الفصل الرابع

السيطرة الحيوية على الميكروبات غير المرغوبة فى أغذية الألبان
Biocontrol of Undesirable Micro-organisms in Dairy Foods

١- مقدمة

يعتبر التخمير fermentation ، التجفيف drying ، والتمليح salting من أقدم طرق حفظ الأغذية . فى كثير من المناطق المعتدلة لا يعتبر التخمير وسيلة مناسبة لحفظ الأغذية ، ولكن فى المناطق الحارة فإن الأغذية الخامة raw والمطبوخة cooked تفسد سريعاً نتيجة لعدم توفر وسائل التبريد ، التجميد أو التعليب . يلعب تخمر حامض اللاكتيك lactic fermentation ، تحت الظروف الصحية السيئة ، دوراً هاماً فى حفظ الأغذية حيث أن التحميض acidification السريع سوف يمنع ، فى كثير من الحالات ، نمو البكتريا المرضية المنقولة عن طريق الغذاء food borne pathogens. فى معظم الحالات فإن الميكروبات المرتبطة بعملية التخمير تكون عبارة عن مخلوط غير معروف من البكتريا ، الخمائر والفطريات . عندما توجد بكتريا حامض اللاكتيك lactic acid bacteria (LAB)، فإن ذلك سوف يؤدى إلى تكوين الحموضة فى الغذاء . قدرة هذه الميكروبات على خفض pH أثناء عملية التخمير قد تتدهور نتيجة إعادة استخدامها فى التلقيح inoculum recycling ، حيث تستخدم الميكروبات الطبيعية الناتجة والمتكونة من عملية التخمير فى تلقيح الدفعة التالية من الأغذية ، يستخدم هذا الإجراء فى إنتاج كثير من منتجات الأغذية المتخمرة .

تعتبر التخمرات الطبيعية صورة من صور السيطرة الحيوية biocontrol حيث تثبط نمو الميكروبات غير المرغوبة المسببة للفساد والميكروبات المرضية ، وبالتالى تعمل على حفظ منتجات الأغذية . تعتبر الأغذية المتخمرة أغذية آمنة safe نسبياً عن الأغذية المحفوظة ، وعادة لا تسبب حالات من التسمم الغذائى food poisoning .

تتكون كميات كبيرة من الأحماض العضوية بواسطة أنواع مختلفة من الميكروبات مثل بكتريا حامض اللاكتيك (LAB) ، الخمائر والفطريات من أجناس

Aspergillus, Mucor, Penicillium, Rhizopus . يعتقد أن حفظ الأغذية التقليدية بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك ، قد يرجع أساساً إلى pH الحامضى الناتج من تمثيل السكريات إلى أحماض عضوية ، مثل حامض الخليك وحامض اللاكتيك ، مما يؤدى إلى زيادة فترة الصلاحية وسلامة الناتج النهائى. ومع ذلك ، فإن التأثير الحافظ لا يرجع فقط إلى زيادة تركيز الأحماض غير المتحللة undissociated acids والأنخفاض المصاحب فى الكربوهيدريت القابلة للتخمر المتاحة ، ولكن يتوقف أيضاً على سلسلة التفاعلات المتداخلة ، التى تشمل نشاط مائى a_w (water activity) ، استنفاذ العناصر الغذائية ، استبعاد الأكسجين ، سوف تساهم فى تثبيط نمو الميكروبات الأخرى. من الأمور شديدة الأهمية ، أن بكتريا حامض اللاكتيك يجب أن تكون قادرة على التكاثر بمعدل أسرع من البكتريا المرضية أو البكتريا المسببة للفساد ، تحت ظروف التخزين المتاحة

فى السنوات الأخيرة أصبح واضحاً أن التأثير المثبط inhibitory action لبكتريا حامض اللاكتيك ترجع إلى أنظمة تضادية معقدة antagonistic systems تتكون بواسطة مزارع البادئات . بكتريا حامض اللاكتيك قادرة على إنتاج وإفراز مواد مثبطة inhibitory substances أخرى بخلاف أحماض اللاكتيك والخليك ، وهذه المواد لها تأثير مثبط لمجموعة كبيرة من الميكروبات ، وبالتالى تساهم بدرجة فعالة فى زيادة التأثير المثبط لهذه الميكروبات ، حيث أنها تنتج بالإضافة إلى أحماض اللاكتيك والخليك كميات صغيرة من حامض الفورميك ، والأحماض الدهنية الحرة ، الأمونيا ، الأيثانول ، فوق أكسيد الأيدروجين H_2O_2 ، ثنائى الأسيتيل ، أسيتوين acetoin ، 2,3-butanediol ، استيالدهيد ، بنزوات benzoate ، إنزيمات محللة للبكتريا bacteriolytic enzymes ، بكتريوسينات bacteriocins ، ومضادات حيوية antibiotics بالإضافة إلى عدة مواد مثبطة أخرى لم يتم التعرف عليها بصورة دقيقة . بعض هذه المواد لها تأثير مثبط لعدد كبير من الميكروبات المسببة لفساد الأغذية والميكروبات المرضية ، تشمل بكتريا حامض اللاكتيك العصوية المتحملة البرودة psychrotrophic lactobacilli ، *Leuconostoc* ، *Bacillus cereus* ، *Clostridium botulinum* ، *Cl.perifringens* ، *Listeria monocytogenes* ، *Staph. aureus* وغيرها . كما

أن التنافس على استهلاك العناصر الأساسية essential substances ، وتراكم D-amino والانخفاض OR قد تحد بدرجة أكبر من نشاط الميكروبات غير المرغوبة.

استخدام مزارع بادئات مناسبة لإنتاج مركبات مثبطة فى الأغذية المتخمرة واستخدام المواد المثبطة النقية أو المنقاة جزئياً كمواد حافظة حيوية biopreservatives للأغذية فى كل من الأغذية المتخمرة وغير المتخمرة ، قد تصبح أكثر أهمية فى المستقبل فى حفظ الأغذية والوقاية من الاضطرابات المعوية .

للوصول إلى طريقة آمنة وفعالة من السيطرة الحيوية على الميكروبات غير المرغوبة فى الأغذية ، فإن الأمر يستلزم توفر معلومات كافية عن الميكروبات المفيدة وأسلوب تأثير المواد المضادة للميكروبات المرتبطة بها.

٢- نواتج التمثيل المضادة للميكروبات

تنتج الميكروبات ، وخاصة بكتريا حامض اللاكتيك (LAB) ، عدد كبير من نواتج التمثيل المضادة للميكروبات antimicrobial metabolites ، تشمل الأحماض العضوية ، H_2O_2 ، الكحولات ، ثنائى الأسيتيل والبكتريوسينات . كثير من هذه المواد تتميز بأن لها القدرة على إبادة أو تثبيط نمو الميكروبات المرضية التى تنتقل عن طريق الغذاء والميكروبات المسببة للفساد.

٢-١- أحماض عضوية

تنقسم بكتريا حامض اللاكتيك LAB إلى متجانسة التخمر homofermenters ومختلطة التخمر heterofermenters طبقاً لنواتج التمثيل النهائية end-products الناتجة من الجلوكوز . تقوم بكتريا حامض اللاكتيك المتجانسة التخمر (*Lactococcus* ، *Pediococcus* ، *Streptococcus* ، *Lactobacillus* spp. متجانسة التخمر) بتحويل الجلوكوز ، عن طريق مسار Embden-Meyerhof Parnas pathway (الفصل التاسع) ، أساساً إلى حامض لاكتيك (أكثر من ٨٥ % من نواتج التخمر النهائية) . بكتريا حامض اللاكتيك المختلطة التخمر (*Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* مختلطة التخمر) تحول الجلوكوز بأتباع مسار 6-phosphogluconate (الفصل التاسع) إلى حامض اللاكتيك (٧٠ %) وكميات مولية متساوية equimolar من CO_2 والخلات

acetate أو الأيثانول ethanol . يتم تمثيل شق acetyl phosphate إلى حامض خليك أو يختزل بواسطة إنزيمات dehydrogenases إلى أسيتالدهيد وإيثانول طبقاً لمستقبلات الأيدروجين المتاحة . تحت ظروف توفر الجلوكوز بكميات محدودة ، فإن بعض البكتريا المتجانسة التخمر قد تنتج النواتج النهائية للتخمر المختلط ، مثل حامض الفورميك ، حامض الخليك والأيثانول . تعرف هذه السلالات بالأنواع متجانسة التخمر الاختيارية facultative homofermenters.

يتم تمثيل السكريات خماسية الكربون pentoses بواسطة جميع بكتريا حامض اللاكتيك المختلطة التخمر ، بكتريا حامض اللاكتيك العصوية Lactobacilli المتجانسة التخمر الإختيارية و Lactococci, Streptococci, Pediococci بكميات مولية متساوية من الخلات واللاكتات .

تستخدم بكتريا حامض اللاكتيك المختلطة التخمر الإجبارية strict والاختيارية facultative كثير من المركبات كمستقبلات للإلكترون electron accceptors . التخمر المختلط للفركتوز ينتج مانيتول mannitol ، لاكتات ، خلات وإيثانول . تستخدم بكتريا *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lc.lactis* ssp. *lactis* ، السترات حيث يتم تمثيلها مع تكوين خلات وبيروفات pyruvate . تتحول البيروفات بعد ذلك إلى ثنائى الأسيتيل ، أسيتوين acetoin أو 2,3-butyleneglycol . كما قد تتكون الخلات من اللاكتات . يخمر *Lb.bifermentans* اللاكتات إلى حامض خليك ، إيثانول وآثار من حامض البروبيونيك ، CO_2 و H_2 . يقوم *Lb.plantarum* (متجانسة التخمر) بتحويل الطرطرات tartrate إلى لاكتات، خلات, CO_2 . يقوم *Lb.brevis* (مختلطة التخمر) بتمثيل الطرطرات إلى حامض السكسنيك succinic ، حامض الخليك , CO_2 . فى الخمور تقوم بكتريا حامض اللاكتيك بتحويل L-malic acid إلى L-lactic acid . تتأكسد البيروفات إلى خلات, CO_2 مع إنتاج الفورمات تحت ظروف لاهوائية وعدم توفر الجلوكوز بكميات كافية ، كما فى Bifidobacteria ، Leuconostocs ، *Lb.casei* ssp. *casei*, *Lb.plantarum*, . جدول (٤-١) يوضح الأسماء الحديثة والقديمة لبكتريا حامض اللاكتيك الهامة فى مجال الألبان .

جدول (٤-١) : الأسماء الحديثة لبعض بكتريا حامض اللاكتيك الهامة فى مجال الألبان .

الأسماء القديمة	الأسماء الحديثة
Lb.bulgaricus	*Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus*
Lb.casei	*Lb.casei* ssp. *casei*
Lb.lactis	*Lb.delbrueckii* ssp. *lactis*
Lb.oenos	*Leuconostoc oenos*
Leuc.citrovorum	*Leuc.mesenteroides* ssp. *cremoris*
Leuc.cremoris	*Leuc.mesenteroides* ssp. *cremoris*
Leuc. mesenteroides	*Leuc.mesenteroides* ssp. *mesenteroides*
Ped.cerevisiae	*Ped.acidilactici*
Propionibacterium shermanii	*Propionibacterium freudenerichii* ssp. *shermanii*
Str.citrovorus	*Leuc.mesenteroides* ssp. *cremoris*
Str.cremoris	*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*
Str.diacetylactis	*Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*
Str.faecium	*Enterococcus faecium*
Str.lactis	*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

كميات شحيحة من حامض البروبيونيك الناتجة بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك قد تؤثر على أغشية الفطريات ، وبالتالى تثبط من انتقال الأحماض الأمينية ، لذلك يستخدم حامض البروبيونيك كمادة حافظة فى الأغذية لمنع نمو الفطريات. بعض الفطريات المخمرة للأغذية (أجناس *Amylomyces* ، *Aspergillus* ، *Penicillium* ، *Rhizopus Mucor*) تنتج أحماض عضوية ، تشمل أحماض الخليك ، الستريك ، الفيوماريك ، crythrobic ، الماليك ، والسكسنيك succinic . فى حالة *Rhizopus* spp. ، يتكون حامض اللاكتيك تحت ظروف هوائية مرتفعة . وقد وجد أن *Rhizopus* spp. تحت ظروف لاهوائية تنتج كميات مولية متساوية من اللاكتات والأيثانول . وفى دراسة عن استخدام

الجلوكوز بواسطة *Rhizopus* spp. وجد أن نواتج التمثيل النهائية يتكون من الأيثانول ، حامض اللاكتيك ، CO_2 . وقد وجد آخرون أن معدل تكوين حامض الفيوماريك بواسطة *Rhizopus arrhizus* قد يتحسن فى وجود أسترات أحماض دهنية fattyacid esters ، مثل polyoxyethylene sorbitan monolaurate . ويعتقد أن هذا التحسين قد يرجع إلى تعديل فى نفاذية الغشاء مما يؤدى إلى إفراز الأحماض العضوية بمعدل أسرع . تحلل الخمائر السكريات إلى CO_2 وإيثانول مع نواتج ثانوية ، مثل الجليسرول ، حامض السكسنيك ، ثنائى الأسيتيل ، حامض اللاكتيك ، حامض الخليك ، حامض الفورميك ، أسيتوين acetion وكميات أكبر من الكحولات ، كثير منها مضادة للميكروبات .

التأثير التضادى antagonistic effect لبكتريا حامض اللاكتيك قد يرجع أساسا إلى pH المنخفض نتيجة تخمر السكريات إلى أحماض عضوية ضعيفة ، خاصة أحماض الخليك واللاكتيك . تتميز الأحماض الضعيفة بنشاط مضاد للميكروبات أقوى عند pH منخفض عنه عند pH التعادل . يعتبر حامض الخليك أقوى مثبط ويتميز بنطاق واسع من النشاط المثبط ، حيث يثبط الخمائر والفطريات والبكتريا . قد يرجع ذلك جزئيا إلى ارتفاع ثابت التحلل (الإنقسام) pKa لحامض الخليك (٤,٧٣ pKa) مقارنة بحامض اللاكتيك (٣,٨٥ pKa) . فمثلا عند pH ٤,٠ يوجد ١١ % فقط من حامض اللاكتيك فى صورة غير متحللة undessociated بينما ٨٥ % من حامض الخليك توجد فى صورة غير متحللة . عموما عند pH المنخفض ، ثابت تحلل الحامض dissociation constant (pKa) وتركيز الحامض تحدد درجة النشاط المثبط لكل من حامض اللاكتيك والخليك . عند pH معين فإن الحامض الذى يتميز بقيم pKa أعلى ، يكون معظمه فى صورة غير متحللة undissociated acid مما يؤدى إلى زيادة نشاطه المثبط للميكروبات antimicrobial activity . فمثلا حامض الخليك (pKa = ٤,٧٣) تكون قدرته على تثبيط الميكروبات حوالى ٢-٤ أضعاف قدرة حامض اللاكتيك (pKa = ٣,٨٥) عند pH ٤ إلى ٤,٦ ، أى أن حامض الخليك أكثر قدرة على تثبيط الميكروبات عن حامض اللاكتيك .

الخلات تتميز بقدرة أكبر مضادة للميكروبات فى الأغذية التى يكون فيها pH بين ٤-٦ ، حيث يكون نسبة أكبر من الحامض فى صورة غير متحللة undissocitated form لذلك أقترح البعض أن بكتريا حامض اللاكتيك المهندسة وراثيا لإنتاج كميات زائدة من حامض الخليك تكون أكثر فاعلية فى حفظ الأغذية، حيث تتميز بنشاط أقوى مضاد للميكروبات .

نشاط الأحماض العضوية المضاد للميكروبات قد يرجع أساسا إلى خلل فى وظيفة الغشاء والإنزيمات الأساسية . جزيئات الخلات غير المتحللة المحبة للدهون lipophilic تكون قادرة على النفاذ من خلال غشاء خلايا البكتريا . عند دخول الخلايا ، يتحلل الحامض فى السيتوبلازم (حيث يكون pH أعلى) وتنفرد البروتونات (H^+) protons ، التى يجب أن تنطلق خارج الخلايا للمحافظة على pH ثابت فى الخلايا (ثبات pH الخلوى) ، مما يؤدى إلى خلل فى قوة البروتون الدافعة proton motive force ، وبالتالى لا تحدث عملية الأكسدة الفوسفورية oxidative phosphorylation وانتقال العناصر الغذائية nutrient transport . وقد وجد أن الخلات وغيرها من الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة تثبط امتصاص L-serine وغيرها من الأحماض الأمينية فى الخلايا الكاملة أو غشاء *Bacillus subtilis* .

الأحماض العضوية ليست بالضرورة أن تقتل الخلايا ، ولكن قد يكون لها تأثير قوى على النمو . وقد وجد أنه عند pH التعادل فإن لاكتات الصوديوم (٥ %) تختزل محصول النمو growth yield ، تطيل فترة النمو اللاجى lag phase وتخفض معدل نمو ميكروبات *Staph. aureus* ، *S.typhimurium* وبعض بكتريا حامض اللاكتيك .

مخلوط من أحماض عضوية يكون مضاد للميكروبات بدرجة أقوى عن كل حامض عضوى بمفرده . وقد وجد أن مخلوط من حامض اللاكتيك وحامض الخليك يكون أكثر قدرة على تثبيط *E.coli, S.enteritidis* عن كل حامض عضوى بمفرده . يعتقد أن آلية هذا التأثير يعتمد على الحامض الأقوى ، حامض الخليك ، فى خفض pH ، وبالتالى زيادة نسبة حامض الخليك غير المتحلل . وقد أظهرت الأبحاث أن حامض اللاكتيك (٢,٢٠ ملليمول) وحامض الخليك (١,٢٨

ملليمول) يكون لهما تأثير تعاونى synergistic ، مسببا انخفاضا قدره ٥٠ % فى معدل نمو *S.typhimurium* . حامض اللاكتيك وحامض الخليك فى الصورة غير المتحللة يكونا أكثر فاعلية فى تثبيط عدد من الميكروبات ، تشمل *Listeria monocytogenes* ، *Brochothrix thermosphacta* ، *Shigella* spp., *Pseudomonas fluorescens* .

٢-١-١- التطبيق فى مجال الألبان

يمكن تأخير فساد جبن Cottage المضاف إليها قشدة بواسطة *Pseudomonas fragi* بدرجة كبيرة إذا أحتوى مخلوط القشدة على *Lc.lactis* biovar *diacetylactis* . كما وجد أن مخلوط القشدة الملقح يثبط بدرجة كبيرة نمو (الأسم القديم *P.putrefaciens*) *E.coli, Alteromonas putrefaciens* نتيجة لقيم pH المنخفض نوعا ، ولكن ليس له تأثير على *Geotrichum candidum* . كما لوحظ تأثير مثبط قوى لحامض اللاكتيك فى الأغذية المتخمرة المحتوية على أنواع من البكتريا السالبة لجرام المسببة للفساد ، كما أنه يثبط أيضا *Staph.aureus* . ظهور أحماض دهنية طيارة ، خاصة حامض الخليك ، فى الجبن المسواه ، يكون مصحوبا بانخفاض أعداد السالمونيلا Salmoncllae . وجد أيضا أن الأحماض الدهنية الطيارة تكون مبيدة للسالمونيلا ،ويتوقف النشاط بدرجة كبيرة على قيم pH . كما أشار البعض أن تثبيط الميكروبات المتحملة البرودة المسببة للفساد فى جبن Cottage يرجع إلى حامض الخليك الناتج بواسطة *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* المضاف إلى مخلوط القشدة . تثبيط *S.gullinarum* بواسطة *Leuc.mesenteroides* ssp. *cremoris* يعزى إلى حامض الخليك وكذلك حامض اللاكتيك ، بالرغم من أن الحامض الأخير مثبط ضعيف . تم تثبيط السالمونيلا عند قيم pH أقل من ٤,٤ لحامض اللاكتيك و ٥,٤ لحامض الخليك . نتيجة لذلك فإن كميات قليلة من حامض الخليك الناتجة بواسطة بكتريا البادئ تساهم بدرجة كبيرة فى التأثير الحافظ لهذه البادئات . لا تستطيع *S.typhimurium, Staph.aureus* أن تبقى فى شرش جبن Cottage نتيجة لانخفاض قيم pH (٤,٥-٤,٦) للشرش . يمكن تثبيط *Staph.aureus,* بواسطة

كل من حامض اللاكتيك وحامض الخليك الناتجة بواسطة *Lc.lactis* biovar *diacetylactis* . يثبط حامض اللاكتيك نمو *Staph.aureus* فقط فى المراحل الأولى وليس فى المراحل المتأخرة من النمو . يرتبط إنتاج الحامض بواسطة بادئات بكتريا حامض اللاكتيك بتثبيط وإتلاف سلالات *E.coli* المرضية أثناء صناعة جبن الكممبير . وقد أشارت بعض التقارير إلى مسئولية حامض اللاكتيك عن تثبيط *Bacillus subitlis* ، *E.coli* ، *P.fluorescens*, *Staph.aureus* بواسطة *Lactobacillus* spp. المعزول من يوجهورت تجارى.

كما أن حامض اللاكتيك يكون مسئولا بصفة أساسية عن النشاط المبيد للبكتريا ضد *S.typhimurium* . وقد وجد أن حامض الخليك هو المثبط الرئيسى للخمائر المحبة للضغط الأسموزى المرتفع osmophilic yeasts فى Soy sauce المتخمر ، بالرغم من أن حامض اللاكتيك مثبط ضعيف . تثبيط ميكروبات القولون coliforms بواسطة مزارع تجارية من *Str.thermophilus*, *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* يعزى إلى تكوين حامض اللاكتيك . وقد أشار البعض إلى التأثير التعاونى synergistic action لحامضى الخليك واللاكتيك فى تثبيط نمو *Salmonella, E.coli* . ونظرا للتأثير الحمضى القوى لحامض اللاكتيك ، فإن الكمية المثبطة من حامض الخليك غير المتحلل تزيد بدرجة كبيرة. نمو خلايا *B.cereus* النامية مع أنواع مختلفة من بكتريا حامض اللاكتيك يتم تثبيطها أساسا بواسطة الخلات (خاصة عند pH ٦,١) ، بينما يتم تثبيط إنبات الجراثيم ، بترتيب تنازلى ، بواسطة الفورمات formate ، اللاكتات lactate والخلات acetate عند pH ٤,٤٠ ، ٤,٣ ، ٤,٢ ، على التوالى . نتيجة لذلك فإن التباين فى حساسية حامض اللاكتيك وحامض الخليك قد يكون عامل اختيار فى السيطرة على فساد بعض الأغذية . فمثلا *Brochothrix thermosphacta* يكون مقاوما نسبيا لحامض اللاكتيك تحت ظروف هوائية ، بينما يفشل هذا الميكروب فى النمو تحت ظروف لاهوائية عند pH ٥,٥٠ فى وجود ٥٠ ملليمول لاكتات . حساسية البكتريا للأحماض قد تتوقف على تأثير عوامل إضافية أخرى فى نفس الوقت (النشاط المائى a_w ، تركيز الملح ، جهد الأكسدة والاختزال OR ، المعاملة

الحرارية .. وغيرها) فمثلا يتم تثبيط *Cl.tyrobutyricum* بواسطة التأثير التعاونى synergistic بين الحموضة وتركيز كلوريد الصوديوم.

وعموما فإن الفطريات والخمائر تكون أقل حساسية للاكتات والخلات عن البكتريا . الخلات أكثر سمية toxic من اللاكتات ، وتثبط فطريات الخبز (عفن الخبز) التى تشمل *Rhizopus* spp., *Aspergillus niger* . خلات الصوديوم بتركيز ١ % عند pH ٤,٥ قد أدى إلى تثبيط نمو وإنتاج الأفلاتوكسين aflatoxin بواسطة *A.parasiticus* فى المزارع السائلة . معظم الأغذية المحفوظة بحامض الخليك تكون عادة آمنة safe من نمو الفطر ، بالرغم من "فطر المخللات pickle mold " *Moniliella acetobutans* يستطيع أن يفسد المشهيات condiments ، وأنه قادر على النمو بدرجة سريعة مستخدما الخلات فى التغذية .

وقد قام بعض الباحثين بمراجعة سمية الأحماض الدهنية ومشتقاتها وقدرتها على إبادة البكتريا والفطريات ، حيث وجد أن الأحماض الدهنية المحتوية على رابطة زوجية واحدة monounsaturated fatty acids تتميز عموما بنشاط مضاد للميكروبات بدرجة أقوى من الأحماض الدهنية المشبعة ، كما أن طول السلسلة يؤثر أيضا على النشاط المضاد للميكروبات . يتميز palmitoleic بنشاط مضاد للميكروبات بدرجة أقوى عن الحامض المشبع المقابل ، حامض البالمتيك palmitic. وقد ذكر بعض الباحثين أنه تم تثبيط *Leuconostoc oenos* بواسطة الأحماض الدهنية الناتجة بفعل *Saccharomyces cerevisiae* أثناء عملية تخمير malolactic . أحماض ، dodecanoic ، palmitoleic ، octanoic, decanoic من الأحماض الدهنية الرئيسية التى شملتها الدراسة ، ويتوقف النشاط على تركيب البيئة .

٢-٢- فوق أكسيد الأيدروجين (H_2O_2)

فى وجود الأكسجين ، تكون بكتريا حامض اللاكتيك قادرة على إنتاج H_2O_2 من خلال تأثير NADH ، flavoprotein-containing oxidases superoxide dismutase, oxidases . فى غياب مصدر للهيم Heme ، فإن بكتريا حامض لاكتيك لا تنتج كتاليز . بعض الأنظمة التى تزيل H_2O_2 تكون أقل

نشاطا عن الأنظمة المنتجة له ، وهذا يسمح بتراكم H_2O_2 . وقد وجد أن H_2O_2 لا يتراكم بكميات كبيرة فى الخلية الحية *in vivo* حيث يتحلل بواسطة إنزيمات peroxidases ، flavoproteins وpseudocatalase (جدول ٤-٢) .

جدول (٤-٢) : إنزيمات بكتريا حامض اللاكتيك التى تشارك فى تمثيل الأكسجين .

$NADH + H^+ + O_2 \xrightarrow{NADH : H_2O_2 \text{ oxidase}} NAD^+ + H_2O_2$	
$2NADH + 2H^+ + O_2 \xrightarrow{NADH : H_2O_2 \text{ oxidase}} 2\,NAD^+ + 2H_2O$	
$NADH + H^+ + H_2O_2 \xrightarrow{NADH \text{ peroxidase}} NAD^+ + 2H_2O$	
$2O^-_2 + 2H^+ \xrightarrow{\text{Superoxide dismutase}} H_2O_2 + O_2$	
$2H_2O_2 \xrightarrow{Mn^{2+}\ \text{Pseudocatalase}} 2H_2O + O_2$	
$\text{Pyruvate+phosphate+}O_2 \xrightarrow[TPP,\ FAD]{\text{Pyruvate oxidase}} \text{acetyl – phosphate} + CO_2 + H_2O_2$	
$\alpha\text{-glycerophosphate+}O_2 \xrightarrow[\text{oxidase}]{\alpha\text{-glycerophosphate}} \text{dihydroxyacetonephosphate} + H_2O_2$	
$\text{Lactate} + O_2 \xrightarrow{\text{L-lactate oxidase}} \text{pyruvate} + H_2O_2$	
$\text{Lactate} + O_2 \xrightarrow[\text{D-lactate dehydrogenase}]{\text{NAD-indepenent}} \text{pyruvate} + H_2O_2$	

عند تخمر الأغذية بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك ، فإن نواتج تمثيل أخرى قد تتكون بالإضافة إلى الأحماض العضوية ، مثل ثنائى الأسيتيل ، H_2O_2 ، وهذه النواتج قد تساهم جزئيا فى حفظ الأغذية.

فى بكتريا حامض اللاكتيك ، مثل Lactococci, *Lb.acidophilus* ، يتكون H_2O_2 كناتج نهائى من أكسدة اللاكتات ، البيروفات أو reduced nicotinamide-(NADH) adenine dinucleotide . يتم أكسدة NADH بواسطة الأكسجين الجزيئى عن طريق NADH oxidase إلى NAD و H_2O_2 وينشط التفاعل بواسطة flavin adenine dinucleotide .

بالرغم من أن بعض H_2O_2 الناتج يتم التخلص منه بواسطة NADH peroxidase ، فإن كميات كافية تتراكم فى بيئة النمو ليثبط نمو ، تنفس وبالتالى حيوية *Lactococcus* spp. .

٢-٢-١- التطبيق فى مجال الألبان

أ- تراكم فوق أكسيد الأيدروجين (H_2O_2)

من المعروف أن بكتريا حامض اللاكتيك تتميز بنشاط مضاد لميكروبات أخرى ، نظرا لإنتاج نواتج تمثيل metabolites وإنفرد H_2O_2 . بالإضافة إلى ذلك، فإن بكتريا حامض اللاكتيك القادرة على تكوين H_2O_2 سوف تؤدى إلى تراكم H_2O_2 الناتج فى بيئة النمو ، حيث أن هذه البكتريا سالبة للكتاليز . هذا التراكم من H_2O_2 قد يصل إلى مستويات مثبطة ذاتية auto-inhibitory levels . وقد وجد أن ٠,٢ ملليمول /اللتر يثبط نمو Lactococci بمقدار ٥٠ % ، ١,٥ملليمول H_2O_2/اللتر يؤدى إلىموت الخلايا . من ناحية أخرى ، فإن بكتريا حامض اللاكتيك تستطيع أن تتأقلم مع H_2O_2 أو الأكسجين.

التأثير المضاد لـ *Lb.delbrueckii, Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus,* ssp. *lactis* ناحية *Staph.aureus* قد يعزى جزئيا إلى H_2O_2 الناتج بواسطة Lactobacilli . إضافة أعداد كبيرة من *Lb.delbrueckii* ssp. *lactis,* *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* إلى لبن خام يؤدى إلى تكوين كميات كافية من H_2O_2 لتأخير نمو الميكروبات المتحملة البرودة المسببة للفساد (مثل *Pseudomonas fragi*) عند درجات حرارة منخفضة . كما أن تكوين H_2O_2 يكون مسئولا جزئيا عن التأثير المضاد لميكروب *Lb.acidophilus* على الميكروبات المرضية التى تنتقل عن طريق الغذاء (كل من الميكروبات الهوائية المنتجة للكتاليز واللاهوائية السالبة للكتاليز) . إنتاج H_2O_2 فى اللبن الفرز المسترجع واللبن المنخفض الدهن بواسطة *Lb.acidophilus* تؤخر من نمو *Ps.fragi* . بالرغم من التأثير المضاد الواضح لحامض اللاكتيك من ناحية و H_2O_2 من ناحية أخرى ، فإنه يعتقد فى معظم الحالات ، أن التأثير المضاد لبكتريا البادئ يعزى إلى عوامل مشتركة تشمل pH المنخفض ، أحماض عضوية ، H_2O_2 ومواد مثبطة أخرى.

وقد وجد أن H_2O_2 المتكون بواسطة *Lb.plantarum* فى بيئة النمو يثبط ، *Proteus, Bacillus, Pseudomonas* spp. كما أن H_2O_2 وحامض اللاكتيك فى راشح مزرعة *Lb.delbrueckii* ssp. *lactis* يثبط من نمو *List.monocytogenes* فى مزارع سائلة ، كما أن H_2O_2 الموجود فى راشح مزارع *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, ssp. *lactis* يثبط من نمو *Staph.aureus* .

وقد أظهرت بعض الدراسات أن بكتريا حامض اللاكتيك المنتجة لفوق أكسيد الأيدروجين فى مزارع مختلطة وفى الأغذية ومنتجات الألبان يثبط من نمو البكتريا المتحملة البرودة المسببة للفساد psychrotrophic spoilage bacteria والبكتريا المرضية التى تنتقل عن طريق الغذاء food-borne pathogens . وقد أظهرت النتائج بوضوح أن H_2O_2 مادة مثبطة أساسية حيث أنه عند إضافة إنزيم الكتاليز catalse ينخفض التأثير المثبط.

عادة تركيزات H_2O_2 الناتج تحت ظروف التجارب ليس مرتفعا بدرجة كافية للحصول على النشاط المضاد للميكروبات . وقد وجد أن *Lb.delbrueckii* ssp. *lactis* ينتج ١,٢-٥,٥ ميكروجرام H_2O_2 /مل ، بينما وجد آخرون أن *Ped.acidilactici, Lb.plantarum* (مزرعة بادئ لحوم) ينتج فقط ٠,٨٥ ميكروجرام H_2O_2/مل . تركيز ٦ ميكروجرام H_2O_2/مل يكون مثبطا bacteriostatic وتركيز ٢٠-٢٢ ميكروجرام H_2O_2/مل يكون قاتلا bactericidal لميكروب *Staph.aureas* . بالنسبة *Pseudomonas* spp. فإن تركيز ٢-٨ ميكروجرام H_2O_2/مل يثبط من نمو هذه الميكروبات ، ويزيد من مرحلة النمو اللاجى من ١ إلى ٧ ساعات ولكن تركيز ٢٥-٤٠ميكروجرام/مل يؤدى إلى مرحلة نمو لاجى طويلة إلى مالا نهاية infinite lag phase .

يرجع تأثير H_2O_2 المبيد للبكتريا bactericidal إلى تأثيره المؤكسد القوى على خلايا البكتريا ، مجاميع السلفدريل (-SH) sulfhydryl لبروتينات الخلية ، وإتلاف التركيب الأساسى لجزيئات الأحماض النووية وأكسدة لبيدات غشاء الخلية مما يزيد من نفاذية الغشاء . كما أن بعض التفاعلات المنتجة لفوق أكسيد الأيدروجين تتخلص من الأكسجين وبالتالى تخلق ظروف لاهوائية تكون غير ملاءمة لبعض الميكروبات.

