

الفصل الثالث

بادئات الجبن Cheese starters

١- مقدمة :

تعتبر مزارع البادئات المحتوية على بكتريا حمض اللاكتيك من المواد الأساسية فى صناعة معظم أنواع الجبن وهذه المزارع يطلق عليها بادئات starters حيث أنها تبدأ أنتاج حامض اللاكتيك وهو الهدف الرئيسى من استخدامها فى صناعة الجبن . أنتاج الحموضة مع طبخ وتقليب الخثرة فى الشرش يجعل خثرة الكازين تنكمش وتطرد الشرش لأنتاج جبن بمحتوى رطوبة أقل (حيث تنخفض الرطوبة من ٨٧٪ وهى نسبة الماء فى اللبن الى ٣٥-٦٠٪) و pH أقل (من ٦,٦ فى اللبن الى حوالى ٤,٦-٥,٢) وبالتالي تتميز بقوة حفظ أفضل من اللبن . أنتاج الحموضة خلال صناعة الجبن يكون لها تأثيرات أخرى بجانب أنكماش الخثرة وطرد الشرش syneresis حيث تؤثر على نشاط وتغير طبيعة (دنترة) واحتجاز المواد المخبنة (المنفحة) فى الجبن وكذلك تؤثر على صلابة الخثرة ودرجة تحلل فوسفات الكالسيوم الغروية كما يثبط نمو كثير من الميكروبات المرضية وكذلك غير المرغوبه المسببه للعيوب pathogenic and defect-producing bacteria .

٢- نبذة تاريخية

بدأ فى استخدام البادئات لأنتاج حموضة أثناء صناعة الجبن منذ فترة طويلة قبل أن يتم التعرف على البكتريا المسببة لذلك حيث كان يحفظ اللبن على درجة حرارة الغرفة لعدة ساعات يتم خلالها تكاثر بكتريا حمض اللاكتيك الموجودة فى اللبن طبيعياً مع أنتاج حمض اللاكتيك ويستخدم اللبن الحامض المتجبن لحقن اللبن المستخدم فى صناعة الجبن ، ومازالت هذه الطريقة مع بعض الاختلافات تستخدم فى سويسرا وإيطاليا وفرنسا حيث مازالت توجد وحدات صغيرة للأنتاج بطريقة تقليدية . الشرش الناتج من صناعة الجبن عادة يحضن عند درجة حرارة مناسبة لأستخدامه فى اليوم التالى فى صناعة الجبن . جميع البادئات المستخدمة حالياً فى صناعة الجبن نشأت بهذه الطريقة حيث أنتقلت بين صناعات الجبن من جيل الى آخر وأستمرت هذه الطريقة البدائية فى إنتاج البادئات حتى نهاية القرن

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

٣- أنواع البادئات

يستخدم بصفة أساسية نوعان من البادئات فى صناعة الجبن :

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

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

ويتوقف اختيار البادئ على نوع الجبن المراد إنتاجه فمثلاً بادئات mesophilic

تستخدم فى صناعة جبن التشدر والجودا والمعركة بالفطر والكمبير بينما تستخدم بادئات thermophilic فى صناعة أنواع الجبن السويسرية والإيطالية . هذا الاختيار عادة يكون مرتبطاً بطريقة الصنائه حيث أن الأنواع السويسرية والإيطالية تطبخ على درجة حرارة مرتفعة (٥٠-٥٥°م) لذلك يجب أن يكون البادئ المستخدم قادراً على مقاومة الحرارة المرتفعة وتتوفر معلومات أكثر عن بادئات الحرارة المعتدلة عن بادئات الحرارة المرتفعة مما يدل على أن الجبن التى تصنع ببادئات الحرارة المعتدلة تنتج بكميات أكبر .

