلافات فى التغذية ، التى بدورها تسبب اختلافاً فى تركيز SCN^- فى اللبن . وقد أشارت بعض التقارير إلى وجود ارتباطاً مباشراً بين تركيز SCN^- والقوة المثبطة لنظام LP . وقد وجد أنه يمكن الوصول إلى الحد الأقصى من التثبيط inhibition عندما يكون تركيز SCN^- يقع بين ٠,٢٣ إلى ٥,٨ ملليجم/لتر.

٦-٥- الأحماض الدهنية الحرة

الأحماض الدهنية الحرة free fatty acids تكون مثبطة أيضاً لبعض LAB . تنتج هذه الأحماض من دهن اللبن من خلال تأثير الليبيز lipase ، الذى يوجد طبيعياً فى اللبن . الجليسريدات الثلاثية فى اللبن يتم حمايتها من تأثير الليبيز بواسطة غشاء يحيط بحبيبات الدهن الذى يتكون أساساً من الفوسفوليبدات ، لكن تحلل الدهن يصبح ممكناً إذا تعرض اللبن إلى معاملات تسبب تلف هذا الغشاء . عملية التبريد يمكن أن تغير من الغشاء وتؤدى إلى إفراز الجليسريدات الثلاثية ، التى تصبح عرضة لفعل الليبيز . دخول الهواء إلى اللبن (التهوية) وتكوين الرغاوى تسرع من تحلل الدهن.

كما أن البكتريا المتحملة البرودة psychrotrophic bacteria (مثل *Pseudomonas flourescens* أو *Ps.putida*) ، التى تتكاثر عند درجات حرارة منخفضة (حوالى ٤°م) ، وتنتج إنزيمات ليبيز ، على جانب كبير من الأهمية .

هذه الإنزيمات المحللة للدهن تكون خطيرة ليس فقط لأنها نشطة عند درجات الحرارة المنخفضة ، لكن أيضاً لأنها ، على عكس البكتريا المنتجة لها ، تكون مقاومة للحرارة . البسترة العادية تتلف هذه الإنزيمات .

تختلف استجابة سلالات Lactococci للأحماض الدهنية . يتم الوصول إلى الحد الأقصى من التثبيط مع أحماض الكابريليك caprylic ، الكابريك capric ، اللوريك lauric ، مع حامض الأوليك oleic فى حالة السلالة C13 . يمكن الوصول إلىالمستويات المثبطة من الأحماض الدهنية فى اللبن المخزن تحت ظروف غير مناسبة . يتم تثبيط نمو السلالة C13 بواسطة تركيزات منخفضة نسبياً من حامض الأوليك ، ومن المتوقع أن أعداد خلايا هذه السلالة تنخفض فى المراحل الأولى من تسوية الجبن التشدر نتيجة لتراكم هذا الحامض الدهنى . يرجع التثبيط إلى التأثير على نفاذية غشاء الخلية ، بحيث يصبح من الصعب على الخلية المحافظة على ΔpH (الجهد نتيجة أختلاف pH على جانبى الغشاء) . بالإضافة إلى ذلك ، فإن حامض الأوليك مثبط نوعي spcific لأنزيم pyruvate dehydrogenase ويمكن أن يمنع تكوين مكونات النكهة مثل ثنائى الأسيتيل ، الأسيتالدهيد والأيثانول . بعض سلالات Lactococci تنتج أنواع variants تستطيع أن تقاوم التثبيط بواسطة الأحماض الدهنية الحرة .

٦-٦- أنظمة مثبطة أخرى

يحتوى اللبن الطبيعى الناتج من حيوانات سليمة على ١ إلى ٥ ×١٠^٥ خلايا جسمية somatic cells لكل مل . بعض هذه الخلايا ، خاصة الخلايا مفصصة النواه polymorpholeukocytes ، تحتوى على بيروكسيديز peroxidase وتتميز بصفات مضادة للميكروبات مماثلة لنظام LP فى اللبن الخام . النشاط المثبط لهذه الخلايا ضد البادئات لم تحدد بدقة.

تلتهم خلايا الدم البيضاء، الموجودة فى لبن المواشى المصابة بالتهاب الضرع، ميكروبات البادئ ، ولا تؤدى الحرارة إلى تحسن ملحوظ . وقد لوحظ أن مزارع بادئ اليوجهورت قد يحدث لها تثبيط ، إذا كان ٣٥ % من اللبن يحتوى على عدد كبير من الخلايا الجسمية ، إلا أن غلى اللبن لمدة دقيقتين أو تسخينه إلى

٩٠°م لمدة ٢٠ دقيقة يؤدى إلى إبطال فعل المواد المثبطة ويساعد على التقدم الطبيعى للحموضة .

يحتوى اللبن أيضاً على بروتينات محتوية على عناصر معدنية metalloproteins الذى يرتبط بصفة نوعية بالحديد Fe^{2+} ويثبط جزئياً التخمر نتيجة نقص الحديد iron deficiency . اللاكتوفرين lactoferrin أهم هذه البروتينات المعروفة ، وهو عبارة عن جليكوبروتين glycoprotein وزنه الجزيئ ٨٠ kDa الذى يرتبط بأيونين من Fe^{2+} لكل جزئى بروتين . يحتوى اللبن البقرى على لاكتوفرين بتركيز أقل ١٠٠ ضعف من تركيزه فى لبن الأم (١,٦ مقابل ١٦٠ ملليجم/مل) لكن تركيزه يكون أعلى فى السرسوب colostrum ولبن التهاب الضرع mastitic milk . يتميز هذا البروتين بتأثير مثبط bacteriostatic ، ويحتاج إلى HCO_3^- لنشاطه. هذه الأنظمة لها أهمية ثانوية فى الحد فى نمو البادئلت، التى ليس لها احتياجات من الحديد ، بعض البكتريا الأخرى الملوثة للبن قد تثبط جزئياً .

يحلل الليسوزيم lysozyme (1,4-N- acetylmuramidase) جدار خلايا البكتريا الموجبة لجرام . هذا الأنزيم مقاوم للحرارة ويوجد طبيعياً فى اللبن البقرى بتركيزات صغيرة (١٣٠ ميكروجرام/لتر) ، يوجد بتركيزات مرتفعة فى لبن الأم (٣٩٠ ميكروجرام/لتر) .من المحتمل أن يثبط LAB بدرجة ضعيفة عند التركيزات الموجودة فى اللبن البقرى . ليسوزيم زلال البيض ، عند إضافته إلى لبن الجبن بتركيزات ٣٥ ملليجم/لتر ، يمنع نمو وإنتاج الغاز بواسطة *Cl.tyrobutyricum* أثناء تسوية الجبن .

بعض LAB المحبة للحرارة المرتفعة ، مثل *Lb.helveticus* تكون حساسة بصفة خاصة لليسوزيم الخارجى . لذلك فإنه من الضرورى أختيار سلالات مقاومة لليسوزيم . سلالات *Lb.helveticus* المقاومة لـ ١٠٠ ميكروجرام ليسوزيم/مل من اللبن يمكن الحصول عليها بواسطة النقل المتعاقب فى اللبن المحتوى على هذا التركيز من الأنزيم ، توجد اختلافات وراثية فى حساسية الخلايا الفردية لليسوزيم .

٦-٧- البكتريوفاج (الفاج)

الفاج bacteriophage (phage) عبارة عن دقائق particles بالغة الصغر فى الحجم بدرجة لا يمكن رؤيتها إلا بالميكروسكوب الألكترونى بعد استخدام طرق صبغ مناسبة . جميع الفاجات لها رأس منشورية متعددة الأوجه ، يتراوح طول مقطعها العرضى بين ٥٠-١٠٠ nm ، عبارة عن غلاف بروتينى يوجد بداخلها جزئ مفرد من DNA ويماثل فى حجمه العديد من البلازميدات. فى معظم هذه الفاجات ، يلحق بالرأس ذيل يتكون من أنبوبة مركزية حلزونية (التى يمر من خلالها DNA الفاج عند غزو الخلية البكتيرية) محاطة بطبقة حلزونية قابلة للتقلص متصلة من أسفلها بصفيحة قاعدية base plate تتصل بألياف ذيلية رفيعة وطويلة ، وهذه الألياف هى أعضاء الأتصال بخلية العائل.

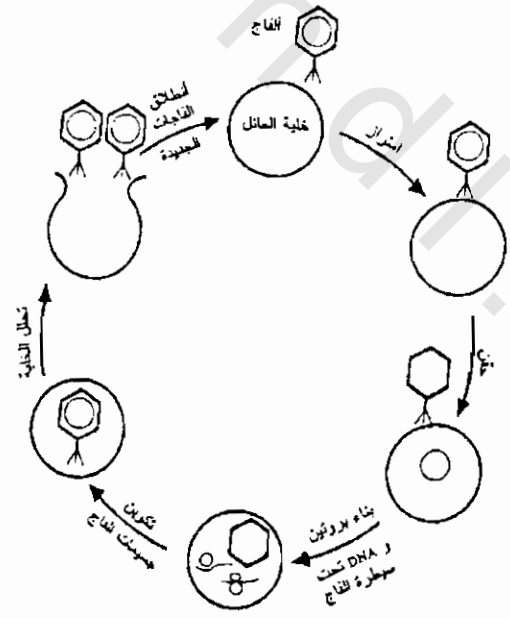
يسبب الفاج مشكلة خطيرة فى صناعة الجبن ، حيث يهاجم ويحلل خلايا البادئ . من الشائع أن يوجد الفاج فى بيئة مصانع الجبن أو فى البادئ نفسه ، الذى لا يؤثر على قدرة البادئ على إنتاج الحموضة . وقد أكتشف فاج بكتريا حامض اللاكتيك الكروية فى نيوزيلندا فى عام ١٩٣٥ . ومنذ هذا الوقت بذلت جهود كبيرة للتغلب على المشاكل التى يسببها الفاج . يوجد نوعان من الفاجات – الفاجات الضارية virulant phages والفاجات المعتدلة temperate phages ، ويمكن أن تدخل هذه الفاجات إلى بكتريا العائل من خلال علاقتين مختلفتين ، دورة التحلل lytic cycle والدورة اللايسوجينية (الدورة المولدة للتحلل) lysogenic cycle .

٦-٧-١- دورة التحلل

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

تبدأ هذه الدورة (شكل ١-٧) بإمتزاز ذيل الفاج عند مراكز استقبال معينة على سطح الخلية البكتيرية ، حيث يتقلص غلاف الذيل ويدخل الأنبوبة المركزية للذيل خلال جدار الخلية ويحقن DNA الفاج قريباً من غشاء الخلية . فى خلال

دقائق ، فإن DNA الفاج يتولى السيطرة على وظائف الخلية لكى يقـــوم ببنـــاء DNA وبروتينات الفاج لمضاعفة نفسه بمعدل أكبر من خلايا العـــائل ، وأخـــيراً تنفجر الخلايا وينطلق منها دقائق فاج حر يمكن أن تصيب خلايا جديدة ، لذلـك يطلق على هذه الفاجات "الفاجات الضارية virulent phage" . تعرف الفترة من الإصابة بالفاج حتى انطلاق الفاج بعد تحلل خلايا العائل بفترة التحضـــير latent period ، وعادة تكون قصيرة (٤٥-٦٠ دقيقة) ويكون عدد الفاجات الناتجة عند الأنفجار (حجم الانفجار burst size) مرتفعاً حيث يصل إلى ٢٠٠/خلية ، لذلك فإن إصابة الخلايا بمثل هذه الفاجات يمكن أن تؤدى إلى اتلاف قدرة خلايا البادئ تماماً على النمو وإنتاج حامض اللاكتيك . وقد وجد أن فترة دورة التحلل للفـاج PI-I الذى يصيب *Lb.casei* ٢٧٠ دقيقة وعدد الفاجات الناتجة ٢٠٠/خليـــة ، بينما للفاج LL-N الذى يصيب *Lb.lactis* فهى ٢٤٠ دقيقة وعـــدد الفاجـــات الناتجة ١٠٠/خلية ، أما بالنسبة Lactococci فإن متوسط دورة التحلل ٤٥ دقيقـة (تتراوح من ٣٢-٥٦ دقيقة) وعدد الفاجات الناتجة ٣٥/خلية (تتراوح مـــن ٢-١٠٥) .