يعزى التأثير المثبط inhibitory effect لفوق أكسيد الأيدروجين إلى تأثيره المباشر أو غير المباشر بواسطة أحد نواتج التمثيل مثل شق الهيدروكسيل (-OH) الحر المتكون من تفاعل H_2O_2 مع السوبر أكسيد (O^-_2) . كما قد يتفاعل H_2O_2 مع مركبات أخرى ليكون مركبات مثبطة أخرى.

ب- نظام لاكتوبيروكسيديز-ثيوسيانات-H_2O_2 المضاد للميكروبات

Lactoperoxidase-thiocyanate-H_2O_2 antimicrobial system (LPS)

تركيزات H_2O_2 التى لاتكون فى حد ذاتها مثبطة قد تصبح مثبطة فى البيئات الطبيعية (اللبن، اللحم ، اللعاب) من خلال نواتج تفاعلات ثانوية. فمثلا، يعتقد أن Lactobacilli (مصدره اللحم) ينتج H_2O_2 الذى يتفاعل مع مواد بروتينية فى اللحم ليكون مواد مثبطة . فى اللبن الخام ، الثيوسيانات thiocyanate عند تركيز ١-١٠ جزء فى المليون (ppm) ، يمكن أن تتأكسد بواسطة لاكتوبيروكسيديز lactoperoxidase فى وجود حوالى ١٠ نانومول nmol H_2O_2/اللتر إلى هيبوثيوسيانيت ($OSCN^-$) hypothiocyanite المضاد للبكتريا antibacterial . هذا الأيون يكون فى حالة اتزان مع hypothiocyanous acid (HOSCN) (pKa = ٥,٣) عند pH متعادل . أنيونات oxyacids cyanosulfuric acid (HO_3 SCN), cyanosulfurous (HO_2SCN) المتكونة بواسطة أكسدة إضافية فى وجود كميات زائدة من H_2O_2 تتميز بصفات مضادة للبكتريا أقوى من هيبوثيوسيانيت hypothiocyanite . يتم تفاعلات نظام اللاكتوبيروكسيديز بمساعدة تركيزات منخفضة من اللاكتوبيروكسيديز تصل إلى ٠,٥ نانوجرام (ng)/مل (يحتوى اللبن على ١٠-٣٠ ميكروجرام ug لاكتوبيروكسيديز/مل).

تثبيط أو قتل كثير من أنواع البكتريا غير المرغوبة معمليا *in vitro* بواسطة نظام LPS قد تم إدراكه بصورة جيدة . وقد وجد أن نظام LPS يثبط نطاق واسع من البكتريا السالبة لجرام المرضية ، تشمل *Salmonella* spp. ، *Campylobacter* spp. ، *P.aeruginosa, E.coli* . كما أن نظام LPS يحد من نمو البكتريا الموجبة لجرام ، مثل *Streptococcus* spp. ، *Staph.aureus, List.monocytogenes* .

كثير من البكتريا السالبة لجرام تموت سريعا فى وجود هيبوثيوسيانيت hypothiocyanite ، التأثير العام على بكتريا حامض اللاكتيك يكون مثبطا bacteriostatic بصفة عامة ومع ذلك ، فإن بعض Lactococci تكون مقاومة للنظام المثبط LPS. هذه المقاومة تتم بواسطة NADH:OSCN$^-$ oxidoreductase الذى يختزل OSCN$^-$ إلى SCN$^-$ خامل inert . بكتريا حامض اللاكتيك تكون قادرة على إصلاح التلف الناتج بواسطة نواتج أكسدة الثيوسيانات thiocyanate .

عدد من تأثيرات تمثيل البكتريا ، التى قد تساهم فى تثبيط نمو الميكروبات الحساسة ، قد سجلت لنظام LPS ، تشمل خفض استهلاك الأكسجين ، خفض إنتاج اللاكتات بواسطة البكتريا المخمرة ، تثبيط إنزيمات التمثيل الرئيسية مثل glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, hexokinase ، تثبيط امتصاص السكر والأحماض الأمينية وأنظمة الانتقال transport systems ، تلف غشاء السيتوبلازم مع فقد أيونات البوتاسيوم ، أحماض أمينية وغيرها من الخلية وتثبيط تخليق DNA ، RNA والبروتين . ويعتقد أن أكسدة مجاميع السلفدريل الأساسية فى الإنزيمات والبروتين بواسطة هيبوثيوسيانيت hypothiocyanite هى التأثير المضاد للبكتريا فى LPS.

تدل الدراسات التطبيقية على أن LPS يكون مفيدا فى إطالة فترة صلاحية اللبن الخام غير المبرد ، حيث أن هذا اللبن غالبا ما يكون ملوثا بميكروبات *Pseudomonas* spp. ، التى تسبب الإنزيمات المحللة للبروتين والدهن الناتجة منها مشكلة هامة عند تصنيع اللبن . إضافة آثار من SCN$^-$ و H_2O_2 بتركيز ١٢ و٨ جزء فى المليون ، على الترتيب ، قد كان له تأثيرا مفيدا. استخدام LPS يكون على جانب كبير من الأهمية كبديل لاستخدام تركيزات مرتفعة من H_2O_2 لحفظ اللبن فترة قصيرة فى الدول النامية حيث لا تتوفر وسائل تبريد كافية فى المزرعة ، كما تم دراسة حفظ منتجات الألبان ، مثل القشدة وجبن Cottage ، جبن الموزاريلا واليوجهورت ولبن UHT وكذلك الجبن الطرية الفرنسية باستخدام LPS. كما تم الاستفادة من هذا النظام كنظام مضاد للبكتريا فى لبن الأطفال أو بدائل الألبان فى تغذية العجول الرضيعة وفى الوقاية ومعالجة مرض التهاب الضرع matitis . وقد وجد أن سلالات مختلفة من البكتريا المسببة لإلتهاب الضرع ، *Str.uberis* ، قد تم

تثبيطها بواسطة عوامل مضادة للميكروبات بالإضافة إلى LPS فى اللبن. بالإضافة إلى ذلك ، فإنه من المعروف أن LPS الكامل يحدث طبيعيا فى الإنسان والحيوانات، حيث يعمل كنظام مضاد للبكتريا داخليا يشجع على توازن الفلورا فى التجويف الفمى والأمعاء .كما أنه يستخدم فى معجون الأسنان ومحاليل العدسات اللاصقة بإدخال مركبات منشطة لنظام LPS.

٢-٣- ثنائى الأسيتيل

ثنائى الأسيتيل diacetyl مسئول عن طعم ونكهة الزبد فى جبن Cottage واللبن الخض،الصور المختزلة لثنائى الأسيتيل (الأسيتوين acetoin, 2,3butyleneglycol) تكون عديمة الطعم flavorless . يوجد ثنائى الأسيتيل أيضا فى الخمور البيضاء والحمراء والبن المحمص والسيلاج وغيرها من الأغذية المتخمرة.

بعض سلالات بكتريا حامض اللاكتيك المتجانسة التخمر أو المختلطة التخمر تنتج ثنائى الأسيتيل (2,3-butandione) بمفرده أو مع الأسيتوين acetoin. يحول *Lactobacillus* spp.,*Leuconostoc* spp. *Lc.lactis* biovar *diacetylactis* السترات إلى خلات وبيروفات . يتم تمثيل البيروفات بعد ذلك مكونا ثنائى الأسيتيل ، أسيتوين acetoin أو 2,3-butyleneglycol . يتكون أقصى إنتاج لثنائى الأسيتيل والأسيتوين acetoin بواسطة *Lb.casei* ssp. *casei* أثناء المراحل المتأخرة من مرحلة النمو اللوغاريتمى أو المراحل الأولى من مرحلة الثبات stationary عند pH ٤,٥-٥,٥ . وقد وجد أن *Lb.casei* ssp. *casei* تنتج ٠,٠٧٥ ميكرومول/مللجم وزن جاف /مل/دقيقة أسيتوين/ثنائى الأسيتيل من البيروفات، بينما تنتج *Lc.lactis* biovar *diacetylactis, Lb.plantarum* ٦,٦ % ,٦٩,٧ % من هذه الكمية على التوالى. ومع ذلك ، فإن إنتاج ثنائى الأسيتيل غير ثابت فى *Lc.lactis* biovar *diacetylactis* ، قد يعزى ذلك إلى وجود جين citrate permease على البلازميد .

التأثير المضاد للميكروبات لثنائى الأسيتيل يكون أقوى على البكتريا السالبة لجرام ، الخمائر والفطريات عنه على البكتريا الموجبة لجرام . يتداخل ثنائى الأسيتيل

مع الاستفادة من الآرجنين ، حيث يتفاعل مع البروتين المرتبط بالآرجنين فى البكتريا السالبة لجرام . وقد وجد أن ثنائى الأسيتيل (٢٠٠ ميكروجرام/مل) يثبط من نمو البكتريا السالبة لجرام (خاصة *Pseudomonas*) والخمائر ، حيث أن تركيز ٣٠٠ ميكروجرام/مل يكون ضروريا لتثبيط البكتريا الموجبة لجرام غير بكتريا حامض اللاكتيك ، ثنائى الأسيتيل بتركيزات أقل من ٣٥٠ ميكروجرام/مل لا تثبط بكتريا حامض اللاكتيك. ثنائى الأسيتيل يكون مضادا للميكروبات بدرجة أقوى عند pH ٥ عنه عند pH ٧ ، لذلك فإن تركيز أقل يكون فعالا فى وجود حامض اللاكتيك أو حامض الخليك ، الذى يخفض pH . يتميز ثنائى الأسيتيل بأن له تأثير قاتل على *Yersinia enterocolitica* ، *Aeromonas hydrophila* ، *S.anatum, E.coli* ، ولكن لا يؤثر على *Listeria* spp. . بعض الفطريات والخمائر (مثل *Geotrichum, Saccharomyces*) تنتج ثنائى الأسيتيل . نظرا لأن ثنائى الأسيتيل مركب طيار volatile وله طعم مميز ، ويحدث تأثير مثبط عند تركيزات مرتفعة ، لذلك من الصعب استخدامه كمادة حافظة فى الأغذية غير المتخمرة التقليدية ولكن يكون مفيدا كمادة معقمة aseptic agent للأوعية والأسطح المستخدمة فى صناعة الأغذية والألبان والصناعات الزراعية .

٢-٤- الأسيتالدهيد

الأسيتالدهيد acetaldehyde المتكون أثناء تمثيل الكربوهيدريت بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك المختلطة التخمر يختزل إلى إيثانول . غياب alcohol dehydrogenase فى بكتريا حامض اللاكتيك قد يؤدى إلى إفراز الأسيتالدهيد الخلوى (من داخل الخلية) . بكتريا حامض اللاكتيك المحبة للحرارة المرتفعة thermophilic المستخدمة فى إنتاج اليوجهورت ، مثل *Str.thermophilus, Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ، لا تحتوى على alcohol dehydrogenase ولذلك تفرز أى أسيتالدهيد يتكون داخل الخلية . ينشأ أيضا الأسيتالدهيد من تحويل الثيرونين threonine والجليسين glycine بواسطة threonine aldolase دون زيادة فى NADH وبالتالى يمنع الاختزال إلى إيثانول . الأسيتالدهيد يكون مسئولا عن النكهة المميزة لليوجهورت.

وقد وجد أن بعض بكتريا حامض اللاكتيك تثبط البكتريا المرضية التي تنتقل عن طريق الغذاء (*E.coli* ، *S.typhimurium* ، *Staph.aureus*) بواسطة الأسيتالدهيد بتركيزات ١٠-١٠٠ جزء فى المليون . يجب مقارنة هذه النتائج بمستوى الأسيتالدهيد المتكون فى اليوجهورت حيث يصل إلى ٢٥ جزء فى المليون ، مما يعتقد أن هذا المركب يلعب فقط دورا ثانويا مضاد للميكروبات.

٢-٥- الكحولات

من المعروف أن الأيثانول من المواد المطهرة disinfectant والمضادة للميكروبات antimicrobial ، لكن الأيثانول بصفة عامة غير مناسب للاستخدام كمادة حافظة فى الأغذية ، حيث أن الأمر يتطلب تركيزات مرتفعة نسبيا لتثبيط البكتريا والفطريات . الأيثانول بتركيز ١٥ % أو أعلى يؤدى إلى تلف سريع لمعظم الخلايا الخضرية الميكروبية ، بالرغم من أن *Lb.homohiochii, Lb.heterohiochii* يسببان فساد المشروبات الكحولية مثل Saké ، ولهما القدرة على النمو عند تركيزات من الأيثانول تزيد عن ٢٠ % . عموما فإن تركيزات من الأيثانول تتراوح بين ٨-١١% (حجم/حجم) تمنع نمو البكتريا والفطريات ، الخمائر أكثر مقاومة وتحتاج إلى تركيز ١٥-١٨ % (حجم/حجم) حتى يحدث التلف .

يعتقد أن التركيزات المرتفعة من الكحولات alcohols تقتل البكتريا نتيجة تلف غشاء الخلية membrane damage من خلال حدوث تغيير فى طبيعة البروتينات (دنترة denaturation) وإذابة الليبيدات . تعتمد قوة الكحولات على طول سلسلة الكحولات وقدرتها على نزع الماء hydrophobicity . الكحولات قصيرة السلسلة تكون أقل سمية من الكحولات الأطول فى السلسلة ، وتزيد السمية بزيادة طول السلسلة حتى تصل إلى ١٠ ذرات كربون . قد تكون *E..coli* قادرة على النمو والبقاء فى وجود الإيثانول بزيادة تركيز الأحماض الدهنية 1 : 18 على حساب الأحماض 0 : 16 المشبعة . تأثير الكحول المضاد للميكروبات قد يتأثر بعوامل أخرى ، مثل a_w ودرجة الحرارة . وقد وجد أن تثبيط نمو *Staph.aureus* بواسطة الأيثانول لا يعزى فقط إلى نشاطه المضاد للميكروبات وإنما أيضا إلى قدرته على خفض a_w . فى الولايات المتحدة الأمريكية ، فإن المشروبات المحتوية على

أكثر من ٠,٥% (حجم/حجم) إيثانول يفرض عليها ضرائب طبقا لمحتواها من الكحول ، الذى يحد بفاعلية ، مع التركيز المرتفع واللازم لتثبيط الميكروبات ، من استخدام الأيثانول كمادة حافظة . وقد أقترح الإيثانول كمادة حافظة فى البيتزا Pizza المخبوزة جزئيا ، يمكن استخدام مولدات بخار الأيثانول ، الذى يباع تحت أسم تجارى Ethi cap ، لإطالة فترة صلاحية منتجات المخابز الخالية من الفطريات المخزنة فى جو معدل . وقد وجد أن تركيز الأيثانول (٠,٧٥% بالوزن) فى الخبز يزيد من فترة صلاحية الخبز لفترة تصل إلى الضعف على الأقل .

٢-٦- ثانى أكسيد الكربون (CO_2)

يعتبر CO_2 ناتج نهائى رئيسى فى تخمر السكريات سداسية الكربون hexoses بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك المختلطة التخمر . كما أن عدد من بكتريا حامض اللاكتيك منها الأنواع المتجانسة التخمر تكون قادرة على إنتاج CO_2 من الملات malate والسترات . تتحول الملات إلى لاكتات و CO_2 بواسطة إنزيم malolactic enzyme ، بينما السترات تتحول إلى خلات ، oxaloacetate بواسطة citrate lyase ثم تنزع مجموعة الكربوكسيل من oxaloacetate ويتحول إلى بيروفات و CO_2 . من الأمور غير الشائعة ، إنتاج CO_2 من L-malate عندما تستخدم كبيئة نمو لميكروب *Ent.faccalis* ، *Lb.casei* ، من الجلوكونات gluconate فى *Lb.casei* و *Ent.faecalis* ، من اللاكتات فى *Ent.faecalis* ، ومن السترات فى بعض أنواع وسلالات من أجناس *Lactococcus* و *Lactobacillus* ، *Leuconostoc* ، *Pediococcus* ، *Streptococcus* وفى بعض *Leuconostoc* spp. أيضا من اللاكتوز . بالإضافة إلى ذلك ، فإن أنواع مختلفة من بكتريا حامض اللاكتيك تتميز بقدرة على تمثيل الأرجنين arginine عن طريق arginine deiminase pathway مكونا CO_2 وأمونيا . أخيرا فإن نزع مجموعة الكربوكسيل من الأحماض الأمينية (هستدين ، تيروسين) يمكن أن تكون مصدرا ثانويا لإنتاج CO_2 . هذه التفاعلات لا تسبب فقط الفساد نتيجة تراكم CO_2 ، ولكن تؤدى أيضا إلى تكوين أمينات حيوية

biogenic amines . وعموما فإن هاتين الظاهرتين غير مرغوبة فى الأغذية المتخمرة .

إنتاج CO_2 لا يكون مسئولا فقط عن تكوين العيون الغازية eyes formation فى كثير من أنواع الجبن ، ولكن يساهم أيضا فى أنشطة مضادة لبكتريا حامض اللاكتيك . دور CO_2 فى خلق ظروف لاهوائية بإحلاله محل الأكسجين الجزيئى الموجود ، تأثيره الخافض للـpH داخل وخارج الخلية وإتلافه لغشاء الخلية يجعله مادة مثبطة لكثير من الميكروبات . يعتبر هذا الدور الواقى protective role لثانى أكسيد الكربون على جانب كبير من الأهمية خاصة فى تخمير الخضراوات والسيلاج لمنع نمو الفطريات ، حيث يؤدى وجوده إلى تكوين ظروف لاهوائية غير ملاءمة لنمو الفطريات . التركيزات المنخفضة من CO_2 تنشط نمو بعض الميكروبات ، بينما التركيزات المرتفعة قد تمنع النمو.

٢-٧- ريوترين Reuterin

ميكروب *Lb.reuterii* من الميكروفلورا الطبيعية المختلطة التخمر فى القناة الهضمية للإنسان وكثير من الحيوانات الأخرى . تقوم بعض سلالات من هذا الميكروب بإنتاج مادة مضادة للميكروبات منخفضة الوزن الجزيئى سريعة الذوبان وذات pH متعادل تعرف "بالريوترين reuterin" ، عندما تنمو تحت ظروف لاهوائية على مخلوط من الجلوكوز والجليسرول أو الجليسرالدهيد glyceraldehyde . ينتج *Lb.reuterii* مركب 3-hydroxy propanal (الريوترين) من خلال تجفيف (نزع الماء من) الجليسرول . خلال مرحلة النمو اللوغاريتمى لا يتكون ريوترين حيث أنه يختزل بواسطة قوة مختزلة reducing power ناتجة من تمثيل الجلوكوز . عندما تدخل الخلية مرحلة الثبات stationary ، يبدأ الريوترين فى التراكم . عندما يسمح لهذه الخلايا بالالتصاق مع الخلايا المستهدفة ، فإن *Lb.reuterii* ينشط فى إنتاج الريوترين . فى المحاليل المائية يوجد الريوترين فى ثلاث صور : أساسا سلسلة واحدة monomeric ، من سلسلة واحدة مائية hydrated monomeric ، ولدرجة محدودة من سلسلة مزدوجة حلقية cyclic dimeric ، من غير المعروف أى من هذه الصور نشطة بيولوجيا بدرجة أكبر . بالرغم من أن

بكتريا أخرى أيضا تمثل الجليسرول بأتباع نفس المسار pathway ، فإن تراكم وفرز الريوترين تبدو أنها صفة مميزة لميكروب *Lb.reuterii*.

يتميز الريوترين بمجال واسع من النشاط المضاد للميكروبات ، حيث وجد أنه مضاد للبكتريا antibacterial ، مضاد للفطريات antifungal ، مضاد للبروتوزوا anti-protozoal ومضاد للفيروسات anti-viral . بكتريا حامض اللاكتيك ، بما فيها *Lb.reuterii* أيضا حساسة للريوترين ، ومع ذلك فإنها أكثر مقاومة من ميكروبات أخرى . كما أن الريوترين يثبط أنواع *Salmonella* ، *Shigella* ، *Clostridium* ، *Staphylococcus* ، *Candida, Listeria* . وقد اقترح إضافة الريوترين مع أو بدون Lactobacilli المنتجة للريوترين للتغلب على الميكروبات المسببة للفساد والمرضية فى الأغذية .

يعتقد أن التأثير المضاد للريوترين للميكروبات قد يرجع إلى تأثيره على الإنزيمات المحتوية على مجاميع السلفدريل sulfhydryl enzymes . وقد وجد أنه مثبط لتحت وحدات subunits إنزيم ribonucleotide reductase المرتبط بالبيئة (مادة التفاعل substrate) ، وبالتالى يتداخل مع تخليق DNA .

٢-٨- ليسينات (Hemo) lysins

الليسينات عبارة عن بروتينات مضادة للبكتريا antibacterial proteins بالرغم من أن الليسين الناتج بواسطة سلالة من Lactococci غير متخصص non-specific وقادر على تحلل أنواع كثير من سلالات البادئ ، فإن استخدام ليسينات الفاج الذى يكون متخصصا فى مهاجمة البكتريا المرضية المنقولة عن طريق الغذاء ، مثل *Listeria* يكون على جانب كبير من الأهمية كمواد مضادة للميكروبات antimicrobial agents . من ناحية أخرى ، فإن الليسين الناتج من Lactococci يكون ذات نشاط محدود ، خاصة لبكتريا Lactococci الألبان ، يمكن أن يستخدم فى تخمرات الألبان كمثبط للنمو وإنتاج الحامض وكذلك كمادة لتحليل خلايا البادئ وانطلاق الإنزيمات الخلوية للإسراع من تسوية الجبن، تكوين الطعم المميز... وغيره من التغيرات المرغوبة ، عقب تخمر اللبن . من ناحية أخرى فإن الإدخال المتزامن لجين ليسين الفاج الخاص بالـ *Listeria* فى ميكروب معتمد استخدامه

فى الأغذية food-grade سوف يساعد على منع مرض listeriosis الذى ينتقل عن طريق الغذاء food brone listeriosis .

٢-٩- مواد مضادة للفطريات Antifungal substances

بكتريا حامض اللاكتيك قد تنتج حامض البنـــزويك benzoic من حامض hippuric acid أثناء التخمر . وقد وجد أن تركيز حامض البنـــــزويك يرتفـــع بدرجة كبيرة أثناء صناعة الجبن ومنتجات الألبان المتخمرة . وقد أقـــترح إضافـــة حامض البنـــزويك إلى اليوجهورت لمنع نمو الخمائر وزيادة فترة صلاحية المنتج.

وقد وجد أن *Str.thermophilus, Lc.lactis* biovar *diacetylactis* تنتـج مواد فعالـــة ضـــد الفطريـــات antifugal ، مثـــل *Aspergillus fumigants* ، *Rhizopus* spp., *A.parasiticus* وقد تم عـــزل عـــدد قليـــل مـــن ســـلالات *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc oenos* التى تثبط نمـــو *Saccharomyces cerevisiae* . كما وجد أن سلالات من *Lb.plantarum, P.pentosaceus* تتميز بتأثير مثبط ناحية *Fusarium* spp. . وقد تم تنقية وتوصيف هذه المواد المضـــادة للميكروبات ووجد أنـــها متشابه بدرجة كبيرة ويتراوح الوزن الجزيئى لها مـــن ١٠٠-٤٠٠ Da وتحتوى شقوق هذه المواد على مجاميع أمينيـــة amino groups ، أيدروكسيل الفينول phenolic hydroxyl أو حلقات عطرية aromatic ring.

تتميز كثير من أجناس الخمائر بالقدرة على إنتاج سلسلة من المواد البروتينية، مواد مضادة للفطريات ذات مجال نشاط ضيق ، تعرف "بالسموم القاتلـــة killer toxins " التى تفرز فى مرحلة النمو اللوغاريتمى . تنتج *Sacch.cerevisiae* أربـــع سموم قاتلة (تشمل K1 ، K2) ذات وزن جزيئى يتراوح بين ١٦,٠٠٠-٢١,٠٠٠ Da . عادة يكون مجال نشاط سموم *Sacch.cerevisiae* ضيق ، مع ميكروبـــات حساسة تنتمى لنفس جنس أو نوع السلالة المنتجة .

أسلوب تأثير هذه السموم يتم فى خطوتين : (١) التصـــاق الســـم بـــ amannoprotein بجدار الخلية أو بمستقبل جدار الخلية cell wall receptor الـــذى يحتوى على a β-1, 6-D-glucan (٢) تمزيق disruption غشاء البلازما ، مما يؤدى

إلى فقد أيونات ، تنتهى بموت الخلية . تركيز ٢,٣ نانوجرام (ng) /مل من سم K1 يؤدى إلى قتل ٢,٠ × ١٠^{٧} خلايا /مل .

دور الخمائر القاتلة killer yeasts فى الأغذية غير واضح ، بالرغم من عزل أنواع مختلفة من الأغذية المتخمرة ، مثل Meso ، Soya sauce ، الخضراوات المتخمرة والمشروبات الكحولية.

٢-١٠- مضادات ميكروبية أخرى

وجد أن *Lb.casei* ssp. *pseudoplantarum*, *Lb.casei* ssp. *casei* ، *Str.bovis* تنتج حامض بيروجلوتاميك pyroglutamic acid (PCA) ، الذى يثبط *Bacillus subtilis* ، *Ps.putida*, *Ent.colacae* .

تحتوى كثير من الأغذية المتخمرة على بكتريا التى عادة ما تكون مرتبطة بفساد الأغذية غير المتخمرة . يعتبر *Acetobacter* spp. من البكتريا الهامة فى فساد المشروبات الكحولية ، وتستخدم أيضا فى إنتاج الخل صناعيا . قدرة *Acetobacter* spp. على إنتاج الخلات أخذت كثير من الاهتمام للتغلب على الميكروبات المرضية فى الأغذية ، بالرغم من أن الخلات ليست المضاد الميكروبى الوحيد التى تنتجه هذه البكتريا . من المعروف أن المزارع النقية لبعض *Acetobacter* spp. ، مثل *Acet.pasturianus* ، تنتج سولفازيسين sulfazecin ، وهو عبارة عن مضاد حيوى amonobactam antibiotic . ينتج السولفازيسين فى الفترات المبكرة من مرحلة النمو اللوغاريتمى ، فى بيئات معقدة complex وفى بيئات معرفة defined تحتوى سواء على جلوكوز ، سكروز ، جليسرول أو إيثانول كمصادر للكربون . يتميز السولفازيسين بسمية منخفضة للثدييات (LD_{50} أكثر من ١٠جم/كجم) وسمية متوسطة لبعض البكتريا السالبة لجرام وغير نشط ضد الفطريات .

وقد وجد البعض أن سلالة من *Acet.pasturianus* كانت قاتلة لـ *Sacch.cerevisiae* ، وخمائر أخرى *Lactobacillus* spp., ، مما يؤدى إلى الاعتقاد بأن أنواع أخرى من المضادات الميكروبية قد تنتج أيضا بواسطة هذه الميكروبات المسببة للفساد . وحتى الآن لم تجرى محاولة لإضافة *Acetobacter* spp.

من الأنواع المعتمدة فى الأغذية food-grade إلى الأغذية بهدف مقاومة الميكروبات المرضية التى تنتقل عن طريق الغذاء . بكتريا *Acetobacter* spp. سالبة لجرام ، لذلك فإن الاستخدامات المفيدة لهذه البكتريا فى الأغذية قد تكون محدودة.

٣- العلاقات المتبادلة بين الميكروبات فى المزارع السائلة
Interaction among micro-organisms in broth culture

وجد أن *Ped.acidilactis* ، *Lb.plantarum* ، *Leuc.mesenteroids* ssp. *cremoris* تثبط *P. flourescens* ، *Shewanella putrefaciens* ، *P.fragi* فى مزارع سائلة مشتركة . كما أن *Lc.lactis* ssp. *lactis* ، *Lb.casei* ssp. *casei* تثبط *Pseudomonas* spp. فى مزارع سائلة . كما أظهرت *Lb.acidophilus* نشاطا مضادا ناحية *Staph.aureus* ، *S.typhimurium* ، *Cl.perfringenes* enteropathogenic *E.coli* عندما تكون فى مزارع سائلة مشتركة . وقد تم تثبيط نمو *List.monocytogenes* فى بيئة ملقحة بـ *Lc.lactis* ssp. *cremoris* وبدرجة أقل بواسطة *Lc.lactis* ssp. *lactis* (٠,٢٥ أو ١%) عند ٣٠°م. كما أن البكتريا المسببة للفساد قد تتأثر فى المزارع المشتركة مع بكتريا حامض اللاكتيك . وقد وجد أن *Lb.brevis*, *Lb.plantarum* تثبط من نمو *Broc.thermosphacta* فى مرق APT عند ١٥,٥°م . كما يمكن تثبيط نمو الفطريات وإنتاج السموم ، حيث وجد البعض أن إنتاج الأفلاتوكسين ونمو *A.flavus* فى بيئة سائلة نصف صناعية semi-synthetic تتأثر بوجود *Lb.acidophilus* ، *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ، *Lb.plantarum* . إنتاج الأفلاتوكسين بواسطة *A.flavus* قد ينخفض عندما ينمو فى مزرعة سائلة بالأشتراك مع *A.oryzae*.

يثبط *Lc.lactis* biovar *diacetylactis* نمو *Staph.aureus* عندما ينمو معا فى مرق trypticase soya نتيجة استنفاذ nicotinamide . وبطريقة مماثلة يثبط *Ped.acidilactici*, *Lc.lactis* ssp. *lactis* نمو وإنتاج التوكسين enterotoxin بواسطة *Staph.aureus* عندما ينمو معا فى مرق APT نتيجة استنفاذ النياسين niacin والبيوتين biotin . إضافة nicotinamide أو النياسين والبيوتين إلى البيئات المستنفذة (الخالية) ، على التوالى ، يؤدى إلى زيادة نمو *Staph.aureus* . استنفاذ

مصادر الكربون يكون له أيضا تأثيرا واضحا على الميكروبات . وقد وجد بعض الباحثين عند نمو *Candida albicans* فى وجود *E.coli* ، *S.typhimurium* أو *P.aeruginosa* ، فإن حساسيتها للـ nysatin, amphotericin B تزيد بدرجة كبيرة نتيجة استنفاذ الكربون أو مصدر الطاقة.

استنفاذ العناصر الغذائية لا يلعب دورا رئيسيا فى تثبيط الميكروبات المسببة للفساد أو المرضية فى منتجات الأغذية ، نظرا لأنها تحتوى عادة على عناصر غذائية كافية لتدعيم نمو أعداد كبيرة من الميكروبات . ومن الملاحظ أنه عندما لا تحتاج بكتريا حامض اللاكتيك حديد ، فإنها تكون سائدة فى البيئات التى استنفذ منها الحديد بالرغم من احتياجها إلى المنجنيز لتنشيط التمثيل الغذائى metabolism . وجود توابل فى بعض أنواع من السجق المتخمر قد تؤدى إلى تنشيط معدل تكوين الحامض بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك ، ويعتقد أن ذلك قد يرجع إلى وجود المنجنيز فى هذه التوابل . قد يؤدى إنتاج الحموضة بدرجة أكبر إلى نظام حافظ أقوى وبالتالى فإن بكتريا حمض اللاكتيك يمكن استخدامها مع التوابل.

٤- إضافة الميكروبات إلى أغذية الألبان كمواد حافظة حيوية

هناك أمثلة كثيرة تشير إلى أن إضافة الميكروبات إلى الأغذية يؤدى إلى تقليل أو التخلص من الميكروبات المسببة للفساد والميكروبات المرضية . آلية حدوث التثبيط من النادر تحديدها نظرا للطبيعة المعقدة للأنظمة الغذائية وأنواع المواد المضادة للميكروبات الناتجة . من المعروف أن إضافة أو وجود بكتريا حامض اللاكتيك فى الأغذية يؤدى إلى تثبيط نمو عديد من الميكروبات الأخرى . يرجع السبب الرئيسى لهذا التثبيط إلى إنتاج الأحماض العضوية بواسطة هذه البكتريا . وفى الواقع ، أن إنتاج حامض اللاكتيك بواسطة الفلورا الطبيعية والانخفاض المصاحب فى pH إلى أقل من ٤,٠ يؤدى إلى تثبيط نمو *Staph.aureus*, *Cl.botulinum* فى منتجات اللحوم النصف محفوظة semi-preserved . ولكى يكون لبكتريا حامض اللاكتيك تأثير حافظ فعال فى الأغذية فأنه يجب أن تنمو بمعدل أسرع عن الميكروبات المرضية فى الأغذية . النتائج المترتبة على ذلك ،

بالرغم من أن الأغذية تصبح آمنة safe ، إلا أنها قد تفسد وتصبح غير مقبولة للمستهلك . وقد يستخدم طريقة بديلة حيث يضاف بكتريا حامض اللاكتيك مشعة irradiated ، مثل *Ped.acidilactici* (مع إضافة ١% جلوكوز) ، حيث أن ذلك لا يعتمد على تكاثر البكتريا ولكن سوف يسمح بحدوث تخمر سريع للجلوكوز إلى حامض لاكتيك مع انخفاض مصاحب فى pH .

عموما تكون الفيروسات viruses أكثر مقاومة للتلف بواسطة درجات الحرارة غير العادية وpH المنخفض عن البكتريا المرضية أو المسببة للفساد . بالرغم من أن وجود الفيروسات فى الأغذية غير مرغوب فيها عادة ، فإن البكتريوفاجات bacteriophages قد تستخدم كوسيلة لإطالة فترة الصلاحية لبعض الأغذية المبردة نتيجة تثبيط نمو البكتريا المسببة للفساد .

استخدام الفاجات للسيطرة البيولوجية biological control على البكتريا المسببة للفساد فى الأغذية يعتمد على الظروف البيئية (pH ، درجة الحرارة ، a_w) وعدد بكتريا العائل والفاجات . الطفرات المقاومة للفاج قد ترتفع سريعا بين أعداد البكتريا ، وبالتالى تقلل من فاعلية الفاجات فى السيطرة على نمو البكتريا.