الجدول (١-٣) يوضح بكتريا حمض اللاكتيك (LAB) Lactic Acid Bacteria

وبعض صفاتها الهامة . وعادة تستخدم المقدرة على النمو عند درجة ١٠°م ، ٤٥°م لتمييز أنواع البكتريا المحبة للحرارة المعتدلة عن أنواع البكتريا المحبة للحرارة المرتفعة بينما الفحوص الميكروسكوبية وقياس كمية ونوع مشابهاة isomers حامض اللاكتيك الناتج والمقدرة على تمثيل السترات (فى الأنواع المحبة للحرارة المعتدلة) تستخدم فى تمييز معظم الميكروبات داخل هاتين المجموعتين .

جدول ١-٣ : الصفات المميزة لكريا جنس اللاكتيك الموجودة في مزارع البادئات .

الميكروبات	الاسم اللاتيني	الشكل	اللون في البيئات	أحزان صيد اللاكتيك في البيئات	أحزان صيد اللاكتيك في البيئات	مصدر isomer	قبل السنوات من الأرتين	إنتاج الأمونيا عند (٥°)	السموم	تجسس
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	<i>Sr. thermophilus</i>	كروي	-	-	L	-	-	+	-	+
<i>Lactobacillus helveticus</i>	unchanged	عصوي	-	-	DL	-	-	+	+	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lb. bulgaricus</i>	عصوي	-	-	D	-	-	+	+	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. lactis</i>	عصوي	-	-	D	-	-	+	+	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Cocci cremoris</i>	كروي	+	+	L	-	-	+	+	±
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Sr. lactis</i>	كروي	+	+	L	-	-	+	+	+
<i>Leuconostoc lactis</i>	unchanged	كروي	-	-	D	±	+	+	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lenc. cremoris</i>	كروي	-	-	D	+	+	+	-	+

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

٣-١- بادئات الحرارة المعتدلة المختلطة السلالة

Mixed strain mesophilic cultures

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

- أ - L type ويحتوى على *Leuconostoc* spp.
- ب - D type ويحتوى على *Cit⁺ lactococci* قادرة على تخمر السترات (*diacetylactis*).
- ج - DL type ويحتوى على النوعين السابقين (L & D types).
- د - O type ولايحتوى على أى نوع من الأنواع القادرة على إنتاج مكونات الطعم والنكهة.

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

بعض مزارع البادئات تكون لها حساسية خاصة للفاج التى تقلل ، أو فى بعض الحالات الشديدة توقف إنتاج حامض اللاكتيك . فى هولندا فإن مزارع الحرارة المعتدلة المختلطة السلالات التى تم تنميتها تجارياً دون أخذ الاحتياطات اللازمة لحماية هذه المزارع من الفاجات التى مصدرها الهواء يطلق عليها مزارع P (P cultures) ويطلق (P) على المزارع التى تم إنتاجها تحت الظروف العادية لتمييزها عن المزارع المماثلة التى تم إعدادها تحت ظروف معقمة فى المعمل التى يطلق عليها L cultures حيث ترمز (L) لكلمة المعمل laboratory ويجب عدم الخلط بين هذه المزارع (L) التى تم إعدادها فى المعمل والمزارع (L) التى تحتوى على *Leuconostoc* والمنتجة لمكونات الطعم والنكهة ويطلق عليها L.cultures . ومزارع الـ (P) أكثر مقاومة للفاج عن مزارع (L) وقد تحتوى على أعداد مرتفعة من الفاج (قد يصل إلى ١٠^٨ /مل) دون أن تؤثر على مقدرة هذه المزارع على إنتاج الحموضة وهذه المزارع يطلق عليها phage "own" لتمييزها عن الأنواع المعروفة بالـ disturbing phage التى تثبط من إنتاج الحموضة . تحتوى مزارع (L) على سلالة واحدة أو أكثر ولذلك تكون أكثر عرضة للأصابة بالفاج وأفضل مزارع (P) هى التى يتم تحضيرها وتحفظ عند درجة حرارة (-٨٠م) فى معمل بحوث الألبان بهولندا (NIZO) حيث يتم تنميتها تحت ظروف مراقبة بدقة وتوزع إلى مصانع الجبن .