شكل (١-٧) : دورة تحلل خلية العائل المصابة بالفاج

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

٦-٧-٢- الدورة اللايسوجينية (الدورة المولدة للتحلل)

الدورة اللايسوجينية مسار بديل لتكاثر الفاج ، إدمصاص الفاج وحقن DNA الفاج فى خلية العائل تكون مماثلة لما يحدث فى دورة التحلل lytic cycle السابقة ، لكن بدلاً من أن يتكاثر الفاج فإن DNA الفاج يتكامل عند موقع معين مع كروموسوم خلية العائل بعد الإصابة (يكوّن ما يعرف بالفاج الأولى prophage) ، ولا يسبب تحلل للخلية وتعرف الخلية البكتيرية المحتوية على نسخة من الفاج الأولى بالـ lysogenic cell ويطلق على هذه الفاجات " الفاجات المعتدلة temperate phage. قد يبقى DNA الفاج مستقلاً بذاته مثل أى من البلازميدات فى السيتوبلازم ، وقد يبقى هذا الفاج كامناً dormant فى الخلية ، لذلك فإن المزارع اللايسوجينية lysogenic المحتوية على فاجات حرة لا تؤثر على نمو أو قدرة هذه المزارع على إنتاج الحموضة . ومع ذلك يمكن حثه فى معظم الخلايا وإنطلاق الفاجات المعتدلة تلقائياً أو بواسطة الأشعة فوق البنفسجية UV أو المعاملة بمواد مطفرة مثل mitomycin C . ويمكن الكشف عن الفاج المنطلق من الخلايا على فترات باستخدام سلالات حساسة تعرف بالسلالات الكاشفة indicator strains ، أو بفحص السائل الرائق بالميكروسكوب الاليكترونى . وقد وجد أن معظم سلالات Lactococci بصفة أساسية لايسوجينية lysogenic والبعض الآخر متعدد اللايسوجينية multilysogenic ، أى يفرز أكثر من فاج معتدل . وعموماً فإن الفاجات عادة ما تصيب نوع واحد فقط من البكتريا وأن كان من الممكن أن يصيب عدد من الفاجات نوعاً واحداً من البكتريا.

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 تفرز الفاج تلقائياً من البادئات تساهم فى خفض مستويات الفاج فى البيئة . كما وجد آخرون أنه لا يوجد تشابه بين الفاجات اللايسوجينية (المعتدلة) lysogenic وفاجات التحلل lytic لعدد من سلالات Lactococci ، مما يدل على أن الفاجات المعتدلة temperate ليست مصدراً لفاجات التحلل (الضارية) . بالرغم من أن الفاجات قد وجدت فى بعض البادئات مختلطة السلالة ، إلا أن مصدرها الأساسى ما زال يحتاج إلى تحديد.

ما زالت 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 ما بين ٦٠٠ إلى ٦٠٠٠ فاج/مل يكون ضرورياً لإبطاء صناعة الجبن ، بينما أوضح البعض الآخر أن عدد ١٠٠ فاج/مل فى البداية مع معدل تكاثر ١ × ١٠^{٧} قد يؤثر بشدة على إنتاج الحموضة أثناء صناعة الجبن . كما وجد أن متوسط أعداد الفاج ١ × ١٠^{٥} /مل ، ٢,٤ × ١٠^{٨} /مل من الشرش الناتج عند صرف الشرش وعند الطحن ، على التوالى . هذه المستويات تدل على أن العدد الأولى يتراوح بين ٥ – ٥٠٠٠ فاج/مل ، عند المستوى الأقل فإن ذلك يعادل حوالى ٠,٠١ مل من الشرش الناتج عند مرحلة الطحن لكل ٦٠٠٠ لتر من اللبن . من الواضح أن هذا المعدل يعتبر مستوى منخفض جداً من التلوث ، الأمر الذى يحتاج إلى إتخاذ اجراءات وقائية صارمة للحد من هذا التلوث.

٦-٧-٣-كشف وعد الفاج

هناك طريقتان مختلفتان لكشف وعد الفاج dectection and enumeration of phage لبكتريا حامض اللاكتيك المصابة وتثبيط إنتاج الحموضة، وبصرف النظر عن الطريقة المستخدمة ، فإن مصدر الفاج يجب أن يتم ترشيحه من خلال مرشحات تعقيم (٠,٤٥ um) قبل أختبارها . وتجرى عملية طرد مركزى لبادئ الصناعة bulk starter قبل أن يتم ترشيح الرائق ، بينما عادة يرشح الشرش 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+}) ضرورية لعملية التصاق الفاج بسطح خلايا العائل ، لكن يترسب فى بيئات تحتوى على منظم فوسفات phosphate buffer ، وقد أمكن التغلب على ترسيب (Ca^{2+}) باستخدام بيئات تحتوى على منظم glycerophosphate الذى يستخدم لـ Lactococci ، *Str.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 (السلالة الكاشفة) إلى بيئة آجار معلق (معلق M17 أو MRS تحتوى على ٠,٧ % آجار) ، الذى يصب بسرعة على آجار صلب فى طبق بترى ، يجب ملاحظة أن تكون نسبة أعداد خلايا العائل إلى الفاج ≤ ١ ، أى أن احصائياً خلية واحدة تتعرض للإصابة بفاج واحد . بعض أنواع الفاج المحب للحرارة المعتدلة mesophilic phage يتضاعف بدرجة أسرع عند ٢١°م ، بينما البعض الآخر عند ٣٥°م ، لذلك يجب أن تحضن الأطباق عند ٢١ ، ٣٠ ، ٣٧°م . عند ٣٠ ، ٣٧°م يمكن رؤية plaque بعد ٥-٨ ساعات تخضين (plaque منطقة شفافة cleared zones تتكون نتيجة إصابة خلية واحدة بفاج واحد) ، ويمكن عدها لمعرفة عدد دقائق الفاج فى التخفيف المستعمل ويضرب فى معامل التخفيف للحصول على plaque-forming unit (pfu) /ml ، عادة تحضن الأطباق طوال الليل . تحضن الأطباق الخاصة بالفاجات المحبة للحرارة المرتفعة عموماً عند ٣٧ - ٤٠°م تحت ظروف هوائية لـ *Str.thermophilus* ، تحت ظروف هوائية أو لا هوائية لـ Lactobacilli . الفاجات المحبة للحرارة المعتدلة التى تتضاعف بسرعة عند ٣٥°م تعرف بـ "فاج اللبن الخام raw milk phage" ، لأنه يتضاعف بدرجة أفضل فى اللبن الخام أو المبستر عنه فى اللبن المعقم ويؤثر فقط على إنتاج الحموضة أثناء المراحل النهائية لصناعة الجبن .

فى طريقة تثبيط الحموضة acid inhibition method ، يضاف التخفيف المناسب للمصدر المراد اختباره ، والذى سبق ترشيحه بمرشحات تعقيم ، إلى

عينات من اللبن المبستر واللبن المعقم ويلقح ببكتريا العائل المناسب . ومن الأمور المهمة التحضين عند درجات حرارة مختلفة ، كما سبق الإشارة ، 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 إلى ٣٩°م فى خلال ٤٥ دقيقة ويحافظ على هذه الدرجة للفترة المتبقية وهى ٣ ساعات و ٤٥ دقيقة) وذلك للمزارع المحبة للحرارة المعتدلة. تحضن المزارع المحبة للحرارة المرتفعة عند ٤٢°م لمدة ٤ ساعات . بعد التحضين يقدر pH ويقارن بـ pH عينة المقارنة والتى لا تحتوى على شرش . الأختلاف فى حدود ٠,٣ وحدة pH أو أكثر عن عينة المقارنة يدل على احتمال الإصابة بالفاج .

يمكن الكشف عن فاج الحرارة المعتدلة ، الذى لا يكون plaque فى الأطباق ، بواسطة اختبار تثبيط الحموضة . ولتحديد ما إذا كان هذا الانخفاض فى الحموضة يرجع إلى الإصابة 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 اختبار التثبيط فى اللبن . نظراً لأن إنتاج الحموضة بواسطة البادئ فى اللبن هو التفاعل الأساسى فى صناعة الجبن ، فإنه يفضل متابعة الفاج بطرق تتضمن تثبيط إنتاج الحموضة فى اللبن بالرغم من أنها لا تعطى نتائج مؤكدة تدل على وجود الفاج مثل طريقة plaque .

٦-٧-٤-الوقاية من الفاج

تدوير rotation سلالات غير مرتبطة بالفاج تعتبر عملية هامة فى السيطرة على الفاج فى البادئات المعرّفة السلالة . تحتوى البادئات المختلطة على سلالات تختلف فى درجة حساسيتها للفاج . عند إصابة بادئ مختلط بالفاج ، فإنه قد يستعيد نشاطه بسرعة نتيجة نمو السلالات المقاومة للفاج . ولهذا السبب فإن تدوير سلالات البادئ لا يستخدم بصورة منتظمة مع البادئات المختلطة . ومع ذلك فإن بادئات مختلطة السلالة التى نشطت تحت ظروف معقمة فى المعمل (L.cultuers) 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، لكن النتائج المتوفرة تدل على أن المعاملة الحرارية غير فعالة فى تثبيط الفاج ، لذلك فإن اللبن المستخدم فى إنتاج بادئ الإضافة يسخن عموماً إلى ٩٠°م لمدة ٢٠ دقيقة.

إصابة بادئ الإضافة bulk starter بالفاج يكون أكثر خطورة من إصابة لبن الجبن بالفاج ، لذلك يجب استخدام كل الاحتياطات اللازمة التى تضمن تلقيح بيئة بادئ الإضافة تحت ظروف معقمة أو شبه معقمة بما يضمن تقليل أو منع التلوث بالفاج ، مثل استخدام مرشحات للهواء الذى يدخل إلى أحواض لبن البادئ أو استخدام معدات تلقيح معقمة للبن البادئ . تستخدم بيئات مثبطة للفاج phage inhibitory media (PIM) ، التى تشمل زيادة العناصر الغذائية (مثل مستخلص الخميرة) والفوسفات مع أو بدون السترات للأرتباط بأيونات الكالسيوم (Ca^{2+}) اللازم لأمتزاز الفاج phage adsorption . تستخدم PIM بكثرة فى أوروبا عنها فى الولايات المتحدة ، ونظراً لوجود بعض الملاحظات على تكاليف، فاعلية ، وأتلاف وتثبيط Leuconostocs المشاركة فى البادئات المختلطة، فقد قام بعض الباحثين بتطوير هذه البيئات (PIM) على أساس السيطرة على معدل النمو بواسطة ضبط pH ، تحديد اللاكتوز ، وانخفاض تركيز الفوسفات والشرش.

أستخدمت الدراسات التى أجريت فى عام ١٩٥٦ ، التى أنتهت إلى عدم قدرة الفاج الذى يصيب LAB على التكاثر فى بيئة خالية من Ca^{2+} اللازمة لعملية أدمصاص الفاج ، فى تجهيز بيئات مثبطة للفاج على المستوى التجارى ، وأصبحت تتوفر فى الأسواق عدة أنواع من هذه البيئات . معظم هذه البيئات يتم تحضيرها من شرش مترو ع الأيونات deionized whey مدعماً بمحللات بروتين protein hydrolysates ، أملاح الصوديوم وفوسفات الأمونيوم . وقد كان هذا التطور على جانب كبير من الأهمية فى تقليل مشاكل الفاج فى صناعة الجبن فى الولايات المتحدة الأمريكية لعدة سنوات ، ولكن لم يتغلب تماماً على الفشل الذى يسببه الفاج . وقد أشارت بعض الدراسات إلى وجود فاجات phages التى تحلل

البادئات الحساسة فى غياب Ca^{2+} ، وقد أقترح أن استخدام بيئات تحتوى على مواد مخلبية chelators فى مصانع الجبن ، قد يؤدى إلى إنتقاء selection مثل هذه الفاجات . وما زالت البيئات المثبطة للفاج تستخدم على نطاق واسع فى صناعة الجبن ، وحالياً توجد بيئات (متوفرة فى الأسواق) تحتوى على مواد مخلبية لأيونات الكالسيوم Ca^{2+} chelators وذلك لتثبيط الفاجات .