٤-١- منتجات الألبان غير المتخمرة

وجد أن عدد من مزارع بادئا بكتريا حامض اللاكتيك (تستخدم فى إنتاج منتجات الألبان المتخمرة مثل اللبن الخض المتخمر ، اليوجهورت والجبن) تثبط من نمو الميكروبات المسببة للفساد أو الميكروبات المرضية فى اللبن وكذلك فى المنتجات المتخمرة (جدول ٤-٣).

وقد وجد أن نمو البكتريا المتحملة البرودة psychrotrophs فى اللبن الخام أو اللبن المسترجع reconstituted عند ٦°م قد تم تثبيطه نتيجة وجود *Lb.acidophilus* . بكتريا حامض اللاكتيك تثبط أيضا البكتريا المتحملة البرودة، خاصة *P.putida* ، فى لبن معقم أو مبستر عند ٧°م . تلقيح لبن فرز بـ ٥ % *Str.thermophilus* مع *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* أو *Lb.helveticus* مع التحضين عند ٤٢°م ، تقضى على خلايا السالمونيلا الحية . ميكروب *Lc.lactis* ssp. *lactis* منفردا أو مع *Lc.lactis* ssp. *cremoris* (٠,٢٥

أو ٢,٠ %) يثبط *E.coli* عند ٢١ أو ٣٢°م ، *Enterobacter cloacae* *Ent.aerogenes*, فى لبن فرز كما تنخفض أعداد البكتريا المرضية المعوية enteropathogenic فى اللبن المتخمر بواسطة *Lb.casei* ssp. *casei* عند ٥ أو ٣٧°م . ومن الأمور الهامة أن *List.monocytogenes* يتم تثبيطه فى اللبن الفرز بواسطة *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* وبواسطة بكتريا حامض اللاكتيك أخرى .

جدول (٤-٣) : أمثلة للميكروبات المستخدمة للتغلب على نمو ميكروبات غير مرغوبة فى بعض منتجات الألبان.

الميكروب المضاف	منتجات الألبان	الميكروب المستهدف
بكتريا حامض اللاكتيك LAB	لبن	*Pseudomonas putida*
بكتريا حامض اللاكتيك LAB	منتجات ألبان	بكتريا مرضية Pathogenic bacteria
Streptococci	لبن	*Salmonella typhimurium*
Lb.delbrueckii ssp. *bulgaricus*	لبن	*Pseudomonas fragi*
Lb.delbrueckii ssp. *bulgaricus*	لبن	*Listria monocytogenes*
Lb.plantarum	جبن	*Staphylococcus aureus*
Lb.plantarum	جبن	*Staphylococcus aureus* *Salmonella typhimurium*
Lc.lactis ssp. *lactis*	جبن	*Staphylococcus aureus*
Lc.lactis biovar *diacetylactis* *Propionibacterium frudenrechii ssp. shermanii*	جبن Cottage	بكتريا سالبة لجرام متحملة البرودة Gram-negative psychrotrophic bacteria

وقد ذكر أن Streptococci (٠,١ أو ٠,٠١ %) يثبط نمو وإنتاج التوكسين المعوى enterotoxin (A, B, C و D) بواسطة *Staph.aureus* فى اللبن لمدة تصل إلى ٢٤ ساعة عند ٣٢°م . وقد أضيفت سلالات مجففة من *Lactobacillus* ، *Leuconostoc, Lactococcus* ، فى صورة منفردة أو مشتركة،

إلى منتجات ألبان مبردة وغير معقمة لوقف أو لمنع نمو البكتريا المرضية نتيجة التنافس competition ، عند ٧-١٠°م.

فوق أكسيد الأيدروجين H_2O_2 المتكون بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك فى اللبن قد يتفاعل مع ثيوسيانات الموجودة طبيعيا thiocynate (SCN^-) والذى يتم تحفيزه catalysed بواسطة lactoperoxidase ليكون مركبات (مثل هيبوثيوسيانيت-hypothiocynite) مثبطة للميكروبات . التأثير الرئيسى المضاد للميكروبات لنظام lactopecoxidase (LPS) يرجع إلى أكسدة مجاميع السلفيدريل SH فى إنزيمات النشاط الأيضى metabolic enzymes.

لذلك فإنه ليس من الغريب أن التأثير المضاد للميكروبات لفوق أكسيد الأيدروجين (H_2O_2) قد لوحظ أساسا فى اللبن ومنتجاته. يوجد H_2O_2 فى تركيزات منخفضة فقط فى اللبن (٢-٤ ميكروجرام/مل) . وقد وجد أن *Lb.acidophilus* بأعداد ٤ × ١٠^ خلية/مل فى لبن فرز مسترجع (١٠ %) أو لبن منخفض فى نسبة الدهن يحتاج إلى إنتاج كمية كافية من H_2O_2 ليثبط من نمو *P.fragi* عند ٤°م (٦-٧ ميكروجرام/مل) أو ٣٧°م (٤٠-٥٥ميكروجرام/مل) . إضافة *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* إلى اللبن يثبط من نمو *P.fragi* عند حفظه عند ٥-٧°م.

بادئ بكتريا حامض اللاكتيك (*Leuc.mesenteroides* ssp. *cremoris*, Lactococci) يمنع نمو البكتريا المتحملة البرودة psychrotrophs فى لبن معقم محفوظ عند ٣,٥ أو ٧°م . فى هذه الحالة تنخفض درجة التثبيط inhibition بواسطة الكتاليز ، مما يعتقد أن H_2O_2 قد يكون العامل المثبط . سلالات *Lb.delbrueckii* ssp. *lactis* (١ × ١٠^/مل) المنتجة لفوق أكسيد الأيدروجين تثبط من نمو البكتريا المتحملة البرودة فى اللبن المحفوظ عند ٥ أو ٧°م . وقد وجد أن Lactobacilli التى تمنع نمو البكتريا المتحملة البرودة بكفاءة فى لبن معقم تكون من الأنواع المنتجة لـ H_2O_2 .

فى الأغذية ، يعزى طعم ونكهة الزبد إلى ثنائى الأسيتيل diacetyl الناتج بواسطة أنواع من *Lactococcus* ، *Streptococcus* ، *Leuconostoc* ، *Lactobacillus, Pediococcus* . فى اللبن الفرز المسترجع يبلغ إنتاج ثنائى

الأسيتيل بواسطة *Lc.lactis* biovar *diacetylactis* بعد ٢٤ ساعة ٥١,٠ ، ٩,٩ و ٩,٠ جزء فى المليون ppm ، وبواسطة *Lc.lactis* ssp. *cremoris* ١٧,٠ ، ٣,٠ و ٣,٠ ppm ، وبواسطة *Str.thermophilus* ٨,٠ ، ٧,٥ و ١٢ ppm فى لبن بقرى ، جاموسي وماعز على التوالى.

ميكروب *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* المنتجة للبن المتخمر البلغاري Bulgarican يثبط *E.coli* ، *Bacillus* ، *Streptococcus* ، *Staphylococcus* ، *Serratia* ، *Pseudomans*, *Sarcinia* فى اللبن الفرز . يثبط *Ped.acidilactici* المنتجة للبكتريوسين البكتريا المتحملة البرودة ، وخاصة *P.fragi* ، فى اللبن المحفوظ عند ٥ أو ٧°م .

٤-٢- اليوجهورت والجبن

تثبيط الميكروبات غير المرغوبة بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك يلعب دورا هاما فى صناعة اليوجهورت والجبن . وقد وجد أن *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* منفردة أو بالاشتراك مع *Str.thermophilus* (بادئ اليوجهورت) يثبط *E.coli* ، *Staph.aureus* ، *P.fragi*, *Micrococcus flavus* فى لبن البقر ، الماعز أوالجاموس ، ويثبط *S.typhimurium* فى اليوجهورت المتخمر عند ٤٢°م لمدة ١٨ ساعة . وقد وجد أن بادئ اليوجهورت (*Str.thermophilus* ، *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) له تأثير مضاد على *E.coli*، *Staph.aureus*، *Candida albicans*, *B.subtilis* .

وقد تم تثبيط *List.monocytogenes* فى اللبن الفرز بواسطة *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* وبكتريا حامض اللاكتيك الأخرى . وقد أظهرت *List.monocytogenes* مقدرة على مقاومة تخمر اليوجهورت ، مما يؤدى إلى الاعتقاد أن عملية التثبيط لا ترجع إلى pH المنخفض فقط إنما إلى أحماض عضوية ووجود بكتريا حامض اللاكتيك .

حامض اللاكتيك الناتج بواسطة Streptococci يثبط *S.typhimurium* فى اليوجهورت المتخمر و*Staph. aureus*, *S.gallinarum* فى اللبن المحفوظ عند ٣٢°م . تنخفض أعداد *Lb. acidophilus* فى اليوجهورت المبرد الذى يرجع إلى

إنتاج H_2O_2 بواسطة *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ، إضافة الكتاليز يقلل من التأثير المضاد antagonism . إنتاج H_2O_2 بواسطة *Lb.casei* ssp. *alactosus* عند ٥ و ٨°م يثبط البكتريا المتحملة البرودة .

هناك اهتمام كبير فى إنتاج منتجات تجارية باستخدام الميكروبات كمواد حافظة حيوية biopreservatives . فى الولايات المتحدة الأمريكية ، يضاف الميكروجارد Microgard إلى جبن Cottage حيث يؤدى ذلك إلى إطالة فترة الصلاحية بحوالى ٦-٩ أيام . يتم إنتاج الميكروجارد بواسطة تخمير لبن فرز مرتفع الجودة (grade A) بواسطة ssp. *Propionibacterium freudenerichii* *shermanii* ثم يعقب ذلك البسترة . يحتوى Microgard على مثبط inhibitor (الوزن الجزيئى ٧٠٠) ، ٠,٦% حامض خليك ، ٠,٤ % حامض بروبيونيك ، ثنائى الإسيتيل وحامض لاكتيك . وقد وجد أن الميكروجارد يثبط البكتريا السالبة لجرام ، الخمائر وبعض الفطريات ولكن لا يؤثر على البكتريا الموجبة لجرام . الميكروجارد ليس له تأثير حتى تركيزات ٢ % على *List.monocytogenes* ، *List.ivanovii* ، *E.coli* ، *S.anatum* ، *S.typhimurium* فى مرق trypticase soya ، الذى يعتقد أن استخدامه فى الأغذية مازال محدودا .

أجريت أيضا محاولات لاستخدام مزارع بكتيرية مختلطة كمواد حافظة حيوية فى منتجات الألبان . تضاف مزارع مختلطة من ssp. *P.freudenerichii* *shermanii* biovar *diacetylactis* *Lc.lactis* (مجمدة ، مجففة ، أو مجففة) إلى جبن Cottage المضاف له قشدة أو إلى القشدة المضاف للجبن عند درجات حرارة منخفضة (الثلاجة) يؤدى إلى تثبيط البكتريا السالبة لجرام المتحملة البرودة المسببة للفساد ، خاصة Pseudomonads . تم منع تكوين طبقة لزجة slime بواسطة *Shew.putrefaciens, P.fragi* على جبن Cottage بالقشدة ونمو بكتريا القولون coliforms بواسطة ssp. *Leuc.mesenteroides* *cremoris* ولكن لم تتأثر *Geotrichum candidum* .

تم تثبيط السالمونيلا و *Staph.aureus* بواسطة Streptococci فى جبن التشدر وجبن Colby . يقاوم *List.monocytogenes* عمليات التخمر التى تحدث فى الجبن Cottage وجبن Colby. تم تثبيط *Staph.aureus* فى جبن Manchego

عندما تم حقن لبن الغنم وميكروب *Lc.lactis* ssp. *lactis* (١%) أو *Lb.plantarum* (٠,١ %) قبل التصنيع . يثبط *Lc. lactis* ssp. *Lb.helveticus, cremoris* أو *Lb.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* نمو والقضاء على البكتريا المتبقية من Enteropathogenic *E.coli* أثناء الترشيح الفائق UF ومرحلة التجبن فى جبن الكممبير . *Lc. lactis* ssp. *lactis* (١%) يقلل أعداد *Enterobacteriaceae* ، coliforms ، Staphylococci فى جبن La Serena . كما أن *Lb.plantarum* (٠,٢% حجم/حجم) يقلل من أعداد *S.typhimurium, Staph aureus* فى جبن Montasio . يثبط *Lb.delbrueckii* ssp. *lactis* (الراشح) أو *Ent.faecium* (الفلورا المسئولة عن تسوية الجبن) Listera . كما أن *Lb.plantarum, Lb.casei* ssp. *casei* ، *Lc.lactis* biovar *diacetylactis*, *Lb. helveticus* يمنع تكاثر *Cl.tyrobutyricum* فى جبن الأمينتال Emmental . وقد تم تثبيط *List.monocytogenes* فى جبن Cottage نتيجة لإنتاج الحامض بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك . مزارع بادئات ssp. *Str.thermophilus, Lb.delbrueckii* *bulgaricus* (١ : ١ ، ١% حجم/حجم) تثبط *List.monocytogens* (٥×١٠^{٣} الحد الأدنى للتلقيح) فى جبن الفتا Feta عندما ينخفض pH إلى ٤,٦.

يقلل *Lc.lactis* ssp *lactis* أعداد *Lc.lactis* ssp.*cremoris*, *List.monocytogenes* فى جبن الترابست Trappist (جبن نصف طرية يوغسلافية) نتيجة إنتاج النيسين.

يؤدى إنتاج البكتريوسين بواسطة *Lc.lactis* ssp. *lactis* ، *Lc.lactis* ssp. *Lc.lactis* biovar *diacetylactis, cremoris* إلى التغلب على نمو ميكروبات Clostridia (*Cl.butyricum, Cl.bifermentans*) ، التى تسبب الانتفاخ المتأخر late blowing فى الجبن الإيطالية (البرمسان Montasio, Asiago) وفى الجبن السويسرية (الأمينتال والجروبير).

٥- بكتريوسينات بكتريا البادئ

٥-١- مقدمة

كثير من بكتريا البادئات من أجناس *Lactococcus* ، *Leuconostoc* ، *Pediococcus* ، *Lactobacillus* ، *Bifidobacterium* ، *Propionibacterium* تنتج بروتينات منخفضة الوزن الجزيئى نسبيا والتى تكون عادة لها القدرة على القضاء على أنواع أخرى من البكتريا الموجبة لجرام . وقد أطلق على هذه البروتينات بكتريوسينات bacteriocins ، لانتبيوتكس lantibiotics (للبروتينات المحتوية على lanthionine) ، وحديثاً تعرف بمواد مثبطة شبيهة بالبكتريوسينات BLIS (bacteriocin-like inhibitory substances) ، كما تعرف أيضاً بالمضادات الحيوية antibiotics .

وقد أشار بعض الباحثين إلى أن بكتريوسين من سلالة بكتريا موجبة لجرام يجب أن يكون بروتين قاتل لبكتريا تنتمى لسلالات وأجناس مرتبطة بهذه البكتريا ، أى أنها تؤثر على عدد قليل من السلالات والأجناس المرتبطة بالبكتريا المنتجة للبكتريوسين. ومع ذلك فقد أمكن التوصل إلى أن كثير من البكتريوسينات من بكتريا البادئات تتميز بمجال نشاط محدود ، بينما هناك بكتريوسينات أخرى تتميز بمجال نشاط واسع والتى تشمل سلالات من أجناس كثيرة من البكتريا الموجبة لجرام. بعض هذه البكتريوسينات تحت ظروف معينة تستطيع القضاء على البكتريا السالبة لجرام والخمائر . وقد أقترح Tagg فى عام ١٩٩٢ تعريف للـBLIS بأنها عبارة عن جزيئات بروتين أو ببتيدات تفرز خارج الخلايا البكتيرية والتى تكون قادرة فى تركيزات منخفضة القضاء على بعض البكتريا الأخرى المشابه بواسطة آلية تجعل الخلايا المنتجة تثبط درجة المناعة النوعية specific immunity . بالرغم من أن هذا التعريف يعتبر عام ، فإنه مازال لا يشمل المواد التى تستطيع أن تقضى على سلالات أجناس كثيرة من البكتريا الموجبة لجرام تحت الظروف الطبيعية ، مثل النيسين Nisin ، البديوسين Pediocin AcH ، البديوسين A والبديوسين PA-I .

يوجد حديثاً اهتمام واسع بالبحوث فى مجال البكتريوسينات من بكتريا البادئات المستخدمة فى مجال الأغذية نظراً لإمكانية استخدامها فى الأغذية كمواد

حافظة حيوية biopreservatives بدلاً من بعض المواد الحافظة التى تستخدم حالياً ، خاصة التى قد تكون غير آمنة unsafe للمستهلك . وعموماً فإن بكتريوسينات مزارع بكتريا البادئات تحتفظ بقدرتها على القضاء على البكتريا bactericidal activity :

١- عند نطاق أوسع من درجات الحرارة و pH عن التى يستخدم عادة فى تصنيع وتخزين الأغذية .

٢- لفترات طويلة نسبياً تحت ظروف تخزين الأغذية.

٣- فى بيئات الأغذية food environments ، خاصة فى الأغذية المعاملة حرارياً.

ونظراً لأن هذه البكتريوسينات عبارة عن بروتينات ، فإن نشاطها يتأثر بالإنزيمات المحللة للبروتينات الموجودة فى كثير من الأغذية الخام وفى القناة الهضمية للإنسان . كثير من الصفات ، مثل إنتاجها بواسطة البكتريا الآمنة المعتمدة GRAS فى مجال الأغذية والتى تستهلك بواسطة الإنسان منذ آلاف السنين دون حدوث أى مشاكل أو أضرار صحية ، ثباتها تحت ظروف التصنيع وتحللها فى القناة الهضمية فى الإنسان بواسطة الإنزيمات المحللة للبروتين ، يجعل هذه المواد (البكتريوسينات) مواد حافظة حيوية مثالية ideal biopreservatives للاستخدام فى الأغذية . ومع ذلك ، فإن عدم فاعلية هذه البكتريوسينات ضد البكتريا السالبة لجرام وكثير من سلالات البكتريا الموجبة لجرام التى ترتبط بفساد الأغذية والأمراض المنقولة عن طريق الغذاء food-borne diseases تحت الظروف الطبيعية تحد من استخدامها فى كثير من الأغذية.

البكتريوسينات bacteriocins عبارة عن بروتينات تنتجها البكتريا ، لها تأثير قاتل bactericidal أو مثبط bacteriostatic ضد البكتريا المشابه . كما أن بعض هذه البكتريوسينات قد تكون ليبوبروتين lipoprotein ، أو جليكوبروتين glycoprptein . يرجع اكتشاف المواد المضادة للبكتريا antibacterial substances ، التى تعرف بالكوليسينات colicins ، التى تنتجها *E.coli* ، إلى العشرينات . المواد المثبطة الشبيه بالكولسينات ، تنتجها أيضاً البكتريا الموجبة لجرام

وتشمل جميع أجناس بكتريا الألبان والأغذية المتخمرة من بكتريا حامض اللاكتيك (LAB).

وقد أقترح لفظ بكتريوسين bacteriocin بواسطة العالم Jacob ومساعديه فى بداية الخمسينات . وقد تم تعريف البكتريوسينات على أنها مضادات حيوية بروتينية protein antibiotics ذات وزن جزئى مرتفع نسبيا ، ويؤثر أساسا على البكتريا من نفس النوع أو أنواع مشابه .

التضاد الميكروبى لبعض سلالات من مجموعة N Streptococci (تعرف حاليا بـ Lactococci) ، التى تثبط نمو Lactobacilli ، تم التعرف عليه لأول مرة بواسطة العالم Rogers فى عام ١٩٢٨ ، وبعد ذلك بواسطة العالم Whitehead فى عام ١٩٣٣ ، وتحديد طبيعة هذه المواد المثبطة على أنها مواد بروتينية . بعد أكثر من عشر سنوات فيما بعد ، وجد أن فشل أو بطء سير الحموضة أثناء صناعة جبن التشدر يرجع إلى مزارع البادئ أكثر منه للبكتريوفاج bacteriophage و/أو وجود المضادات الحيوية antibiotics . وقد تم عزل المواد 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 Inhibitory *S*ubstance (الحرف الأول من كل كلمة أى nis) مع إضافة in إليها ، وهى النهاية المعروفة لأسماء المضادات الحيوية ، ويصبح الأسم Nisin .

النيسين ، البكتريوسين الوحيد من بكتريا حامض اللاكتيك LAB الذى وجد له أهمية تجارية ، وقد تم اعتماده فى عام ١٩٦٩ بواسطة منظمة الصحة العالمية WHO كمادة مضافة للغذاء food additive ، وقد استخدم 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 تكوين سم البوتيولين botulinal toxin فى الناتج.

باستثناء النيسين وعدد قليل جدا من المواد المثبطة ، فإن تسمية البكتريوسينات تشبه لحد ما تسمية الإنزيمات ، حيث يضاف مقطع "ase" لنشاط إنزيم محلل للبروتين ، مقطع "cin" – عادة يلحق بأسم جنس أو نوع الميكروب الذى يعطى البكتريوسين.

عند تقدير إنتاج البكتريوسينات ، فإنه من المهم جدا التمييز بين البكتروسينات وغيرها من المثبطات التى تنتجها بكتريا حامض اللاكتيك مثل H_2O_2 وأحماض اللاكتيك والخليك . ويتم ذلك عادة بمعادلة الحموضة فى راشح أو رائق المزرعة culture supernatant ثم يتم تقدير النشاط فى وجود وغياب إنزيم بروتينيز proteinase ، الذى يحلل البكتريوسينات إذا وجدت .

٥-٢- مقاومة البكتريوسينات للحرارة والأحماض والإنزيمات

البكتريوسينات ، عادة تكون حساسة لإنزيم واحد على الأقل من الإنزيمات المحللة للبروتين . وقديما كان كثير من الباحثين يميز بين النيسين والبكتريوسينات ، حيث كان يعتقد أن α-chymotrypsin إنزيم البروتينيز الوحيد الذى يستطيع أن يحلل النيسين . ومع ذلك ، فإن إنزيمات pronase ، nisinase, proteinase K تحلل أيضا النيسين . إنزيم nisinase عبارة عن إنزيم dehydroalanine reductase، الذى ينتج بواسطة بعض سلالات من *B.cereus* ، *Str.thermophilus* ، ويعتبر ذلك على جانب كبير من الأهمية فى استخدام النيسين فى حفظ الأغذية بالتعليب ، نظرا لأن أفراز nisinase بواسطة البكتريا الموجودة فى الأغذية قد يبطل النشاط المثبط للنيسين.

حساسية بكتريو سينات بكتريا حامض اللاكتيك لإنزيمات البروتييز ، خاصة الإنزيمات التى مصدرها الأمعاء والبنكرياس ، يجعل استخدام النيسين عرضة لكثير من المناقشات ، حيث أن النيسين قد يتحلل فى القناة الهضمية ، الذى يقلل من مخاطرة الإخلال بالتوازن الميكروبى فى القناة الهضمية ، أو يسبب بعض تفاعلات الحساسية . بالإضافة إلى ذلك ، فقد أوضحت بعض التجارب أن بكتريوسينات بكتريا حامض اللاكتيك مقاوم نسبيا لكميات المنفحة التى تستخدم عادة فى صناعة الجبن .

بعض البكتريوسينات ، مثل Plantaricin B, Helvectin J ، التى تنتجها *Lb. helveticus* ، *Lb. plantarum* ، على الترتيب ، تتلف بواسطة أنواع أخرى من الإنزيمات ، مثل lipases ، amylases أو phospolipases ، مما يدل على أن البكتريوسينات مركبات معقدة أو مرتبطة بجزيئات كبيرة أخرى بالإضافة إلى البروتينات.

عموما فإن بكتريوسينات بكتريا حامض اللاكتيك مقاومة للحرارة بدرجة كافية ، حيث أن البسترة لا تقلل من نشاطها . هذه البكتريوسينات فى معظم الحالات يكون تركيبها البنائي بسيط نسبيا ، بإستثناء Helveticin J ، حيث يكون هذا البكتريوسين عبارة عن تركيب معقد من البروتين وغير مقاوم للحرارة .

بكتريوسينات بكتريا حامض اللاكتيك بصفة عامة ثابتة عند قيم pH حامضية أو متعادلة ، وبالتالى فإنها تتأقلم بدرجة جيدة مع الظروف البيئية للميكروب الذى ينتجه . النيسين وغيره من lantibiotics حساس خاصة للأختلافات فى pH . عند pH ٢,٠ يصل درجة ذوبان وثبات النيسين أقصى حد لها ، مع انخفاض سريع لهما بإرتفاع pH ، خاصة عند pH أعلى من ٧,٠ ، وقد تعتبر هذه الصفة أحد العقبات التى تواجه استخدام النيسين فى الجبن أو على سطح الجبن ، نظرا لأن pH يرتفع بدرجة سريعة فى الجبن المسواه بالفطر ، مثل الكممبير أو الجبن المسواه سطحيا بالبكتريا smear مثل Munster و Brick.

٥-٣- تخليق البكتريوسينات

عادة يحدث تخليق biosynthesis البكتريوسينات أثناء أو عند نهاية مرحلة النمو اللوغاريتمى ، وتفرز عادة فى بيئة نمو الميكروب ، ومع ذلك فإن جزء من هذه البكتريوسينات تبقى مرتبطة بالخلايا فى بعض السلالات . يحدث ذلك فى إنتاج النيسين إذا كان pH ثابتا عند ٦,٧ أثناء النمو ، أو إذا أمكن المحافظة على pH عند ٦,٧ أثناء النمو .

نظرا لأن تخليق النيسين يبدأ فقط بعد تراكم كتلة حيوية biomass بدرجة كبيرة ، وحيث أن جزئى النيسين يحتوى على أحماض أمينية غير عادية ، فإنه

النيسين النشط يتكون نتيجة عملية إنزيمية معقدة التى تؤدى إلى انتقال ribosomal pronisin إلى نيسين نشط.

نظرا لوجود ارتباط محسوس بين كمية البكتريوسين المتكونة والكتلة الحيوية biomass ، فقد أجريت عدة محاولات لزيادة إنتاج البكتريوسين عن طريق زيادة الكتلة الحيوية biomass ، وذلك بإضافة سكريات ، فيتامنيات أو عناصر غذائية نيتروجينية إلى البيئة ، أو بالمحافظة على المزارع عند pH ثابت .

تعتبر البيئة من العناصر الهامة فى إنتاج النيسين ، فى حالة Lactococci فإن مرق إيليكر غير المنظم unbuffered Elliker broth يكون أفضل بصفة عامة لإنتاج البكتريوسين عن مرق M17 المنظم بدرجة عالية . على العكس من ذلك ، فقد وجد أن إنتاج Lacticin 481 ، الذى تنتجه *Lc.lactis* ssp. *lactis* CNRZ 481 يكون تركيزه فى اللبن وجبن Caprion (نوع من الجبن الإيطالية الطرية المصنوعة باستخدام بادئات حرارة معتدلة) معادل لتركيزه فى البيئات المعملية.

كما أن pH النمو عامل مهم فى إنتاج البكتريوسينات ، لكن يختلف تأثيره باختلاف نوع الميكروب المستخدم . يصل إنتاج النيسين إلى الحد الأقصى له والتى بعدها ينخفض عندما لا يتم تنظيم pH المزرعة . يحدث تخليق Plantaricin S بواسطة *Lb. plantarum*، Lacticin 481 بواسطة *Lc.lactis* ssp. *lactis* CNRZ 481 و Helveticin J بواسطة *Lb. helveticus* بكميات تصل إلى أقصى حد عند pH ٥,٥ . على العكس ، فإن إنتاج Lactocin F, Lactocin B بواسطة *Lb.acidophilus* يكون بكميات تصل إلى أقصى حد عند pH ٧,٠ و ٦,٠ ، على الترتيب . يلاحظ بصفة عامة أن انخفاض إنتاج البكتريوسينات عند pH قريب من التعادل أو فى مرحلة ثبات النمو stationary phase ، مما يعتقد أن البكتريوسينات قد تتحلل بواسطة الإنزيمات المحللة للبروتين من الخلايا المنتجة.

٥-٤- أسلوب تأثير البكتريوسينات

تأثير البكتريوسينات على الخلايا المستهدفة يتم بعملية تتكون من خطوتين . تتضمن الخطوة الأولى ادمصاص adsorption البكتريوسين بمستقبلات متخصصة specific acceptors أو غير متخصصة nonspecific على سطح الخلايا

المستهدفة. عند هذه المرحلة ، فإن البكتريوسين ما زال حساسا لفعل الإنزيمات المحللة للبروتين . الخطوة الثابتة تكون غير رجعية irreversible وتتضمن تغيرات (تكوين ثقوب pores فى الغشاء ، تدفق مكونات السيتوبلازم ، اتلاف نظام فرق الجهد Δp) التى تكون متخصصة للبكتريوسين المعنى . فى حالة بكتريا حامض اللاكتيك فإن معظم الأبحاث أوضحت أن البكتريوسينات تدمص بصورة عشوائية على البكتريا الموجبة لجرام ، التى تعنى أنها تدمص بطريقة متماثلة سواء كانت السلالة حساسة أو غير حساسة للبكتريوسين.

وعموما فإن النيسين وجميع البكتريوسينات التى تنتمى لمجموعة اللانتيبيوتك lantibiotics تعتبر ببتيدات كاتيونيه (تحمل شحنات موجبة) cationic peptides وتحتوى على أحماض أمينية غير محبة للماء hydrophobic amino acids ، حيث تدمص على غشاء السيتوبلازم (مثل المطهرات الكاتيونية ذات النشاط السطحى) . النيسين لا يحتاج إلى مراكز استقبال خاصة لإدمصاصه ، ولكن يحتاج إلى مركبات أنيونية (تحمل شحنات سالبة) وموجودة فى جدار خلايا البكتريا الموجبة لجرام ، مثل حامض التيكويك teichoic acid ، حامض التيكيورنيك teichuronic acid وحامض الليبوتيكويك lipotechoic acid والسكريات العديدة الحامضية acidic polysaccharides ، وبناء على ذلك يفترض حدوث قوى جذب electrostatic للبكتريوسين مع المكونات الأنيونية بجدار الخلية . تتجه جزيئات البكتريوسينات (بفعل الخاصية غير المحبة للماء) إلى المكونات الليبدية فى غشاء السيتوبلازم مع ترتيب نفسها فى تجمعات مكونة قنوات تسمح بمرور مكونات السيتوبلازم الصغيرة (مثل K^+ ، Mg^{+2} والأحماض الأمينية ,ATP) مما يؤدى إلى توقف العمليات الحيوية فى الخلية وتخليق الجزيئات الكبيرة (مثل البروتينات والأحماض النووية) مما يؤدى إلى قتل الخلايا.

عموما فإن بكتريوسينات بكتريا حامض اللاكتيك لا تثبط طبيعيا naturally البكتريا السالبة لجرام، بأستثناء ميكروب *Salmonella typhimurium*، الذى يثبط بالنيسين فى وجود(EDTA) ethylene-diamine-tetra-acetic acid. يعزى أى تثبيط للبكتريا السالبة لجرام بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك إلى عوامل أخرى ، تتضمن pH المنخفض ، إنتاج H_2O_2 والتنافس على العناصر الغذائية .

وقد يرجع ذلك إلى الأختلافات الأساسية الموجودة فى جدار الخلية cell wall وأغشية membranes البكتريا الموجبة والسالبة لجرام . ومن غير المحتمل أن البكتريوسين ، الذى يكون ثقوبا أو قنوات فى جدار خلايا البكتريا الموجبة لجرام، سوف يسبب نفس التأثير فى جدار خلايا البكتريا السالبة لجرام.

قد ترجع السهولة التى يتم بها ادمصاص البكتريوسينات التى تنتجها بكتريا حامض اللاكتيك ، عشوائيا على جدار خلايا أو الأغشية إلى طبيعتها غير المحبة للماء hydrophobic . وطبقا لنوع البكتريوسين ، فإن جدار الخلية قد يشارك أو لا يشارك فى تأثير جزيئات البكتريوسين المضاد للبكتريا antibacterial. فمثلا ، Lactacin F ، الذى ينتجه *Lb.acidophilus* ، يكون قاتلا للبكتريا bactericidal ، لبروتوبلاست protoplasts بكتريا OGIX *Ent.faecalis* *Lb.acidophilus* NCK 88, ، بينما الخلايا الكاملة لهذه السلالات تكون مقاومة. فى حالة Pediocin AcH فإن lipoteichoic acids تكون مسئولة عن التصاق البكتريوسين بجدار الخلية .

باستثناء Lactocin 27 ، الناتج بواسطة *Lb.helveticus* ، الذى يكون مثبطا للبكتريا bacteriostatic ، فإن معظم البكتريوسينات الناتجة بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك تكون قاتلة للبكتريا bactericidal . تأثير البكتريوسينات يكون سريعا ، حيث أن الخلايا الحية للسلالات المستهدفة تنخفض فى خلال عدة دقائق بعد أتصال البكتريوسين بالخلايا . عادة يكون التأثير القاتل أكثر وضوحا على الخلايا فى مرحلة النمو اللوغاريتمى مقارنة بالخلايا فى مرحلة الثبات stationary phase . التأثير القاتل يكون مصحوبا بهروب أيونات البوتاسيوم K^+ ، ATP والجزيئات الممتصة للأشعة فوق البنفسجية UV (البروتينات والأحماض النووية nucleic acids) من الخلايا . فقد ATP وتدفق K^+ يدل على أن الميكروب المستهدف لا يستطيع المحافظة على فرق جهد Δp فى الخلايا ، كما يستهلك مخزون الطاقة للمحافظة على التوازن اللازم لتوليد ATP ، لذلك فإن الغشاء يكون الهدف الأساسى للبكتريوسينات . يعمل النيسين كمادة مزيلة للأستقطاب depolarizing مكونة ثقوب pores فى الفوسفوليبدات التى تعكس طبيعة النيسين وغيره من البكتريوسينات غير المحبة للماء .