٣-٢- بادئات الحرارة المعتدلة معرفة السلالة

Defined strain mesophilic culture

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

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

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

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

٣-٣- بادئات الحرارة المرتفعة Thermophilic starters

تمثل البادئات المحبة للحرارة المرتفعة أهمية خاصة فى مصانع الجبن الصغيرة فى فرنسا وسويسرا وإيطاليا حيث يصنع جبن الجروير والأمتال والجرانا وغالبا ما يتم إنتاج هذه المزارع بتحصين الشرش الناتج من اليوم السابق على درجة ٤٠-٤٥ م طول الليل وتتكون الميكروبات الموجودة فى هذا الشرش أساسا من *S.salivarius* subsp. *thermophilus* (وقد يوجد *Enterococci & Lactococci*) وعدة أنواع من *Lactobacillus* مثل *Lb.helveticus*, *Lb.fermentum*, *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis* and *Lb.acdophilus* . مزارع الشرش الطبيعية المنخفض الحموضة low-acid natural whey culture التى يسود فيها *S.salivarius* subsp. *thermophilus* استخدمت فى الماضى ولكن حديثاً يستخدم مزارع الشرش المرتفعة الحموضة high-acid whey cultures وتتكون أساساً من *Lactobacilli* وقد بذلت جهود كبيرة لتنقية هذه المزارع . حين الأمتال أكثر عرضه لظهور عيب يطلق عليه التخمرات الثانوية secondary fermentation التى تتميز بإنتاج غاز CO₂ بكميات زائدة ويسبب أنتفاخ الجبن بعد تخمر حمض البيروبيونيك ويعتقد أن ذلك يعزى إلى النشاط الزائد لبكتريا حمض البيروبيونيك (PAB) ولكن وجد فيما بعد أنه يرجع إلى استخدام *Lb.helveticus* ذات نشاط زائدة فى تحليل البروتين والذى يؤدي الى زيادة نمو بكتريا حمض البيروبيونيك وإنتاج زائد من غاز CO₂ وقد أمكن الحد من هذه المشكلة فى الأنتخاب الدقيق لمزارع البادئ وتجميع المزارع

المختلطة من مصانع الجبن التي تنتج جبن أمنتال مرتفعه الجودة والتي تم اختيارها من حيث إنتاج الحموضة وتحليل البروتين والثبات أثناء التخزين وكفاءتها فى صناعة الجبن وتسمى هذه المزارع تحت ظروف مراقبة بدقة لتوزيعها على مصانع الجبن .

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

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

ب - بكتريا حمض لاكتيك عسوية محبة للحرارة المرتفعة *a thermophilic lactobacillus* :
أو *Lb.delbruckii* subsp. *bulgaricus* و *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis*

Lb.helveticus

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

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

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

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

عند درجة ٣٧°م لمدة ٧٢ ساعة) .

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

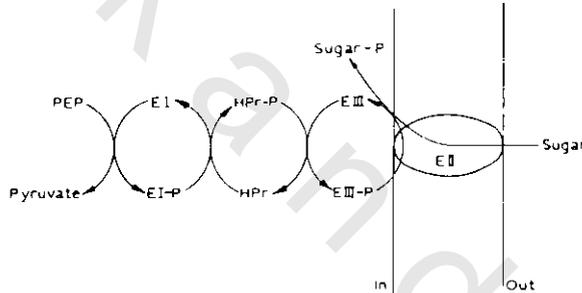
وقد اقترح بيتتين أخريتين تعطى نتائج مقبولة ، فى البيئة الأولى يمكن التعرف على *Cit⁺ lactococci* بواسطة قدرتها على تمثيل السترات بينما يمكن تمييز *L.lactis* subsp. *cremoris* عن *L.lactis* subsp. *lactis* بعدم قدرتها على إنتاج الأمونيا (NH_3) من الأرجنين، والبيئة الثانية تكون مفيدة جداً فى التمييز بين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