ومن التطورات الأخرى الهامة فى تجهيز بيئات البادئ التى ظهرت منذ عام ١٩٧٧ ، الدراسات التى أشارت إلى تحسين عمل البادئات النامية فى شرش مدعم بالفوسفات phosphated whey مع مراقبة الـpH الخارجى ، وتعرف هذه البيئات بالبيئات المنظمة بعوامل خارجية externally buffered media ، ويمكن أن يتم تنفيذ هذه الطريقة بأحد الأسلوبين الأتيين :

- استخدام الشرش الناتج فى مصنع الجبن مع تدعيمه بمكونات البيئة للحصول على بيئة كاملة.
- الحصول على بيئة كامل (من المعامل المتخصصة) فى صورة جافة وأسترجاعها.

يتم ضبط pH البيئة بعد المعاملة الحرارية (٨٥°م /٤٥ دقيقة) إلى حوالى ٦,٢ بواسطة الحقن المستمر بالأمونيا فى صورة غاز أو سائل . يثبت فى خزان البادئ ألكترود pH وجهاز تسجيل pH وذلك للحصول على سجلات لإضافة المواد المعادلة neutralizers للمحافظة على pH المناسب . وقد تم تطوير هذه الطريقة فى نيوزيلندا عام ١٩٨٠ ، حيث يسمح للبادئ بالنمو طوال الليل عند ٢٢°م حتى يصل pH إلى ٥,٠ أو أقل ، ثم يضاف NaOH عند هذه النقطة حتى يصل pH إلى ٧,٠ . يسمح للبادئ للنمو لمدة أخرى تصل إلى ساعتين ينخفض خلالها pH إلى ٥,٤ ، حيث يتضاعف عدد الخلايا مرة أخرى . عند هذه النقطة يتم تبريد البادئ إلى ١٠°م أو أقل . هذه المعاملة تقلل بدرجة كبيرة من كمية اللقاح inoculum اللازمة فى صناعة الجبن.

وهناك أتجاه آخر لتجهيز بيئات البادئ محتوية على مواد معادلة داخلياً built-in neutralizing لتجنب ضرورة تعديل pH والإضافة المستمرة للمواد

المعادلة أثناء النمو ، وتعرف بالبيئات المنظمة داخلياً internally buffered media حيث يضاف كمية كافية من مواد معادلة غير ذائبة ، التى تذوب عندما يتكون حامض اللاكتيك ، ولضمان عدم خفض pH البيئة إلى أقل من ٥,٢ – ٥,٣ ، يسمح هذا النظام بمعادلة حامض اللاكتيك عند تكوينه أثناء النمو . يعتبر فوسفات ثلاثى المغنسيوم trimagnesium phosphate من أفضل المواد المعادلة داخلياً فى هذا النظام.

عند تجهيز بيئات لتنمية بكتريا البادئات لصناعة الجبن ، فإنه يجب أخذ عدة عوامل على جانب كبير من الأهمية فى الأعتبار لتنمية LAB فى اللبن . يوجد اختلافات بين تحت الأنواع subspecies (مثل *Lc.lactis* ssp. *lactis* ، *Lc.lactis* ssp. *cremoris*) فى الاحتياجات الغذائية ، طول فترة النمو اللاجى ، التغلب على الأضرار ، القدرة على تحليل البروتين ، المحافظة على pH ، تثبيط الفاج ، تنافس السلالات والنشاط أثناء التخزين . هذه العوامل تعتبر هامة لكل من البادئات المحبة للحرارة المعتدلة والمرتفعة ، ولكن النسبة بين الكرويات والعصويات وسيادة العصويات على جانب كبير من الأهمية فى المزارع المحبة للحرارة المرتفعة المركزة المجمدة.

قصر فترة النمو اللاجي يقلل بدرجة واضحة طول الفترة اللازمة للوصول إلى الحد الأقصى للنمو . تتضمن العوامل التى تزيد من طول مرحلة النمو اللاجى حدوث ضرر للخلايا cell injury ، انخفاض درجة حرارة النمو ، التغذية غير المناسبة ، وجود المثبطات ، أرتفاع جهد الأكسدة والإختزال (OR) وإنتاج البكتروسينات ، مثل النيسين.

هذه البيئات لها قوة تنظيمية أكبر من اللبن ، ويرجع ذلك إلى ارتفاع تركيز الفوسفات والسترات فيها ، وتكون فعالة ضد الفاج الذى يصيب كل من البادئات المحبة للحرارة المعتدلة والمرتفعة . من مزايا كل من هذين النوعين من البيئات (المنظمة خارجياً أو داخلياً) هو انخفاض معدلات التلقيح ، انخفاض متطلبات بادئ الإضافة ، إطالة فترة التخزين التى خلالها يحتفظ البادئ بنشاطه وكذلك انخفاض تكاليف العمالة . استبعاد فترة تسوية اللبن (أى الفترة بين إضافة البادئ وإضافة المنفحة) تعتبر مفيدة فى الوقاية من الإصابة بالفاج ، حيث أنه عند

حدوث التجبن فإن الفاج يكون غير قادر على النفـــاذ إلى جزيئـــات الخـــثرة . فى المصانع التى تملأ فيها أحواض الجبن عدة مرات يومياً ، فإن أعداد الفاج يرتفـــع باضطراد ويمكن السيطرة على ذلك بمعاملة الأحواض بالكلور chlorination بـــين كل ملئة وأخرى لمدة ١٠ دقائق مع استخدام ٢٠٠ جزء فى المليون كلور متـــاح available chlorine . من الأمور التى يجب الأهتمام بـــها عدم شـــطف بقايـــا الكلور من الأحواض ، كما أن استخدام بادئات مقاومة للفاج ، أعداد محـــدودة من السلالات ، فصل أماكن تحضير البادئ عن أماكن تصنيع الجبن ، يؤدى أيضـــاً إلى تقليل مستوى الفاج فى المصانع.

ومن الواضح أن وجود الفاج يخلق بعض المشاكل فى صناعة الجبن لذلـــك يجب مراعاة الاحتياطات التالية:

١- يجب تنشيط مزارع البادئ تحت ظروف معقمة .

٢- المعاملة الحرارية للبن البادئ النهائى يجب أن تكون كافية للقضاء علـــى الفاج ، كما يجب أن يملأ خزان البادئ تماماً (سعته القصوى) ، وإلا فإنه من الضرورى إجراء معاملة حرارية لمدة طويلة للتخلص من الفـــاج فى الحيز الهوائى.

٣- يجب استخدام التناوب اليومى daily rotation لسلالات البادئ الـــتى لا ترتبط بالفاج أو السلالات المقاومة للفاج فى صناعة الجبن.

٤- الترشيح الجيد للهواء فى غرفة تحضير البادئ وفى صالة الإنتاج يسا عـــد على السيطرة على مشكلة الفاج.

٥- يجب تطهير المعدات بطريقة ملائمة ، مثل استعمال الحـــرارة أو المـــواد الكيماوية المطهرة.

٦- موقع غرفة البادئ يجب أن يكون بعيداً عن منطقة الإنتاج وصالة تـــداول الشرش ، مما يقلل من احتمال التلوث عن طريق الهواء.

٧- يجب التأكد من أن عمال المصنع ، خصوصاً العاملون فى صالة الجـــبن لا يسمح لهم بدخول غرفة تحضير البادئ.

٨- تنشيط مزرعة البادئ فى البيئات المثبطة للفاج.

٩- يجب عدم استخدام سلالات مزارع البادئ الحساسة للفاج والتى صنفت بأن لها فترة تحضير قصيرة ولها حجم انفجار كبير .

١٠- رش الحيز الهوائى لغرف تحضير البادئ بمحلول الهيبوكلوريت واستخدام الأشعة فوق البنفسجية UV للحد من وجود الفاج فى الجو المحيط.

١١- تطوير إنتاج سلالات مقاومة للفاج.

١٢- يجب استخدام بادئات مختلطة السلالة.

٧- إنتاج مزارع بادئات الألبان تجارياً

تستخدم البادئات فى صناعة معظم انواع الجبن وجميع أنواع الألبان المتخمرة . تعتمد عملية تخمر أى نوع من منتجات الألبان المتخمرة بصورة رئيسية على نقاوة ونشاط البادئ ، وذلك إذا كان اللبن أو بيئة النمو الخالية من العوامل المثبطة مثل المضادات الحيوية أو الفاج . تنمو هذه البادئات فى اللبن أو بيئات تتكون أساساً من اللبن وتضاف إلى اللبن المعد لصناعة الجبن قبل إضافة المنفحة أو إلى اللبن المعد لصناعة الألبان المتخمرة . يتم تحضير بادئ الإضافة (الصناعة) b ulk starter من مزرعة صغيرة تعرف بالمزرعة الأم mother culture من خلال عدة مراحل وسطية.

يوضح شكل (١-٩) تحضير البادئ بكميات كبيرة فى معامل ومصانع الألبان باستخدام صور مختلفة من البادئات . الطريقة التقليدية لإنتاج البادئ بكميات كبيرة ، بالرغم من أن طريقة التنشيط قد تستهلك وقتاً طويلاً وتتطلب عمالة ماهرة ، فإن البادئ يكون أكثر عرضة للتلوث بالفاج ، الذى يعتبر من مصادر الخطر الهامة فى الصناعة ، إلا أنها تستخدم على نطاق واسع .

حتى بداية هذا القرن كانت صناعة الجبن تمارس على مستوى المزرعة farms وكانت تنتج البادئات بالسماح لبكتريا حامض اللاكتيك الموجودة عرضاً فى اللبن لتتكاثر وتنتج كمية كافية من الحموضة لتجبنه. وعندما أصبح إنتاج الجبن على مستوى المصانع ، فقد أنشئت الشركات والمعامل التى تقوم بإنتاج المزارع والإنزيمات وغيرها من مستلزمات إنتاج صناعة الجبن ، وفى البداية كانت تجهز المزارع فى اللبن المضاف إليه كربونات كالسيوم $CaCO_3$ ليتعادل جزئياً مع

الحامض المتكون . هذه المزارع السائلة تكون لها فترة حفظ قصيرة (أقل من أسبوع) ، واستبدلت تدريجياً بواسطة المزارع المجففة تحت تفريغ ، التى تتميز بفترة حفظ أطول ولكن تحتاج إلى عدة تنشيطات لتحضير الكميات الضرورية والمطلوبة لإنتاج بادئات الإضافة (الصناعة) . عادة تستخدم المزارع بمعدل ١-٢ % ، لذلك فإن المصنع الذى يقوم بتصنيع ٥٠٠,٠٠٠ لتر لبن فى اليوم إلى جبن يحتاج إلى ٥٠٠٠ لتر بادئ إضافة فى اليوم (أى ٥٠ لتر من اللقاح) .

فى منتصف الستينات أستبدلت المزارع المجففة تحت تفريغ vacuum dried cultures بالمزارع المجمدة المركزة frozen concentrated cultures ، وهذه المزارع تحتفظ بنشاطها لفترة طويلة تصل إلى عدة شهور بالتخزين تحت ظروف التجميد ، ولا تحتاج لعملية تنشيط subculturing وإنما تستخدم مباشرة لتلقيح بيئة بادئ الإضافة . فى خلال العشر سنوات الماضية ، وجد أن التجفيد freeze-drying له تأثير مماثل للتخزين المجمد فى المحافظة على أعداد كبيرة من الخلايا مع قدرات جيدة لإنتاج الحموضة ، ولكن لسوء الحظ فإن جميع المزارع ليست مقاومة للتجفيد . عادة تضاف المواد الواقية من التجميد cryoprotective agent إلى المزارع قبل التجفيد ، تتميز المزارع المجففة 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 و pH ٦,٠ لـ *Str.thermophilus* ، وعند ٤٢°م و pH ٥,٥ لبكتريا حامض اللاكتيك العصوية المحبة للحرارة المرتفعة thermophilic lactobacilli . تستخدم الصودا الكاوية NaOH وأيدروكسيد الأمونيوم NH_4OH فى معادلة الحموضة وتحصد الخلايا من المزارع بواسطة الطرد المركزى أو بالترشيح الغشائى membrane filtration . يستخدم التخمير على دفعات مع التقليب الخفيف لخلط القلوى ، ويمكن أن يؤدى ذلك إلى تثبيط إنتاج H_2O_2 ، كما قد يحافظ على جو النتروجين أعلى المزارع لتمنع من دخول الأكسجين إلى البيئة . يجب الأهتمام بتنمية المزارع عند pH ثابت ، حيث أنه عند pH أعلى من ٦,٠ فإن مزارع Prt^- (غير القادرة على تحلل البروتين) تتراكم بمعدلات مرتفعة وتؤدى إلى عدم اتزان بين السلالات.