تحلل الخلايا cell lysis قد يكون أو لا يكـــون موازيـــا لمـــوت الخلايـــا المستهدفة. النيسين ، نتيجة قابليته للـــlipoteichoic acids ، يفرز وينشط نظامين للتحلل الذاتى autolytic فى *S.cohnii* ، اللذان يرتبطان عادة بـــــlipoteichoic acids فى صورة غير نشطة . ويعتقد أن Pediocin AcH يحتوى على نفس النـوع من النشاط التحللى lytic activity.

٥-٥- تقسيم البكتريوسينات

قام كثير من الباحثين بتنقية بعض البكتريوسينات وتوصيفـــها . الترســـيب على مراحل fractional precipitation بواسطة $(NH_4)_2 SO_4$ يؤدى بدرجة كبيرة إلى ارتفاع النشاط لبعض البكتريوسينات ، نتيجة تحلل البكتريوســـــينات عديـــد الوحدات polymeric forms إلى صـــــورة أكـــثر نشـــاطا وحيـــد الوحـــدات monomers . عادة يتم الحصول على الصورة النقية النهائية بواسطة بعض طـــرق ion-exchange chromatography . عند هذه المرحلة ، يلاحظ أن فقد النشـــاط فى عدد من الحالات ، الذى قد يعزى إلى طبيعة بعض البكتريوسينات غير المحبـــــة للماء.

فى ضوء محتوى الأحماض الأمينية وعناصر التركيب البنائى للبكتريوسينات ، فقد تم تقسيم البكتريوسينات الناتجة من بكتريا حـــامض اللاكتيـــك ، فى عـــام ١٩٩٢ ، إلى ٣ أقسام :

١- Lantibiotics .
٢- ببتيدات غير محبة للماء ومقاومة للحرارة (وزن جزيئى أقل من ١٣ kDa).
٣- بروتينات كبيرة غير مقاومة للحرارة (وزن جزيئى أكبر من ٣٠ kDa) .

فى عام ١٩٩٣ تم مراجعة هذا التقسيم ، وتم تقسيم هذه البكتريوسينات إلى ٤ أقسام رئيسية على النحو التالى :

١- Lantibiotics . منخفض الوزن الجزيئى (أقل من ٥ kDa) ، يحتوى علـــى أحماض أمينية غير عادية مثل lanthionine ومقاوم للحرارة ، مثـــل Nisin , Lacticin 481 .

٢- ببتيدات منخفضة الوزن الجزيئى (أقل من ١٠ kDa) ، لا تحتوى على lanthionine ومقاوم للحرارة مثل : Diplococcin ، A Lactococcin ، Lactacin F ، Pediocin AcH, Leucocin UAL 187 .

٣- بروتينات مرتفعة الوزن الجزيئى (أعلى من ١٠ kDa)، غير مقاومة للحرارة، مثل Caseicin 80, Helveticin J .

٤- بكتريوسينات معقدة التركيب تتكون من بروتين مع واحد أو أكثر من الشقوق الكيماوية (اللبيدات ، الكربوهيدريت) مثل Plantaricin S ,Lactocin 27.

٥-٦- الأهمية التكنولوجية للبكتريوسينات فى مجال الألبان

أول أهمية تكنولوجية لإنتاج اليكتريوسين بواسطة بادئ ، هو سيطرة السلالة المرغوبة فى مزرعة مختلطة السلالة خلال عملية التنشيط المتتالية successive subcuturing للمزرعة . يمكن أن يحدث ذلك أيضا خلال صناعة الجبن ، كما فى صناعة جبن Caprino (نوع من الجبن الطرية الإيطالية تصنع باستخدام بادئات حرارة معتدلة). البادئات المستخدمة تتكون من سلالة منتجة للبكتريوسين (Bac^+ strain *Lc.lactis* ssp. *lactis* CNRZ 481) وسلالة غير منتجة للبكتريوسين (Bac^- strain *Lc. lactis* ssp. *cremoris* CNRZ 1175). الجبن المصنوعة من سلالات فردية يحدث بها تخمرات مرغوبة ، ومع ذلك فإن عدد السلالة Bac^- فى البداية أقل بدرجة بسيطة . فى الجبن المصنوعة بنوعين من المزارع فإن أعداد السلالة Bac^+ تصل إلى الأعداد الطبيعية ، بينما سلالة Bac^- يتم تثبيطها فى خلال ساعتين نتيجة لإنتاج البكتريوسين بواسطة السلالة Bac^+ . يستمر الانخفاض فى الأعداد حتى ٢٤ ساعة ، حيث تصل الأعداد المتبقية للسلالة Bac^- إلى ٢٠ cfu/مل فقط .

الأهمية الثانية التكنولوجية لإنتاج البكتريوسين ، هى إمكانية تكوين بادئات جديدة تستطيع أن تثبط البكتريا غير المرغوبة مثل *Cl.tyrobutricum* ، التى تكون مسئولة عن الأنتفاخ المتأخر late blowing أو تخمر حامض البيوتريك butyric acid fermentation فى الجبن و *List. monocytogenes* من الميكروبات المرضية

للإنسان . الأنتفاخ المتأخر فى الجبن يرجع إلى وجود عدد من جراثيم البكتريا فى اللبن المستخدم فى الصناعة . يحدث تلوث للبن أثناء الإنتاج ، ويتوقف ذلك على العناية المتبعة أثناء عملية الحلب وعلى نوع العليقة التى يتناولها الحيوان وجودته البكتريولوجية . المصدر الرئيسى للتلوث غالباً ما يكون السيلاج المنخفض الجودة . يمنع النيسين نمو جراثيم *Cl.tyrobutyricum* . وقد حاول كثير من الباحثين استخدام النيسين فى عدة أنواع من الجبن ، خاصة الجبن السويسرية والأيدام ، الذى يكون أكثر عرضة للأنتفاخ . وقد أنتهت الدراسات بصفة عامة إلى أن تخمر حامض البيوتريك يمكن السيطرة عليه بكفاءة باستخدام سلالات منتجة للنيسين (Nis^+) أو البكتريوسين (Bac^+) ، ولكن جودة الجبن النهائى قد تتأثر ، حيث أن مثل هذه السلالات غالبا ما تثبط سلالات البادئ الأخرى ، ونتيجة لذلك فإنها تؤثر على إنتاج الحموضة أو إنتاج مكونات الطعم . لذلك يجب الأهتمام باختيار السلالات المنتجة للبكتريوسين Bac^+ الفعالة ضد *Cl.tyrobutyricum* .

توجد بعض الصعوبات فى استخدام السلالات المنتجة للنيسين ، هذه السلالات بصفة عامة حساسة جدا للفاج ، بالإضافة إلى أن وجود ميكروبات منتجة لإنزيم nisinase ، الذى يتلف النيسين ، ويبطل فعل النيسين . ويؤدى هذا إلى الحد من الاستفادة العملية من السلالات المنتجة للنيسين (Nis^+) لتثبيط *Cl.tyrobutricum* .

هناك عدة أسباب للتأثير الضعيف للسلالات المنتجة للبكتريوسين Bac^+ للتغلب على الأنتفاخ فى صناعة الجبن . من غير المؤكد أن السلالات المنتجة للبكتريوسين ، ما عدا *Lb.helveticus* ، تتكاثر جيدا فى الجبن . فإذا لم تصل هذه السلالات إلى أعداد كافية، فإنه من المحتمل أن البكتريوسين لا ينتج فى خثرة الجبن، أو ينتج بكميات غير كافية أو بدرجة بطيئة جدا لأحداث تثبيط كامل لـ *Cl.tyrobutyricum* ، أو يفقد فى الشرش ، بالإضافة إلى ذلك ، فقد لوحظ أن التثبيط يحتاج إلى وجود خلايا حية ، التى لا تتكاثر بصورة متجانسة خلال الجبن. لذلك فإنه من المحتمل أن التوزيع الطبيعى لسلالة Bac^+ أو البكتريوسين نفسه لا يكون مماثلا لتوزيع *Cl.tyrobutyricum* فى الخثرة .

استخدام النيسين مصرح به فى عدد من الدول للتغلب على المخاطر الناجمة من وجود جراثيم *Cl.botulinum* فى الجبن المطبوخ . المستحضرات التجارية للنيسين ، نيسابلين nisaplin، يمكن أن يستخدم عند تركيز ٥٠٠ ملليجم/كجم . بعض المستحضرات تحتوى على ٢ % نيسين فقط ، لذلك فإن مستوى النيسين فى الجبن يصل إلى ١٠ ميكروجرام/كجم فقط . تركيز النيسين المستخدم يتوقف على عدة عوامل . أولاً ، درجة حرارة أنصهار melting temperature الجبن أثناء عملية الطبخ تكون مرتفعة نسبياً (٨٠ – ٨٥°م) ، وحوالى ١٥% من نشاط النيسين يتلف عند هذه الدرجة من الحرارة . ثانياً ، يتوقف الحد الأدنى من التركيز المثبط MIC على أعداد الجراثيم ، فمثلاً أعداد $١٠^{٤}$ جراثيم *Cl.sporogenes* /مل يحتاج ٠,٣ ملليجم من nisplin / مل ، لكن $١٠^{٢}$ جراثيم /مل يحتاج فقط ٠,١ من هذا التركيز . يختفى نشاط النيسين تدريجياً أثناء تخزين الجبن المطبوخ. التركيز فى البداية يجب أختياره بحيث تكون الكميات المثبطة للجراثيم تظل موجودة حتى نهاية فترة التخزين (الصلاحية) المتوقعة للناتج .

حالات التسمم الغذائى الناتج من استهلاك الجبن قد أرتفعت خلال السنوات القليلة الماضية ، خاصة الجبن الطرية عندما تصنع تحت ظروف غير صحية. قد يرجع ذلك فى بعض الحالات ، إلى وجود سلالات مرضية من *List.monocytogenes* ، هذا الميكروب حساس للنيسين ، وقد اقترح كثير من الباحثين استخدام سلالات من بكتريا حامض اللاكتيك منتجة للبكتريوسين Bac^{+} أو النيسين Nis^{+} على السطح لتثبيط هذا الميكروب .

فى عدد من الحالات ، يكون اللبن المستخدم فى الصناعة مصدراً للتلوث بـ*List.monocytogenes* . عادة هذا الميكروب المرضى لا ينمو فى الجبن نتيجة للفعل المشترك للـpH المنخفض (٥,٠ أو أقل) والنشاط المائى (a_w) المنخفض . ومع ذلك ، فإن الجبن المسواه سطحياً ، مثل الكممبير ، فإن نمو الفلورا السطحية (الخمائر، الفطريات والبكتريا) يؤدى إلى ارتفاع pH الجبن ، وتستأنف *List.monocytogenes* النمو . يكون pH داخل الجبن أقل منه عند السطح ، وترتفع أعداد البكتريا بدرجة بطيئة دون أن تبلغ الأعداد المرتفعة الموجودة على سطح الجبن.

قام عدد من الباحثين باختبار عدة سلالات من *Lb.paracasei* ، Lactococci ، Pediococci, Enterococci ، فى جبن الكممبير التى لوثت بالـ *Listeria* عمداً ، ووجد حدوث تثبيط فقط فى حالة *Lb.paracasei* عندما استخدم فى تسوية اللبن الملوث عمداً ، لم يحدث تثبيط فى حالة تلويث الجبن عمداً فيما بعد.

كما قام بعض الباحثين حديثاً بدراسة تأثير بادئات Nis^+ لتثبيط *Listeria* فى جبن الكممبير ، والسلالة المستخدمة المنتجة للنيسين Nis^+ كانت *Lc.lactis* CNRZ 150 والسلالة غير المنتجة للنيسين Nis^- كانت *Lc.lactis* CNRZ 117 S. كان تركيز النيسين فى الجبن متطابقاً مع التغيرات فى أعداد سلالة Nis^- . الحد الأقصى من تركيزات النيسين ، حوالى ٧٠٠ IU/جم ، تم الوصول إليه بعد ٩ ساعات ، بعدها بدأت هذه التركيزات فى الأنخفاض سريعاً خلال ١٥ ساعة التالية ، خاصة فى قشرة الجبن . يحدث نمو ضعيف *List.monocytogenes* فى خلال الساعات القليلة الأولى فى الجبن المصنوعة باستخدام كل من بادئات Nis^+ ، Nis^- ، بعدها تبدأ الأعداد فى الأنخفاض فىالجبن المصنوعة باستخدام بادئ Nis^+ . يستمر تثبيط *Listeria* فى داخل الجبن حتى الأسبوع الثانى ، بحيث يصل الأنخفاض إلى ٣,٣ دورة لوغاريتمية مقارنة بالعدد فى البداية فى اللبن. يستأنف النمو فى الجبن بعد ذلك ويحدث بدرجة أسرع على السطح عنه داخل الجبن . ومع ذلك فقد حدث انخفاضاً قدره ٢,٤ دورة لوغاريتمية فى *List.monocytogenes* فى الجبن المصنوعة ببادئ Nis^+ مقارنة بالجبن المصنوعة ببادئ Nis^- وقد تم المحافظة عليه حتى نهاية التسوية (٦ أسابيع) . نمو *Listeria* بدرجة أكبر على قشرة الجبن يرجع إلى أرتفاع قيم pH فى قشرة جبن الكممبير ، وكذلك إلى تحلل lantibiotic بواسطة proteinases الناتج من *Penicillium camemberti* أثناء التسوية . استخدام كل من أنواع Prt^+ و Prt^- من بادئات Nis^+ أدى إلى سيطرة أفضل على الصفات الطبيعية الكيماوية للخثرة . يزداد هذا التأثير مع انخفاض تلوث اللبن بالـ *Listeria* .

وعموماً يجب أن تتوفر الصفات التالية فى البكتريوسينات المثلى لأستخدامها فى الجبن :

١- مجال واسع من النشاط ضد كل من البكتريا الموجبة والسالبة لجرام.
٢- تأثير قاتل أكثر منه مثبط.
٣- غير مثبط لميكروبات البادئ الأخرى المستخدمة والتى تتضمن الأنواع المشاركة فى إنتاج النكهة.
٤- نشاط جيد وثابت عند قيمpH ودرجات الحرارة المستخدمة فى الصناعة والتسوية ، وهذا يعنى أن تحلل أو إتلاف المواد المثبطة يكون أقل ما يمكن.
٥- آمناً safe صحياً بدرجة عالية بالنسبة للمستهلك ، خاصة غياب تفاعلات الحساسية للمنتجات نفسها أو نواتج تحللها ، وليس له تأثير كبير على توازن الفلورا فى القناة الهضمية . وفى هذه الحالة فإن تناول النيسين ليس له تأثيرات سمية.

٦- بكتريوسينات Lactococci

اول بكتريوسين تم التعرف عليه من بكتريا حامض اللاكتيك (*Lactococcus*) كان النيسين nisin. ومنذ هذا الأكتشاف فإنه أمكن عزل بكتريوسينات أخرى من سلالات مختلفة من Lactococci .

٦-١- *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

٦-١-١- النيسين Nisin

النيسين عبارة عن بروتين مضاد للميكروبات antimicrobial protein ينتج بواسطة بعض سلالات بكتريا الألبان *Lc.lactis* ssp. *lactis* وقد أكتشف نتيجة دراسات بدأت فى الثلاثينات على التأثيرات المثبطة على مزارع البادئات التقليدية نتيجة توكسين موجود فى اللبن.

السلالات المثبطة من *Lc.lactis* ssp. *lactis* تم التعرف عليها بواسطة Mattick and Hirsch فى عام ١٩٤٤ . وقد أطلق اسم نيسين Nisin على مادة تم توصيفها بواسطة هذين الباحثين فى عام ١٩٤٧ . وقد وجد أن النيسين عبارة عن ببتيدات عديدة polypeptide وقد تم التعرف على تركيبه البنائى غير الطبيعى بواسطة Gross and Morell فى عام ١٩٧١ . النيسين عبارة عن بروتين شاذ

(غير طبيعي) atypical protein يحتوى على أحماض أمينية غير طبيعية unusual وحلقات lanthionine . هذه الصفة معروفة الآن لتمييز مجموعة أكبر من الببتيدات العديدة المثبطة التى تنتج بواسطة بكتريا مختلفة موجبة لجرام . يعتبر النيسين من المواد المضادة للميكروبات التى تعرف باللانتبيوتيك lantiobiotics .

وقد وجد أن التأثير المثبط للنيسين يغطى نطاق واسع جدا من أنواع أخرى من البكتريا الموجبة لجرام لكن ، بأستثناء *Neisseria* ، فإن أنواع البكتريا السالبة لجرام مقاومة للنيسين و لم يسجل أى تأثير ضد الخمائر والفطريات . وقد أظهرت الأبحاث الحديثة أن استخدام النيسين بالأشتراك مع مركبات أخرى يؤدى إلى إمتداد تأثيره ليغطى نطاق واسع من البكتريا السالبة لجرام . تشير صفات النيسين المضادة للميكروبات أن له دورا هاما فى الأدوية الخاصة بالإنسان أو البيطرية ولكن لم يتضح ذلك حتى الآن . ويعتبر النيسين هو البكتريوسين الوحيد الذى تم الموافقة عليه بواسطة الجهات الرقابية لاستخدامه فى كثير من منتجات الألبان كمادة حافظة حيوية .

أ- مجال التأثير

وجد أن النيسين (والمستحضر التجارى نيسابلين Nisaplin) له تأثير مثبط inhibitory على خلايا وجراثيم سلالات كثيرة من البكتريا الموجبة لجرام والتى يسبب بعضها فساد الأغذية ، مثل *Pediococcus damnosus* ، وكثير من أنواع وسلالات *Clostridium, Bacillus* ، *Leuconostoc, Lactobacillus,* وكذلك *Micrococcus* و *Brochothrix thermosphacta* . تشمل البكتريا المرضية الحساسة للنيسين التى تنتقل عن طريق الغذاء ، سلالات من *Listeria monocytogenes* ، *Staphylococcus aureus* ، *Bacillus cereus* ، *Cl.botulinum, Clostridium perfringens* . وقد وجد ان جراثيم كثير من سلالات *Clostridium, Bacillus* المسببة لفساد الأغذية والمرضية تكون حساسة للنيسين . ومع ذلك فإن كثير من الأنواع يوجد بها سلالات مقاومة للنيسين ، فى وجود أعداد من سلالة حساسة قد يظهر أفراد variants مقاومة للنيسين . كما يختلف الحد الأدنى للتركيز المثبط للنيسين minimum inhibitory concentration (MIC) بدرجة كبيرة خلال السلالات الحساسة . وقد أشارت بعض التقارير أن

النيسين قد يكون قادرا للقضاء على كثير من البكتريا الموجبة لجرام المسببة لفساد الأغذية والمرضية بعد المعاملة بالـ ethylene-diamine tetra-acetic acid (EDTA) والتي يعقبها أضرارا تحت المميتة sublethal injury نتيجة التسخين ، التجميد والتعرض لـpH منخفض.

ب- تخليق النيسين

يختلف مستوى إنتاج النيسين بين سلالات *Lc.lactis* ssp. *lactis* . تعطى بيئة غنية فى البروتينات والببتيدات ، الجلوكوز ، مستخلص الخميرة ، الفوسفات ، البنتوثينات pantothenate ، المغنسيوم Mg^{2+} والمنجنيز Mn^{2+} وسط نمو جيد لإنتاج النيسين بواسطة سلالة منتجة للنيسين . المحافظة على pH البيئة قريبا من ٦,٠ يجعل السلالات قادرة على إنتاج نيسين بدرجة أكبر . يتم تحويل جزيئات النيسين غير النشطة إلى جزيئات نشطة فى السيتوبلازم بأسلوب لا يسمح للجزيئات النشطة أن تلتصق مباشرة بغشاء السيتوبلازم ولكن تفرز خارج الخلايا. فى بيئة مزرعة سائلة culture broth توجد الجزيئات النشطة فى كل من البيئة وعلى سطح الخلايا (حيث تدمص على مستقبلات متخصصة) ، يتوقف نسبة كل منها بدرجة كبيرة على pH البيئة . تم تنقية النيسين بطرق مختلفة من المزارع السائلة والخلايا ، بواسطة الترسيب بالأسيتون ، الترسيب بالكحول والترسيب NH_4-sulfate . وحديثا شرح بعض الباحثين طريقة بسيطة ، تعتمد على تعديل pH المزرعة السائلة المحتوية على الخلايا المنتجة ، تنتج نيسين على درجة نقاوة عالية بكميات كبيرة.

جـ- أسلوب تأثير النيسين

يعتمد تاثير النيسين المثبط للبكتريا bacteriostatic أو القاتل bactericidal على تركيز كل من النيسين وعدد الخلايا الخضرية للبكتريا أو الجراثيم الحساسة. وقد أجريت عديد من الدراسات على أسلوب تأثير النيسين ضد الخلايا الخضرية للبكتريا الحساسة ، كما أجريت عدد قليل من الدراسات على أسلوب التأثير ضد جراثيم البكتريا . ويعتقد أن الموقع الرئيسى لتأثير النيسين ضد الخلايا الخضرية هو غشاء السيتوبلازم cytoplasmic membrane . وقد اشار البعض أن تأثير النيسين

المضاد للميكروبات قد يحدث نتيجة تفاعل النيسين مع الفوسفوليبيدات فى غشاء السيتوبلازم ، وقد أوضحت الدراسة أن الفوسفوليبيدات المختلفة وأغشية السيتوبلازم المعزولة قد تقاوم التأثير المثبط للنيسين ، وأن النيسين يسبب تحلل ليبوسوم الفوسفوليبيدات المخلقة synthetic phospholipid liposomes ، وأن النيسين سوف يرتبط مع الفوسفوليبيدات ليكون مركب فوسفوليبيد – نيسين nisin-phospholipid complex . كما وجد أن النيسين يمنع تكوين مكون جدار الخلايا ، الميورين (peptidoglycan) murein . وقد وجد بعض الباحثين أن الميكروبات التى لا تحتوى على ميورين فى جدار خلاياها تكون أيضا حساسة للنيسين ، وبالتالى فإن منع تكوين الميورين لا يعزى إليه أسلوب التأثير الأساسى .

وعموما فإن الخلايا الكاملة للبكتريا السالبة لجرام ، مقاومة لفعل النيسين. ومع ذلك فإن تمزيق جدار خلايا البكتريا السالبة لجرام تجعل *E.coli* حساسة للنيسين . تحدث زيادة فى درجة نفاذية جدار خلايا البكتريا السالبة لجرام بواسطة استخدام مواد مخلبية chelating agents التى تزيل أيونات المغنسيوم التى تعمل على تثبيت طبقة lipopolysaccharide من الغشاء الخارجى . استخدام النيسين مع مواد مخلبية disodium ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) يؤدى إلى القضاء على السالمونيلا وأنواع أخرى من البكتريا السالبة لجرام . معاملة الخلايا بالـ EDTA أو النيسين بمفرده لا يؤدى إلى قتلها . يحدث خفض كبير فى معدل قتل الخلايا عند درجات حرارة منخفضة . استخدام النيسين مع EDTA لكى يحدث التأثير على البكتريا السالبة لجرام قد تم تسجيلها كأختراع patent . الأضرار تحت المميتة sublethal injury التى تحدث نتيجة الحرارة ، التجميد والتعرض لأحماض عضوية تزيد أيضا من نفاذية جدار خلايا البكتريا السالبة لجرام، مما يجعلها حساسة للنيسين.

تدل الدراسات المتقدمة أن التأثير الرئيسى للنيسين يرجع إلى تمزيق غشاء السيتوبلازم ، حيث أن استخدام النيسين للبكتريا الموجبة لجرام الحساسة يسبب تدفق مكونات السيتوبلازم الصغيرة مثل ATP (adenosine triphosphate) وأيونات البوتاسيوم وأحماض أمينية .

تأثير النيسين على الجراثيم غالبا ما يكون مثبط bacteriostatic أكثر منه قاتل bactericidal .ويعتبر ذلك على درجة كبيرة من الأهمية عند استخدامه كمادة حافظة فى الأغذية ، مما يعنى إلى أنه يجب المحافظة على متبقيات النيسين بدرجة كافية حتى يضمن استمرار التأثير على أى جراثيم موجودة . الجراثيم التى حدث لها تلف بواسطة الحرارة تصبح أكثر حساسية للنيسين . وقد وجد أن تأثير النيسين ضد الجراثيم يحدث نتيجة ارتباط النيسين بمجاميع السلفدريل sulfhydryl فى البروتين ، الفوسفوليبيدات ليس لها دور فى هذا التأثير.

قد تعزى مقاومة الخلايا للنيسين إلى تغيير فى تركيب الفوسفوليبيدات أو تنظيم فى غشاء سيتوبلازم الخلايا المنتجة ، مما يؤدى إلى نمط شحنات charge pattern مختلف مقارنة بالخلايا الحساسة لنيسين.

د–استخدام النيسين فى الأغذية

(i) النواحى السمية والرقابية Toxicological and regulatory aspects

النيسين غير سام non-toxic عندما يتناول عن طريق الفم ، كما أنه مادة حافظة آمنة safe فى الأغذية . يعتبر حساسية النيسين للتحلل الإنزيمى ، بالرغم من أن ذلك يمثل بعض العيوب عند استخدامه كمادة علاجية ، من المزايا المرغوبة عند استخدامه فى الأغذية ، حيث أن النيسين يتم هضمه سريعا ، وبالتالى لا يكون له تأثير على الفلورا المعوية أو يمتص فى الدم.

وحاليا يسمح باستخدام النيسين فى حوالى ٥٠ دولة ، تشمل الولايات المتحدة الأمريكية ، المملكة المتحدة والصين . فى عام ١٩٨٨ تم اعتماده بواسطة إدارة الأغذية والأدوية FDA بالولايات المتحدة الأمريكية كمادة آمنة ومعتمدة GRAS . تختلف الأغذية التى يسمح باستخدام النيسين فيها من دولة إلى أخرى ، وتعتبر منتجات الجبن المطبوخة والأغذية المعلبة من أكثر الأغذية التى يستخدم فيها النيسين.

الأكتشاف الأولى للنيسين فى العشرينات شجع على تقويم إمكانية استخدامه كمادة علاجية فى مجال علوم الطب البشرى والبيطرى . نتيجة تحلله السريع بواسطة الإنزيمات الهاضمة ، عدم ثباته عند pH الفسيولوجى (pH =

٧,٤) ومجال تأثيره المضاد للبكتريا المحدود جعله غير مناسبا للأستخدام فى هذه الأغراض .

بدأ دراسة استخدام النيسين كمادة حافظة بعد الحرب العالمية الثانية وكان بداية الاهتمام به عند استخدامه فى الجبن الطبيعية لمنع تكوين الغازات فى الجبن بواسطة Clostridia . وقد كانت المشكلة الرئيسية هو تثبيط بكتريا بادئات الجبن بواسطة النيسين. وفى محاولة للتغلب على هذه المشكلة تم أقلمه ميكروبات البادئات على النمو فى وجود النيسين ، وقد تم الحصول على نتائج مشجعة ولكن تدهورت الفائدة المترتبة على ذلك ، نتيجة لصعوبة أقلمة أعداد كافية من الميكروبات وكذلك مشاكل تثبيط ميكروبات التسوية الطبيعية . ومع ذلك فإن التطورات الحديثة فى تكنولوجيا جين النيسين nisin gene الذى بواسطته يتم نقل إنتاج ومقاومة النيسين إلى بكتريا البادئ قد أدى إلى إعادة الاهتمام بإمكانية استخدام النيسين فى إنتاج الجبن الطبيعية.

أول استخدام للنيسين كوسيلة لمنع فساد الجبن المطبوخة بواسطة Clostridia ، قد تم دراسته فى عام ١٩٥٢ . وفى إحدى شركات صناعة الجبن المطبوخ ، نتيجة لأنخفاض جودة الجبن الخام المتاحة فى الفترة ما بعد الحرب وفى بداية الخمسينات ، استخدام النيسين كوسيلة لمنع فساد منتجات الجبن المطبوخ وقد استخدم مستحضرات النيسين الخام (غير نقية) بنجاح ، مما دفع الشركة إلى تطوير إمكانيات استخدامات النيسين . ومنذ ذلك الوقت فقد استطاعت الشركة الحصول على مركز نيسين تجارى يعرف بالنيسابلين "Nisaplin" الذى يتميز بنشاط مرتفع وثابت . ومنذ استخدام النيسين كمادة حافظة فعالة فى مفرود الجبن المطبوخ المبستر ، فقد تم استخدامه فى مجالات أخرى.

(ii) منتجات الجبن المطبوخ

تركيب قوالب الجبن المطبوخ ومفرود الجبن المطبوخ غالبا ما تجعلها عرضة للفساد بواسطة إنبات ونمو جراثيم البكتريا التى توجد أصلا فى الجبن الخام وتقاوم عملية الطبخ cooking (الانصهار melting) المستخدمة فى صناعة الجبن المطبوخ . وجود جراثيم البكتريا بأعداد كبيرة فى الجبن غالبا لا يكون مرتبطا بتغذية ماشية

اللبن على السيلاج silage . البكتريا الشائعة المسئولة عن فساد منتجات الجبن المطبوخ هى *Cl.sporogenes* ، *Cl.tyrobutyricum, Cl.butyricum* . وتعتبر *Bacillus* spp. الاختيارية أقل شيوعا فى فساد هذه الجبن .

تم حقن منتجات جبن مطبوخ مختلفة تحتوى على ٤٠-٦٠ % رطوبة ونيسين بتركيز ٢,٥-٦,٢٥ ملليجم/كجم بمخلوط من جراثيم *Cl.sporogenes* (PA3679)، *Cl.tyrobutyricum* (NCDO1757), *Cl.butyricum* (NCIB7423) عند مستوى ١٦٠-٢٤٠/جم عند مرحلة الانصهار melting . تعرضت الجراثيم لصدمة حرارية عند ٨٠°م لتنشيط الإنبات germination وتم طبخ الجبن فى حلة Kustner عند ٨٥°م لمدة ٦-٨ دقائق . تم تعبئة الجبن المنصهرة فى أنابيب بلاستيكية وتم لحمها بالحرارة باستخدام رقائق الألمونيوم . تم تخزين ١٠ عينات من كل ناتج عند ٣٧°م وفحصها أسبوعيا من حيث الفساد . تم التعرف على مظاهر الفساد من حيث إنتاج الغاز ، وفساد المنتج مع ظهور رائحة والفحص الميكرسكوبى . والجدول (٤-٤) توضح النتائج المتحصل عليها ، التى تدل على أن معدل الفساد كان أقل بدرجة كبيرة فى منتجات الجبن المطبوخ عنها فى مفرود الجبن المطبوخ ، يرجع ذلك إلى أن محتوى الرطوبة فى مفرود الجبن المطبوخ كان أعلى . وقد أدت المعاملة بالنيسين بتركيز ٢,٥ ملليجم/كجم إلى معدل أبطأ ومظاهر فساد أقل عن جبن المقارنة ، ولكن لم تؤدى إلى وقاية كاملة . المعاملة بالنيسين بتركيز ٦,٢٥ ملليجم/كجم أدت إلى منع الفساد بميكروبات Clostridia تماما .

وقد اهتمت أيضا صناعة الجبن المطبوخ بإمكانية نمو وتكوين التوكسين بواسطة *Cl.botulinum* فى هذه المنتجات . وقد أظهرت نتائج التجارب أن مستويات النيسين ١٢,٥-٢٥٠ ملليجم/كجم فى مفرود الجبن المطبوخ المبستر كانت فعالة ضد *Cl.botulinum* ، حيث يؤخر أو يمنع نمو وتكوين التوكسين بواسطة جراثيم *Cl.botulinum* نوع B,A التى تم حقنها فى الجبن . مخلوط مفرود الجبن المطبوخ ذات محتوى رطوبة أعلى ومستويات أقل من كلوريد الصوديوم والفوسفات يتطلب مستويات أعلى من النيسين .

جدول (٤-٤) : معدل فساد منتجات الجبن المطبوخ المحفوظة عند ٣٧°م.

المنتج	النيسين المضاف (ملليجم/كجم)	عدد العينات الفاسدة من ١٠ عينات — فترة الحفظ (أسبوع) ١	٢	٣	٤	٥	٦	ملاحظات
جبن تشدر مطبوخ	صفر	*	*	١	١	١	١	(B)
	٢,٥	*	*	*	*	*	*	
	٦,٢٥	*	*	*	*	*	*	
مفرود جبن التشدر	صفر	*	٣	٣	٤	٥	٧	(B)
	٢,٥	*	*	٢	٢	٢	٢	(B)
	٦,٢٥	*	*	*	*	*	*	
جبن إمينتال مطبوخ	صفر	*	*	١	٢	٣	٣	(B)
	٢,٥	*	*	*	*	*	*	
	٦,٢٥	*	*	*	*	*	*	
مفرود جبن إمينتال	صفر	*	٥	٦	٦	٨	٨	(S+B)
	٢,٥	*	*	*	٣	٣	٣	(S+B)
	٦,٢٥	*	*	*	*	*	*	

* = لا توجد عينات فاسدة
B = يرجع الفساد أساساً إلى butyric clostridia
S = يرجع الفساد أساساً إلى *Cl.sporogenes*

يتوقف مستويات إضافة النيسين على عوامل أخرى غير محتوى الملح والفوسفات فى الجبن المطبوخ . يختلف المستوى المضاف من النيسين تحت ظروف الإنتاج من ٥ إلى ١٥ ملليجم نيسين/كجم. يتوقف تقدير مستوى النيسين على مدى عملية الطبخ ، pH الجبن المطبوخ ، درجة الحرارة وطول فترة الصلاحية المطلوبة ، عدد الجراثيم فى الجبن وإضافة وعدم إضافة المواد المكسبة للطعم إلى الجبن المطبوخ.