٤- التمثيل الغذائي Metabolism

٤-١- نظام انتقال اللاكتوز Lactose transport

تحتاج بكتريا حمض اللاكتيك LAB الى كربوهيدريت قابلة للتخمر لإنتاج الطاقة والنمو. يوجد في اللبن اللاكتوز ، سكر ثنائي يتكون من الجلوكوز والجالاكتوز، يحتاج انتقال اللاكتوز إلى طاقة ولكن ميكانيكية إنتقال اللاكتوز في جميع بادئات LAB غير معروفة تماماً بالتحديد ، فينما تستخدم *S.salivarius subsp. thermophilus* القوة المحركة للبروتونات (PMF) proton motive force تستخدم Lactococci مجموعة نظم انتقال translocation systems تتضمن نظام (PEP) phosphoenolpyruvate (PTS) phospho-transferase system . في نظام PMF ينتقل اللاكتوز نتيجة فرق الجهد لأختلاف التركيز على جانبي غشاء الخلية بينما في نظام PTS حيث يتحول اللاكتوز الى لاكتوز فوسفات lactose-P أثناء عملية الأنتقال ولا توجد معلومات متوفرة عن نظم أنتقال اللاكتوز في thermophilic lactobacilli أو Leuconostocs . يوجد نظام PTS فقط في البكتريا التي تخمر السكر باتباع مسار glycolysis ومن غير المحتمل أن يوجد في *Leuconostoc* والتي تخمر السكر باتباع مسار phosphoketolase pathway حيث يوجد فرق في تركيز أيونات الأيدروجين على جانبي غشاء الخلية ، فاله pH داخل الخلية يميل الى القلوية مما يسبب فرق جهد كهربى electrical potential عند غشاء الخلية. وهذا الفرق في الجهد الكهربى مع الفرق في الـ pH داخل وخارج الخلية يكونان معاً نظام PMF . وغالباً ما يتضمن نظم PMF انتقال جزيء ثان الى داخل أو خارج الخلية بصورة منتظمة بواسطة بروتينات حاملة توجد في مواقع معينة على غشاء الخلية specific membrane-located carrier proteins ويطلق عليه peramease . وعموماً فإن اللاكتوز ينتقل كما هو في *Lactobacillus, Leuconostoc spp.* المحبه للحراره المرتفعة بواسطة نظام permease system حيث يتحلل بواسطة β -galactosidase (β -gal) إلى جلوكوز وجالاكتوز. وطبقاً للميكروب فإن الجلوكوز يتحلل باتباع سواء مسار glycolytic pathway كما في *S.thermophilus, Lactobacillus spp.* أو مسار phosphoketolase pathway كما في *Leuconostoc spp.* بينما يتحلل الجلاكتوز من خلال مسار Leloir pathway . و *Lb. lactis* لا يخمر الجلاكتوز ولكن يفرزه خارج الخلية لذلك فإن من الضروري استخدام *Lb. helveticus* أو سلالات من *Lb. lactis* Gal⁺ (قادرة على تخمر الجلاكتوز) في بادئات الجبن السويسرية حيث تقوم هذه البكتريا بتخمر الجلاكتوز الناتج

بواسطة *S. thermophilus* بالإضافة إلى بقايا اللاكتوز وهذا يضمن خلو الجين من السكر بعد التملح الرطب ويساعد في تجنب نمو البكتريا التي تسبب بعض العيوب في الجين .
 وفي *Lactococci* ينتقل اللاكتوز بواسطة (PEP/PTS) حيث يتحول اللاكتوز إلى لاكتوز فوسفات Lactose-P وينتقل إلى داخل الخلية. وهذه العملية معقدة (شكل ١-٣) ويحتاج إلى Mg^{2+} وأربع بروتينات ، اثنتين منهما (أنزيمات II, III) مرتبطة بغشاء الخلية ونوعية السكر بينما النوعين الآخرين (أنزيم I وبروتين مقاوم للحرارة ومنخفض الوزن الجزيئي HPr) بروتينات ذائبة وتوجد في جميع نظم الانتقال PEP/PTS . يتحلل اللاكتوز فوسفات داخل الخلية بواسطة p-β-gal إلى جلوكوز الذى يتحلل باتباع مسار glycolytic بينما الجللاكتوز ٦- فوسفات باتباع مسار tagatose (tagatose مشابه stereoisomer للفركتوز) .