كما أمكن إنتاج مزارع فائقة التركيز superconcentrated لأستخدامها فى التلقيح المباشر للبن الجبن بطريقة مماثلة ، هذه المزارع مرتفعة التكاليف ولكنها تستخدم بكثرة فى المصانع الصغيرة ، حيث لا تحتاج إلى وسائل إنتاج بادئات الإضافة . يحتوى بادئ الإضافة على أعداد من البكتريا حوالى 10^9 /مل ، حيث أن المزارع المركزة والفائقة التركيز تحتوى على حوالى 10^{10} خلية/جرام ، 10^{13} خلية/جرام ، على التوالى.

٧-١- طرق حفظ مزارع البادئات

من الضرورى حفظ preservation مزارع البادئ للمحافظة على مزارع أصلية يمكن الرجوع إليها فى حالة فشل البادئ أو النقل المستمر لهذه البادئات الذى قد يؤدى إلى حدوث طفرات فى السلالات قد تغير من السلوك والصفات العامة للبادئ.

تعتمد مصانع الألبان على مزارع البادئات التجارية عند تحضيرها للبادئ بكميات كبيرة ، أى البادئ الذى يدخل عادة فى الإنتاج الفعلى (بادئ الإضافة أو الصناعة bulk) ، ويمكن الحصول على هذه المزارع التجارية من معامل الأبحاث وبنوك حفظ المزرع أو المعامل والشركات التجارية المتخصصة ، وقد تتضمن عملية التحضير أكثر من مرحلة وتعرف المزارع فى مختلف مراحل التحضير بالمصطلحات 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 مصدراً لكل المزارع التى تحضر فى مصنع الألبان.
- **المزرعة الوسطية Intermediate culture** : وهى مرحلة وسطية ضمن مراحل تحضير كميات كبيرة من بادئ الإضافة.
- **بادئ الإضافة (الصناعة) Bulk culture** : وهو البادئ المستخدم فى الإنتاج .

يمكن حفظ مزارع البادئات فى أحد الصور التالية:

١- مزراع البادئ السائلة Liquid starter cultures .

٢- مزارع البادئ المجففة Dried starter cultures .

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

ب- مركزة (مجفدة freeze-dried) .

٣- مزارع البادئ المجمدة Frozen starter cultures.

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

ب- مركزة (مجمدة عند -٤٠ إلى -١٩٦°م).

مزارع البادئات (١) ، (٢-أ) و (٣-أ) تستخدم عادة لإنتاج بادئ الإضافة بالطريقة التقليدية. مزارع (٢ب) و (٣ب) تضاف مباشرة إلى حوض بادئ الإضافة أو يضاف مباشرة إلى حوض الصناعة (شكل ١-٩).

٧-١-١- مزارع البادئ السائلة

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

المزرعة التجارية ← المزرعة الأم ← المزرعة الوسطية ← بادئ الإضافة (الصناعة).

فعلى سبيل المثال ، تصنيع ١٠٠٠٠ لتر من اللبن إلى جبن فى اليوم باستخدام معدل تلقيح ٢ % ، يتطلب تنشيط تدريجى على النحو التالى:

المزرعة التجارية $\xrightarrow{١\%}$ المزرعة الأم $\xrightarrow{١\%}$ المزرعة الوسطية $\xrightarrow{٢\%}$ بادئ الإضافة (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^٢ 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 ، تلقح البيئة المعقمة بمعدل ١ %

وتحضن عند ٢٢ أو ٣٠°م لمدة ١٨ أو ١٦ ساعة ، علىالترتيب . 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 عند ٤٢°م لمدة ٣-٤ ساعات أو عند ٣٠°م لمدة ١٦-١٨ ساعة مع التلقيح بمعدل ٢ أو ١ % ، على الترتيب.

يتأثر نشاط مزرعة البادئ بمعدل التبريد بعد التحضين وبمستوى الحموضة عند نهاية فترة التحضين وبدرجة الحرارة وفترة التخزين . يعتبر التبريد عاملاً هاماً فى الحد من نشاط مزرعة البادئ ، وعادة تحفظ مزرعة إحتياطية من مزرعة الأم فى صورة سائلة فى بيئة النمو التالية ، التى تعتبر مثالية لمعظم بكتريا حامض اللاكتيك : لبن فرز ١٠-١٢ % جوامد لا دهنية ، ٢ % محلول عباد الشمس (٥٠%) ، ٠,٣ % مستخلص خميرة ، ١,٠ % جلوكوز أو لاكتوز ، كمية كافية من كربونات الكالسيوم لتغطية أسفل أنبوبة الاختبار ، ٠,٢٥ % panmede ، ١,٠ % ليسثين ، تعقم البيئة عند ١٠ رطل/بوصة٢ لمدة ١٠ دقائق مع التحضين لمدة أسبوع عند ٣٠°م للتأكد من كفاءة عملية التعقيم . تحضن البيئة الملقحة لفترة قصيرة وتخزن تحت ظروف الثلاجة العادية ، ومن الضرورى إعادة تنشيطها مرة واحدة كل ٣ شهور.

٧-١-٢- مزارع البادئ المجففة

حفظ مزارع البادئ بالتجفيف تعتبر طريقة بديلة للمحافظة على المزرعة الأصلية ، كما يسهل أيضاً من نقل المزارع بواسطة البريد ، دون أن يحدث فقد فى نشاطها. كان الإجراء العادى المتبع فىالماضى (قبل ١٩٥٠) هو التجفيف تحت تفريغ ، وتتضمن هذه العملية خلط المزرعة السائلة مع اللاكتوز ثم معادلة الحموضة الزئدة بكربونات الكالسيوم ، يركز المخلوط جزئياً عن طريق الفرز أو التخلص من الشرش أو الأثنين معاً ، مما ينتج حبيبات يجرى تجفيفها تحت تفريغ ، يحتوى البادئ المجفف على ١-٢ % بكتريا حية ، وقد يتطلب الأمر تنشيطه عدة مرات قبل أن يستعيد نشاطه الأقصى.

يحلل بروتين اللبن بأنزيم التربيسين trypsin لمدة ٤ ساعات عند ٣٧°م

↓

يعامل اللبن بالبخار

↓

يبرد اللبن ويلقح بمزرعة البادئ ويحضن عند ٢٠°م مع ضبط pH
(يستخدم إيدروكسيد الكالسيوم لمعادلة الحموضة)

↓

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

↓

يجفف بطريقة الرذاذ بـــهواء ساخن عند ٧٠°م إلى ٩ % رطوبة
(درجة حرارة المسحوق لا تتجاوز ٤٢°م)

↓

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

شكل (١-٨) : الطريقة الهولندية لإنتاج مزارع بادئ مجففة بطريقة الرذاذ.

يمكن الحصول على معدل مرتفع من الخلايا المتبقية فى البادئـــات المجففـــة باستخدام طريقة التجفيف بالرذاذ ، وهى طريقة نشأت فى هولندا . يوضح شـكل (١-٨) خطوات هذه الطريقة ، ويعتقد أن البادئ المجفف يكون مماثلاً فى نشـــاطه لبادئ سائل عمره ٢٤ ساعة . بالرغم من أن هذا التطور فى صناعة البادئ برهـــن على إمكانية استخدامه بنجاح ، إلا أن هذا النظام لم يستخدم على نطاق تجارى ، حيث أن نسبة الخلايا المتبقية عادة تكون منخفضة فى المـــزارع المجففـــة ، ١٠ % لمعظم بكتريا حامض اللاكتيك المحبة للحرارة المعتدلة و ٤٤ % لـــــ *Lc.lactis* biovar *diacetylactis* . ومع ذلك ، فإن إضافة جلوتاميت أحادى الصوديـــوم mono-Na-glutamate وحامض الاسكوربيك إلى مزرعة البادئ ، التى يجـــرى

تنشيطها فى بيئة تحتوى على منظم buffer لحماية الخلايا البكتيرية إلى حد مـــا ، وتحتفظ المزرعة المجففة بطريقة الرذاذ بنشاطها لمدة ٦ شهور عند ٢١°م.

٧-١-٣- مزارع البادئ المجففة

تحضر مزارع البادئ المجففة freeze-dried بتجفيف البادئ وهو فى الحالـة المجمدة ، حيث تحسن هذه الطريقة من معدل الخلايا المتبقية فى المزرعة المجفـــدة ، كانت النتائج أفضل بالمقارنة بالبادئات المجففة بطريقة الرذاذ . وقـــد لوحـظ أن عملية التجميد والتجفيف تؤدى إلى أتلاف غشاء الخلية البكتيرية ، لكـن يمكـن تقليل هذا الضرر بإضافة مواد مبردة واقية معينة قبل إجراء التجميد والتجفيـف ، هذه المواد الواقية عبارة عن روابط إيدروجين و/أو مجموعات متأينة تساعد علـى منع الأضرار بالخلية ، وذلك بتثبيت مكونات غشاء الخلية خلال عملية الحفظ.

فى تحضير مزارع البادئات المجففة ، عادة يستخدم اللبن أو الشرش أو بيئـة تتكون أساساً من اللبن أو الشرش ، لتنمية بكتريا البادئ عند تجفيدها . يجـب المحافظة على pH بيئة النمو بحيث يكون أعلى من ٥,٥ خلال عملية التخمير ، لمنع حدوث أضرار من الحامض acid injury . قد يستخدم NH_4 OH ، Na_2 CO_2 أو KOH كمواد لمعادلة الحموضة neutralizers . عادة يفضل حصد الخلايا بعـد النمو مع غسلها ، وذلك للتخلص من كل المواد الوسيطة السامة ، مثل اللاكتات، ومع ذلك فإن عملية الغسيل لا تجرى على المستوى التجارى لأسباب أقتصاديـة. وقد تدعم بيئة النمو أيضاً بتوين ٨٠ (Tween 80) ، حامض الأســكوربيك أو جلوتاميت أحادي الصوديوم monosodium glutamate ، وذلك لحماية الخلايا ، كما يضاف إلى البيئة مستخلص الخميرة كمصدر للفيتامينات وببتيدات منشـطة للنمو growth stimutating peptides.

يتم تركيز الخلايا عقب عملية النمو بواسطة الطرد المركزى أو الترشـيح الفائق UF . الخلايا التى يتم حصدها فى الفترات الأولى لمرحلة الثبات stationary phase تكون أكثر مقاومة للتجميد والتجفيد عن الخلايا التى تحصـد فى مرحلـة النمو اللوغاريتمى. زيادة تركيز الخلايا يساعد على ارتفاع نسبة الخلايا المتبقيـة الحية فى الناتج النهائى . قد تضاف بعض المواد (الجليسرول ، فيتامين C ، أدينتـول

adonitol ، جلوتاميت احادى الصوديوم ، مستخلص المولت أو المانيتول) إلى بيئة النمو لحماية الخلايا أثناء عملية التجميد والتجفيد . يجب أن تتم عملية التبريد بدرجة سريعة بقدر الأمكان ، وللكميات الصغيرة يفضل عمل فيلم رقيق thin film وذلك بتدوير دورق flask مغمور فى مادة مبردة ، مثل النتروجين السائل أو مخلوط من الكحول والثلج الجاف dry ice-alcohol mixture . تعمل هذه المواد المبردة على خفض درجة الحرارة إلى حوالى -١٩٦°م أو -٦٥°م ، على الترتيب.

لإجراء عملية التجفيد على نطاق كبير ، تفرد المزارع فى صوانى من الصلب غير قابل للصدأ على هيئة طبقة رقيقة تبلغ سمكها حوالى ١-٢سم ، ثم توضع هذه الصوانى فى أجهزة التجفيد ، حيث يستخدم تفريغ عال ، وذلك للمحافظة على هذه المزارع فى حالة مجمدة أثناء تجفيفها خلال فترة تتراوح من ١٢-٢٤ ساعة . أفضل نشاط مائى a_w (water activity) للحصول على أكبر عدد للخلايا الحية فى المزارع الجافة يكون حوالى ٠,١ ، كما يسبب التجفيف الزائد overdrying موت الخلايا . وعادة تحتوى مزارع البادئات المجففة على $١٠^{٨} - ١٠^{٩}$ بكتريا/جرام.