يختلف مقدار الفقد فى النيسين أثناء عملية الانصهار من ١٥-٢٠ % ويتوقف ذلك على شدة المعاملة الحرارية المستخدمة ، المدة التى تحجز عندها الجبن

المنصهرة قبل التعبئة والتبريد وكذلك pH الجبن المطبوخ . يكون النيسين أكثر ثباتاً عند pH منخفض . ينخفض نشاط النيسين أثناء تخزين منتجات الجبن المطبوخ ، ويزاد هذا المعدل بارتفاع درجة حرارة التخزين . تصل درجة الاحتفاظ بنشاط النيسين لمدة تصل إلى أكثر من ٣٠ أسبوع إلى حوالى ٨٠ % عند ٢٠°م ، ٦٠ % عند ٢٥°م و ٤٠ % عند ٣٠°م . عادة يكون النيسين مثبطاً لجراثيم البكتريا sporostatic أكثر منه مبيداً sporicidal لهذه الجراثيم ، لذلك فإن بقاء النيسين بدرجة كافية ليحدث تأثيراً مثبطاً يكون ضرورياً خلال فترة صلاحية المنتج . وبناء على ذلك ، فإن مستويات أعلى من النيسين (١٢,٥-١٥ ملليجم نيسين/كجم) يوصى بها فى منتجات الجبن المطبوخ التى تخزن عند درجة حرارة مرتفعة لفترات طويلة . الاستخدام الفعال للنيسين يسمح بتخزين منتجات الجبن المطبوخ بدون تبريد (خارج الثلاجات) دون أن يحدث بها فساد.

وقد ركزت بعض الدراسات على إيجاد علاقة بين مستوى النيسين فى منتجات الجبن المطبوخ وكل من نوع وعدد جراثيم Clostridia الموجود . وقد وجد بصفة عامة أن *Cl.sporogenes* أكثر مقاومة للنيسين عن *Cl.botulinum*, *Cl.tyrobutyricum* . الجدول (٤-٥) يوضح العلاقة بين عدد الجراثيم والمعاملة بالنيسين لاطالة فترة الصلاحية إلى ٦ شهور عند ٢٥°م .

جدول (٤-٥) :العلاقة بين عدد الجراثيم وتركيز النيسين لاطالة فترة الصلاحية إلى ٦ شهور عند ٢٥°م.

عدد جراثيم Clostridia/جم	تركيز النيسين (ملليجم/كجم)
١٠	٢,٥
١٠٠	٦,٢٥
١٠٠٠	١٢,٥

(iii) اللبن ومنتجاته

بينما لا يسمح فى المملكة المتحدة وبعض الدول الأخرى المعتدلة المناخ بإضافة النيسين إلى اللبن ، فإنه يسمح بإضافته فى بعض دول الشرق الأوسط ، حيث تكون من الصعوبة توفير لبن مبستر على درجة جيدة من الجودة للمستهلك.

ترجع هذه الصعوبة إلى المناخ الدافئ ، الحاجة إلى نقل اللبن لمسافات طويلة من مناطق الإنتاج إلى مراكز التوزيع أو الاستهلاك وعدم توفر وسائل تبريد ملاءمة . وقد أظهرت بعض الدراسات إلى أن المستويات المنخفضة من النيسين (٠,٥-١,٠ ملليجم/كجم) قد يؤدى إلى إطالة فترة الصلاحية إلى أكثر من ٦ أيام عند ١٥°م أو يومين عند ٢٠°م . وفى دراسة أخرى حيث تم تلويث اللبن المبستر ، وجد أن النيسين غير قادر على إطالة فترة الصلاحية .

اللبن المعقم تجاريا قد يحتوى على جراثيم محبة ومقاومة للحرارة thermophilic heat-resistant spores التى يمكن التغلب عليها بواسطة النيسين. عند معاملة اللبن الكامل بالحرارة عند ١٢١°م لمدة ١١-١٣ دقيقة مع إضافة نيسين أو بدون إضافة نيسين ، وجد أن معدل فساد العينات غير المحتوية على نيسين عند تحضينها عند ٥٥°م لمدة ١٠ أيام يتراوح من ٣٠ إلى ١٠٠ % ، بينما لم يحدث أى فساد عند إضافة النيسين بمعدل ٠,٧٥-١,٢٥ ملليجم/اللتر . وقد وجد أن إضافة النيسين يزيد من فترة صلاحية اللبن المعقم إلى ٦٠ يوما مقارنة لفترة صلاحية ٣-٧ أيام بدون إضافة نيسين . كما أشارت الدراسات إلى كفاءة النيسين أيضا فى إطالة فترة صلاحية لبن الشيكولاتة المعقم واللبن المبخر.

وقد استخدم النيسين فى إنتاج مشروب لبن الشيكولاتة المعقم واللبن الجاموسى المعقم ، حيث أدت إضافة النيسين بمعدل ١٠ وحدة/مل إلى خفض زمن المعاملة الحرارية المطلوب عند ١٢١°م (٢٥٠°ف) بنسبة ٨٠ % فى اللبن الجاموسى الكامل و ٨٥ % فى مشروب لبن الشيكولاتة.

مستويات النيسين ٠,٦٢٥-٢,٥ ملليجم/اللتر تكون فعالة فى إطالة فترة صلاحية القشدة المبسترة مع ضرورة تجنب تلوث ما بعد البسترة . كما أظهرت الأبحاث كفاءة النيسين فى إطالة فترة صلاحية حلوى الألبان dairy desserts ، حيث أمكن استخدام النيسين فى بعض هذه المنتجات التى يتم بسترتها أثناء الإنتاج ، والتى لا يمكن تعقيمها تماما نتيجة الأضرار التى تحدث نتيجة المعاملة الحرارية . وقد وجد أن النيسين عند تركيز ١,٢٥ إلى ٣,٧٥ ملليجم/كجم يؤدى إلى إطالة فترة صلاحية بودنج الكريم كرامل من أقل من ٦ أيام إلى أكثر من ٣٥ يوما عند ١٢°م ، وإطالة فترة صلاحية حلويات ألبان الشيكولاتة chocolate

dairy deserts من ٧ أيام إلى ٢١ و ٣١ يوما ، على التوالى ، عند التخزين عند ٧°م.

بالرغم من أن النيسين يبطئ من نشاط بكتريا بادئ اليوجهورت ، إلا أن هناك اهتمام باستخدام النيسين فى اطالة فترة صلاحية اليوجهورت نتيجة بطء تقدم الحموضة. وقد أوصى باستخدام النيسين بمعدل ٠,٦٢٥-١,٢٥ ملليجم/اللتر لإنتاج يوجهورت بعد ٥,٥ ساعة بصفات جودة حسية وتركيبية texture جيدة مع إطالة فترة الصلاحية إلى ١٩ يوما عند ١٠°م أو ٣٣ يوما عند ٦°م.

كما استخدم النيسين فى صناعة الجبن الدمياطى ، حيث تم إضافة تركيزات مختلفة من النيسين إلى لبن الجبن فى وجود أو عدم وجود معاملات أخرى مختلفة مثل المعاملات الحرارية والتمليح . وقد وجد أن إضافة النيسين بتركيز ١٠٠ وحدة/مل لبن قد منعت حدوث إنتفاخ صفائح الجبن أثناء التخزين فى جميع المعاملات المستخدمة ، مع انخفاض الحمولة الميكروبية للجبن.

هـ- صفات النيسين المضاد لليستريا (*Listeria*)

زيادة الاهتمام بالأمراض التى تسببها الليستريا *Listeria* عن طريق الغذاء أدت إلى تقويم النيسين كمادة مثبطة bacteriostatic أو قاتلة bactericidal ضد *List.monocytogenes* . وقد وجد أن تأثير النيسين على نمو وقيم الحد الأدنى للتركيز المثبط minimum inhibitory concentration (MIC) لل *List.monocytogenes* بلغ الحد الأقصى له عند pH منخفض . استخدام النيسين بتركيز ٢,٥ ملليجم/اللتر أدى إلى خفض أعداد *List.monocytogenes* فى منظم buffer من حوالى 10^{6}/مل إلى حوالى 10^{3}/مل فى ٢-٣ ساعة ، ولكن لم يحدث قتل إضافى للميكروب بعد ٢٤ ساعة . وقد تم تقدير MIC لعدد (٩) من سلالات *Listeria* تغطى نطاق واسع ، حيث وجد أن مقاومة *List.monocytogenes* ATCC7644 فى المرق يتوقف على pH . عند pH ٥ وأعلى ، فإنه يحدث بعض النمو فى خلال ٢٤ ساعة ، الذى أعقبه بعد ذلك تثبيط . عند pH ٤,٥ وأقل حدث تثبيط فى خلال ٢٤ ساعة . فى جبن Cottage لم تقاوم *List.monocytogenes* بعد ٢٤ ساعة عند ٣٧°م أو عند ٤°م عندما أضيف الميكروب بأعداد كبيرة تصل إلى ٣,٥ × 10^{5} خلية/جم ، وقد كان تركيز

النيسين المستخدم مرتفعا (٦٣,٧٥ملليجم/كجم) . وقد وجد أن النيسين عند تركيز ١٠ ملليجم/مل قد أدى إلى خفض أعداد *List.monocytogenes* من $١٠^{٩}$ cfu/مل إلى $١٠^{٢}-١٠^{٣}$ cfu/مل . وقد حدث تحسين لحساسية الميكروب فى وجود ٢ % NaCl وبخفض pH . وقد لوحظ وجود طفرات مقاومة للنيسين عند تركيز ٥٠ ملليجم/مل عند أعداد من $١٠^{٦}-١٠^{٨}$.

عند مقارنة الحساسية للنيسين لـ ٢٧ سلالة سيرولوجية من *List.monocytogenes* وسلالات من *List.innocua, List.ivanovi* بواسطة تقدير قيم MICعند pH ٦,٨ و٥,٥ ، وجد أنه عند pH ٥,٥ و ٢٠°م كانت قيم MIC لمعظم السلالات تتراوح بين ٢,٥-١٠,٠ ملليجم/مل . سلالة ممثلة للسلالات المقاومة من *List.monocytogenes* تم قتلها سريعا فى بيئة المزرعة عند pH ٥ محتوية على ١٢,٥ ملليجم نيسين/مل وحضنت عند ٢٠°م ، بينما تكاثر الميكروب تحت هذه الظروف فى عدم وجود النيسين. فى جبن Cottage عند pH ٤,٦ و ٥,٠ كان تأثير النيسين القاتل على *Listeria* أقل منه فى بيئة المزرعة . عند حقن *List.monocytogenes* فى جبن معبأ تحت ظروف تبريد cold pack cheese محتوية على نيسين بتركيزات تصل إلى ٢٠ ملليجم/كجم ، حدث موت الميكروب عند تخزين الجبن عند ٢١°م و ٣٠°م ولكن لم يحدث موت للميكروب عند تخزين الجبن عند ٧°م . وقد وجد أن وجود دهن اللبن يؤثر سلبيا على صفات النيسين المضادة لـ *List.monocytogenes* ، حيث كانت تركيزات النيسين ١,٢٥ ملليجم/اللتر فعالة جدا فى خفض ٤-٦ دورة لوغاريتيمة فى اللبن الفرز بينما فى قشدة خفيفة half-and-half كان التأثير أقل من دورة لوغاريتيمة واحدة . وقد أشارت كثير من الدراسات أن التركيب الكيماوى للأغذية يعتبر عاملا هاما فى هذا المجال حيث أن بعض مكونات الغذاء قد تكون لها القدرة على الارتباط بالنيسين.

٦-١-٢- لاكتيسين ٤٨١ Lacticin 481

وجد أن *Lc.lactis* ssp. *lactis* CNRZ 481 ينتج بكتريوسين ، Lacticin 481 الذى يتميز بتأثير مثبط ضد سلالات من *Lactococcus* ، *Lactobacillus* ،

Cl.tyrobutyricum, Leuconostoc . تثبط السلالة المنتجة نمو سلالات Lactococci الحساسة فى بادئ الجبن . ينتج Lacticin 481 عند pH مثلى تبلغ ٥,٥ ، يبلغ وزنه الجزيئى ١٧٠٠ Da . جزيئات lacticin 481 غنية بالأحماض الأمينية غير القطبية non-polor وتحتوى على حامض أمينى غير طبيعى lanthionine . وقد أقترح أن Lacticin 481 يمكن استخدامه بنجاح فى الأغذية لمنع الفساد بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك ,Clostridia.

٦-١-٣- لاكتوكوكسين Lactococcin

أشار بعض الباحثين أن *Lc.lactis* ssp. *lactis* ADRIA 85L030 وثلاث سلالات أخرى قد أنتجت لاكتوكوكسين Lactococcin ، وهو بكتريوسين حساس للبرونيز pronase والتربسين trypsin وله تأثير قاتل على *Cl.tyrobutyricum* ، *Lb.helveticus* ، *Str.thermophilus* ، ولكن لا يؤثر على كثير من بادئات الألبان . يتراوح الوزن الجزيئى للاكتوكوكسين من ٢٣٠٠-٢٤٠٠ Da.

٦-١-٤- دريسين Dricin

الدريسين عبارة عن بكتريوسين ينتجه *Lc.lactis* ssp. *lactis* DRCI ، وحساس لإنزيمات البرونيز pronase والكيموتربسين chemotrypsin والتربسين trypsin ومجال نشاطه محدود حيث يؤثر على عدد قليل من البكتريا بنشاطه بعد المعاملة الحرارية إلى ١٠٠°م وعند pH ٤,٦ وليس عند pH ٧,٥ . ونظرا لأن مجال نشاطه محدودا فإن إمكانية استخدامه كمادة حافظة حيوية فى الأغذية ليس على درجة كبيرة من الأهمية.

٦-٢- *Lactococcus lactis* biovar *diacetylactis*

بالرغم من أن بعض سلالات من *Lc.lactis* biovar *diacetylactis* تنتج بكتريوسينات ، فقد أشارت بعض الدراسات إلى أن سلالات WM4 ، S50 تنتج مركبات حساسة لبعض الإنزيمات المحللة للبروتينات . ومع ذلك ، فإن كل من

هذين البكتريوسينين يتميز بضيق مجال تأثيرهما حيث يتأثر عدد قليل من سلالات Lactococci ، لذلك فإن استخدامهما كمواد حافظة حيوية فى الأغذية محدود جدا.

٦-٣- *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*

٦-٣-١- دبلوكوكسين Diplococcin

نتج سلالة *Lc.lactis* ssp. *cremoris* 346 دبلوكوكسين Diplococcin ، وهو بكتريوسين يثبط فقط السلالات المرتبطة أو المشابه لهذه البكتريا . الدبلوكوكسين النقى غير مقاوم للحرارة والإنزيمات المحللة للبروتينات ، ويبلغ وزنه الجزيئى ٥,٣ kDa ، وهو غنى بالأحماض الأمينية الحامضية والمتعادلة ، كما يحتوى كل جزئ من الدبلوكوكسين على ornithine .

٦-٣-٢- لاكتوكوكسين إيه Lactococcin A

وجد أن سلالة *Lc.lactis* ssp. *cremoris* 9B4 نتج نوعين من اللاكتوكوكسين ، أحدهما ضعيف الفاعلية والآخر شديد الفاعلية ولكن ضد سلالات الأنواع وتحت الأنواع المرتبطة أو المشابه لهذه البكتريا . ويعرف البكتريوسين شديد الفاعلية ويرجع تأثير هذا البكتريوسين ضد السلالات الحساسة إلى زيادة نفاذية غشاء السيتوبلازم وتبديد قدرة الغشاء.

وقد أشار بعض الباحثين إلى أن اللاكتوكوكسين A الذى تنتجه *Lc.lactis* ssp. *cremoris* LMG 2130 يتميز بتأثير مثبط قوي ضد سلالات من نفس الجنس فقط . ومع ذلك ، فإنه يثبط السلالات المنتجة للنيسين والدبلوكوكسين Diplococcin . يحتوى جزئ هذا البكتريوسين فى الصورة غير النشطة على ٧٥ حامض أمينى الذى يتحول إلى جزئ نشط يحتوى على ٥٤ حامض أمينى حيث يفقد شق يحتوى على ٢١ حامض أمينى من الطرف الأمينى ، يؤدى الترسيب بكبريتات الأمونيوم إلى الحصول على ٤٠ % فقط من النشاط الأصلى . ويبلغ الوزن الجزيئى لهذا البكتريوسين حوالى ٥٧٧٨ Da . والجزئ غنى فى الآلانين والجليسين ويحتوى فقط على ٣ أحماض أمينية محملة بالشحنات charged ولا

يحتوى على أحماض أمينية غير طبيعية . يتلف نشاط هذا البكتريوسين بواسطة الإنزيمات المحللة للبروتين مثل التربسين.

وقد أظهر بعض الباحثين أن نوعى اللاكتوكوكسين متماثلين بدرجة كبيرة ، وتدل المعلومات المتوفرة على أن كل من هذين البكتريوسينين ليس لهما أهمية كمواد حافظة حيوية فى الغذاء.

٦-٣-٣- لاكتوستربسين ٥ Lactostrepcin 5 (Las 5)

تنتج سلالة *Lc.lactis* ssp. *cremoris* 202 بكتريوسين Las 5 الذى يكون نشطا ضد الأنواع المشابة . وقد لوحظ أن النشاط القاتل لهذا البكتريوسين يكون أكثر وضوحا عند pH الحامضى (٥,٠ pH) وخلال فترة النمو اللوغاريتمى للسلالات الحساسة . يدمص جزيئات Las 5 على مستقبلات نوعية (متخصصة) على سطح جدار الخلايا الحساسة ، وهذه الجزيئات ذات طبيعة بروتينية . ويحدث التأثير القاتل الرئيسى للـ Las 5 نتيجة حدوث خلل فى وظائف الغشاء ، حيث يحدث فقد أيونات البوتاسيوم K^+ من داخل الخلية و (adenosine triphosphate) ATP وتحليل ATP وإضعاف فرق الجهد على جانبى الغشاء .كما قد يدخل Las 5 فى تثبيط تخليق الجزيئات الكبيرة macromolecules الخلوية الأخرى (مثل البروتينات والأحماض النووية) فى الخلايا الحساسة.

٦-٣-٤- بكتريوسينات أخرى

تم التعرف على سلالات أخرى من Lactococci تنتج لاكتوستربسينات Lactostrepcins أخرى التى تكون نشطة فقط فى نطاق من pH يتراوح بين ٤,٢ - ٥,٠ ضد سلالات مماثلة . هذه البكتريوسينات ذات أهمية محدودة كمواد حافظة حيوية فى الأغذية . وقد ذكر بعض الباحثين أن بعض سلالات من *Lactococcus* تنتج بكتريوسينات تكون مختلفة عن النيسين ولها قدرة على تثبيط سلالات كثيرة من *Lactococcus* وسلالات من جنس *Clostridium* ، *Pediococcus*, *Leuconostoc* .

٧- بكتريوسينات Leuconostocs

٧-١- *Leuconostoc mesenteroides*

تمكن بعض الباحثين من عزل بكتريوسين أطلق عليه ميسنتروسين ٥ Mesenterocin 5 من مزرعة بادئ جبن *Leuc.mesenteroides*. هذا البكتريوسين حساس لإنزيم برونيز pronase والكلوروفورم chloroform ، ولكن مقاوم نسبيا للمعاملات الحرارية المرتفعة . تنتج الخلايا ، عندما تنمو فى مرق MRS عند ٣٠°م ، بكتريوسين أثناء مرحلة النمو اللوغاريتمى ، يفقد البكتريوسين نشاطه سريعا أثناء مرحلة الثبات stationary phase . يثبط البكتريوسين جميع سلالات *List.monocytogenes* وسلالات أخرى من *Listeria* spp. التى تم أختبارها ، ولكن الحد الأدنى من التركيز المثبط MIC بصفة عامة لمعظم السلالات يكون مرتفعا جدا . هذا البكتريوسين لا يكون فعالا ضد سلالات من بكتريا حامض اللاكتيك المختلفة التى تشمل *Staph.aureus*, *Leuc.mesenteroides*، *Enterococcus* ، *Micrococcus*, *Broc.thermosphacta*. يبلغ الوزن الجزيئى لهذا البكتريوسين حوالى ٤,٥ kDa .

نظرا لأن السلالة تستخدم كبادئ جبن فإن Mesenterocin 5 لا يثبط نمو مزارع البادئات الأخرى ، وقد تستخدم الخلايا أو البكتريوسين فى عملية التخمر لتثبيط نمو *List.monocytogenes* ، ويجب ملاحظة أن الحد الأدنى من الجرعة المثبطة لميكروب *List.monocytogenes* مرتفعة.

٧-٢- *Leuconostoc paramesenteroides*

تنتج سلالة *Leuc.paramesenteroides* OX ، التى تم عزلها من لحم الغنم، بكتريوسين ليكونوسين إس Leuconosin S ، الذى يتلف بواسطة عدة إنزيمات محللة للبروتين وكذلك بواسطة إنزيم α-amylase . البكتريوسين يكون حساسا جزئيا للحرارة المرتفعة (١٠٠°م) ولكن يكون ثابتا عند ٦٠°م لمدة ٣٠ دقيقة . ويتميز Leuconosin S بمجال واسع من النشاط المضاد للبكتريا antibacterial ، حيث يكون نشط ضد سلالات موجبة لجرام من *List.monocytogenes* ، *Staph.aureus*, *Cl.botulinum* وكذلك البكتريا السالبة لجرام *Yersina*

enterocolitica . يرجع التأثير المثبط لهذا البكتريوسين إلى إتلاف القوة الدافعة للبروتون proton motive force . وقد لوحظ النشاط المضاد للبكتريا لهذا البكتريوسين عند نطاق واسع من pH (٧.٦-٥,٧) ويكون مثاليا optimum عند pH ٦,١٥ . تنتج السلالة أعلى تركيز من Leuconosin 5 عند نموها فى مرق مناسب عند ٣٠°م وفى نطاق من pH يتراوح بين ٦,٠ إلى ٧,٥ ويعتبر pH ٦,٥ أكثر ملاءمة لهذا الإنتاج. قد يكون Leuconosin 5 مفيدا كمواد حافظة حيوية ، ولكن فاعليته فى الأنظمة الأغذية يحتاج إلى تقويم .

٧-٣- *Leuconostoc gelidum*

تمكن بعض الباحثين من عزل كثير من *Leuconostoc, Cornobacterium* spp. من لحوم معبأة تحت تفريغ ومبردة ، تنتج بكتريوسينات التى تختلف فى نشاطها المضاد antibacterial ضد بعض البكتريا المسببة للفساد والمرضية . تنتج سلالة *Leuc.gelidum* UAL 187 بكتريوسين من نوع ليكوسين إيه Leucocin A-UAL187 الذى يتلف بواسطة إنزيمات بروتييز protease والتربسين trypsin ، ولكن لا يتلف بالتسخين عند ٦٢°م لمدة ٣٠ دقيقة . ينتج هذا البكتريوسين خلال المرحلة المبكرة من النمو عند درجة حرارة تتراوح بين ١°م و ٢٥°م . يتميز هذا البكتريوسين بأنه يثبط عددا كبيرا من بكتريا حامض اللاكتيك المشابه وكذلك *List.monocytogenes* . وتدل نتائج تحليل Leucocin A-UAL 187 بواسطة mass spectrometry على أن الجزئى النشط يتكون من ٣٧ حامض أمينى وأن وزنه الجزيئى يبلغ ٣٩٣٠ Da . وقد وجد أن الجزئى غير النشط لهذا البكتريوسين عند تكوينه يحتوى على ٦١ حامض أمينى والذى يتحول إلى جزئى نشط بعد فقد شق يحتوى على ٢٤ حامض أمينى من الطرف الأمينى للجزئى تاركة جزئى يحتوى على ٣٧ حامض أمينى والذى يفرز فى بيئة النمو .

التأثير المثبط لليكوسين Leucocin A –AUL 187 ضد البكتريا المتحملة البرودة psychrotrophic المسببة للفساد وكذلك *List.monocytogenes* قد يكون مفيدا وخاصة لأن تركيبه الكيماوى وصفاته الوراثية معروفة . ومع ذلك فإن فاعليته فى الأنظمة الغذائية تحتاج إلى تقويم.

كما وجد أن البكتريوسين التى تنتجه سلالة *Leuc.gelidum* INI 39 يكون حساسا لإنزيم البروتييز protease ولكن مقاوم للمعاملات الحرارية المرتفعة (١٠٠°م) . كما أنه يقضى على كثير من البكتريا الموجبة لجرام المسببة للفساد فى الأغذية والتى تشمل Lactobacilli, *Enterococcus, Carnobacterium* Leuconostocs, المتحملة البرودة,*List.monocytogenes* ولكن لا يؤثر على *Staph.aureus* . خلايا السلالات الموجبة لجرام المقاومة والحساسة تدمص البكتريوسين بالرغم من أن السلالات الحساسة تدمص البكتريوسين بدرجة أكبر .

٧-٤- *Leuconostoc carnosum*

تم عزل عدة سلالات من البكتريا المتحملة البرودة psychrotrophic المسببة للفساد من اللحوم المصنعة المعبأة تحت تفريغ والتى تم الحصول عليها من مصادر تجارية ، تنتج بكتريوسينات لها نطاق مختلف من العوائل host . وقد وجد أن *Leuc.carnosum* Lm1 ينتج بكتريوسين مقاوم للحرارة ، Leuconcin Lcm1 ، الذى يكون فعالا ضد سلالات من *List.monocytogenes* . يدمص هذا البكتريوسوين على سطح خلايا سلالات البكتريا الموجبة لجرام الحساسة والمقاومة ويبلغ وزنه الجزيئى ٢,٣-٢,٤ kDa . ويتم حاليا دراسة فاعلية Leuconocin Lcm1 فى الأنظمة الغذائية .

٨-بكتريوسينات Pediococci

من بين ٨ أنواع التى تتبع جنس *Pediococcus* ، وجد أن *Pediococcus P.acidilactici, pentosaceus* فقط تستخدم فى تخمرات الأغذية ، أساسا كبادئات فى اللحوم والخضراوات . وقد وجد أن بعض السلالات من هذين النوعين من البكتريا تنتج بكتريوسين ، حيث لوحظ أن سلالتين من *P.pentosaceus* تنتج بديوسين إيه Pediocin A و *P.acidilactici* H,E,F,M تنتج بديوسين AcH وسلالة *P.acidilactici* PAC I.0. تنتج بديوسين PA-1 . بالإضافة إلى ذلك ، تم التعرف على عدة سلالات أخرى من كل من هذين النوعين تنتج بكتريوسينات ، ولكن لم يتم تقدير صفاتها بدرجة كافية .

٨-١- *Pediococcus pentosaceus*

٨-١-١- بديوسين إيه Pediocin A

تمكن بعض الباحثين من عزل سلالتين من(L-7230 و FBB-61) *P.pentosaceus* من محلول ملحى brine تخليل الخيار لهما قدرة على تثبيط نمو بكتريا حامض اللاكتيك ، *Staph.aureus* ، *Ent.faecalis, B.cereus* ، ولا تؤثر على أى من البكتريا السالبة لجرام والخمائر التى تم اختبارها . كما لوحظ أيضا أن السلالات الحساسة بدأت النمو بعد التثبيط الأولى . وقد وجد أن المادة المثبطة عبارة مادة بروتينية مقاومة للحرارة تم إنتاجها تحت الظروف المثلى فى بيئة آجار . وعموما فإن مستوى إنتاج هذه المادة منخفضا جدا بدرجة لا تسمح بتنقيته . وقد تم تعريف البكتريوسين الناتج من هذه السلالات بالبديوسين إيه Pediocin A . يؤثر هذا البكتريوسين على عدد كبير نسبيا من البكتريا الموجبة لجرام التى تشمل سلالات من *Cl.botulinum* ، *Cl.perfringens* ، *Cl.sporogenes* ، *Lb.brevis*، *Lb.plantarum* ، *P.acidilactici* ، *P.pentosaceus* ، *Lc.lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 (المنتجة للنيسين) *Staph.aureus,*. كما وجد أن Pediocin A يثبط من نمو *List.monocytogenes* وأن Pediocin A من سلالات FBB-61 (ATCC43200) يثبط من نمو سلالات *Lb.brevis* ، *Lb.saké* ، *Lb.plantarum*. وقد وجد أن بديوسين A له تأثير مثبط ضد جراثيم *Cl.botulinum* من نوع B,A (المحللة وغير المحللة للبروتين) وقد أظهرت دراسة أخرى أن البديوسين A من سلالات FBB-61 يثبط سلالات من *B.cereus* ، *Cl.perfringens* ، *List.monocytogenes* وأنواع أخرى من *Staph.aureus,* *Listeria* ، ولكن لا تثبط عدة أنواع أخرى من البكتريا السالبة لجرام.

بالرغم من أن الدراسات قد أقترحت أن البديوسين A مثبط لكثير من البكتريا الموجبة لجرم المسببة للفساد والمرضية ، فإن الأمر يستلزم دراسة التأثير المضاد للبكتريا antibacterial للبديوسين A النقى . وقد أكدت بعض الدراسات الحديثة أن السلالة FBB-61 تنتج بديوسين A بتركيزات منخفضة نسبيا بدرجة تجعل من الصعب تنقيته .كما ذكر أن دراسات التحسين الوراثى لهذه السلالة لإنتاج البديوسين مشجعة.

٨-٢- *Pediococcus acidilactici*

٨-٢-١- بديوسين Pediocin AcH

بالإضافة إلى النيسين فإن بديوسين AcH من بكتريوسينات بكتريا حلمض اللاكتيك التى تم دراستها باستفاضة خاصة من الأنواع التى تؤثر على عدد كبير نسبيا من البكتريا.

عزل بعض الباحثين سلالة من *P.acidilactici* H من السجق المتخمر ، كما تم عزل ثلاث سلالات أخرى منتجة للبكتريوسين (M, F,E) من مصادر مختلفة . عند عزل سلالة بكتريا حامض اللاكتيك المنتجة للبكتريوسين يتم تنمية السلالة المنتجة للبكتريوسين بطريقة صب الأطباق وتحضين الأطباق لتكوين المستعمرات ثم يصب طبقة من الآجار الطرى soft gar المحتوى على السلالة الدليل (الكاشفة) an indicator strain . بعد التحضين طول الليل تختبر الأطباق للكشف من وجود مناطق خالية من النمو zone of growth inhibition حول المستعمرات. وعادة تستخدم بكتريا حامض اللاكتيك من عدة اجناس كسلالات كاشفة .

عند قياس قوة بديوسين AcH فى مزرعة سائلة ، يتم تسخين مزرعة من *P.acidilactici* H نامية فى مرق TGE إلى ٧٠-٧٥°م لمدة ١٥ دقيقة لقتل الخلايا، ثم يعدل pH المرق إلى ٥,٠ بواسطة محلول معقم من NaOH . يستخدم ١ مل من هذا المرق ويعمل منه تخفيفات متتالية من ١ : ١٠ إلى ١ : ٢٠٠ باستخدام ماء deionized معقم . يغطى طبق سبق صبه بآجار TGE بطبقة من آجار طرى تحتوى على حوالى ١٠° خلية من *Lb.plantarum* NCDO 955 كسلالة كاشفة ثم يبرد الطبق فى الثلاجة لمدة لا تقل عن ٣٠ دقيقة . يتم نقل ٥ ملليميكرون من تخفيفات المرق السابق تحضيره إلى الطبق ، بعد تحضين الأطباق طول الليل ، تفحص الأطباق للكشف عن وجود منطقة خالية من النمو حول المستعمرات.يضرب أعلى تركيز أدى إلى حدوث منطقة خالية من النمو فى ٢٠٠ (١مل/٥ميكرولتر µl) لتقدير وحدة النشاط activity unit (AU) لكل مل من المرق . باستخدام نفس الطريقة للنيسين وجد أن الوحدة العالمية IU تعادل حوالى ١٠٠ وحدة نشاط (AU) .

أ- الصفات الطبيعية والكيماوية

تستخدم عدة طرق لتنقية بديوسين AcH . يتم التنقية الجزئية بمعاملة الرائق الخال من الخلايا سواء بالترسيب بواسطة NH_4-sulfate أو بواسطة الترسيب بالايثانول يعقبه ترشيح الجل gel filtration .

يحتفظ البديوسين AcH بنشاط مضاد للبكتريا بعد المعاملة الحرارية المرتفعة، عند نطاق واسع من pH وعند درجات حرارة التبريد والتجميد . المعاملة بالإنزيمات المحللة للبروتين مثل التربسين والكيموتربسين تؤدى إلى إتلاف نشاط البديوسين ، ولكن لا يحدث هذا التلف بواسطة إنزيمات أخرى غير محللة للبروتين والمذيبات العضوية . كما وجد أن الكلوريد chloride والفوسفات PO_4^{3-} تعمل كمثبطات منافسة competative inhibitors لنشاط البديوسين AcH المضاد للبكتريا .

يبلغ الوزن الجزيئى للبديوسين AcH حوالى Da٢٧٠٠ ، كما أن البديوسين AcH النقى يحتوى على ٤٤ حامض أمينى ووزن جزيئى حسابى Da ٤٦٢٨ و pI ٩,٦ . المحصلة النهائية للشحنات على الجزيئات موجبة ويحتوى على ٢٥ % أحماض أمينية غير قطبية ، ٥٦,٨ % أحماض أمينية قطبية ، ٢,٤ % أحماض أمينية حامضية و ١٥,٩% أحماض أمينية قاعدية.