شكل ١-٣ : نظام PEP/PTS لانتقال السكر في *Lactococci*

EI : أنزيم I ، EII : أنزيم II ، EIII : أنزيم III

HPr بروتين مقاوم للحرارة حامل للفوسفات

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

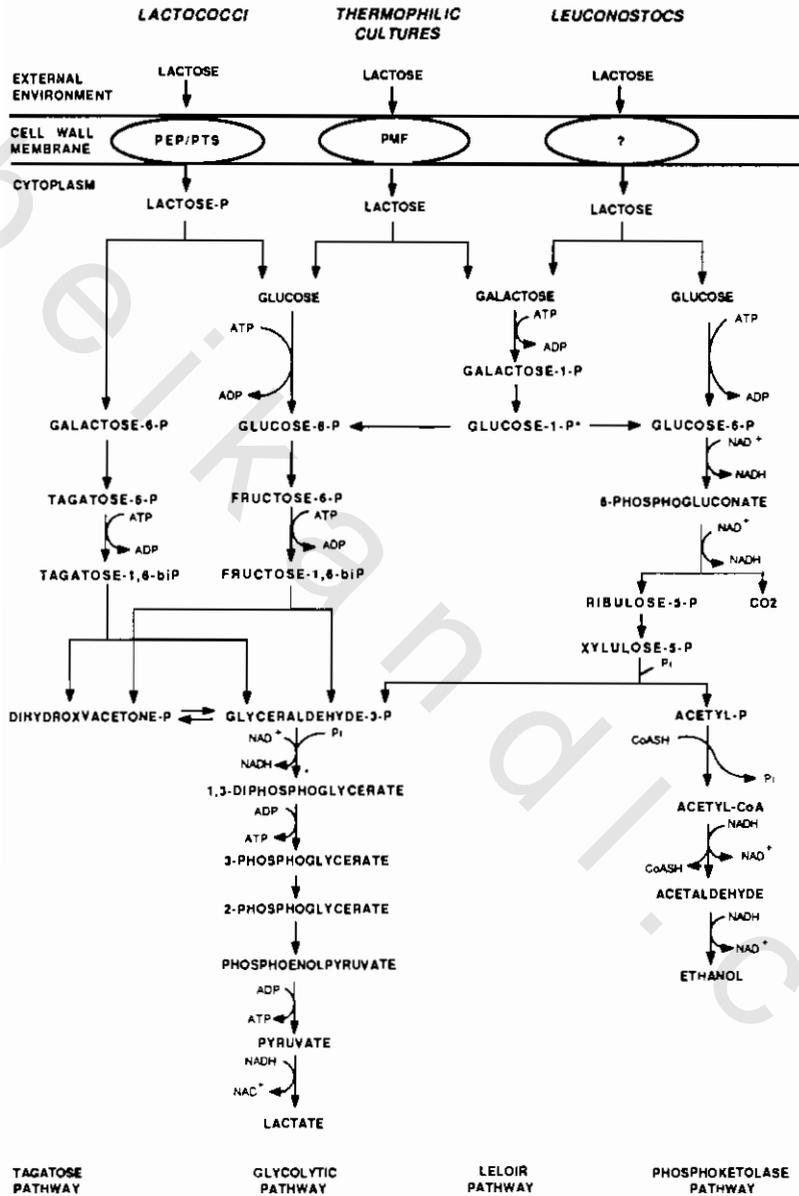
S.salivarius subsp. *thermophilus* لا يوجد بها PTS ولا p-β-gal وتخمّر اللاكتوز بسرعة . وفي نظام PMF ينتقل اللاكتوز كما هو بينما في نظام PTS ينتقل اللاكتوز في صورة لاكتوز فوسفات ويتحلل اللاكتوز بداية بواسطة β-gal إلى جلوكوز وجلالكتوز بينما لاكتوز فوسفات يتحلل بواسطة p-β-gal إلى جلوكوز وجلالكتوز -6- فوسفات والشكل (٢-٣) يوضح ملخص لمسارات تمثيل اللاكتوز بواسطة بكتريا حمض اللاكتيك المختلف الموجودة في مزارع البادئات .