يجب تعبئة المزارع المجففة تحت ظروف لا هوائية (فى غياب الأكسجين) ، حيث أن التعرض لفترة قصيرة للأكسجين يسبب تلف الخلايا . ويمكن تقليل التعرض للأكسجين إلى أقل حد ممكن وذلك بأتمام عملية التعبئة تحت جو من النتروجين.

تستخدم مزارع البادئات المركزة المجفدة على نطاق واسع فى أوروبا ، وبدرجة محدودة فى الولايات المتحدة الأمريكية ، حيث تكون مزارع البادئات المجمدة أكثر شيوعاً ، ويرجع السبب فى ذلك إلى طول فترة النمو اللاجى lag phase عندما تستخدم مزارع البادئات المركزة المجفدة فى تلقيح اللبن مباشرة فى حوض صناعة الجبن مقارنة بالمزارع الحديثة (النشطة) ، مما يؤدى إلى إطالة فترة صناعة جبن التشدر . عادة يكون الوقت اللازم من إضافة البادئ إلى مرحلة التمليح فى صناعة الجبن التشدر فى الولايات المتحدة حوالى ٣,٥ ساعة ، ولكن قد تطول هذه الفترة وتصل إلى ٤ أو ٤,٥ ساعة عند استخدام مزارع بادئات مركزة مجفدة . على العكس من ذلك ، فإن الفترة من إضافة البادئ إلى مرحلة التمليح فى

صناعة الجبن التشدر فى المملكة المتحدة ، أستراليا ونيوزيلندا حوالى ٥ ساعات . تحتوى المزارع المركزة المجفدة عادة على 10^{11} إلى 10^{12} بكتريا/جرام . كما يتوفر حالياً مزارع مركزة مجفدة ، يطلق عليها bulk sets لتلقيح ٢٠٠ و ١٠٠٠ لتر بادئ الإضافة مباشرة.

وفى ضوء المعلومات المتوفرة فى مجال إنتاج مزارع البادئات بالتجفيد ، فإنه يمكن الإشارة إلى ما يلى :

١- يتم حفظ معظم بكتريا حامض اللاكتيك بنجاخ ، ما عدا *Lb.helveticus, Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ، التى تعتبر حساسة للتجميد والتجفيف.

٢- تنشيط مزرعة البادئ فى لبن مدعم بمستخلص الخميرة والبروتين المحلل يحسن من معدل الخلايا المتبقية ، كما أن رفع تركيز الخلايا فى مزرعة إلى أكثر من 10^{10} خلية/مل يؤدى إلى زيادة عدد الخلايا الحية فى المزرعة المجفدة .

٣- تكون مزارع البادئ أقل حساسية للتجميد والتجفيف إذا تم حصاد الخلايا عند نهاية مرحلة النمو اللوغاريتمى ، ما عدا *Lc.lactis* ssp. *cremoris, Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ، حيث يتم حصد الخلايا عند بداية مرحلة الثبات stationary وذلك للحصول على أعلى حيوية.

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

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 مناسبة لبكتريا *Str.thermophilus* ، ومحلول اللاكتوز وإيدروكسيد الآرجنين يعطى حماية للـ *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* وحامض الجلوتاميك للـ *Leuconostoc*.

٦- يجب أن يكون محتوى الرطوبة فى المزارع المجففة أقل من ٣ %.
٧- أظهرت المزارع المجففة المخزنة عند ٥-١٠°م معدلات أعلى للخلايا المتبقية خلال التخزين لفترات طويلة مقارنة بتلك المخزنة عند درجة حرارة الغرفة.
٨- يفضل تعبئة المزارع المجففة تحت تفريغ لأن الميكروبات المجففة تكون حساسة للأكسجين.
٩- تعتبر الأنابيب الزجاجية الصغيرة أفضل أنواع مواد التعبئة وأكثرها شيوعاً للمزارع المجففة، يليها أكياس من رقائق الألمونيوم المتعددة الطبقات ، كما وجد أن استخدام عبوات من النايلون ، تسبب أنخفاضاً فى معدل الخلايا المتبقية نتيجة لنفاذيتها للأكسجين من خلال مواد العبوة.
١٠- تجميد المزرعة عند -٢٠ إلى -٣٠°م ، والتجفيف عند درجة حرارة بين -١٠ إلى -٣٠°م ، يؤدى إلى ارتفاع نشاط البكتريا فى المزارع المجففة.
١١- مركبات الكربونيل carbonyl ، مثل البيروفات وثنائى الاستيل اللذان يتفاعلان مع مجموعات الأمين فى الخلايا المحفوظة ، قد تؤدى إلى الاسراع من موت هذه الخلايا ، لذلك يفضل فصل هذه المركبات من الخلايا التى تم حصادها . لحفظ المزارع المجففة لفترات طويلة ، يجب أن تدعم بيئة التعليق بسكريات غير مختزلة وأحماض أمينية و/أو semicarbazide.

مزارع الفطريات

عادة يتم حفظ الفطريات البيضاء والزرقاء بالتجفيد freeze-drying . عند استخدام هذه المزارع الجافة يتم تعليقها فى ماء مغلى أو معقم ويطلق على هذا المعلق الناتج مزرعة التشغيل working culture . الجراثيم المعلقة rehydrated spores يمكن أن تبقى نشطة لمدة أسبوع عند ٥°م . يتوقف استخدام هذه الفطريات فى صناعة الألبان على الناتج النهائي ، يمكن أن تستخدم مزرعة الفطر

الأبيض *Penicillium camemberti* فى صناعة جبن الكممبير والبراي بإحدى الطرق التالية :

١- تضاف مباشرة إلى اللبن ، مع بادئ بكتريا حامض اللاكتيك ، قبل إضافة المنفحة .

٢- يرش spray معلق الفطر على خثرة الجبن قبل التمليح .

٣- تغطية سطح الجبن بمخلوط خاص من الملح وجراثيم الفطر الجافة .

ومع ذلك ، فإن استخدام الفطريات الزرقاء : مثل *P.roquefoti* فى إنتاج الجبن المعرقة بالفطر يكون على النحو التالي :

(i) إتباع الطريقة (١) ، (٣) بالنسبة للفطريات البيضاء السابق ذكرها .

(ii) تضاف مزرعة الفطر إلى الخثرة بعد تعبئة القوالب مباشرة .

(iii) تنمية الفطر على مكعبات خبز من دقيق كامل ، وتشكيل كتلة الميسليوم على هيئة كور صغيرة balls وتغلف فى شاش ويتم سحقها باليد فوق اللبن بعد إضافة البادئ ، لكى تسقط الجراثيم فى اللبن .

وقد تم حفظ الفطريات وبكتريا حامض اللاكتيك المستخدمة فى إنتاج جبن الجروجترولا وذلك بتنمية المزارع فى اللبن عند pH ٦,٥-٥,٥ للحصول على أعداد $١٠^{٨}-١٠^{٩}$ cfu/مل ، ثم يعقب ذلك التجميد عند -١٨°م . وقد كان معدل البقاء survival rate لهذه الميكروبات على النحو التالي : *Str.thermophilus* ١٨% ، *Lc.lactis* ssp. *lactis* ٣٨% ، *Leuc.mesenetroides* ssp. *cremoris* ٨٠% ، *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ٤٧% *Torula* spp., ٥٠% *P.roqueforti*, ١٠٠% . من هذه النتائج ، فإنه يمكن القول أن الفطريات الزرقاء يمكن أن تحفظ بالتجميد دون حدوث أى فقد فى نشاطها . وقد أمكن حديثاً تنمية *P.roqueforti* فى مخمر يحتوى على حبوب قمح لإنتاج جراثيم ، وقد كان متوسط الإنتاجية $٩,٢ \times ١٠^{٦}$ جراثيم خارجية /جم مادة جافة /الساعة ، فى طريقة التخمير نصف المستمر semi-continuous fermentation .

٧-١-٤-مزارع البادئ المجمدة

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

مزارع البادئ السائلة (الأم أو الوسطية) يمكن حفظها بالتجميد عند -٢٠ إلى -٤٠°م لعدة شهور . يتم حفظ البادئ بهذه الطريقة فى المعامل المركزية ، وتوزع المزارع المجمدة على مصانع الألبان عند الحاجة للتلقيح مباشرة إلى بادئ الإضافة . قد يؤدى التجميد والتخزين لفترة طويلة عند -٤٠°م إلى تلف نشاط مزرعة البادئ ، وقد يؤدى إلى تلف انواع معينة من Lactobacilli ، لكن استخدام بيئة تحتوى على ١٠ % لبن فرز ، ٥ % سكروز ، ٠,٩ % كلوريد الصوديوم أو ١ % جيلاتين ، قد يؤدى إلى تحسين معدل الخلايا المتبقية ، بالإضافة إلى أن الخلايا المركزة (10^{10}-10^{12} cfu/مل) المجمدة عند -٣٠°م فى وجود خليط من مواد مبردة واقية (سترات الصوديوم ، جليسرول ، صوديوم بيتا - جليسروفوسفات ، مستخلص الخميرة ، سكروز ، لبن فرز معقم أو لاكتوز) تحتفظ بنشاطها فى حالة مزارع البكتريا المحبة للحرارة المعتدلة ومزارع بكتريا حامض اللاكتيك العصوية أو مزارع بكتريا حامض البروبيونيك.

وبالرغم من أن عملية التجميد عند -٤٠°م تعتبر عملية ناجحة لحفظ مزارع البادئ ، 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 بالإمكان استخدامها فى التلقيح المباشر للبن المستخدم فى صناعة الجبن أو لبادئ الإضافة (شكل ١-٩) . تعتبر هذه الطريقة سهلة وتحسن من كفاءة العمل اليومى وتوازن السلالات ، مع سيطرة أفضل على الفاج وتحسن جودة الناتج ، إلا أنها تعتبر طريقة مرتفعة التكاليف مع ضرورة توفير الوسائل اللازمة للنتروجين السائل.

يلاحظ مما سبق أن معدل الخلايا المتبقية فى مزارع البادئ المحفوظة ، يعتمد على ظروف التصنيع (بيئة النمو ، وجود مواد مبردة واقية ، التجميد والتجفيف) وعلى طريقة تركيز الخلايا . وباختصار ، فإن 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.

ثانياً : معادلة مستمرة لبيئة النمو لضبط pH إلى حوالى ٥,٨ – ٦ للحصول على مزرعة تحتوى على عدد مرتفع من الخلايا ، التى تتعرض بعد ذلك لعملية الطرد المركزى ليكون مزرعة مركزة الخلايا . تكوين اللاكتات قد يكون مثبطاً وبالتالى يحد من درجة التركيز.

ثالثاً : تنقية المزرعة بالانتشار diffusion culture technology ، وهى طريقة متطورة للتخلص من اللاكتات من بيئة النمو حتى يمكن بهذا النظام إنتاج مزارع مركزة بها $١٠^{١١}$ خلية /مل ، تعرف هذه المزارع بالمزارع فائقة التركيز superconcentratcd cultures ، ويمكن استخدامها فى التلقيح المباشر للبن الجبن (شكل ١-٩) . بالرغم من أن هذه المزارع مرتفعة التكاليف ، إلا أنها تستخدم بكثرة فى المصانع الصغيرة حيث لا تحتاج إلى وسائل إنتاج بادئات الإضافة (الصناعة) .

عند تحضير مزارع بادئات الحرارة المعتدلة المركزة المجمدة frozen concentrated starter cultures ، يتم معادلة الحموضة فى المزارع بعد النمو أو المحافظة على pH ٦-٦,٥ أثناء النمو ، وذلك بحقن NH_4OH أو غيرها من المواد المعادلة أثناء النمو . ونظراً لأن الخلايا يتم تركيزها بعد النمو ، فإن المزارع النامية فى اللبن ، حتى بعد معادلة الحموضة ، يجب أن يتم تنقيها clarified وذلك بإضافة سترات ثلاثى الصوديوم (١%) trisodium citrate إلى المزارع تامة النمو والتى تم فيها معادلة الحموضة .بيئات الشرش أو البيئات المحتوية على تركيزات مختلفة من مكونات اللبن قد تستخدم أيضاً ، حيث يتم فصل الخلايا بسهولة بواسطة الطرد

المركزى . وغالباً ما يستخدم تحت الظروف التجارية جهاز طرد مركزى bactofuge من نوع Alfa-Laval Model D3187M .