ب- مجال النشاط

وجد أن البديوسين AcH مثبط لسلالات البكتريا الموجبة لجرام من أجناس *Pediococcus* ، *Leuconostoc* ، *Lactococcus* ، *Lactobacillus* ، *Enterococcus* ، *Micrococcus* ، *Bacillus* ، *Brochothrix* ، *Staphylococcus* ، *Listeria, Clostridium* تشمل *Cl.botulinum* من نوع E وليس من أنواع B,A . كما أنه يثبط نمو جراثيم بعض سلالات من *Clostridium, Bacillus* . وقد أظهرت بعض الأبحاث حساسية سلالات من *List.monocytogenes* للبديوسين AcH .

وقد أشارت بعض الدراسات إلى أن البديوسين AcH يثبط *Aeromonas hydrophila, Pseudomonas putida* . كما أظهرت أبحاث حديثة أن البديوسين AcH يقضى على *Escherichia, Pseudomonas* (تشمل السلالات

المرضية) والسالمونيلا *Aeromonas, Yersinia ، Salmonella* فقط عندما يحدث ضرر تحت القتل sublethally injured لخلايا البكتريا السالبة لجرام بواسطة التجميد ، التسخين والمعاملة بحامض ضعيف.

جـ- أسلوب التأثير

يقضى البديوسين AcH على الخلايا الحساسة للبكتريا الموجبة لجرام . يحدث القتل نتيجة خلل فى وظائف غشاء السيتوبلازم . قد يحدث لبعض السلالات تحلل lysis ، ومع ذلك فإن التحلل قد لا يرجع إلى التأثير المباشر للبديوسين AcH . ومن المحتمل أن تكون هذه السلالات الحساسة تحمل إنزيمات محللة ذاتية autolytic enzymes التى تنشط عندما تقتل الخلايا (بواسطة البديوسين AcH أو وسائل أخرى) . ومع ذلك ، قبل أن تلتصق جزيئات بديوسين AcH بالغشاء السيتوبلازمى للخلايا الحساسة فإن هذه الجزيئات تدمص عند مستقبلات نوعية specific على سطح الخلية. بالرغم من أن الخلايا الموجبة لجرام المقاومة والحساسة تستطيع أن تدمص البديوسين AcH ، فإن الجزيئات تمر خلال جدار خلايا السلالات الحساسة فقط ، تلتصق بالغشاء وتسبب عدم استقراره destablize والقضاء على الخلايا . فى الخلايا المقاومة فإن البديوسين AcH لا يستطيع المرور من خلال جدار الخلايا.

البكتريا السالبة لجرام لا تحتوى على مستقبلات للبديوسين AcH . فى الخلايا التى حدث لها ضرر نتيجة المعاملات تحت القاتلة ، فإن جزيئات البديوسين AcH تستطيع المرور من خلال الجدار نتيجة إضعاف الغشاء الخارجى ، وتلتصق بالغشاء السيتوبلازمى مما يؤدى إلى حدوث خلل فى وظائف الغشاء وقتل الخلايا.

د- الإنتاج

تستطيع *P.acidilactici* H أن تنمو بدرجة سريعة نسبيا وإنتاج كميات كبيرة من بديوسين AcH عند ٣٧°م فى مرق بسيط مثل مرق TGE المحتوى على trypticase أو تربتوز tryptose ، جلوكوز ومستخلص خميرة (بمعدل ١ % من كل منهما) ، Tween 80 ٠.٢% ، ٠,٠٠٨ % من كل من المغنسيوم Mg^{2+} والمنجنيز Mn^{+2} ، pH ٦,٥ . يعتبر pH البيئة على درجة كبيرة من الأهمية فى

إنتاج البديوسين AcH . عند pH ٥,٠ أو أعلى يكون إنتاج البديوسين AcH منخفضا جدا فى المزارع السائلة ، وعند pH ٤,٠ أو أقل يتوقف تكاثر الخلايا وإنتاج الحامض ويفرز كميات كبيرة نسبيا من البديوسين AcH فى البيئة.

هـ- فاعلية البديوسين AcH فى الأغذية

تم اختبار البديوسين AcH فى أنظمة غذائية معقمة وغير معقمة ضد البكتريا الموجبة لجرام المتحملة البرودة psychrotrophic والمسببة للفساد والمرضية . وقد قام بعض الباحثين بدراسة بقاء ونمو أربع سلالات من *List.monocytogenes* (تشمل السلالات التى تم عزلها من حالات مرضية نتيجة تناول الغذاء) وسلالة من *Leuc.mesenteroides* معزولة من لحوم باردة فاسدة، فى خمس أغذية مختلفة (لبن، مثلجات قشدية ice – cream ، جبن Cottage ، لحم مفروم وخلطة سجق) فى وجود وغياب البديوسين AcH . تم تعقيم الأغذية قبل تلقيحها بالبكتريا والمعاملة بالبديوسين AcH للحد من المشاكل التى قد تحدث من البكتريا الموجودة فى الأغذية غير المعقمة . حدث فى جميع الأنظمة الغذائية انخفاضا سريعا فى أعداد البكتريا الحية ، ولكن حدث أقصى انخفاض فى جبن Cottage . لوحظ أن معظم الفقد فى الحيوية قد حدث عند تركيز من البديوسين AcH يبلغ ١٣٥٠ وحدة نشاط AU/مل . تنمو البكتريا المتبقية فى جميع الأغذية أثناء التخزين عند ٤°م ، لكن عند نهاية ٤ أسابيع فإن أعداد البكتريا فى الأغذية غير المعاملة (control) تكون أعلى بحوالى ٣ دورات لوغاريتمية عن العينات المعاملة بالبديوسين AcH .

وقد تم دراسة فاعلية البديوسين AcH فى التغلب على نمو البكتريا المتحملة البرودة المسببة للفساد والمرضية الملقحة فى اللحم البقرى الطازج ، المنتجات الثانوية للحوم البقرية ومنتجات لحم الخنزير المصنعة بمعاملات حرارية منخفضة . نمو *Leuconostoc* ، *List.monocytogenes, Lactobacillus* الملقحة فى اللحوم البقرية المبردة والمنتجات الثانوية للحوم البقرية كان أبطأ خلال التخزين لمدة تصل إلى ٤ أسابيع عند ٤°م فى العينات المعاملة بالبديوسين AcH مقارنة بالعنيات غير المعاملة (المقارنة).يعتبر الكبد من المنتجات الثانوية البقرية التى حدث بها أقل تثبيطا نتيجة لإتلاف البديوسين AcH بواسطة إنزيمات البروتييز proteases ، بينما كان درجة التثبيط بالبديوسين AcH أعلى كثيرا فى القلب ، الكلى ومنتجات

أخرى . فى اللحوم المصنعة مثل hot dog واللانشون كان هناك تباين فى نمو البكتريا الملقحة والمتبقية من أنواع *Leuconostoc* ، *Lactobacillus* ، *List.monocytogenes* نتيجة للتأثير المثبط للبديوسين AcH ، فى بعض المنتجات كانت درجة التثبيط أعلى عن غيرها من المنتجات ، وقد يرجع ذلك إلى الاختلاف فى تركيب المنتجات . وقد لاحظ بعض الباحثين أن كل من البديوسين AcH وخلايا السلالة المنتجة *P.acidilactici* H قد أدت إلى قتل *List.monocytogenes*، لكن البكتريا المتبقية تنمو خلال فترة التخزين . يحتمل أن تكون البكتريا المتبقية عبارة عن أنواع مقاومة فى الحمولة البكتيرية ، ولا تتأثر بالبديوسين AcH حيث أن هذا البكريوسين ليس مادة مثبطة للبكتريا bacteriostatic agent.

توجد معلومات كثيرة متوفرة التى تعتبر ضرورية لاستخدام البديوسين AcH فى الأغذية المختلفة ، مما يساعد على استخدامه فى مجال حفظ الأغذية . وحاليا تجرى دراسات مستفيضة على فاعلية البديوسين AcH كمادة حافظة حيوية فى كثير من الأغذية .

٨-٢-٢- بديوسين PA-1

أ- السلالة المنتجة والنشاط المضاد للبكتريا

تنتج سلالة *P.acidilactici* PAC1.0 بديوسين PA-1 حيث تم دراسة صفاته المختلفة . تعتبر سلالة NRRLB-5627 السلالة الأصلية . يفرز البديوسين PA-1 فى المرق بواسطة الخلايا المنتجة . المستحضر الخام المتحصل عليه عقب عملية الترسيب بواسطة كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2 SO_4$ والديلزة dialysis يحتفظ بالنشاط المضاد للبكتريا بعد المعاملة الحرارية عند ١٠٠°م (يفقد أكثر من ٩٠ % من النشاط بعد المعاملة الحرارية عند ١٢١°م) ، والليبيز lipase ،الفوسفوليبيز phospholipase C ،الليسوزيم lysozyme ، deoxyribonuclease (DNase). ribonuclease (Rnase), المعاملة بالبروتييز proteasc، البابين papain و α- chemotrypsin يتلف نشاط البديوسين PA-1. كما أن البديوسين PA-1 يحتفظ بنشاطه عند pH بين ٤-٧ ، بينما يفقد بعض نشاطه عند pH أعلى أو أقل من ذلك.

ب- الصفات الكيماوية

فى دراسة أولية أشارت الى أن الوزن الجزيئى للبديوسين PA-1 حوالى ١٦٢٠٠ Da. وقد دلت الدراسات الحديثة أن الوزن الجزيئى للبديوسين يبلغ ٤٦٢٩ Da ويحتوى على سلسلة تتكون من ٤٤ حامض أميني مماثلة للموجودة فى البديوسين AcH. المحصلة النهائية للشحنات موجبة وpI ٨,٦ ويحتوى على روابط disulfide الذى يجعل الجزئي يأخذ الشكل الحلزونى الذى يكون ثابتا بين درجة حرارة -٢٠ و ١٠٠°م . ومن الصعب تنقية البديوسين PA-1 نتيجة لطبيعته غير المحبة للماء hydrophobic nature.

جـ- أسلوب التأثير

السلالات المنتجة والسلالات المشابه التى لها القدرة على انتاج البديوسين PA-1 كلاهما يقاوم البديوسين PA-1. السلالات المنتجة والسلالات المشابه وكذلك السلالات الحساسة تدمص البديوسين PA-1 بدرجة متماثلة. وقد ذكر أن البديوسين PA-1 تحلل خلايا بكتريا *List.monocytogenes* LM0l حيث لوحظ انخفاضا فى درجة العكارة turbidity فى مزرعة نامية ولكن لم يحدث تحليل لسلالات حاسة أخرى.

د- الانتاج

تنتج السلالة *P.acidilactici* PAC 1.0 ، عند نموها فى مرق MRS ومدعم بـ ٢ % مستخلص خميرة، كميات كبيرة من البديوسين PA-1. يفرز البكتريوسين بعد تكوينه داخل الخلايا فى البيئة، حيث يمكن فصله من السائل الرائق الخال من الخلايا.

هـ- مجال النشاط

أظهرت الدراسات التى أجريت على مزارع نقية أن البديوسين PA-1 يقضى على سلالات *List.monocytogenes* فى مرق APT عند pH يتراوح بين ٥,٥-٧,٠ ، درجة حرارة تتراوح بين ٤ ، ٣٢°م . وقد وجد أن أقل تركيز يمنع النمو (MIC) ،الذى يقاس بدرجة العكارة المرئية لعدد من الخلايا (١٠^{٣}/مل) بعد ٢٤ ساعة ، يبلغ ٥٤,٧ وحدة نشاط AU/مل لسلالة *List.monocytogenes*

LM01 و ٢٥,٤ AU/مل للسلالة *P.pentosaceus* FBB63 . كما أشارت دراسات أخرى أن البديوسين PA-1 يمنع نمو سلالات *P.acidilactici* ، *P.pentosaceus* ، *Leuc. dextranicum, Lb.plantarum* ولكن لا تؤثر على *Lc.lactis* ssp. *lactis,* ssp. *creomris* أو biovar *diacetylactis* ، *Lb.acidophilus* ، *Micrococcus* ، *Staph.aureus* ، *Str.thermophilus* *Lb.bulgaricus* وغيرها.

و- فاعلية بديوسين PA-1 فى الأغذية

تم تلقيح قشدة خفيفة (half-and-half) بمعدل البديوسين PA-1 بتركيز ١٠٠ AU/مل ، وجبن Cottage بتركيز ١٠ AU/مل مع التلقيح بسلالة *List.monocytogenes* LM01 بتركيز $١٠^{٢}$-$١٠^{٣}$ cfu/مل أو جم. أثناء تخزين جبن Cottage عند ٤°م (pH = ٥,١) حدث موت خلايا *List.monocytogenes* بدرجة سريعة نسبيا ، بينما فى المنتجين الآخرين (عند pH أعلى) فإن بعض الخلايا قد ماتت ولكن الخلايا المتبقية بدأت فى التكاثر ووصلت إلى أعداد كبيرة أثناء التخزين لمدة ١٤ يوم . فى دراسة أخرى على مكسبات الطعم للسلطات salad dressing حيث تم تلقيح هذه المكسبات ببكتريا مسببة للفساد *Lb.bifermentans* بتركيز $١٠^{٣}$ cfu/جم مع بديوسين PA-1 بتركيز حوالى ٢٠٠ AU/جم ، وجد أنه لم يحدث فسادا للمنتج خلال ٧ أيام عند ٢٥°م، وأن عينات المقارنة (سواء تحتوى أو لا تحتوى على بديوسين PA-1) عند تركيزات أقل من AU/مل قد فسدت . كما وجد أن معاملة اللحوم البقرية الطازجة بالبديوسين PA-1 مع تلقيحها بميكروب *List.moncytogenes* قد أدت إلى خفض أعداد الميكروب المرضى سريعا على أسطح اللحوم .وقد وجد أن معدل الانخفاض يرتبط مباشرة مع تركيزات البديوسين المستخدمة . يحتفظ البديوسين PA-1 بنشاطه على سطح اللحوم أثناء التخزين لمدة ٢٨ يوم عند ٤°م.

وفى دراسة أخرى حيث استخدم فيها سلالة *P.acidilactici* PAC 1.0 المنتجة للبديوسين PA-1 كبادئ لتثبيط نمو *List.monocytogenes* أثنساء عملية تخمير السجق sausage fermentation ، وجد أن البديوسين PA-1 الذى تم إنتاجه فى السجق الجاف بواسطة البادئ أثناء التحضين ، يؤكد (فى البيئة الحامضية

حيث يكون pH أقل من ٤,٩ مع التجفيف) فقد حيوية *List.monocytogenes* فى المنتجات .

المعلومات المتوفرة عن صفات البديوسين PA-1 مع نتائج الدراسات فى الأغذية المختلفة يدل على أن هذا البكتريوسين يكون فعالا فى بعض الأغذية للتغلب علىالبكتريا الموجبة لجرام المسببة للفساد والمرضية.

٨-٢-٣- سلالات أخرى

وجد أن البكتريوسينات الناتجة من سلالات (PO_2, B-5627, PC) *P.acidilactici* ، عند استخدامها كبادئات فى تخمير الأغذية ، تثبط سلالات من *List.monocytogenes* ، *Pediococcus* spp. ، *Staph.aureus* ، *Ent.faecalis* ، *Leuc.mesenteroides*, .

٩- بكتريوسينات Lactobacilli

بالرغم من التعرف على النشاط المضاد للبكتريا antibacterial activity لسلالات من *Lactobacillus* منذ فترة طويلة ، إلا أن كثير من الدراسات المبكرة لم تبرز بصورة واضحة أن النشاط المضاد للبكتريا يعزى إلى البكتريوسينات . وفى هذا الجزء سوف يتم تناول أنواع وسلالات *Lactobacillus* التى تم دراسة البكتريوسينات الناتجة منها .

٩-١- *Lactobacillus acidophilus*

٩-١-١- لاكتاسين بى Lactacin B

لاحظ بعض الباحثين أن *Lb.acidophilus* N_2 ينتج بروتين يقضى على البكتريا bactericidal . هذا البروتين مقاوم للحرارة (١٠٠°م/٦٠ دقيقة) ولكن غير مقاوم للإنزيمات المحللة للبروتين . وقد أطلق على هذا البروتين Lactacin B ويثبط أربع سلالات من *Lactobacillus* spp. . خلايا السلالات المقاومة وغير المقاومة تدمص اللاكتاسين B . يتم إنتاج اللاكتاسين B بواسطة الخلايا النامية

obeikandl.com

تحت ظروف مثالية عند pH ٦,٠ ، ويبلغ الوزن الجزيئى للاكتاسين حوالى ٦,٠-٦,٥ kDa .

٩-١-٢- لاكتاسين إف Lactacin F

نتج سلالة 88 *Lb.acidophilus* بكتريوسين ، أطلق عليه لاكتاسين إف Lactacin F ، يثبط نمو عدداً من سلالات Lactobacilli وسلالة من *Ent.faecalis* . يتميز اللاكتاسين F بأنه مقاوم للحرارة وغير مقاوم للفيسين (ficin) والبروتنيز K (proteinase K) والتربسين و subtilisin . ينتج هذا البكتريوسين بكميات كبيرة أثناء نمو السلالات المنتجة عند pH ٧,٠ فى مرق MRS . يتم تنقية اللاكتاسين F من الرائق الخال من الخلايا من المزارع السائلة بالترسيب بواسطة كبريتات الأمونيوم ، وترشيح الجل gel filtration ، gel electro phoresis .يبلغ الوزن الجزيئى للاكتاسين F ٢,٥ kDa ، ويحتوى على ٥٦ حامض أمينى . وفى دراسة أخرى وجد أن اللاكتاسين فى الصورة غير النشطة يحتوى على ٩٠ حامض أمينى حيث ينفصل منه شق يحتوى على ٣٣ حامض أمينى من الطرف الأمينى لينتج الصورة النشطة التى تحتوى على ٥٧ حامض أمينى.

٩-١-٣- اسيدوفليوسين إيه Acidophilucin A

تم عزل سلالة *Lb.acidophilus* LAPT 1060 من براز الأطفال الرضع التى تستطيع تثبيط بعض سلالات من *Lb.delbrueckii, Lb.helveticus,* ، وقد أطلق على هذا التأثير المثبط لهذا المركب أسيدوفليوسين إيه acidophilucin A وهو غير مقاوم للإنزيمات المحللة البروتين والحرارة أيضاً (٦٠°م/١٠ دقائق) .

٩-١-٤- بكتريوسينات أخرى

أشارت بعض التقارير إلى احتمال إنتاج بكتريوسينات بواسطة *Lb.acidophilus* ، ولكن صفات هذه البكتريوسينات لا تطابق صفات البكتريوسينات التى تم دراستها لهذا النوع . وقد قام بعض الباحثين بعزل بروتين

ذات وزن جزيئى حوالى ٣,٥ kDa من *Lb.acidophilus* IFO 3205 الذى يثبط *E.coli* .

كما أشار آخرون إلى عزل ببتيد عديد polypeptide ذات وزن جزيئى ٥,٤ kDa من *Lb.acidophilus* Ac1 غير مقاوم للتربسين والكيموتربسين ، مقاوم للببسين pepsin ، غير مقاوم للحرارة ونشط عند pH ٤,٠-٧,٥ ، ويثبط عدة أنواع من البكتريا الموجبة والسالبة لجرام ، تشمل البكتريا المرضية . كما وجد أن سلالة 147 *Lb.acidophilus* التى تم عزلها من أمعاء الدجاج ، تنتج مركب (LA-147) غير مقاوم للحرارة (يتلف بعد التسخين إلى ١٠٠°م/١٥ دقيقة) وغير مقاوم للكيموتربسين ويثبط نمو سلالات *Lb.leichmanii* . عموماً فإن بكتريوسينات *Lb.acidophilus* تتميز بمجال نشاط مضاد للبكتريا محدود ، لذلك فإن مجال استخدامه كمادة حافظة حيوية فى الأغذية محدود جداً.

٩-٢- *Lactobacillus brevis*

٩-٢-١- برفيسين ٣٧ Brevicin 37

نتج سلالة B37 *Lb.brevis* ، المعزولة من المواد النباتية ، برفيسين ٣٧ الذى يقاوم الحرارة (١٢١°م لمدة ساعة) ، ويتلف تماماً بالإنزيمات المحللة للبروتين ، التربسين والبرونيز (pronase E) ، ويتلف جزئياً نتيجة المعاملة بالكلورفورم . يحتفظ البرفيسين ٣٧ بنشاطه حتى بعد التسخين عند pH ١,٠-١١,٠ ، ولكن يتلف عند pH ١٢,٠ . يفقد الراشح النشاط المثبط للبكتريا عقب ترشيح المزرعة السائلة خلال مرشح غشائى 10 kDa membrane filter .

يثبط البرفيسين ٣٧ بعض سلالات من بكتريا حامض اللاكتيك التى تنتمى لأجناس *Lactobacillus* ، *Pediococcus*, *Leuconostoc* . تعتبر *Lb.brevis* ، *P.damnosus*, *Leuc.oenos* من أكثر السلالات حساسية .

٩-٣- *Lactobacillus casei*

٩-٣-١- كازياسين ٨٠ Caseicin 80

تم عزل Caseicin 80 من سلالة *Lb.casei* B 80 ، يؤثر على عدد قليل جداً من الميكروبات ، حيث يؤثر فقط على سلالة *Lb.casei* B109 . يتلف نشاط Caseicin 80 بواسطة البرونييز pronase E ، والتربسين ، proteinase K ، بعد المعاملة بالكلورفورم والتسخين عند درجات حرارة أعلى من ٦٠°م . تنتج السلالة Caseicin 80 بكميات قليلة نسبياً ، ويبلغ وزنه الجزيئى حوالى ٤٠-٤٢ kDa و pI ٤,٥ .

٩-٤- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*

٩-٤-١- لاكتاسين إيه وبي Lactacin A and B

تنتج سلالة *Lb.delbrueckii* ssp. *lactis* JCM 1106 and 1107 لاكتاسين إيه (Lactacin A) ، بينما تنتج سلالة JCM 1248 لاكتاسين بي (Lactacin B). يؤثر كل من هذين البكتريوسنين على عدد محدود من البكتريا ، حيث يؤثر فقط على عدد قليل من السلالات المشابهة . يفقد البكتريوسين نشاطه بعد المعاملة بالإنزيمات المحللة للبروتين والتسخين عند ٦٠°م لمدة ١٠ دقائق.

٩-٥- *Lactobacillus fermenti*

تم تنقية بكتريوسين من سلالة *Lb.fermenti* 466 الذى يثبط نمو بعض Lactobacilli أخرى . النشاط المضاد للبكتريا حساس لإنزيمات التربسين والببسين، ولكن يقاوم التسخين عند ٩٦°م لمدة ٣٠ دقيقة . البكتريوسين عبارة عن معقد من البروتين والكربوهيدريت واللبيدات lipocarbohydrate-protein ويتكون من ١٦ حامض أميني ، ٤ سكريات ، hexosamine وفوسفور .

٩-٦- *Lactobacillus gasseri*

٩-٦-١- جاسيرسين إيه Gassericin A

وجد أن جاسيرسين إيه من سلالات *Lb.gasseri* LA33, 39 التي عزلت من براز الأطفال الرضع ، يثبط بعض سلالات *Lactobacillus* spp. يحتفظ الجاسيرسين A بنشاطه عقب التسخين عند ١٠٠°م لمدة ٣٠ دقيقة أو عند ١٢٠°م لمدة ٢٠ دقيقة لكن يتلف بواسطة إنزيمات التربسين وأكتنيز actinase .

٩-٧- *Lactobacillus helveticus*

٩-٧-١- لاكتوسين ٢٧ Lactocin 27

وجد أن سلالة *Lb.helveticus* LP27 تنتج مركب glycoprotein ذات وزن جزيئي ١٢٤٠٠ Da ، يثبط عدد قليل من السلالات المشابه . يحتفظ اللاكتوسين ٢٧ بنشاطه المثبط بعد التسخين عند ١٠٠°م لمدة ساعة ، ولكن يفقد نشاطه بعد المعاملة بالتربسين والبرونيز pronase . يتميز اللاكتوسين ٢٧ بنشاط مثبط للبكتريا bacteriostatic على الخلايا الحساسة . يدمص جزيئات اللاكتوسين ٢٧ على خلايا البكتريا الموجبة لجرام المقاومة وغير المقاومة وعلى خلايا البكتريا السالبة لجرام (*E.coli*) . يسبب اللاكتوسين ٢٧ عدم إستقرار غشاء الخلايا غير المقاومة مما يسبب تدفق أيونات البوتاسيوم K^+ ودخول أيونات الصوديوم Na^+ ، ولكن تسبب بدرجة كافية تسرب كاتيونات ثنائية التكافؤ أو المواد السيتوبلازمية . كما أن اللاكتوسين ٢٧ يثبط تخليق البروتين ولا يؤثر على تخليق DNA ، RNA أو ATP .

٩-٧-٢- هلفتسين Helveticin J

تنتج سلالة *Lb.heveticus* 481 بكتريوسين ، هلفتسين J (Helveticin J)، الذى يتميز بنشاط قاتل bactericidal حيث يقضى على ٥ سلالات مشابه للـ *Lactobacillus* . المعاملة الحرارية عند ١٠٠°م لمدة ٣٠ دقيقة وكذلك المعاملة بالإنزيمات المحللة للبروتين تؤدى إلى فقد نشاط الهلفتسين J. الوزن الجزيئى

للهلفتسين J حوالى ٣٧,٠٠٠ Da . يتكون الحد الأقصى لإنتاج الهلفستين J فى المرق عند pH ٥,٥ تحت ظروف لاهوائية.

٩-٨- *Lactobacillus plantarum*

٩-٨-١- بلانتاريسين إيه Plantaricin A

وجد أن سلالة *Lb.plantarum* C-11 ، المعزولة من تخليل الخيار ، تنتج مكون بروتينى مثبط ، أطلق عليه بلانتاريسين إيه (Plantaricin A) ، يتميز بنشاط مضاد لبعض سلالات من *Lb.plantarum* ، *Lb.brevis* ، *Lb.acidophilus* ، *Lb.viridescens* ، *Lb.xylosus* ، *Lc.lactis* ssp. *lactis* ، *P.acidilactici* ، *Ent.faecalis, P.pentosaceus* . البلانتاريسين A غير مقاوم للإنزيمات المحللة للبروتين ولكن مقاوم للمعاملة الحرارية (١٠٠°م لمدة ٣٠ دقيقة) أو عند pH ٤,٠-٦,٥ . يتكون البلانتاريسين A من نوعين من الببتيدات . يتطلب نشاط البلانتاريسين A إلى تأثير كل من الببتدين والذى يبلغ الوزن الجزيئى لكل منهما ٢٤٢٦ ، ٢٤٩٧ Da . نظرا لأن هذه الببتيدات تتميز بشكل حلزونى α-helices فأنه يعتقد أن هذه الببتيدات تكون مسام حيث تخلق قنوات channel فى غشاء الخلايا.

٩-٨-٢- بلانتاسين بي Plantacin B

بلانتاسين B ، مادة مضادة للبكتريا ، تنتج بواسطة سلالة *Lb.plantarum* NCDO 1193 ، وتتلف تماما بواسطة إنزيمات البيسين ، التربسين والكيموتربسين، وجزئيا بواسطة إنزيمات الليبيز أو الأميليز . مجال تأثير البلانتاسين B محدود نسبيا ، حيث يؤثر على عدد قليل من سلالات بكتريا حامض اللاكتيك . الجزيئات النشطة عبارة عن مركب من اللبيدات ، البروتين والكربوهيدريت . ومع ذلك ، فإن جميع محاولات تنقية البلانتاسين B من مزرعة سائلة لم يكتب لها النجاح.

٩-٨-٣- بكتريوسينات أخرى

ذكر حديثا أن سلالة *Lb.plantarum* 27 ، بادئ يستخدم فى تخمير اللحوم ، تنتج بكتريوسين يثبط من نمو سلالات من *P.acidilactici* ،

Staph.aureus, Lactobacillus spp. . هـذا البكتريوسين مقاوم للحرارة (١٢١°م لمدة ١٥ دقيقة) ويظل نشطا عند pH ٤,٠-٩,٠ ، لكن يفقد نشاطه بعد المعاملة بالتربسين ، البابيين papain ، الفيسين ficin والبروتييز XIV أو عند pH ١٠,٠ .

٩-٩- *Lactobacillus reuterii*

٩-٩-١- ريوتريسين ٦ Reutericin 6

يعتبر ريوتريسين ٦ بكتريوسين تنتجه سلالة *Lb.reuterii* LA 6 ، حيث يتلف بواسطة الإنزيمات المحللة للبروتين ، يتميز بنشاط قاتل للبكتريا حيث يقضى على *Lb.acidophilus* وسلالتين من *Lb.delbrueckii* . كما أنه يتميز بنشاط محلل lytic ضد السلالات الحساسة . هذا النشاط غير مقاوم للإنزيمات المحللة للبروتين ولكن مقاوم للتسخين.

٩-١٠- *Lactobacillus sakè*

٩-١٠-١- سكاسين إيه Sakacin A

قام بعض الباحثين بدراسة مسحية على ٢٢ سلالة من Lactobacilli تم عزلها من اللحوم للتعرف على نشاطها المضاد للبكتريا ، وقد وجد أن الرائق الخلل من خلايا ٦ سلالات يحتوى على مكونات مختلفة مضادة للبكتريا . وقد أظهرت الدراسة أن سلالة واحدة ، *Lb.sakè* LB 706 ، تنتج مادة بروتينية مضادة للبكتريا عندما تنمو فى مرق MRS عند ٢٥°م لمدة ٢٣ ساعة أو أكثر ، استمرار التحضين فترة أطول من ٤٧ ساعة يقلل من النشاط المضاد . نشاط البروتين ، الذى أطلق عليه سكاسين إيه (Sakacin A) ، غير مقاوم للإنزيمات المحللة للبروتين ومقاوم للحرارة ، كما أنه يقضى على السلالات الحساسة . يؤثر السكاسين A على عدد من سلالات *Carnobacterium piscicola* ، *Enterococcus* spp. ، *Lb.curvatus* وسلالات أخرى من *Lb.sakè* ، *Leuconostoc* spp. ، *List.monocytogenes*.

obeikan.com

كما لاحظ بعض الباحثين أن *Lb.sakè* LB 706 عندما تستخدم كبادئ فى اللحوم المفرومة بالإضافة إلى *List.monocytogenes* ، فإن سلالة LB 706 تنتج Sakacin A أثناء عملية تخمر السجق ويثبط نمو *List.monocytogenes* .

٩-١٠-٢- لاكتوسين إس Lactocin S

تنتج سلالة *Lb.sakè* L 45 ، التى تم عزلها من السجق المتخمر ، بكتريوسين مقاوم للحرارة بدرجة معتدلة ، وغير مقاوم للإنزيمات المحللة للبروتين، وقد أطلق هذا البكتريوسين لاكتوسين Lactocin S الذى يثبط كثيرا من Lactobacilli التى تم عزلها من اللحوم وبعض سلالات *Lactobacillus* spp. الأخرى وكذلك *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp. ينتج اللاكتوسين S أثناء المرحلة المتأخرة من النمو اللوغاريتمى بواسطة الخلايا المنتجة فى بيئة سائلة.

وقد أظهرت الدراسات أن اللاكتوسين S يحتوى على ٣٣ حامض أمينى ، ٥٠ % من هذه الأحماض عبارة عن أحماض أمينية غير قطبية ، الآلانين ، الفالين والليوسين . كما أن جزيئات اللاكتوسين S قد تحتوى على حامضين أمينين من سستئين cystein . وقد يبدو أن تسلسل الأحماض الأمينية فى لاكتوسين S فريد أى ليس له مثيل.

بإستثناء سكاسين A (Sakacin A) ، فإن بكتريوسينات Lactobacilli لا تستخدم فى الأغذية . كما أن المعلومات المتاحة حاليا ، بالإضافة إلى مجال نشاطها المحدود ، تجعل معظم هذه البكتريوسينات لها أهمية محدودة كمواد حافظة حيوية فى الأغذية.

١٠- بكتريوسينات Bifidobacteria

عند دراسة إنتاج البكتريوسين بواسطة *Bifidobacterium* تم عزلها من منتجات ألبان تجارية ، ووجد أن سلالة واحدة عندما تنمو فى مرق MRS تنتج مركب ذات نشاط مضاد للميكروبات ، وغير مقاوم للببسين ، التربسين والبرونيز pronase ،ولكن مقاوم للتسخين (لدرجات حرارة تصل إلى ١٢١°م لمدة ١٥ دقيقة) .يمنع هذا المركب نمو سلالات البكتريا الموجبة لجرام من

Lb.acidophilus ،*Str.thermophilus*، *Lc.lactis*ssp.*lactis*،*Bifidobacterium* *Cl.perfringens, Cl.tyrobutyricum* ، *Cl.butyricum*. بالرغم من ذلك فإن لم يتم حتى الآن تنقيته ودراسته فى الأنظمة الغذائية .

١١- بكتريوسينات Propionibacteria الألبان

١١-١- *Propionibacterium thoenii*

وجد أن سلالة *Propionbacterium thoenii* P 127 ، بادئ ألبان ، تتميز بنشاط مثبط لبكتريا حامض البروبيونيك الأخرى فقط فى بيئة الآجار . يتم تنمية السلالة فى مرق لاكتات الصوديوم المحتوى على ٠,٤ % آجار وتعريضها للطرد المركزى لازالة الخلايا والآجار . يتم ترسيب الرائق بواسطة كبريتات الأمونيوم ويجرى على الراسب ديلزه dialysed للحصول على المركب المثبط نقياً جزئياً . نظراً لأن النشاط المثبط يفقد عقب المعاملة بالإنزيمات المحللة للبروتين ، فإن المادة المثبطة عبارة عن بكتريوسين . بالإضافة إلى ذلك ، فإن النشاط المثبط يفقد بعد التسخين إلى ٨٥°م . وقد أطلق على البكتريوسين أسم Propionicin PLG-1 . وقد أظهر هذا البكتريوسين مناطق خالية من النمو (نشاط مثبط أو مضاد) لعدة سلالات من *Propionibacterium* ، بعض بكتريا حامض اللاكتيك ، سلالات بكتريا سالبة لجرام تشمل *Yersinia enterocolitica, Aeromonas hydrophilia* وكذلك بعض الخمائر والفطريات . كما وجد أن سلالات من *Staph.aureus* ، *Bacillus* sp. ، *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. لم تتأثر بهذا البكتريوسين.