٢-٤-٢- تمثيل اللاكتوز Lactose metabolism

١-٢-٤-٤ في Lactococci

في هذا النوع من البكتريا ينتقل اللاكتوز الى داخل الخلية بواسطة نظام PTS في صورة لاكتوز فوسفات حيث يتحلل الى جلوكوز وجلالكتوز -6- فوسفات بواسطة p-β-gal . يتخمّر الجلوكوز بإتباع مسار glycolytic pathway بينما يتخمّر الجالكتوز من خلال عدة مشتقات tagatose : glyceraldehyde-3-P & dihydroxy acetone-P التي تدخل بعد ذلك في التفاعلات النهائية لتحليل السكريات glycolysis (شكل ٢-٣) وبالرغم من أن tagatose مركب مشابه stereoisomer للفركتوز إلا أن أنزيمات مختلفه تشارك في تكوين فركتوز-6- فوسفات، تجتوز-6- فوسفات وفركتوز -١ و -٦- ثنائي الفوسفات (FDP) وتجتوز -١ و ٦ ثنائي الفوسفات (TDP) . وأنزيم TDP aldolase له بعض النشاط على FDP ولكن FDP aldolase ليس له نشاط على TDP والتفاعلات النهائية لتمثيل كل من الجلوكوز والتجتوز متشابه وينتج عنها أختزال البيروفات إلى لاكتات وتتكون فقط L-lactate . وبصفة عامة يتكون L-lactate كناتج وحيد للتخمّر ولكن عندما تنمو هذه البكتريا في وجود الجالكتوز ، المالتوز أو مستوى منخفض من الجلوكوز ، فإن نواتج أخرى تتكون من تمثيل البيروفات بالإضافة الى L-lactate مثل الفورمات fomate ، الأيثانول ethanol والخلات acetate والشكل (٣-٣) يبين مسارات تكوين هذه النواتج .

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



شكل ٢-٣: المسارات المختلفة لتمثيل اللاكتوز في بكتيريا حمض اللاكتيك

جوع للخلايا starvation فإن تركيز (FDP) يكون منخفضاً وتركيز (Pi) يكون مرتفعاً ويؤدي ذلك إلى إيقاف نشاط أنزيم PK وبالتالي زيادة في تركيز فوسفواينول بيروفات (PEP) .