بعد حصد الخلايا بواسطة الطرد المركزى ، يضاف عادة مواد واقية من التجميد cryoprotective agent مثل الجليسرول (٥-١٥ %) أو جلوتاميت أحادى الصوديوم (٥ %) monosodium glutamate أو سكروز (٧ %) لحماية الخلايا والمحافظة على قدرتها فى إنتاج الحموضة بعد التخزين تحت ظروف التجميد . تختلف البكتريا فى درجة مقاومتها للتجميد والتسييح ، طبقاً للسلالة strain ، النوع species ، ظروف النمو growth conditions ، العمر age ، طبيعة بيئة النمو nature growth medium وظروف التجميد ، التخزين والتسييح. كلما زاد تركيز الخلايا كلما زاد مقاومة الخلايا لأضرار التجميد freeze injury ، والخلايا فى مرحلة الثبات stationary تقاوم بدرجة أفضل عن الخلايا فى مرحلة النمو اللوغاريتمى.

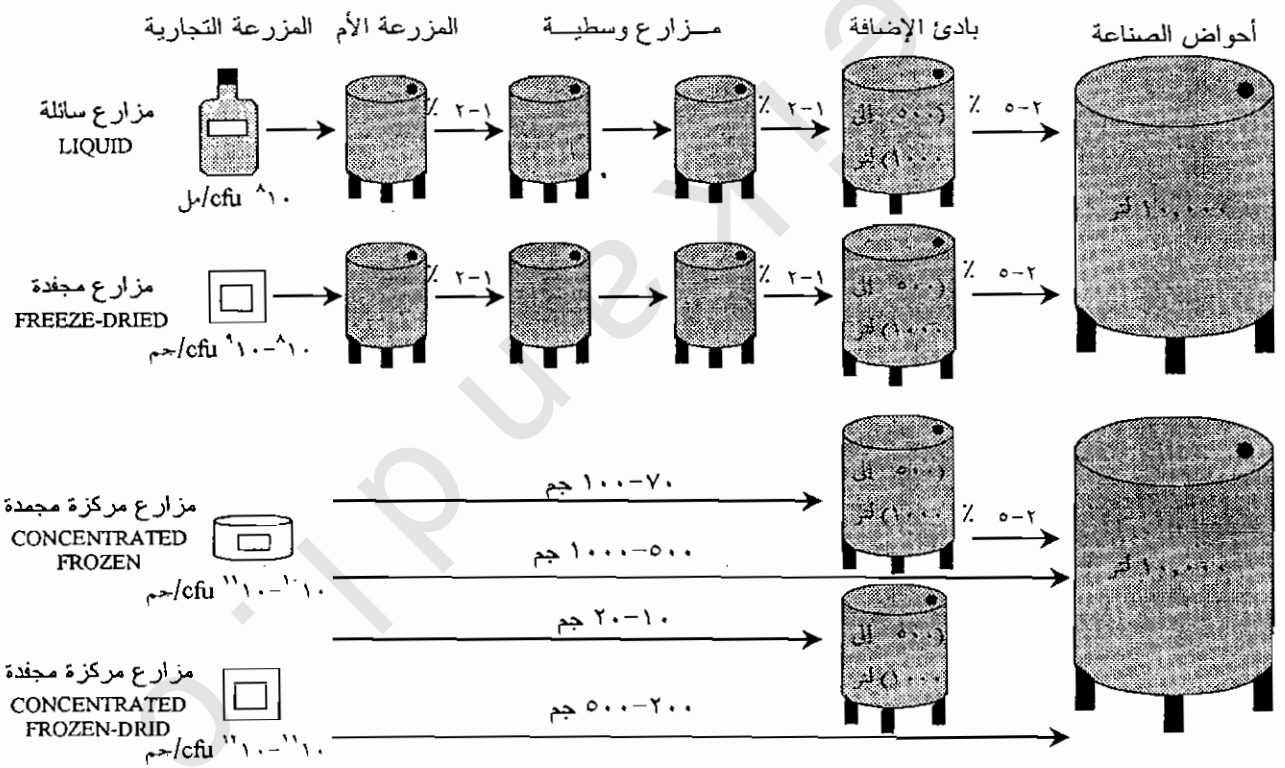
تتحسن مقاومة المزارع لعمليات التركيز ، التجميد والتجفيف بإضافة بعض اللعناصر الغذائية nutrients أو مواد مضافة additives . يزيد نشاط وأعداد *Lb.bulgaricus* بعد التجميد عند -١٩٦°م ، بدرجة كبيرة ، إذا كانت الخلايا نامية فى بيئة مناسبة مدعمة بتوين ٨٠ (Tween 80) . كما تم الحصول على نتائج مماثلة فى المزارع المجمدة عند -١٧°م . ويعتبر حمض الأوليك oliec acid وتوين ٨٠ من المكونات الفعالة فى زيادة عملية الثبات stability وذلك بزيادة مستوى الحامض الدهني C_{19} cyclopropane فى لبيدات الخلايا . معظم الأحماض الدهنية فى خلايا البكتريا توجد فى غشاء الخلية cell membrane ، ويعتقد أن تركيب الغشاء على درجة كبيرة من الأهمية للخلايا المقاومة للتجميد ، حيث تزيد من مرونة الغشاء . وقد لوحظ أن Lactococci تقاوم التجميد عند -١٩٦°م بدرجة أفضل من Lactobacilli ، بصرف النظر عن بيئة النمو ، ويرجع ذلك إلى أن Lactococci تحتوى طبيعياً على مستوى أعلى من الحامض الدهني C_{19} cyclopropane . كما يبدو أن النسبة بين الأحماض الدهنية غير المشبعة إلى المشبعة فى غشاء الخلية فى بعض الحالات ترتبط بقدرة Lactobacilli,

Lactococci على مقاومة التجميد ، بزيادة هذه النسبة تتحسن المقاومة عند -١٧°م .

الخلايا المركزة ، بعد إضافة المواد الواقية من التجمد cryoprotective agents ، يجب الأسراع فى تجميدها بقدر الأمكان ، وذلك بغمرها فى نتروجين سائل أو فى مخلوط من الكحول والثلج الجاف ، وتخزن عند درجة حرارة منخفضة بقدر الإمكان . درجة حرارة التخزين -٢٠ إلى -٤٠°م شائعة فى معظم مصانع الجبن ، ولكن قد يحدث انخفاضاً فى حيوية ونشاط المزارع نتيجة التسييح ، إذا كانت درجة حرارة التخزين أعلى من -٢٠°م . كما أن معدل تسييح المزارع المركزة المجمدة تكون حرجة فى تقليل الأضرار injury التى تصيب الخلايا ، لذلك فإنه من الضرورى أن يتم التسييح بأسرع ما يمكن . عادة تحتوى البادئات المركزة المجمد على $١٠^{١٠}$ إلى $١٠^{١١}$ cfu/جم .

٧-٢- تنمية البادئات فى مصانع الألبان

منذ أكثر من ٢٥ سنة مضت ، كان يستخدم اللبن المستخدم فى صناعة الجبن cheese milk كبيئة medium لتنمية البادئ لتحضير بادئ الإضافة فى الصناعة . استخدام المضادات الحيوية antibiotics فى علاج مرض التهاب الضرع mastitis الذى يصيب ماشية اللبن دفع مديرى مصانع الألبان إلى تحديد بعض منتجى الألبان كمصدر للبن الذى يستخدم فى تحضير البادئ ، وقد يساعد ذلك على ضمان عدم وجود المضادات الحيوية والتأكيد على أن البادئ الناتج من مثل هذا اللبن يكون أكثر ضماناً ويمكن استخدامه فى الصناعة دون حدوث مشاكل تؤثر على سير الحموضة أثناء صناعة الجبن . ومع تطور صناعة اللبن المجفف بالرذاذ spray-dried milk industry ، فقد أصبح اللبن الفرز المجفف المعاد استرجاعه reconsituted skim milk (RSM) مصدراً مرغوباً كبيئة لنمو البادئ، حيث يمكن إذابته ومعاملته حرارياً بكفاءة . لذلك فإن كثير من مصانع الألبان كانت تستخدم RSM (١٠ %) كبيئة لتنمية البادئ .



شكل (١-٩): تحضير بادئ الإضافة (الصناعة) فى مصانع الألبان

نظراً لوجود اختلافات متابينة بين دفعات RSM ، فإن عدد من الشركات تمد مصانع الألبان بمسحوق اللبن RSM السابق اختباره ، حيث يختبر هذا اللبن لوجود المضادات الحيوية أو المواد المثبطة الأخرى inhibitory agents ، التى قد تؤخر من نمو بكتريا البادئ . ومن المعروف أن الشرش قد يكون أقل تكلفة عن اللبن فى تحضير بيئة نمو جيدة لبكتريا البادئ ، لذلك فإن البيئات التى تتكون أساساً من الشرش تستخدم على نطاق واسع فى صناعة الجبن ، وخاصة فى الولايات المتحدة الأمريكية ، بالرغم من أن بعض صانعى الجبن ترفض استخدام بيئة الشرش ، حيث يعتقد هؤلاء الصناع إنه من الأفضل تنمية بكتريا البادئ فى اللبن نظراً لأن هذه البكتريا يجب أن تنمو فى اللبن فى حوض صناعة الجبن cheese vat . كما أشار بعض الباحثين فى عام ١٩٩٦ إلى تشجيع استخدام راشح الشرش whey permeate كبيئة للبادئ.

إنتاج بادئ الإضافة (الصناعة) ، وهو البادئ الذى يستخدم مباشرة فى الصناعة ، يستلزم عدة مراحل من التنشيط من أجل الحصول على الكمية المطلوبة أو التلقيح المباشر فى خزانات بادئ الإضافة باستخدام المزارع المركزة (شكل ١-٩). ويعتبر توفير بادئ الإضافة (الصناعة) خال من الفاج العامل الرئيسى فى إنتاج جبن مرتفع الجودة . وقد تستخدم بيئات مختلفة فى تحضير هذا البادئ مثل البيئات المثبطة للفاج phage inhibitory medium (PIM) أو البيئات المقاومة للفاج phage-resistant medium (PRM) ، اللبن الكامل ، اللبن الفرز و اللبن الفرز المدعم بجوامد إضافية . عادة يستخدم لبن فرز مجفف مسترجع خال من المضادات الحيوية ويحتوى على ١٠-١٤ % مواد صلبة . تسخن البيئة (وكذلك حيز الفراغ head spaces فى الحوض) إلى درجة حرارة لا تقل عن ٩٠°م لمدة ٢٠ دقيقة على الأقل . ويفضل بعض المنتجين تسخين البيئة فى مبادل حرارى (٩٠°م لمدة ٢٠ ثانية) قبل الإضافة إلى حوض إعداد بادئ الإضافة والذى سبق تنظيفه وتعقيمه. وهذه الطريقة غير مفضلة نظراً لأن التنظيف والتعقيم قد لا تتلف الفاج. المعاملة الحرارية لها عدة مزايا : (١) القضاء على البكتريا الملوثة التى قد تتنافس فى نموها مع نمو بكتريا البادئ وبالتالى تسبب بعض المشاكل أثناء صناعة الجبن ، (٢) زيادة معدل نمو بكتريا البادئ نتيجة زيادة النتروجين الناتج من

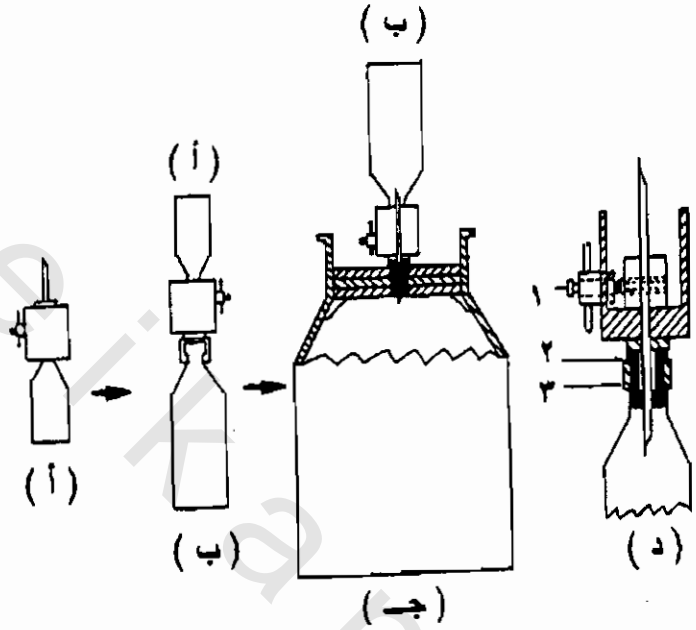
التحلل الجزئى لبروتين اللبن ، (٣) إتلاف المواد المثبطة الطبيعية الموجودة فى اللبن وكذلك أى فاج قد يكون موجوداً فى البيئة. ولرفع كفاءة القضاء على الفاج فيجب تسخين حيز الفراغ الموجود أعلى البيئة بالبخار خلال فترة التسخين حيث أن الفاج قد يدخل إلى خزانات إعداد بادئ الصناعة خلال عملية تبريد البادئ ، لذلك يجب بسترة خزان التحضير أو ترشيح الهواء الداخل للخزان أثناء عملية التبريد خلال مرشحات خاصة بذلك . ويعتبر التلقيح عملية حيوية فى تحضير بادئ الصناعة لذلك يجب استخدام معدات تلقيح خاصة تعمل تحت ظروف معقمة. هناك طريقتان للحصول على البادئ الأصلى inoculum لتحضير بادئ الإضافة (الصناعة) bulk culture :

١- استخدام مزارع مجمدة أو مجففة لتلقيح اللبن المعامل حرارياً والمبرد مباشرة لتحضير بادئ الإضافة (الصناعة) وتعرف هذه المزارع بـbulk-set culture . هذه الطريقة مرتفعة التكاليف وتحتاج إلى عمالة أقل ، كما أنها تتميز بأن المزارع لا يتم تنشيطها فى المصنع وبالتالى نادراً ما تتلوث أو تصاب بالفاج.