يتميز Propionicin PLG-1 بنشاط مبيد للبكتريا ضد سلالات حساسة ، حيث يدمص على الخلايا الحساسة ، ولكن لا يدمص على خلايا السلالات المنتجة. يختلف هذا البكتريوسين عن البكتريوسينات الأخرى مثل النيسين والبديوسينات ، التى تدمص على خلايا السلالات المنتجة . يبلغ الوزن الجزيئى للشق النشط من هذا البكتريوسين حوالى ١٠,٠٠٠ Da.

١١-٢- *Propionibacterium jensenii*

قام بعض الباحثين بدراسة صفات جنسنين جي Jensenin G الناتج من سلالة *Prop.jensenii* P 126 (ATCC 4872) ، من بادئات الألبان . يتم تحضير Jensenin G بتنمية الخلايا على سطح بيئة آجار طرى عند ٣٢°م لمدة ١٠ أيام تحت ظروف لاهوائية . يوضع مخلوط الآجار فى كيس بلاستيك وتجرى عملية ديلزة باستخدام الماء ليسمح بالمادة المثبطة للانتشار فى الوسط المائى . بعد إجراء عملية الطرد المركزى ، يركز السائل الرائق إلى ١ : ٥٠ إلى ١ : ١٠٠ من الحجم الأصلى وتختبر العينة المركزة للصفات المضادة للبكتريا .

يتلف النشاط المضاد للبكتريا بواسطة إنزيمات proteinase K, pronase E. كما أن النشاط غير مقاوم للحرارة جزئيا حيث يتلف النشاط عند ١٠٠°م لمدة تزيد عن ٢ دقيقة . يثبط Jensenin G نمو نوعين من بكتريا حامض البروبيونيك المستخدم فى مجال الألبان وبعض بكتريا حامض اللاكتيك ، ولكن لا تؤثر على كثير من البكتريا الموجبة لجرام الأخرى وكذلك البكتريا السالبة لجرام التى تم دراستها . كما أن هذا البكتريوسين له تأثير قاتل على البكتريا bactericidal وقد يدمص فقط بواسطة الخلايا الحساسة.

تدل المعلومات المحدودة على البكتريوسينات من السلالتين السابق ذكرهما أن هناك عدة مشاكل تحد من استخدام هذه البكتريوسينات من بكتريا حامض البروبيونيك كمواد حافظة حيوية فى الأغذية . أهم صفات هذه البكتريوسينات انخفاض قدرتها المثبطة وكذلك انخفاض الإنتاج . لذلك فإن الأمر يحتاج إلى دراسة مستفيضة لصفات المثبط وكذلك البحث عن سلالات تستطيع إنتاج هذا المثبط بكميات كبيرة .

١٢- البكتريوسينات كمواد حافظة حيوية فى الأغذية

نظرا لأن الأتجاه الحديث حاليا يهدف إلى تقليل استخدام الإضافات الكيماوية chemical additives فى الأغذية ومنتجاتها ، فإن اهتمام الباحثين فى هذا المجال قد تركز على استخدام نواتج التمثيل الغذائى metabolites لبعض الميكروبات المنتقاه فى الأغذية لتثبيط نمو الميكروبات غير المرغوبة . هذه المواد

المثبطة الطبيعية يمكن أن تحل محل المواد الكيماوية الحافظة chemical preservatives ، مثل ثانى أكسيد الكبريت ، حامض البنزويك ، حامض الأسكوربيك ، النترات ، النيتريت وغيرها . وهناك اتجاهات مختلفة لإطالة فترة صلاحية الأغذية بطرق طبيعية تشمل استخدام أنظمة حامضية منظمة buffered acidulant system ، الليسوزيم lysozyme والأحماض العضوية . هناك العديد من الأنظمة الطبيعية المضادة للميكروبات تتميز بإمكانية استخدامها فى حفظ الأغذية مستقبلا ، فمثلا البكتريوسينات التى تنتجها بكتريا حامض اللاكتيك قد تكون مشجعة لاستخدامها كمواد حافظة حيوية فى الأغذية حيث تكون نشطة ضد البكتريا الموجبة لجرام ، لكن أنواع أخرى من البكتريوسينات تنتجها بكتريا حامض اللاكتيك تكون نشطة ضد الميكروبات المسببة لفساد الأغذية والميكروبات المرضية التى تسبب الأمراض عن طريق الأغذية ، وتشمل *List. monocytogenes*، *Cl.perfringens* ، *Staph.aureus* ، *B.cereus* وغيرها . بالإضافة إلى ذلك فإن عديد من البكتريوسينات تكون مقاومة للحرارة مما يسمح باستخدامها مع المعاملة الحرارية . وأخيرا ، يبدو أن هذه المواد تتميز بتأثير مبيد للبكتريا bactericidal وأنها ثابتة فى الغذاء food stable ، وقابلة للتحلل حيويا وقابلة للهضم وآمنة صحيا safe ، كما إنها نشطة عند تركيزات منخفضة .

ويجب ملاحظة أن النيسين من ضمن هذه البكتريوسينات التى تنتجها بكتريا حامض اللاكتيك ، وتسمح التشريعات فى بعض الدول مثل الولايات المتحدة الأمريكية ودول أوروبا باستخدامه فى الأغذية ، خاصة فى منتجات الجبن المطبوخ للتغلب على الفساد الذى تسببه Clostridia . ونظرا لمقاومته للحرارة عند pH حامضي فإنه يمكن إضافته إلى الأغذية المعلبة قبل المعاملة الحرارية ليمنع نمو الجراثيم التى تقاوم المعاملة الحرارية المعتدلة ولتقليل تكاليف المعاملة الحرارية . وهناك مضاد حيوى آخر يعرف بالـ natamycin نتيجة *Streptomyces natalensis* ومضاد للخمائر والفطريات ، حيث يستخدم لمنع نمو الفطريات . ومن الضرورى تحديد الصفات المطلوب توفرها فى البكتريوسين المراد استخدامه كمادة حافظة حيوية فى الأغذية . الصفات المناسبة والمطلوب توفرها يمكن تلخيصها فيما يلى :

١- يجب أن تكون فعالة ضد كثير من أنواع وسلالات البكتريا الموجبة والسالبة لجرام المسببة للفساد والمرضية وكذلك الجراثيم.
٢- يجب أن تقضى على معظم خلايا السلالات الحساسة الموجودة .
٣- يجب أن تكون فعالة فى أنظمة غذائية مختلفة.
٤- يجب أن تكون اقتصادية عند استخدامها فى الأغذية.
٥- يجب أن لا تؤثر على جودة وقابلية الغذاء للاستهلاك.
٦- يجب أن تتوفر معلومات ضرورية للحصول على موافقة الجهات الرقابية المسئولة لاستخدامها فى الأغذية.

عند تقدير البكتريوسينات ، فإنه من المهم جدا التمييز بين البكتريوسينات وغيرها من المواد المضادة التى تنتجها بكتريا حامض اللاكتيك ، مثل H_2O_2 وأحماض اللاكتيك والخليك . يتم ذلك عادة بمعادلة الحموضة فى راشح أو رائق المزرعة ، ثم يتم تقدير النشاط فى وجود وغياب إنزيم proteinase الذى يتلف البكتريوسينات إذا وجدت.

يختلف إنتاج البكتريوسين خلال مجموعة بكتريا حامض اللاكتيك إختلافا واضحا ، فمثلا وجد أن ٦٣ % من سلالات *Lb.acidophilus* التى تم فحصها تثبط سلالات أخرى من بكتريا حامض اللاكتيك ، كما أن ١٥,٥ % من سلالات *Lb.fermenti* تنتج بكتريوسين وحوالى ٩ % من سلالات *Lc.lactis* ssp. *lactis* تنتج بكتريوسين ، ٧,٥ % من سلالات *Lc.lactis* ssp. *cremoris* تنتج بكتريوسين ، ويمكن أن تعزى هذه الاختلافات إلى أن التعرف على السلالة المنتجة للبكتريوسين يتوقف تماما على الميكروب الكاشف indicator organism .

كما أن تسمية البكتريوسينات قد أدت إلى بعض اللبس . حاليا توجد فرصة جيدة لبعض البكتريوسينات لتسميتها بأسماء مختلفة بواسطة مجموعات مختلفة من الباحثين ، مما قد يؤدى إلى خلق بعض الصعوبات للجهات الرقابية واستخدام الناتج فى الأغذية. ومن المفضل عدم إعطاء أسم معين لبكتريوسين ما لم يتم تقدير صفاته الكيماوية بدرجة جزئية على الأقل . وقد يتضمن ذلك النقاوة أو التنقية الجزئية ، تقدير الوزن الجزيئ ، تقدير تسلسل الأحماض الأمينية جزئيا أو

الأحماض الأمينية الطرفية . كما أنه عند تسمية بكتريوسين جديد ، يجب أن تتم التسمية بطريقة علمية وذلك باستخدام الجنس ، النوع والسلالة المنتجة معا .

ومن الأمور الهامة ، الوصول إلى طريقة مناسبة لمقارنة قوة مستحضر بكتريوسين جديد مع مستحضر قياسي مثل النيسين . وسوف يساعد ذلك على فهم التأثير النسبى للبكتريوسينات المختلفة ضد سلالة البكتريا المعنية . استخدام سلالات مختلفة كاشفة indicator للبكتريوسينات المختلفة لتقدير قوة المستحضرات قد يسبب بعض اللبس إذا كان المستحضر سوف يستخدم فى الغذاء.

١٣- الصفات الطبيعية والكيماوية والبيولوجية للبكتريوسينات

معظم البكتريوسينات المتكونة بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك غير محبة للماء hydrophobic بدرجة كبيرة ، كاتيونية cationic مع ارتفاع نقطة التعادل الكهربى pI . طبقا لتسلسل الأحماض الأمينية ، يمكن تقسيم بكتريوسينات بكتريا حامض اللاكتيك إلى مجموعتين رئيستين : (١) بكتريوسينات محتوية على lanthionine ويطلق عليها lantibiotics ، (٢) بكتريوسينات محتوية على أحماض أمينية بروتين قياسي standard protein amino acids . تحتوى المجموعة الثانية من البكتريوسينات على قسمين على الأقل من البكتريوسينات :

(أ) بكتريوسينات شبيه بالبديوسين Pediocin-like bacteriocins (مثل Pediocin PA-1 ، Sakacin A ، Sakacin P ، Leucocin A-UAL ، 187 ، CurvacinA ، Mesentericin Y105 ، Carnobacteriocin B2).

(ب) بكتريوسينات شبيه باللاكتوكوكسين Lactococcin-like bacteriocins، وقد أكتشف حديثا قسم ثالث من البكتريوسينات تتكون من أحماض إمينية قياسية . تختلف هذه البكتريوسينات عن القسمين السابقين حيث إنها تحتاج إلى نوعين من الببتيدات لكى تصبح نشطة بيولوجيا (مثل Lactococcin G ، Plantaricin A) .

وقد وجد أن درجة ثبات محاليل البكتريوسينات تنخفض بدرجة كبيرة مع زيادة درجة التنقية . بالإضافة إلى ذلك ، فإن البكتريوسينات تختلف كثيرا بالنسبة لحساسيتها للتلف نتيجة التغيرات فى pH ودرجة الحرارة . كثير من البكتريوسينات

والمواد الشبيه بالبكتريوسينات المتكونة بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك تكون ثابتة فقط عند pH المتعادل والحامضى وتصبح غير نشطة عند pH أعلى من ٨,٠ (مثل النيسين Nisin ، Lactostrepcins ، Pediocin AcH ، Leucocin A-UAL 187) . المقاومة الحرارية ، صفة رئيسية لكثير من البكتريوسينات والمواد الشبيه بالبكتريوسينات المتكونة بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك ، تختلف بدرجة كبيرة فى نطاق درجة حرارة من ٦٠°م أو ١٠٠°م لمدة أكثر من ٣٠ دقيقة (مثل Lactocin 27 ، Lactacin S ، Carnobacteriocins A&B) إلى التعقيم عند ١٢١°م لمدة ١٥-٢٠ دقيقة (مثل Lactacin B ، Lactacin F ، النيسين Nisin وغيرها) . قد ترجع الثبات الحرارى إلى تركيبات كروية صغيرة small globular structures ووجود مناطق غير محبة للماء بدرجة شديدة (مثل Lactacin F ، Nisin, Lactococcin A) ، روابط عرضية ثابتة stable cross-linkages (مثل Nisin ، Lacticin 481 ، Lactocin S) ، محتوى الجليسين glycine المرتفع (مثل Diplococcin ، Lactacin F ، Lactococcin A, Lactocin 27) .

الحساسية لإنزيمات البروتييز protease تعتبر صفة رئيسية فى توصيف مثبط مثل البكتريوسين . نظرا لأن البكتريوسينات عبارة عن مواد بروتينية ، فإنها تصبح غير نشطة عموما بواسطة مجموعة من الإنزيمات المحللة للبروتين (trypsin ، α-chymotrypsin ، pepsin ، prteinasc K وغيرها) . تختلف بكتريوسينات البكتريا المختلفة فى درجة حساسيتها للإنزيمات المحللة للبروتين. بالإضافة إلى ذلك، فإن الحساسية للإنزيمات المحللة للبروتين المعوية gastric أو البنكرياسية panceratic على جانب كبير من الأهمية بالنسبة لاستخدام البكتريوسينات كمواد حافظة حيوية فى الأغذية والعلائق ، حيث أن ذلك يعنى أن تناول هذه البكتريوسينات سوف لا يؤثر على ميكروفلورا القناة الهضمية . يبدو أن بعض البكتريوسينات تكون غير حساسة لبعض إنزيمات proteases ، مما يعنى أن هذه البكتريوسينات تحتوى فقط على مواد بروتينية ثانوية minor . فى الواقع ، بعض البكتريوسينات تحتوى على كربوهيدريت ، ليبدات و/أو شق فوسفور . وجود مثل هذه الشقوق غير البروتينية يمكن التحقق منه بواسطة حساسية هذه البكتريوسينات لإنزيمات محللة للكربوهيدريت glycolytic (α-amylase) ، محللة لليبيدات lipolytic (lipase) ومحللة للفوسفوليبدات phospholipolytic (phospholipase).

بكتريوسين Bacteriocin 446 ، Lactocin 27 أمثلة لبكتريوسينات معقدة تحتوى على بروتين -كربوهيدريت - ليبدات ، بينما Caseicin LHS Leuconocin S, عبارة عن بروتينات تحتوى على كربوهيدريت glycoproteins . بعض البكتريوسينات تحتوى على أحماض أمينية غير طبيعية unusual (lantibiotics) ، أحماض أمينية تحتوى على thiolether (lantibiotics) أو عدة روابط عرضية (روابط -S-S-) مثل Leucocin A-UAL 187 ، روابط thioether (lantibiotics) . يختلف الوزن الجزيئى للبكتريوسينات المتكونة بواسطة بكتريا حامض اللاكتيك بدرجة كبيرة ، ويتراوح من ببتيدات صغيرة (مثل Lacticin 481 ، وزن جزيئى ١٧٠٠ Da) إلى تجمعات بروتين - بروتين إلى بروتين - ليبدات وجزيئات كبيرة بوزن جزيئى أكثر من ٢٠٠٠٠٠ Da (مثل Lactocin 27، Lactacin B ، Lactacin F ، Helveticin J) . هذه التجمعات تتفتت بواسطة الترشيح الفائق UF أو بالمعاملة بمواد كيماوية detergents أو يوريا ، مكونة وحدات أحادية monomers تكون أكثر نشاطا عن معقد البكتريوسين الأصلى . بالإضافة إلى ذلك ، فإن أنواع من البكتريا من نفس الجنس قد تنتج بكتريوسينات تختلف بدرجة كبيرة فى الوزن الجزيئى . فمثلا ، Lactacin B من *Lb.acidophilus* N_2 تنتمى إلى بكتريوسينات أصغر ناتجة بواسطة *Lactobacillus* spp. وذات وزن جزيئى ٦٥٠٠ Da ، بينما الوزن الجزيئى للـ Helveticin J, Lactocin 27 يبلغ ١٢٤٠٠ ، ٣٧٠٠٠ Da على الترتيب . يتكون البكتريوسينين الأخرين بواسطة سلالات من *Lb.helveticus* وتمثل بكتريوسينات مرتفعة الوزن الجزيئى من *Lactobacillus* .

جدول (٤-٦) يوضح بعض صفات بكتريوسينات بكتريا حامض اللاكتيك التى تم توصيفها ، من حيث الوزن الجزيئى ، عدد الأحماض الأمينية ونطاق pH الذى يكون فيه البكتريوسين فى صورة نشطة ، وكذلك الإنزيمات المحللة لهذه البكتريوسينات مما يؤدى إلى فقد نشاطها . كما يوضح الجدول السلالات المنتجة لهذه البكتريوسينات ومجال نشاط هذه البكتريوسينات المضاد للميكروبات.

جدول (٤-٦): بعض صفات بكتريوسينات بكتريا حامض اللاكتيك.

بكتريوسينات	السلالة المنتجة	مجال النشاط المضاد	الأنزيمات المحللة	نطاق النشاط (pH)	عدد الأحماض الأمينية	الوزن الجزيئي (Da)
Nisin A Nisin Z	*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454, 6F3, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* NIZO 22186	Gram-positive bacteria	α-chymotrypsin, nisinase	٧,٠-٢,٠ (٢,٠)	٣٤	٣٣٥٣
Lacticin 481	*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CNRZ 481	Lactic acid bacteria, *Clostridium tyrobutyicum*, *Staphylococcus carnosus*	α-chymotrypsin, pronase, ficin, Proteinase k	٨,٠-٢,٠ (٧,٠)	٢٧	٢٩٠١
Lactocin S	*Lactobacillus sake* L45	Carnobacteria, Lactobacilli, Pediococci, Lactococci	Trypsin, Protease type XIV	أقل من ٥,٥	٣٧	٣٧٧٨
Carnocin U149	*Carnobacterium pisciola* U149	Carnobacteria, Lactobacilli, Pediococci, Lactococci		٨,٠-٢,٠	٣٧-٣٥	٤٦٣٥
Diplococcin	*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* 346	Lactococci	α-chymotrypsin, Trypsin, Pronase	١١,٠-٥,٠	٥١	٥٣٠٠
Lactococcin A	*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* LMG 2130	Lactococci	Trypsin, endoproteinase, Glu-C			
Lactocin 27	*Lactobacillus helveticus LP27*	Lactobacilli	Trypsin, pronase		أقل من ١٠٠	١٢٤٠٠
Lactacin B	*Lactobacillus acidophilus N2*	Lactobacilli	Proteinase K	(٥,٠)		٦٥٠٠
Lactacin F	*Lactobacillus acidophilus 11088*	Lactobacilli, *Enterococcus faecalis*	Trypsin, Ficin, Proteinase K		٥٧	٦٣٠٠
Sakacin A	*Lactobacillus sake L8 706*	Lactobacilli, Enterococci, Carnobacteria, *Listeria monocytogenes*	Trypsin, Pepsin, α-chymotrypsin, Pronase E, Proteinase K. Collagenase	٩,٠-٢,٠	٤١	٦٠٠٠
Curvacin A	*Lactobacillus curvatus* LTH 1174	Lactobacilli, carno bacteria, *Enterococcus faecalis, Brochothrix thermosphacta, Listeria monocytogenes*	Proteinase K, trypsin		٤١-٣٨	٥٠٠٠

تابع جدول (٤-٦) : بعض صفات بكتريوسينات بكتريا حامض اللاكتيك.

بكتريوسينات	السلالة المنتجة	مجال النشاط المضاد	الأنزيمات المحللة	نطاق النشاط (pH)	عدد الأحماض الأمينية	الوزن الجزيئي (Da)
Sakacin P	*Lactobacillus sake* LTH 673	Lactobacilli, carno bacteria, *Enterococcus faecalis, Brochotrix thermosphacta Listeria monocytogenes*	Proteinase K, trpsin		٤١	٥٠٠٠
Carnobacteriocin A & B	*Carnobacterium piscicola* LV17	Carnobacteria, Lactobacilli, Pediococci, *Enterococcus* spp, *Listera monocytogenes*	Proteases, trypsin, Chymotrypsin, papain	١١,٠-٢,٠	(A) ٥٣ (B2) ٤٨	(A) ٥٠٤٩ (B2) ٤٩٦٩
Pediocin AcH	*Pediococcus acidilactici* E, F, H, M	Pediococci, Lactobacilli Leuconostocs, *Brocho trix thermosphacta*, Propionibacteria, Bacilli, Enterococci, Staphylococci, Listeriae, Clostridia	Trypsin α-chymotrypsin, Papain.	٩,٠-٢,٥	٤٤	٤٦٢٨
Pediocin PA-1	*Pediococcus acidilactici* PAC-20	Pediococci, Lactobacilli, Leuconostocs. Listeriae	Protease, Papain, α-chymotrypsin	١٠,٠-٢,٠ (٧,٠-٤,٠)	٤٤	٤٦٢٩
Leucocin A-UAL-187	*Leuconostoc gelidum* UAL 187	Lactic acid bacteria. *Listeria monocytogenes*	Protease, trypsin	٣,٠-٢,٠	٣٧	٣٩٣٢
Enterocin 1146	*Enterococcus faecium* DPC 1146	*Lactobaeillus sake, Listeria* spp.	Pronase E, pepsin, Trypsin, α-chymotrypsin, Proteinase K	٩,٠-٣,٠ (٣,٠)		٣٠٠٠
Helveticin J	*Lactobacillus helveticus* 481	Lactobacilli	Trypsin, pronase, ficin, Proteinase K, Pepsin, Subtilisin		٣٣٣	٣٧٥١١
Caseicin 80	*Lactobacillus casei B80*	*Lactobacillus casei* B109	Trypsin, α-chymotrypsin, Pronase, Proteinase K, Pepsin	٩,٠-٣,٠ (أقل من ٥,٢)		٤٢٠٠-٤٠٠٠

١٤- مستقبل المواد الحافظة الحيوية فى الأغذية

عندما استخدمت البادئات فى إنتاج الأغذية المتخمرة على نطاق تجارى ، فإن السلالات المستخدمة يتم اختيارها على أساس الإنتاج السريع للحموضة ، حيث أن مثل هذه السلالات تساعد بدرجة أفضل فى السيطرة على عملية التخمر والصفات الحسية للمنتج . تعتمد سلامة safety وصلاحية منتجات الأغذية المتخمرة ليس فقط على إنتاج الحامض ، لكن أيضاً على مجموعة من العوامل الطبيعية المضادة للميكروبات فى النظام البيئى للغذاء المتخمر ، ويمكن تحسين ذلك باستخدام مزرعة بادئ منتج للبكتريوسين.

تتغير نظم الحفظ ويقبل المستهلكون على الاستفادة من المواد المضادة للميكروبات الطبيعية بدلاً من المواد الكيماوية الحافظة غير المرغوبة . فى مثل هذا النظام ، يستخدم بادئات مصرح باستخدامها فى الأغذية food-grade starters ، والتى تم قبولها بواسطة المستهلكين والجهات الرقابية وصناعة الأغذية . هذه البادئات يمكن استخدامها كمواد مقاومة حيوية biological control agents لإطالة فترة صلاحية shelf-life الأغذية المبردة . تتوقف كفاءة مثل هذه الأنظمة الحافظة على : (١) نوع/سلالة ميكروبات البادئ ، (٢) نوع وتركيز الكربوهيدريت القابلة للتخمر ، (٣) pH عند البداية والقدرة التنظيمية buffering capacity للغذاء ، (٤) التركيبة الغذائية للناتج ، (٥) العوامل المثبطة لنمو ميكروبات البادئ و (٦) صفات نمو ميكروبات للبادئ . يجب أن تكون هذه البادئات سريعة النمو، سريعة فى إنتاج المواد المضادة للميكروبات ، مقاومة للفاج، مقاومة للملح وثابتة وراثياً . يحتاج الإنتاج الاقتصادى إلى إنتاج مرتفع من كتلة خلايا cell mass البادئ ، التى تقاوم عمليات التجميد والتجفيف . يجب توصيف الصفات الطبيعية والكيماوية لنواتج التمثيل الغذائى ، وتقدير أسلوب عمل هذه المواد فى تثبيط الميكروبات ، ثبات هذه المواد فى الأغذية وأختبار سلامة هذه المواد . ومع ذلك فقد تم إعتماد ثنائى الأسيتيل ، أحماض اللاكتيك والخليك كمواد آمنة معتمدة (GRAS) .

كثير من المواد الطبيعية المضادة للميكروبات يمكن أن تستخدم فى أنظمة حفظ الأغذية ، لكن قليل من هذه الأنظمة تستخدم ، وقد يرجع ذلك إلى أن

الأمر يحتاج إلى مزيد من الدراسة والبحث للتطبيق العملى فى الأغذية ، خاصة مع أنظمة حفظ أخرى . فى كثير من الحالات فإن آلية التأثير المضاد للميكروبات وكذلك تأثيرها فى النظام الغذائى غير معروف . المزارع المضادة ، خاصة بكتريا حامض اللاكتيك ، تستخدم عادة فى حفظ الأغذية المتخمرة فى المناطق الحارة . فى الولايات المتحدة الأمريكية والدول المتقدمة الأخرى ، فإن الأغذية المتخمرة مثل اليوجهورت ، اللبن الخض المتخمر ، السجق المتخمر ، الكفير Kefir ، الكوميس Kumiss والتوفو Tofu ، يزداد الأقبال عليها ، حيث تعتبر أغذية طبيعية natural وصحية healthy.

يمكن إضافة الأنظمة المضادة للميكروبات ، إلى الأغذية المبردة كمواد نقية (التضاد غير المباشر indirect antagonism) أو فى صورة مزارع حية viable و غير حية non-viable (التضاد المباشر direct antagonism). فى حالة الخلايا الحية، يضاف أعداد قليلة ، ويعتمد النظام على سرعة التكاثر وإنتاج الحموضة إذا حدث تغيير غير عادى فى درجة الحرارة .

معظم بكتريا حامض اللاكتيك من المضادات الآمنة الضعيفة حيث تكون مرحلة النمو اللاجى طويلة عندما ترتفع درجة الحرارة . ميكروب *Lb.saké* يكون فعالا عندما ينتج كميات قليلة من الحامض عند درجة حرارة أقل من ٦°م فى معلق اللحوم ، لكن ينمو سريعا عند درجة حرارة أعلى من ١٠°م ، منتجا حامض ويثبط الميكروبات ، حيث أنه مع الخلايا المشعة ، فإن أعداد كبيرة تحول الجلوكوز إلى حامض بدون نمو.

لتحسين النشاط المضاد للميكروبات لمزارع البادئ ، فإن السلالات المستخدمة فى الأغذية يمكن تعديلها وراثيا . يمكن نقل العناصر الوراثية المسئولة عن النشاط المضاد للميكروبات من نوع واحد إلى سلالة أخرى من بكتريا حامض اللاكتيك التى تنتج كمية مرتفعة من المواد المضادة للميكروبات ، أى منتج متميز superproduer . وهذا الأتجاه سوف يزيد من إصدار تشريعات رقابية خاصة بسلامة الأغذية وإثارة قضايا علمية وأخلاقية . وقد تمت الموافقة على استخدام الخمائر المهندسة وراثيا فى صناعة الخبز فى المملكة المتحدة.

ومن الفوائد الإضافية لبكتريا حامض اللاكتيك قدرتها على تدعيم فلورا الأمعاء فى الأفراد الذين يعانون اضطرابات هضمية وأمراضا معوية (يرجع إلى الفوائد الصحية للألبان المتخمرة فى الفصل الحادي عشر) .

بالرغم من التركيز هنا بصفة أساسية على استخدام بكتريا حامض اللاكتيك كمواد حافظة فى الأغذية ، فإن ميكروبات أخرى ومكوناتها قد تكون لها القدرة للعمل كمواد حافظة فى الأغذية .

وقد أخذت الإنزيمات حديثا أهتماما زائدا نظرا لقدرتها للعمل كمواد مضادة للميكروبات عند استخدامها فى الأغذية . وقد أشار بعض الباحثين إلى بعض إنزيمات جديدة محللة للبكتريا bacteriolytic enzymes وكذلك إلى كيميلء الليسوزيم واستخدامه كمادة حافظة فى الأغذية . وقد وصف بعض الباحثين عملية لحفظ اللحوم الطازجة باستخدام إنزيم محلل للبكتريا من *Streptomyces* spp. ، كما أقترح البعض إنزيمات البروتييز proteases كإنزيمات جديدة .

يوجد كيتوسان chitosan ، بوليمر طبيعى من n-acetylglucosamine ، فى جدار بعض الفطريات ويتم إنتاجه صناعيا بواسطة التحلل القلوى alkaline hydrolysis للقشريات crustacean أوكيتين الحشرات Insect chitin . يستخدم الكيتوسان chitosan فى مجالات عديدة ، تشمل استعادة البروتين protein recovery ، وتنقية purification وترويق clarification السوائل فى صناعة الأغذية . قد تستخدم بعض أملاح الكيتوسان كمواد مضادة للميكروبات فى حفظ الأغذية . وقد أظهرت بعض الدراسات أن أملاح الكيتوسان الذائبة فى الماء تؤدى إلى خفض أعداد الميكروبات الحية من *Sacch.cerevisiae* ، *E.coli* أو *Staph.aureus* بدرجة كبيرة فى خلال دقيقتين من التعرض . يعتقد أن أسلوب التأثير يرجع إلى خلل فى وظائف الغشاء وتسرب مكونات الخلايا ، حيث أن التأثير القاتل للبكتريا قد يحبط blocked بواسطة polygalacturonate . وقد وجد أن الكيتوسان (٠,٥-٢ %) فى مرق مغذى nutrient broth عند pH ٥,٥ يثبط *Staph.aureus* ، *S.typhimurium* ، *E.coli*, *Y.enterocolitica* . ويعتبر الكيتوسان مكون رئيسى فى جدار هيفات فطريات أجناس (*Absidia* ، *Mucor* ، *Rhizopus*) ، التى تستخدم فى إنتاج الأغذية المتخمرة الشرقية . بالرغم من أن

الكيتوسان من المكونات البنائية للهيفات hyphae ، فإن دورها كمادة مضادة للميكروبات أو مادة واقية protective فى هذه الفطريات غير معروف . وهناك بعض الدلائل تشير إلى أن بعض هذه الفطريات تحتوى على نشاط مضاد للميكروبات ، وقد يحتاج الأمر إلى إجراء دراسات إضافية لمعرفة إذا كان الكيتوسان له دور مضاد للميكروبات فى الأغذية المتخمرة.

يثبط البكتريوفاج البكتريا الحساسة المسببة للفساد مثل Pseudomonads فى بيئات النمو السائلة وفى اللحوم الطازجة . وقد أظهرت بعض الدراسات أن تحضين خمس سلالات من *P.flourescens* وسلالة من *P.putida* عند ٧°م مع مشابهات الفاج homolgous phages فى مرق tryptic soya ومحلول مستخلص عضلات اللحم البقرى قد أدى إلى إطالة فترة النمو اللاجى للبكتريا بحوالى ٢,٥-٥,٦ يوم .

بالرغم من أن الفاجات تتميز بمقدرة السيطرة الحيوية على الميكروبات غير المرغوبة فى الأغذية ، فإن الاهتمام قد تركز على إمكانية استخدام بكتريا صغيرة ، متحركة ، سالبة لجرام ، مفترسة predatory من جنس *Bdellovibrio* . وقد وجد أن *Bdellovibrio bacteriovorus* تكون قادرة على خفض أعداد *E.coli* K12 تحت ظروف بيئية مختلفة . فى معظم الأغذية ، البكتريا المرضية قد تكون غير موجودة أو موجودة بأعداد غير كافية بدرجة تجعل نظام الأفتراس والفريسة predator-prey system يعمل بكفاءة . وقد وجد أن *Bdellovibrio* spp. يهاجم أنواع كثيرة من البكتريا ، كما أن لها القدرة على خفض أعداد الميكروبات المسببة للفساد وكذلك المرضية . وتعتبر هذه الصفة هامة للمفترسات للبقاء survive فى هذه الأغذية حيث تكون أعداد البكتريا المستهدفة قليلة .

إصابة الفاكهة والخضراوات بعد الحصاد ومنتجات الحبوب بالفطريات تكون مسئولة عن فقد اقتصادى كبير . بالرغم من أن الكيماويات تلعب دورا هاما فى مقاومة هذه الأمراض ، فإن ذلك يرتبط بظهور مقاومة لبعض المبيدات الفطرية ، بالإضافة إلى زيادة اهتمام المستهلكين لمزيد من المعاملات الطبيعية . وقد وجد أن خميرة *Pichia anomala* لها تأثير مثبط على نمو الفطريات أثناء تخزين الحبوب ، مثل *Penicillium roqueforti, Aspregillus candidus* . كما وجد

أن الخمائر التى تم عزلها من سطح الفواكه قد تكون لها القدرة على مقاومة أمراض ما بعد الحصاد فى التفاح والموالح التى تسببها *Penicillium, Botrytis* . بالرغم من أنه تم التعرف على هذه الخمائر على إنها نوع من *Candida* spp. أو *Debaryomyces hansenii* ، فإنه فى دراسة إضافية لإعادة تصنيف هذه الخمائر تم تصنيفها على إنها *Candida guilliermondii* . وعموما لا ينظر إلى الخمائر على أنها تحتوى على صفات مضادة للفطريات . كما يمكن استخدام البكتريا كمواد مقاومة حيوية biocontrol agents لتثبيط الفساد الفطرى للفاكهة بعد الحصاد postharvest fungal spoilage . وقد استخدمت *B.subtilis* فى مقاومة العفن البنى brown rot (*Monilinia fructicola*) على النكترين nectarines ، الخوخ peaches ، البرقوق plums والكريز cherries . وقد استخدم *Enterobacter cloacae* للتغلب على نمو *Rhizopus stolonifera* على الخوخ ، واستخدم *P.cepacia* لتثبيط الفطريات الزرقاء (*P.expansum*) على التفاح والكمثرى الأمر الذى يحتاج إلى مزيد من الأبحاث للتعرف على أسلوب التثبيط أو المقاومة ومعرفة إذا كان من الممكن الوصول إلى أنظمة مماثلة للحد من أمراض ما بعد الحصاد فى الخضراوات أو مقاومة الميكروبات المرضية فى الحقل.