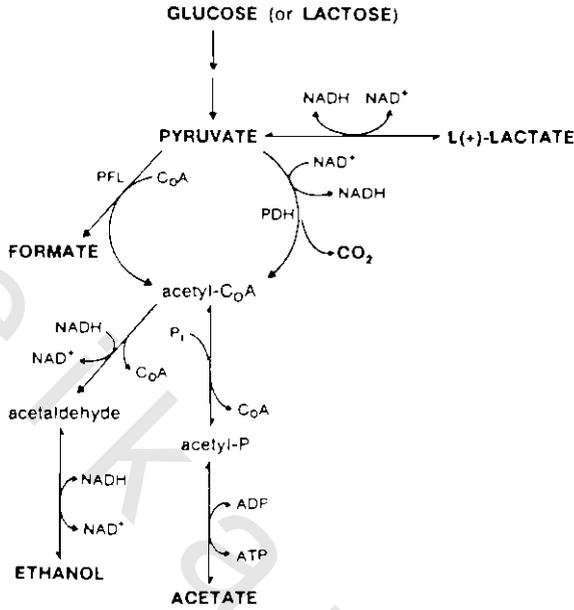
٤-٢-٢- في *Leuconostoc*

في هذا النوع من البكتيريا يتحلل اللاكتوز إلى جلو كوز وجللا كوز بواسطة β -gal ويتخمّر الجلو كوز باتباع مسار phosphoketolase pathway ليكون اللاكتات والأيثانول وغاز CO_2 بكميات مولية متساوية بينما يتحول الجلاكتوز باتباع مسار Leloir الى جلو كوز-٦- فوسفات باستخدام أنزيمات galactose-1 puridyl transferase, UDP-4-epimerase (شكل ٢-٣) . يتكون لاكتات وأيثانول نظراً للحاجة إلى توليد NAD^+ لاستمرار عملية التخمر . وعلى عكس بكتيريا Lactococci ، يتكون D-lactate . وفي حالة تمثيل الجلو كوز والسترات معاً فإنه يؤدي إلى التحويل من إنتاج الأيثانول إلى إنتاج خلات وإنتاج كمية أكبر من اللاكتات عن المتوقع بالنسبة لكمية الجلو كوز المستخدمة ويعزى ذلك إلى تحويل كل البيروفات الناتجة من كل من السترات والجلو كوز إلى لاكتات لتوليد NAD^+ .

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

ينتقل اللاكتوز في هذا الميكروب عن طريق نظام PMF ويتحلل اللاكتوز بواسطة β -gal والذي يتكون في الخلايا النامية في وجود الجلو كوز ولكن يزداد إلى ضعفين ، ٤ أضعاف بواسطة اللاكتوز والجلاكتوز على التوالي . ومع ذلك فإن جزيئات الجلو كوز فقط يحدث لها تمثيل ويفرز الجلاكتوز بكميات متساوية مولياً مع اللاكتوز المستخدم . معظم سلالات هذا الميكروب لا تستخدم الجلاكتوز (Gal) ، كما أن الأنواع القادرة على استخدام الجلاكتوز Gal^+ wild-type تفرز الجلاكتوز عندما تنمو في وجود اللاكتوز ولكنها تخمر الجلاكتوز في وجود تركيز منخفض من اللاكتوز (٣,٥ ملليمول) ويتم تخمير الجلو كوز باتباع مسار glycolytic pathway .

بالإضافة إلى هذا فإن هذا الميكروب لا يستخدم PEP في انتقال اللاكتوز وبالتالي فإن الدور المنظم لأنزيم (PK) قد لا يكون مهماً في هذا الميكروب كما هو الحال في Lactococci . وعلى عكس Lactococci ، فإن هذا الميكروب يخمر السكريات تخميراً متجانساً homofermentative حتى عندما ينمو في وجود تركيزات منخفضة من الجلو كوز أو اللاكتوز ومع ذلك فإن كميات صغيرة من الفورمات (أقل من ١٪ من السكر الكلي المتخمر) تتكون من السكر .



شكل ٣-٣: تمثيل البيروفات في Lactococci

PFL: pyruvate-formate lyase, PDH: pyruvate dehydrogenase

٤-٢-٤- في Thermophilic Lactobacilli

هذه البكتريا تحتوي على كل من β -gal, p - β -gal ولكن هناك كثير من المعلومات تدل على احتمال وجود β -gal فقط في هذه البكتريا . وقد وجد أن *Lb. helveticus* فقط وعدد قليل من سلالات *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* تخمر الجلكتوز. جميع سلالات *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ومعظم سلالات *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* لا تخمر الجلكتوز والميكروبات الأخيرة ، تشبه *S. salivarius* subsp. *thermophilus* ، تفرز الجلكتوز بكميات موليه مساوية لللاكتوز المستخدم عندما تنمو في وجود اللاكتوز ، وبعض السلالات تخمر الجلكتوز ولكن فقط في حالة وجود تركيز منخفض من اللاكتوز (٤,٠ ملليمول) وتخمر السكر في هذه الميكروبات يتم بأتياع مسار glycolysis مع تكوين مشابهاة مختلفه isomers من اللاكتات والتي تكون مفيدة في التعرف على الميكروبات وأنتاج كل من الصورتين isomers قد يعزى الى وجود أنزيمين

من LDH هاتين الصورتين أو وجود أنزيم واحد من LDH وأنزيم racemase الذى يحول إحدى هاتين الصورتين إلى الصورة الأخرى. وقد وجدت أنزيمات racemases فى عدد قليل من سلالات LAB ولكن لا توجد فى مزارع البادئات وبالتالي فإن إنتاج L- & D- Lactate يعزى بصفة عامة الى وجود أنزيمين متخصصين من LDH والجدول (٢-٣) يبين ملخص لنظم انتقال وتمثيل اللاكتوز فى بادئ LAB.