٢- استخدام كمية صغيرة من البادئ inoculum لتحضير مزارع وسطية intermediate cultures اللازمة لتحضير بادئ الإضافة من خلال عدة خطوات (شكل ١-٩) ، هذه الطريقة ما زالت تستخدم فى كثير من مصانع الألبان . المزارع الأصلية (التجارية) التى تستخدم فى هذه الطريقة قد تكون سائلة ، مجففة ، مركزة مجمدة أو مركزة مجففة . تعتبر هذه الطريقة اقتصادية (منخفضة التكاليف) مقارنة بالطريقة الأولى ولكنها تحتاج إلى عمالة أكثر . ومن العيوب الرئيسية لهذه الطريقة أن المزارع تكون أكثر عرضة للإصابة بالفاج ، ما لم يتخذ قدر كبير من العناية ، أثناء إنتاج المزارع الوسطية . عموماً فإن مصانع الألبان المركزية تفضل استخدام الطريقة الأولى ، بينما المصانع الصغيرة تستخدم الثانية.

وهناك أنظمة تستخدم فى تحضير بادئ الإضافة ، تهدف أساساً إلى حماية البادئ من الإصابة بالفاج . من الأمور الهامة فى هذه الأنظمة ، أنه يتم معاملة بيئة

النمو ونمو البادئ فى خزان محكم الغلق ، ويتم التلقيح من خلال حاجز يمنع دخول الهواء الملوث ومن أمثلة هذه النظم:



شكل (١-١٠) : رسم تخطيطى لنظام لويس لنقل مزرعة البادئ

أ) المزرعة الأم ب) المزرعة الوسطية جـ) بادئ الإضافة د) تركيب الأبرة:

(١) صنبور (٢) لحام استل (٣) محلول الهيبوكلورايت الصوديوم

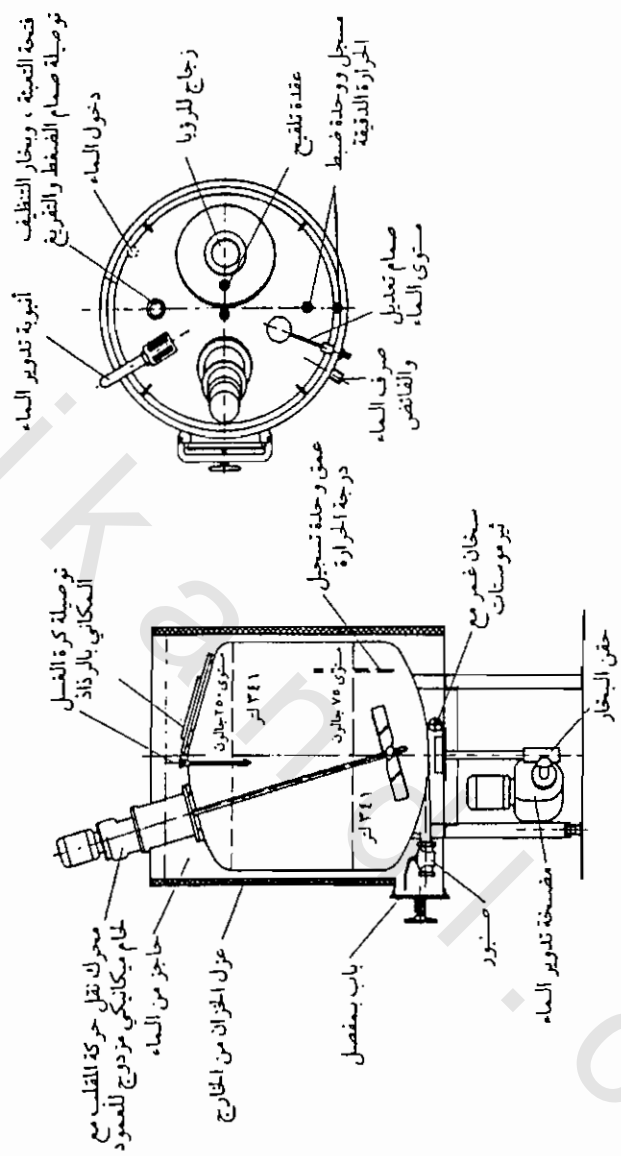
١-٢-٧- نظام لويس The Lewis system

فى هذا النظام ، تستخدم زجاجات بولي إيثلين التى يمكن استخدامها مرة أخرى سعة ١١٥ و ٨٥٠ جرام للمزرعة الأم والمزرعة الوسطية ، على الترتيب . هذه الزجاجات مزودة بلحامات مطاطية وبيئة النمو (١٠-١٢ % لبن فرز مسترجع خال من المضادات الحيوية) حيث يتم تعقيمها فى هذه الزجاجات . تجرى عملية نقل مزرعة البادئ باستخدام إبرة معدة للحقن ثنائية الفتحات (شكل ١-١٠) . يتطلب نظام لويس ، خزان يعمل تحت ضغط لبادئ الإضافة ، حيث تعامل بيئة النمو حرارياً فى داخل الوعاء المحكم الغلق . يجب التأكد من عدم

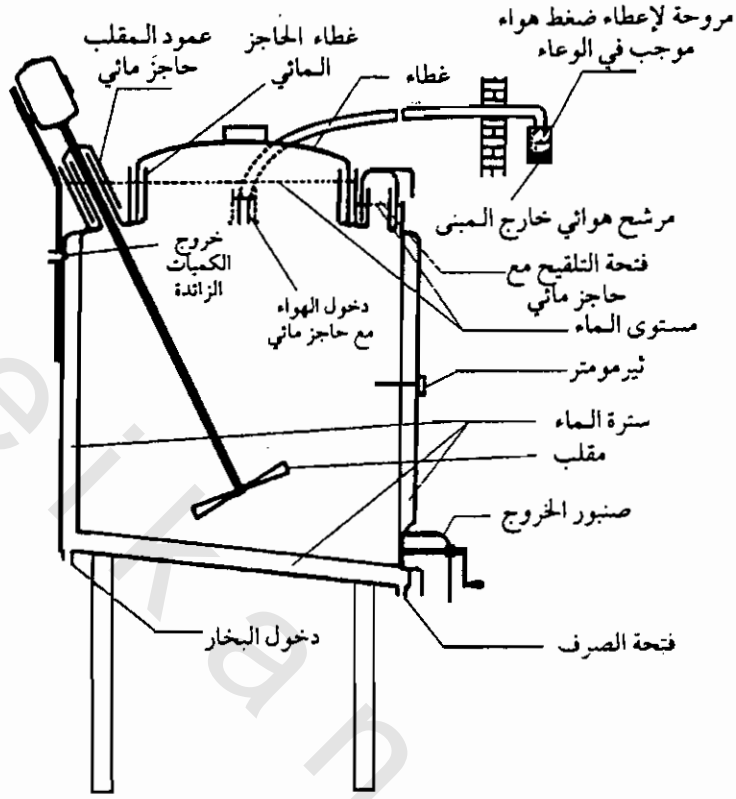
دخول أو خروج الهواء خلال تسخين أو تبريد اللبن. يغطى سطح الخزان بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم (١٠٠ ملجم /لتر) ، حتى يتم نقل بادئ التلقيح فى المزرعة الوسطية إلى بيئة بادئ الإضافة خلال حاجز معقم . يوضح شكل (١-١١) مثال لهذا الخزان . يعتمد فى نقل البادئ من وعاء لآخر فى نظام لويس على ضغط زجاجة البولي إثيلين لضخ المزرعة ، ويمكن استخدام نظام لويس بنجاح فى إنتاج كميات أصغر من البادئ.

٧-٢-٢- نظام جونز The Jones system

يوضح شكل (١-١٢) مواصفات الخزان المستخدم فى هذا النظام . يتم دخول أو خروج الهواء إلى وعاء البادئ خلال تسخين أو تبريد اللبن ، حيث أن الخزان لا يعمل 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 باستخدام الحرارة والترشيح من خلال مرشحات من الصوف والقطن. يصب بادئ التلقيح فى الخزان خلال فتحة خاصة ضيقة مع استخدام حلقة لهب أو بخار للتعقيم عند نقطة الدخول . من الأمور الجديرة بالذكر ، أن وحدة ترشيح الهواء يتم تنشيطها أثناء تسخين وتبريد المزرعة النشطة ، وذلك للتأكد من أن الهواء الداخل إلى الخزان دائماً معقماً . الشكل (١-١٣) يوضح نظام مماثل لخزان بادئ الإضافة ويحتوى على وحدة خاصة لترشيح الهواء . كما تستخدم بيئات مثبطة للفاج (PIM) ، وقد يطلق عليها بيئات مقاومة للفاج (PRM) فى تحضير بادئات الإضافة ، حيث يعتمد تكاثر الفاج فى مزارع البادئلت على وجود أيونات كالسيوم حرة فى بيئة النمو . وعادة يستخدم الفوسفات للأرتباط بأيونات الكالسيوم الحرة فى اللبن الفرز فى إنتاج بادئ الإضافة . وقد حدث تطورات كثيرة فى تركيب هذه البيئات ، وتوجد حالياً فىالأسواق وتتكون من جوامد لبنية ، سكر ، عوامل منشطة للنمو ، ومواد منظمة مثل الفوسفات والسترات ، ومع ذلك فإن تأثير هذه البيئات فى حماية وتنشيط نمو البادئات محدودة ، كما أشار البعض إلى فشل نمو بعض سلالات بكتريا حامض اللاكتيك فى هذه البيئات.



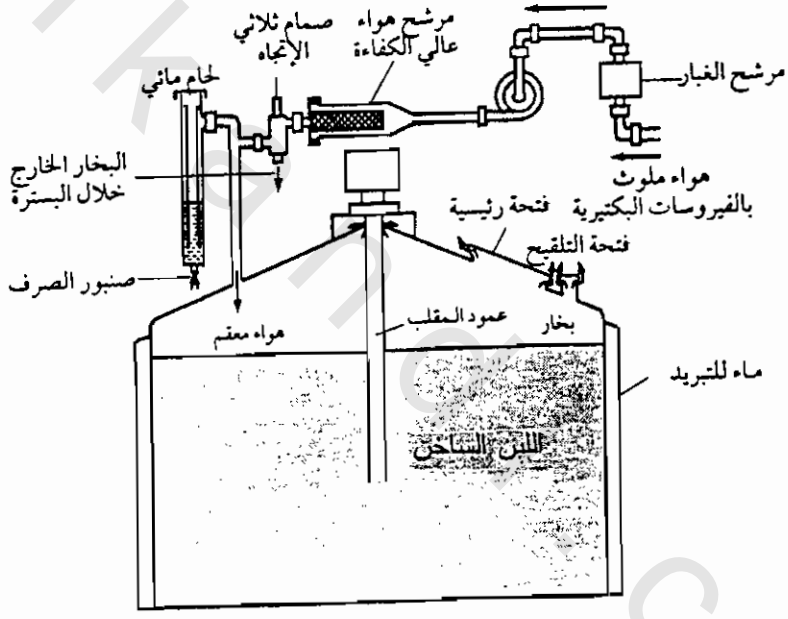
شكل (١-١١) : رسم تخطيطى لمخزان بادئ الإضافة فى نظام لويس لتحضير البادئ



شكل (١-١٢) : رسم تخطيطى لخزان بادئ الإضافة من نوع جونز .