بكتريا حامض اللاكتيك لا تنتج بكتريوسينات فقط ، ولكن تنتج أيضا نواتج تمثيل نهائية مضادة للميكروبات مثل حامض اللاكتيك ، حامض الخليك ، ثنائى الأسيتيل ، H_2O_2 والريوترين reuterin . يرجع فترة صلاحية الأغذية المتخمرة أساسا إلى pH المنخفض نتيجة إنتاج أحماض اللاكتيك والخليك عندما تسود بنجاح بكتريا حامض اللاكتيك الفلورا الموجودة . بكتريا البادئ لا تصبح سائدة دائما ،ولكن قد يحدث ذلك بالتأكيد وذلك باستخدام بكتريا بادئ منتجة للبكتريوسين . يمكن أن يتم التضاد antagonism بطريقة مباشرة عندما تضاف بكتريا حية أو غير حية إلى الأغذية أو بطريقة غير مباشرة عندما تضاف هذه المواد فى صورة نقية إلى الأغذية.

وقد أصبح ثنائى الأسيتيل وأحماض اللاكتيك والخليك مواد حافظة آمنة معتمدة GRAS فى الأغذية ، بالرغم من أن الطبيعة العطرية الطيارة لثنائى الأسيتيل يحد من استخدامه .

كثير من البكتريوسينات قد تم تعريفها ، لكن النيسين فقط حتى الآن يستخدم على نطاق واسع تجاريا . النيسين ، الذى يستخدم لفترة أكثر من ٢٥ سنة ، تم تسجيله من ضمن المواد الآمنة المعتمدة GRAS . التوسع فى استخدام النيسين جعل من الممكن استخدام بكتريوسينات أخرى بهذه الطريقة . يستخدم النيسين للتغلب على نمو وإنتاج التوكسين بواسطة *Cl.botulinum* فى الجبن المطبوخ المبستر ، كما يستخدم النيسين للسيطرة على نمو الأنواع البرية من بكتريا حامض اللاكتيك فى البيرة والخمور وإطالة فترة صلاحية اللبن فى البلاد الناميه . تلعب الهندسة الوراثية دورا هاما فى إنتاج البادئات ذات صفات مرغوبة مثل زيادة كفاءة إنتاج البكتريوسينات بطريقة اقتصادية.

كثير من البكتريوسينات تتميز بمجال نشاط ضيق فقط ولكن يمكن تعديله وراثيا لتوسيع مجال نشاطها ضد الميكروبات . بالإضافة إلى ذلك ، فإن البكتريوسينات قد تستخدم مع مواد أخرى مضادة للميكروبات التى تسبب تأثير تعاونى synergistic effect وتوسيع مجال التأثير المضاد للميكروبات . بهذه الطريقة فإن النيسين قد استخدم مع بديوسينات pediocins ، مما يؤدى إلى تأثير تعاونى كبير ضد *List.monocytogenes* وبكتريا دليل (كاشفة) indictor أخرى . عندما تستخدم النيسين بالاشتراك مع disodium ethylene diaminetetra-acetic acid (EDTA) فأنها تؤدى إلى زيادة حساسية البكتريا السالبة لجرام . يؤدى EDTA إلى تمزيق طبقة lipopolysaccharride للغشاء الخارجى نتيجة الارتباط بأيونات المغنسيوم ، وبالتالى تسمح للنيسين بالتأثير على غشاء السيتوبلازم.

كثير من البكتريوسينات ، بالإضافة إلى النيسين ، قد تم دراستها عند مستوى الجزيئى . يمكن مقارنة قدرة المضادات الميكروبية لبكتريوسين جديد بقدرة النيسين كمضاد قياسى standard . يوجد عدد من المواصفات لمعظم البكتريوسينات الأكثر ملاءمة . قد تؤدى المعلومات المتعلقة بمجال النشاط المضاد للميكروبات وأسلوب التأثير إلى تطوير السلالة . البكتريوسينات المثالية يجب أن تكون فعالة ضد الجراثيم والخلايا الخضرية لكثير من أنواع البكتريا الموجبة والسالبة لجرام المسببة لفساد الأغذية والمرضية فى أغذية ذات ظروف بيئية مختلفة دون أن تؤثر على الصفات الحسية للغذاء . كما يجب أن تكون البكتريوسينات فعالة عند

جرعات منخفضة ، تنتج بطريقة اقتصادية ، ثابتة أثناء تخزين المركب وأثناء فترة صلاحية الغذاء وأن يكون مقبولا من الناحية السمية من الجهات الرقابية المسئولة ، مع عدم وجود دليل يشير إلى وجود مقاومة ضد الأدوية العلاجية المستخدمة . وعموما فإن التركيب البنائى لبروتين البكتريوسينات يؤدى إلى الاعتقاد أنه يمكن تحليلها بواسطة الإنزيمات المحللة للبروتينات فى القناه الهضمية فى الإنسان ، مما يجعلها غير ضارة . استخدام الهندسة الوراثية يؤدى إلى زيادة الإنتاج ، ومجال النشاط الميكروبى للبكتريوسينات.

المواد المخلبية chelating agents التى توجد طبيعيا فى النظم الغذائية تعتبر مصدرا آخر للمواد المضادة للميكروبات . الأفيدين avidin ، الذى يوجد فى بيض الدجاج ، يحرم الميكروبات من البيوتين biotin (عامل مساعد أساسي للإنزيمات) . الترانسفرنيات transferrins ، مثل الأفوترانسفرين ovotransferrin (بيض الدجاج) واللاكتوفرين lactoferrin (اللبن) يرتبط chelate بالحديد وبالتالى يجعله غير متاح للميكروبات . تعتبر هذه الميزة غير مهمة نسبيا فى الأغذية التى تتوفر فيها كمية كافية من الحديد المتاح . يثبط اللاكتوفرين lactoferrin ميكروب *List.monocytogenes* فى لبن UHT . بالإضافة إلى ذلك فإن اللاكتوفرين قد يضاف إلى أغذية الأطفال infant formula foods لمقاومة الاضطرابات المعوية فى الأطفال الرضع فى الدول النامية . يمكن تحسين تأثير الأوفوترانسفرين ovotransferrin المضاد للميكروبات ، خاصة البكتريا الموجبة والسالبة لجرام نتيجة ارتباط البروتين مع الزنك . يحدث التعاون synergism عندما يستخدم ovotransferrin بالاشتراك مع البيكربونات أو السترات أو EDTA وذلك للتغلب على السالمونيلا فى الدواجن أو فى السجق النصف جاف.

وقد أوضحت الدراسات فائدة الأنظمة الإنزيمية الطبيعية فى حفظ الأغذية . يستخدم الليسوزيم lysozyme (بيض الدجاج) للسيطرة على تخمر اللاكتات بواسطة *Cl.tyrobutyricum* ، التى تسبب عيب الغاز المتأخر فى الجبن الجافة والنصف جافة التى تملح بالطريقة الرطبة (فى محلول ملحى) . يمكن زيادة فاعلية الليسوزيم ضد الميكروبات عندما يستخدم بالاشتراك مع مركبات مثل butyl-*p*-hydroxy benzoate ، *p*-hydroxybenzoic esters ، أحماض أمينية ، أحماض

عضوية مثل الأسكوربات ascorbate ، الملح والمواد المخلبية مثل حامض الفيتيك phytic acid و EDTA. فى هذه الحالة فإن الليسوزيم بالاشتراك مع EDTA يمنع نمو *List.monocytogenes, Cl.botulinum*. التلف الطبيعى physical damage، نتيجة التجميد مثلا ، يجعل خلايا *E.coli* أكثر نفاذية لليسوزيم . يجب إجراء دراسات مسحية على إنزيمات الليسوزيم أخرى لاختيار الأنواع التى تصلح للأغذية. الهندسة الوراثية للميكروبات المناسبة سوف تؤدى إلى زيادة إنتاج الليسوزيم أو إنزيمات أخرى حتى يمكن استخدامها على نطاق تجاري . يستخدم اللاكتوبروكسيديز lactoperoxidase للتغلب على فساد اللبن وبالتالى اطالة فترة صلاحيته فىالدول الحارة حيث لا تتوفر وسائل التبريد.

وفى النهاية فإن استخدام مواد طبيعية مضادة للميكروبات كمواد حافظة حيوية biopreservatives فى الأغذية يتطلب مراعاة ما يلى:

- يمكن إنتاجها اقتصاديا على نطاق واسع.
- يجب أن تكون آمنة safe وغير سامة non-toxic .

مستقبل استخدام المواد الطبيعية المضادة للميكروبات قد تكون بالاشتراك مع أنظمة حافظة أخرى . فمثلا ، البكتريا السالبة لجرام مقاومة للنيسين والليسوزيم ولكن تصبح غير مقاومة لكل من هاتين المادتين فى وجود EDTA ، التى تمزق طبقة lippolysaccharide نتيجة الارتباط بأيونات المغنسيوم . بالإضافة إلى ذلك فإنه يوجد تأثير تعاونى synergistic بين الليسوزيم والنيسين أو *Lc.lactis* ssp.*lactis* المنتجة للنيسين ، لذلك فإن كميات أقل من هاتين المادتين يمكن استخدامها كمادة حافظة .

كما قد يستخدم المواد الطبيعية المضادة للميكروبات بالاشتراك مع معاملات طبيعية physical treatments ، مثل عمليات التسخين أو التجميد ، التى تؤدى إلى إتلاف الخلايا الميكروبية ، وبالتالى تجعل هذه الخلايا أكثر حساسية للنيسين ، الليسوزيم أو المواد الأخرى . التكنولوجيا الحديثة للحفظ باستخدام الضغط المرتفع high-pressure preservation (يرجع إلى الفصل الثاني) يكون أكثر فاعلية عند pH منخفض ، قد تستخدم بكتريا حامض اللاكتيك فى هذا النظام لتوفير الظروف الحامضية . بالإضافة إلى ذلك ، عندما تصبح البكتريا السالبة

لجرام أكثر حساسية للضغط العالى ، فإن الجرعة المستخدمة قد تسمح لبكتريا حامض اللاكتيك بالبقاء حيث تكون الخلايا الحية ضرورية لعملية التخمر . كما أن الأمر يتطلب مزيد من البحث أو الدراسة للمواد الطبيعية المضادة للميكروبات بالأشتراك مع أنظمة حافظة أخرى لتقويم فاعليتها ومدى صلاحيتها فى مجال حفظ الأغذية.

obeikandl.com

Selected References مراجع مختارة

أ – المراجع الأجنبية

- Abd El-Hady, H.M.; A.A. Moawad and A.M. Abouzeid. 1996. Vilidation of simple method for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk and Karish chees. Veterinary Medical J. Giza, 44: 209.

- Abd El-Hady, H.M.; A.M. Abdauzeid and A.A. Moawad. 1995. Prevelance of newly emerging foodbrone pathogens in hard cheese. Alex. Veterinary Sci., 11: 587.

- Adams, M.R. and M.O. Moss. 1995. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge. UK.

- Adrews, A.T. and J. Varley. 1994. Biochemistry of Milk Products. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

- Ahmed, A.H. 1989. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during preparation and storage of yoghurt. Assiut Vet. Med. J. 22: 83.

- Ali, A.A. 1994. Accelerating cheese ripening with bacterial proteinases. Ph.D. Thesis, Faculty of Agric., Ain Shams University, Cairo, Egypt.

- APHA, 1994. Standard Methods for Examination of Dairy Products. 16th edn, American Public Health Association, Washington, DC.

- Asker, A.A.; M. Gaafar; M.N.I. Magdoub and A.E. Shehata. 1982. Manufacture of Domiati cheese by direct acidification method. Egypt. J. Dairy Sci., 10:73.

obeikandl.com

- Attaie, R.; R.L. Richter and E. Risch. 1996. Production of Cottage cheese using dressing fermented Bifidobacteria. J. Dairy Sci., 79:8.
- Back, J.P.; S.A. Langford and R.G. Kroll. 1993. Growth of *L. moncytogenes* in Camembert and other soft cheeses at refrigeration temperatures. J. Dairy Res., 60:421.
- Baldwin, A.J.; H.R. Cooper and K.C. Palmer. 1991. Effect of preheat temperaturc and storage on the properties of wholc milk powder. Changes in sensory properties. Netberlands Milk and Dairy Journal, 45:97.
- Buaggi, M.M.; M.E. Johnson and E.M. Marth. 1992. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Swiss chesse. J. Dairy Sci., 75: 380.
- Cogan, T.M. and J.P. Accolas (eds). 1996. Dairy Starter Cultures. VCH Publishers, Inc. New York.
- Darwish, S.M.; E.A. El-Difrawy and R. Mashally. 1994. Compositional and microbiological properties related to bitterness in Ras cheese on market. Egypt. J. Dairy Sci. 22:11.
- Davies, F.L. and B.A. Law (eds). 1994. Advanccs in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. Elsevier Applied Science Pulishers, London and New York.
- DeVuyst, L. and R.J. Vandamme (eds). 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Application. Blackie Academic & Professional, London.
- Dillon, V.M. and R.G. Board (eds). 1994. Natural Antimicrobial Systems and Food Preservation. CAB International, Willingford, UK.

- Early, R. (ed.). 1998. The Technology of Dairy Products. 2nd edn. VCH Publishers, Inc. New York.

- El-Gazzar, F.E. and E.H. Marth. 1991. *Listeria monocytogenes* and listeriosis related to milk, milk products and dairy ingredients: A review. 1- *Listeria monocytogenes,* listeriosis and responses of pathogen to environmental conditions. Milchwissenschaft, 46:14.

- El-Gazzar, F.E. and E.H. Marth. 1991. *Listeria monocytogenes* and listeriosus related to milk, milk products and dairy ingredients: A review. II. *Listeria monocytogenes* and dairy technology. Milchwissenschaft, 46:82.

- El-Gazzar, F.E. and E.H. Mart. 1992. Salmonellae, Salmonellosis, and dairy foods : A review. J. Dairy Sci., 57:2327.

- El-Gazzar, F.E. 1993. Fate of *Escherichia coli* 0157 : H7 during manufacturing and storage of yoghurt and domiati cheese. Assiut J. Agric. Sci., 24: 185.

- El-Gendy, S.M. and M.A. Mohran and M.A. Fahmy. 1989. Influence of adding nisin to Domiati cheese milk on cheese quality and prevention of tins blowing. Assuit J. Agric. Sci., 20:121.

- El-Sadek, G.M.; A.E. Shehata; A.A. Hassan and H.A. El-Tobgi. 1975. The effect of freeze-drying on viability and activity of lactic streptococci cultures. Egypt. J. Dairy Sci., 3:95.

- El-Sadek, G.M.; S.Z. Mahmoud and A.M. Dawood. 1974. The use of nisin to combact gassniss in processed cheese. Egypt J. Microbiol. 9:9.

- El-Soda, M. 1986. Acceleration of cheese ripening : recent advances. J. Food Prot. 49:394.

- El-Soda, M.A. 1993. Accelerated maturation of chesse. Int. Dairy J., 3:531.
- El-Soda, M.A. 1993. The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. FEMS-microbiol. Rev., 12:239.
- El-Soda, M.A. and S. Pandian. 1991. Recent developments in accelerated cheese ripening. J. Dairy Sci., 74:2317.
- Farrag, S.A.; F.E. El-Gazzar and E.H. Marth. 1992. Behavior of *Escherichia coli* 0157:H7 or *Yersinia enterocolitica* at 4 or 7°C in raw milk inoculated with a commercial culture of lactic acid bacteria. Milchwissenschaft, 47:149.
- Fox, P.F. (ed.). 1993. Cheese : Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 1, 2nd edn, Chapman Hall, London.
- Fox, P.F. (ed.). 1993. Cheese : Chemistry, Physics and Microbiology. Vol. 2, 2nd edn, Chapman & Hall, London.
- Frazier, W.C. and D.C. Westhoff. 1988. Food Microbiology. 4th edn, McGraw-Hill Book Company, New York.
- Gehan, A. Moustafa. 1994. Studies on *Staphylococcus aureus* in soft cheese. M.Sc. Thesis, Faculty of Agric., Ain Shams Univ., Cairo, Egypt.
- Gilliland, S.E. (ed.). 1985. Bacterial Starter Cultures for Foods. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, USA.
- Girgis, E.S.; M.N. Hassan and L.M. Youssef. 1992. Some chemical and microbiological properties of Ras cheese in the Egyptian market. Egypt J. Dairy Sci., 20:273.
- Grappin, R.; T.C. Rank and N.F. Olson. 1985. Primary proteolysis and cheese proteins during ripening. A review. J. Dairy Sci., 68:531.

obeikandi.com

- Hagrase, A.E.; H.F. Haggage; F.M. Abo El-Naga and A.E. Shehata. 1984. Effect of direct acidification on the yield and gross composition of Ras checse. Egypt. J. Dairy Sci., 12:231.

- Harper, W.J. and C.W. Hall. 1976. Dairy Technology and Engineering. The AVI Puplishing Company, Inc., Westport, Connecticut, USA.

- Hofi, A.A.; A.E. Hagrass; F.M. Abo-El-Naga; H.F. Haggage and A.E. Shehate. 1984. Effect of direct acidification on some milk properties. Egypt J. Sci., 12: 145.

- Hofi, A.A.; A.E. Shehata; M.N.I. Magdoub and M.A. Hofi. 1979. Effect of hydrogen peroxicde-catalase treatment on the chemical quality of Ras cheese. Res. Bull. No. 974, Fac. of Agric., Ain Shams Univ.

- Holt, J.G. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore and London.

- Holt, J.G. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 2, Williams & Wilkins, Baltimore and London.

- Holt, J.G. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1, Williams & Wilkins, Baltimore and London.

- International Dairy Federation. 1994. The Significance of Pathogenic Microorganisms in Raw Milk. IDF, Belgium.

- Jones, J.M. (ed.). 1995. Food Safety. Eagan Press, Minnesota, USA.

- Khalafalla, S.M.; A.E. Shehata; M.N.I. Magdoub and A.A. Hofi. 1976. Spore-forming bacteria in buffaloes' milk. Milchwissenschaft, 31:738.

obeikandl.com

- Khalafalla, M.; G.M. El-Sadek and A.E. Shehata and M.N.I. Magdoub. 1973. Effect of H_2O-catalase treatment on coliform organisms in milk. Egypt. J. Dairy Sci., 1:13.

- Khalafalla, S.M.; G.M. El-Sadek; A.E. Shehata and M.N.I. Magdoub. 1973. Comparative study on the effect of pasteurization and H_2O – catalase treatment of milk on the chemical properties of Domiati cheese. Egypt. J. Dairy Sci., 1: 163.

- Khalafalla, S.M.; G.M. El-Sadek; A.E. Shehata and M.N.I. Magdoub. 1973. Micrococci and Streptococci in the H_2O – catalase treated milk. Annals Agric. Sci., Fac. of Agric., Ain Shams Univ., 18:49.

- Khalil, A.A.M. 1996. Studies on using different heat – shocked starters for accelerating Ras cheese. M.Sc. Thesis, Ain Shams Univ.

- Kosikowski, F.V. and V.V. Mistry 1990. Microfiltration, ultrafiltration and centrifugation separation and sterilization processes for improving milk and cheese quality. Journal of Dairy Science, 73: 1411.

- Kosikowski, F.V. 1982. Cheese and Fermented Foods, 2nd, edn., F.V. Kosikowski and Associates, Brooktondale, New York.

- Law, B.A. (ed.). 1997. Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. 2nd edn. Blackie Academic & Professional, New York.

- Lewis, J.E. 1988. Cheese Starter. Development and Application of Lewis System. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.

- Magdoub, M.N.I.; A.E. Shehata; E.O. Fayed and A.A. Hofi. 1983. Effect of added salt and capsicum tincture on sporeformers

obeikandi.com

and coliforms in pickled Domiati cheese. Egypt J. Dairy Sci., 11:140.

- Magdoub, M.N.I.; A.E. Shehata; M.A. Hofi and A.A. Hofi. 1979. Use of trace elements in accelerating ripening of Ras. Res. Bull. No. 976, Fac. of Agric., Ain Shams Univ.

- Molimard, P. and H.E. Spinnler. 1996. Review : Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheese : Origins and properties. J. Dairy Sci., 79: 169.

- Noman, A.A. 1986. Microbiological studies on Ras cheese. M.Sc. Thesis. Faculty of Agric. Ain Shams University.

- Otero, A.; M.C. Gorcia; M.L. Gareia; J.A. Samtos and B. Moreno. 1992. Behaviour of *Staph. aureus* strains FRI 137 and FRI 316 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. Int. Dariry J. 3:85.

- Picon, A.; P. Geaya; M. Medina and M. Nunez. 1995. The effect of liposome-encaprulated *Bacillus subtilis* neutral proteinase on Manchego cheese ripening. J. Dairy Sci., 78:1238.

- Ramk, T.C.; R. Grappin and N.F. Olson. 1985. Secondary proteolysis of cheese during ripening : A review. J. Dairy Sci., 68:801.

- Renner, E. and M.H. Abd El-Salam. 1991. Application of Ultrafiltration in the Dairy Industry. Elsevier Applied Science, London and New York.

- Robinson, R.K. (ed.). 1986. Modern Dairy Technology. Vol. I, Advances in Milk Processing. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.

- Robinson, R.K. (ed.). 1986. Modern Dairy Technology. Vol. 2, Advances in Milk Products. Elsevier Applied Science Publishers, London.

- Robinson, R.K. (ed.). 1990. Dairy Microbiology. Vol. 1, The Microbiology of Milk. 2nd edn., Elsevier Applied Science, London and New York.

- Robinson, R.K. (ed.). 1990. Dairy Microbiology. Vol 2. The Microbiology of Milk Products. 2nd end., Elsevier Applied Science, London and New York.

- Robinson, R.K. and A.Y. Tamime. (eds). 1991. Feta and Related Cheeses. Ellis Horwood, New York.

- Rosenthal, I.; S. Benstein and B. Rosen. 1996. Alkaline phosphatase activity in *Pencillium roqueforti* and in blue veined cheese. J. Dairy Sci., 79:20.

- Sahl, H.G. 1991. Pore Formation in Bacterial Membranes by Cationic Lantibiotics. In : Nisin and Novel Lantibiotics, ed., G. Jung and H.G. Sahl. ESCOM Science Publishers B.V., London.

- Salminen, S. and A. von Wright (eds.). Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects. 2nd edn. Marcel Dekkar, Inc. New York.

- Schlesser, J.E.; S.J. Schmidt and R. Speckman. 1992. Characterization of chemical and physical changes in Camembert cheese during ripening. J. Dairy Sci., 75: 1753.

- Shehata, A.E.; M.A. El-Nawawy; Y.M. El-Kenany and I.E.M. Aumara. 2000. Effect of some factors influencing the autolysis of some bifidobacterial strains. Annals of Agric. Sci., 8th Conf. Agric. Dev. Res. Sp. Issue.

- Shehata, A.E.; M.A. El-Nawawy; Y.M. El-Kenany and I.E.M. Aumara. 2000. Production of probiotic strawberry fermented permeate beverages. Annals of Agric. Sci., Vol. 40(3).

- Shehata, A.E.; M.A. El-Nawawy; Y.M. El-Kenany and I.E.M. Aumara. 2000. Associative growth of bifidobacteria with some other lactic acid bacteria. Annals of Agric. Sci., 8th Conf. Dev. Res., Sp. Issue.

- Shehata, A.E.; A.E. Hagras; T.E. Shehata and A.A. Ali. 1995. Acceleration of Ras cheese ripening with Liposome-entrapped *P. fluorescenes* Protease. Submitted for publication.

- Shehata, A.E.; A.M. Gaafar and Gehan, A. Moustafa. 1995. Growth and survival of enterotoxigenic *S. aureus* in Kareish cheese. Proc. 6th Egypt. Conf. Dairy Sci. & Tech., 155-168.

- Shehata, A.E.; A.M. Gaafar and Gehan, A. Moustafa. 1995. Fate of enterotoxigenic *S. aureus* in Tallaga cheese. Proc 6th Egypt. Conf. Dairy Sci. & Tech., 169-182.

- Shehata, A.E.; A.M. Gaafar and Gehan A. Moustafa. 1996. Viability of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Domiati cheese Egypt. J. Dairy Sci., 25: 135-148.

- Shehata, A.E.; G.M. El-Sadek; A.A. Hassan and H.A. El-Tobgi.1974. A study on the preserving lactic streptococci cultures by freezing. Egypt J. Dairy Sci., 2:113.

- Shehata, A.E.; G.M. El-Sadek; S.M. Khalafalla and M.N.I. Magdoub. 1975. Effect of pasteurization and H_2O_2 – catalase treatment of milk on lactic acid bacteria in Domiati cheese. Egypt J. Dairy Sci., 3:120.

- Shehata, A.E.; M.N.I. Magdoub; E.O. Fayed and A.A. Hofi. 1980. Stimulation of lactic starter cultures by filtrates from milk

obeikandl.com

cultures of some proteolytic spore-formers. 1- *B. circulans* culture filtrates. Milchwissenschaft, 35: 28.

- Shehata, A.E.; M.N.I. Magdoub; E.O. Fayed and A.A. Hofi 1980. Stimulation of lactic starter cultures by filtrates from milk cultures of some proteolytic spore – formers. 3. *B. Pumilus* culturc filtrates. Milchissenschaft, 35 : 607.

- Shehata, A.E.; M.N.I. Magdoub; E.O. Fayed and A.A. Hofi. 1983. Bacteriological quality of Domiati cheese containing different concentrations of salt and cpassicum tincture. Egypt. J. Dairy Sci., 11:91.

- Shehata, A.E.; M.N.I. Magdoub; M.A. Hofi and A.A. Hofi. 1979. Bacteriological quality of Ras cheese made from hydrogen peroxide catalase treated milk. Res. Bull. No. 975, Fac. of Agric., Ain Shams Univ.

- Shehata, A.E.; M.N.I. Magdoub; N.E. Sultan and I.M. Rowshdy. 1986. Incidence of *Bacillus cereus* in some dairy products. The 3rd Egypt. Conference for Dairy Sci & Technol. Nov. 1986. Cairo, Egypt.

- Shehata, A.E.; N.F. Meenalyer; N.F. Olson and T. Richardson, 1967. Effect of type of acid used in direct acidifation procedures on moisturc, firmness and calcium levels of cheese. J. Dairy Sci., 50: 824.

- Shehata, A.E. and N.F. Olson. 1966. Manufacture of Blue cheese by direct acidification methods. J. Dairy Sci., 49:1025.

- Shehata, A.E.; Soheir A. El-Nockrashy; Y.A. El-Samragy and B.A. Mahmoud. 1986. Effect of pre-processing treatmcnt on evaluation of bacterial flora of raw milk. Annals Agric. Sci., Fac. of Agric., Ain Shams Univ., 31: 477.

- Shehata, A.E.; S.M. Khalafalla; M.N.I. Magdoub and A.A. Hofi. 1977. The use of nisin in the production of sterilized milk drinks. Milchwissenschaft, 32: 412.

- Sulzer, G. and M. Busse. 1993. Behviour of *Listeria* spp. during the production of Camembert cheese under various condition of inoculation and ripening. Milchwissenschaft, 48:196.

- Tornadijo, E.; J.M. Fresno; J. Carballo and R. Marthin Sarmiento. 1991. Studyof *Enterobacteriaceae* throughout the manufacturing and ripening of hard goat's cheese, J. Appl. Bact., 75:240.

- Varnam, A.H. and J.P. Sutherland. 1994. Milk and Milk Products, Technology, Chemistry and Microbiology, Chapman & Hall, London.

- Visser, S. 1993. Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavour : An overview. J. Dairy Sci., 76:329.

- Wood, B.J. (ed.). 1992. The Lactic Acid Bacteria. Vol. 1, The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Elsevier Applied Science, London and New York.

- Wood, B. and W.H. Holzapeel (eds). 1995. The Lactic Acid Bacteria. Vol. 2. The Genera of Lactic Acid Bateria. Blackie Academic & Professional, New York.

obeikandi.com

ب- المراجع العربية

- جمال الدين الصادق ، سعد خلف الله ، عبده السيد شحاته . ١٩٦٨ . اختبارات وتصنيع اللبن ومنتجاته . كلية الزراعة – جامعة عين شمس . القاهرة .
- عبده السيد شحاته ١٩٦٧ . معاملات اللبن السائل . دار المعارف القاهرة.
- عبد الوهاب عبد الحافظ ، محمد الصاوي مبارك . ١٩٩٦ الميكروبيولوجيا التطبيقية . مراجعة سعد على زكي . المكتبة الأكاديمية . القاهرة .
- عبده السيد شحاته ١٩٩٩ . أمراض ناتجة عن الغذاء . المكتبة الأكاديمية . القاهرة .
- عبده السيد شحاته ١٩٩٧ . تكنولوجيا الجبن . الأسس العلمية . المكتبة الأكاديمية . القاهرة .
- عبده السيد شحاته ، محمد نبيل المجدوب . ١٩٩٨ . ميكروبيولوجيا اللبن ومنتجاته . كلية الزراعة – جامعة عين شمس . القاهرة .
- مجدى محب الدين سعد . ١٩٩١ السموم الفطرية – مشكلة ، زراعية – بيئية – صحية) . الهيئة العامة المصرية للكتاب . القاهرة .

obeikandl.com

المؤلف فى سطور

- أ.د. عبده السيد شحاتة
- من مواليد بور سعيد ١٩٣٩/٦/٨.
- حصل على بكالوريوس فى العلوم الزراعية (صناعات غذائية وألبان) . تقدير عام ممتاز من كلية الزراعة – جامعة عين شمس . عام ١٩٦٠ .
- حصل على الماجستير فى علوم وتكنولوجيا الألبان من جامعة ويسكونسن بالولايات المتحدة الأمريكية . عام ١٩٦٤ .
- حصل على درجة دكتور الفلسفة فى علوم وتكنولوجيا الألبان من جامعة ويسكونسن بالولايات المتحدة الأمريكية . عام ١٩٦٦ .
- تدرج فى وظائف هيئة التدريس بجامعة عين شمس إلى أن أصبح أستاذ تكنولوجيا وميكروبيولوجيا الألبان منذ عام ١٩٧٧ .
- وكيل كلية الزراعة – جامعة عين شمس للدراسات العليا والبحوث (١٩٨٧-١٩٩٢) .
- عميد كلية الزراعة – جامعة عين شمس (١٩٩٢-١٩٩٩) .
- عمل أستاذاً فى بعض الجامعات والمعاهد العليا بالدول العربية .
- عضو فى عدد من الهيئات واللجان والجمعيات العلمية والأكاديمية والاجتماعية.
- له ما يزيد عن ٩٠ بحثاً منشوراً فى مجال علوم وتكنولوجيا الألبان بالمجلات المحلية والأجنبية العلمية المتخصصة .
- أشرف على أكثر من ٥٠ رسالة ماجستير ودكتوراه فى مجال علوم وتكنولوجيا الألبان .
- شارك فى العديد من الأنشطة والمؤتمرات العلمية المحلية والإقليمية والدولية .
- حالياً أستاذاً متفرغاً بقسم علوم الأغذية – كلية الزراعة بجامعة عين شمس .
- حصل على جائزة جامعة عين شمس التقديرية فى العلوم الزراعية لعام ٢٠٠٠.
- مقرر اللجنة العلمية الدائمة للترقية لوظائف الأساتذة والأساتذة المساعدين فى مجال الصناعات الغذائية والألبان – المجلس الأعلى للجامعات (١٩٩٨-٢٠٠١) .
- عضو لجنة قطاع الدراسات الزراعية – المجلس الأعلى للجامعات (١٩٩٢-١٩٩٩) .
- متزوج وله بنت وولد .

المؤلف فى سطور

- أ.د. محمد نبيل إبراهيم المجدوب
- من مواليد بور سعيد ١٩٤٧.
- حاصل على بكالوريوس فى العلوم الزراعية (صناعات غذائية وألبان) من كلية الزراعة - جامعة عين شمس عام ١٩٦٧.
- حاصل على درجة دكتوراه فلسفة فى العلوم الزراعية، تخصص علوم وتكنولوجيا الألبان، من جامعة عين شمس، عام ١٩٧٤.
- يعمل حالياً أستاذاً لميكروبيولوجى وتكنولوجى الألبان بقسم علوم الأغذية، بكلية الزراعة، جامعة عين شمس، وميديراً لمركز الثروة الميكروبية للدول العربية والأفريقية.
- تولى إعداد وتنفيذ العديد من الدورات التدريبية فى مجالات الميكروبيولجى والتقنية الحيوية، قطرياً وإقليمياً.
- عضو بالعديد من الجمعيات والإتحادات العلمية القطرية والدولية.
- تولى الإشراف على أكثر من ٥٠ رسالة ماجستير ودكتوراه فى مجال علوم وتكنولوجى الألبان.
- إشترك فى العديد من الأنشطة والمؤتمرات والندوات العلمية، قطرياً ودولياً.
- متزوج وله بنت وولد.

obeikandl.com