يفضل عادة تنظيم 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 تحضن مزارع الحرارة المعتدلة عند ٢١°م ، بالرغم من أن درجة الحرارة المثلى لنموها هى ٣٠°م . معظم هذه الأنواع لها معدل نمو متماثل عند ٢٧°م ، لكن عند درجات حرارة أخرى خاصة ٢١°م ، يحدث اختلافات 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 تنتج هذه المزارع فى اللبن حموضة قدرها ٠,٨٥ % كحامض لاكتيك ، وينخفض pH من ٦,٥ إلى ٤,٥ . التحضين عند ٢١°م يعتبر من العوامل الهامة ، حيث أن ذلك يعنى أن البادئ الذى يلقح عند الساعة الرابعة مساء عند درجة حرارة الغرفة (٢١°م) يكون جاهزاً للأستخدام فى الصناعة بعد ١٦ ساعة ، أى عند الساعة الثامنة صباح اليوم التالى. عند درجة ٢١° فإن فترة الجيل (GT) فى البادئات المختلطة والمعرّفة السلالة فى اللبن تكون ٢,٢ ساعة.



شكل (١-١٣) : رسم تخطيطى لخزان بادئ الإضافة المحتوى على وحدة خاصة لترشيح الهواء .

عند التحضين عند 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 ، الحسابات بهاتين الطريقتين تعطى عدد أجيال متساوية تقريباً . عادة تحضن المزارع المحبة للحرارة المرتفعة عند ٤٢°م لمدة ٨-١٢ ساعة ، بالرغم من تباين درجة الحرارة المثلى للسلالات المختلفة من *Str.thermophilus* وكذلك thermophilic lactobacilli : ٣٩-٤٦°م ، ٤٢-٤٨°م على التوالى . خلال فترة التحضين ، ينخفض pH إلى حوالى ٣,٥ ، ٤,٥ للـ Lactobacilli ، Streptococci ، على التوالى ، منتجة حموضة قدرها ١,٢ ، ٠,٦ % كحامض لاكتيك . استمرار تحضين thermophlic lactobacilli يؤدى إلى إنتاج حموضة قدرها ٢ % كحامض لاكتيك . يمكن حفظ كل من المزارع المحبة للحرارة المعتدلة والمرتفعة لعدة أيام عند ٤°م بدون حدوث فقد كبير فى نشاطها أو قدرتها على إنتاج حامض لاكتيك.

٧-٣- تنظيف وتطهير المعدات

تغسل معدات مزرعة الأم والمزرعة الوسطية باليد باستخدام مواد تنظيف مناسبة ثم يجرى التطهير بعد الغسيل باستخدام البخار أو الكيماويات (مثل هيبوكلوريت يحتوى على ٢٠٠ ملجم/لتر من الكلور المتاح) ثم تشطف بماء بارد.

معظم أوعية بادئ الإضافة مجهزة بوسائل لاستخدام نظام التنظيف المكانى (CIP) . تتم طرق التنظيف والتطهير على النحو التالى : شطف بالماء البارد لإزالة بقايا اللبن ، الغسيل بالمنظفات الساخنة لإزالة بقايا اللبن من سطح الخزان ، الشطف بالماء ثم التطهير بالحرارة . إذا استخدمت الكيماويات المطهرة فإن خزان البادئ يشطف بالماء لإزالة البقايا ، وحيث أن لبن البادئ يعامل حرارياً لدرجة حرارة أعلى من ٨٨ °م فى الخزان ، فإن تطهير الخزان بعد الغسيل ليس ضرورياً.

٧-٤- مراقبة جودة مزارع البادئات

قدرة مزرعة البادئ على أداء عملها بكفاءة خلال عمليات التصنيع يعتمد على نشاطها ونقاوتها ، ويمكن تلخيص الخطوات الروتينية لاختبارات مراقبة جودة quality control مزارع البادئ فيما يلى:

١- مزارع بادئات بكتريا حامض اللاكتيك والبكتريا الأخرى:

أ- فحص مجهرى باستخدام صبغة جرام و/أو طريقة نيومان Neuman ، بكتريا البادئ موجبة لصبغة جرام ، وتستخدم الطريقة الأخيرة لضبط نسبة البكتريا الكروية إلى العصوية فى مزارع اليوجهورت (النسبة المرغوبة ٤٠ : ٦٠ إلى ٦٠ : ٤٠)

ب- الكشف عن الملوثات:

١- يكشف عن النقاوة باستخدام اختبار الكتاليز ، بكتريا حلمض اللاكتيك سالبة للكتاليز والتفاعل الموجب يدل على التلوث.

٢- يدل الاختبار الموجب لبكتريا القولون على تلوث عام.

٣- يجب ألا تحتوى مزارع بكتريا حامض اللاكتيك على الخمائر والفطريات .

٤- الكشف عن الفاج.

جـ-أختبار النشاط activity test يساعد على تقدير معدل تكوين الحموضة بمزرعة البادئ 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 اختباراً بيوكيماوياً 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 اختبار بكتريا القولون للكشف عن التلوث العام.

٣- اختبارات المسحة swab test لمعدات مزرعة البادئ وأوعية التنشيط والتحضير تعتبر ضرورية للحكم على كفاءة عملية التنظيف والظروف الصحية فى المصنع.

٧-٤-١- اختبارات نشاط البادئ

يجب اختبار مزارع البادئات بصفة دورية لبعض الصفات المرغوبة وكذلك بعض العيوب طبقاً لنوع المنتج الذى يستخدم البادئ فى تصنيعه ، فقد قام بعض الباحثين بشرح بعض الطرق لأختبار بادئات الإضافة (الصناعة) المحبة لدرجات الحرارة المعتدلة mesophilic bulk starters لنشاط إنتاج الحموضة acid producing activity ، ثنائى الأسيتيل diacetyl وإنتاج CO_2 والحساسية للفاج phage sensitivity . ومن المعروف منذ زمن طويل أنه كان يستخدم تقدير حامض اللاكتيك تحت ظروف معينة لتقويم نشاط مزارع البادئات ، أو قدرتها على إنتاج الحامض . وحالياً يتم تقدير pH حيث تعتبر طريقة سهلة وبسيطة ومرغوبة فى معظم الأحيان . ويمكن تقدير نشاط مزارع البادئات المحبة للحرارة المعتدلة المركزة المجمدة frozen concentrates ، حيث يتم تلقيح لبن UHT أو ١١ % RSM بمعدل ٠,١ % وقياس pH بعد التحضين لمدة ٢,٥ ساعة عند ٣١°م . تحت هذه الظروف فإن الفرق فى pH (Δ pH) بين لبن المقارنة غير الملقح وعينات اللبن الملقح يجب أن يكون ١,٤٠ - ١,٦٠ .

وقد شرح أحد الباحثين اختبارات النشاط activity tests لاستخدامها فى مصانع الألبان ، حيث يلقح لبن المصنع بمعدل ٣ % وذلك بالنسبة لبادئات الإضافة (الصناعة) المحبة لدرجات الحرارة المعتدلة mesophilic bulk starters ، والتحضين عند ٣١°م لمدة ٢,٥ ساعة . تحت هذه الظروف فإن التغير فى pH (Δ pH) يجب أن يكون ١,٢ - ١,٥ . كما يمكن قياس نشاط بادئات الإضافة المحبة للحرارة المرتفعة thermophilic bulk starters بإتباع هذا الاختبار مع التحضين عند ٤١°م ، وفى هذه الحالة يجب أن يكون ΔpH ١,٥٠ - ٢,٠ . وللحصول على نتائج دقيقة يجب الالتزام بدرجة الحرارة وفترة التحضين بدقة بالغة.

كما يمكن تقدير حامض اللاكتيك بواسطة المعادلة titration باستخدام أيدروكسيد الصوديوم NaOH حتى pH ٨,٣ . تعتبر هذه الطريقة مرهقة مقارنة بطريقة قياس pH ، ولكنها مفيدة فى تنفيذ منحنيات النمو growth curves

وتقدير فترة التضاعف (فترة الجيل generation time). والمعادلة التالية تعبر عـــن العلاقة بين كتلة خلايا البكتريا bacterial cell mass والوقت time .

$$\text{Ln}x - \text{Ln}\ x_0 = k\,(t - t_0)$$

وبتحويل هذه المعادلة إلى $\log_{10}$ تصبح على النحو التالى :

$$\log_{10} x - \log_{10} x_o = \frac{k\,(t - t_o)}{2.303}$$

حيث أن : x ، x_0 تعبر عن كتلة الخلايا عند زمن t ، t_o على الترتيب

k ثابت معدل النمو grrowth rate constant

عادة تنتج LAB حامض اللاكتيك بكمية تتناسب مع كتلة الخلايا ، لذلك فإنه يمكن إحلال حامض اللاكتيك محل كتلة الخلايا (أى التعبير عن كتلة الخلايـــا بكمية حامض اللاكتيك الناتجة) فى المعادلة السابقة . وتشير هذه المعادلـــة إلى أن العلاقة البيانية plot بين لوغاريتم $\log_{10}$ إنتاج الحامض مع الوقت علاقـــة خـــط مستقيم linear .بميل slope (m) يعادل $k/\ 2.303$ ،وفى الحقيقة فإن هذه العلاقـــة تمثل المرحلة اللوغاريتمية لمنحنى النموexponential phase of the growth curve.

عند تنفيذ منحنى إنتاج الحموضة ، يجب أن يتم تصحيح كل قيمة وذلك بطـــرح الحموضة الطبيعية (حموضة البيئية غير الملقحة uninoculated medium) ، مـــن النتائج المتحصل عليها ، حتى تعبر النتائج عن الحموضة المتكونة فعـــلاً . برســـم منحنى إنتاج الحموضةعلى ورق نصف لوغـــاريتمى semilogarithmic paper ، وذلك بتحويل النتائج الحسابية إلى لوغاريتمات .

فترة الجيل generation time (GT) تمثل الوقت اللازم لكى تتضاعف كتلة الخلايا أو إنتاج حامض اللاكتيك أى أن :

$$\text{GT} = t - t_0\,,\ x = 2\,x_0$$

وباستخدام هذه المعلومات فى المعادلة السابقة فإنها تصبح على النحو التالى :

$$\text{Ln}\ 2x_0 - \text{Ln}\ x_0 = k.\ \text{GT}$$

وبإعادة ترتيب هذه المعادلة تصبح على النحو التالى :

$$GT = \frac{\text{Ln } 2x_o - \text{Ln } x_o}{k}$$

$$= \frac{\text{Ln}2}{k} = \frac{0.693}{k} = \frac{0.693}{2.303xm} = \frac{0.301}{m}$$

ويمكن حساب ميل المنحنى m بسهولة من المنحنى السابق تنفيذه.

متوسط فترة الجيل GT للبادئات المحبة للحرارة المعتدلة حوالى ٢,٢ ساعة عند ٢١°م ، وحوالى ساعة عند ٣٠°م . مزارع البادئات تامة النمو تحتوى على حوالى ٠,٦٥ % حامض لاكتيك (يعادل ٠.٨ % حامض لاكتيك إذا لم يتم التصحيح بطرح الحموضة الطبيعية للبن غير الملقح ، كما سبق الإشارة) مع pH حوالى ٤,٦ وأعداد خلايا ١ × ١٠^{9} cfu/مل .

لا توجد معلومات متوفرة فى معظم المراجع عن فترة الجيل للبادئات المحبة للحرارة المرتفعة ، وعموماً فإن هذه البكتريا تنمو بمعدل أسرع من البادئات المحبة للحرارة المعتدلة عند درجات الحرارة المثلى ، ولذلك فإنه من المتوقع أن يكون فترة الجيل (GT) لهذه البكتريا أقصر عن البادئات المحبة للحرارة المعتدلة .