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

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

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

تتكون الخلات واللاكتات من المكونات الرئيسية الناتجة من تمثيل السكر فى وجود كميات زائدة من lipoate بينما يحل acetoin محل الخلات فى وجود محدود من lipoate. ويمكن زيادة إنتاج ثنائي الأستيل بإضافة hemin إلى *Cit⁺ lactococci*.

فوق أكسيد الأيدروجين (H_2O_2) مرتبط مع SCN^- و lactoperoxidase (LP) مثبت قوى لبعض Lactococci. ويوجد كل من SCN^- , LP طبيعياً فى اللبن ويمكن أن ينتج H_2O_2 نتيجة تهوية اللبن أثناء النمو. يتلف LP عند درجة حرارة حوالى 80°C لذلك فإن التثبيط لا يحدث عادة فى اللبن المستخدم لإنتاج البادئ.

جدول ٢-٣: الصفات المميزة لتمثيل اللاكتوز في بدائل بكتريا حمض اللاكتيك

صور اللاكتات Isomer of lactate	نواتج التحلل Products (mol/ mol lactose)	أنزيم التحلل Cleavage enzyme	مسار التحلل (a) Pathway	نظام إنتقال (a) اللاكتوز Transport	البكتروب Organisms
L	4 Lactate	p-β-gal	GLY	PTS	Lactococcus
D	2Lactate+2Ethanol+2 CO ₂	β-gal	PK	?	Leuconostoc
L	2Lactate ^c	β-gal	GLY	PMF	<i>S.salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
D	2Lactate ^c	β-gal	GLY	PMF?	<i>Lb.delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
D	2Lactate ^c	β-gal	GLY	PMF?	<i>Lb.delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
L+D	4Lactate	β-gal	GLY	PMF?	<i>Lb.helveticus</i>

هذه الأبرع تحمل فقط شئ البلكتروب من اللاكتوز (a) PER, phosphotransferase system; PMF, proton motive force (b) Gly, glycolysis; PK, phosphoketolase. (c) اللاكتوز

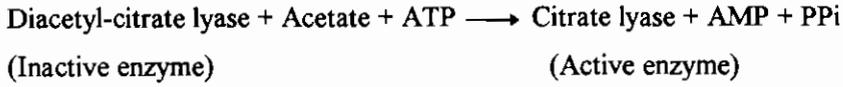
٤-٢-٦- اللاكتات في الجبن Lactate levels i`n cheese

يبلغ محتوى جبن الكمبير ، السويسريه ، النشدر والرومانو من اللاكتات بعد الصناعة ١,٠ ، ١,٤ ، ١,٥ ، ١,٧ ٪ على التوالي والصور السائدة من اللاكتات فسي الجبن هي L-lactate . في الأصناف الهولندية يصل تركيز اللاكتوز عند الكبس حوالي ١,٤ ٪ والذي يكون نظرياً حوالي ١,٤ ٪ حامض لاكتيك . ونتيجة لفقد اللاكتات فسي الشرش وخلال عملية التملح الرطب فإن تركيز اللاكتات قد يصل الى حوالي ١,٢ ٪ . يحدث تمثيل لللاكتات فسي الجبن إلى مكونات أخرى ، فسي جبن الكمبير تتحول إلى H_2O , CO_2 بواسطة الفطريات التي تنمو على سطح الجبن ، و فسي الجبن السويسرية فإن كل من L & D-lactate تتحول إلى بروبيونات و خلات ، CO_2 بينما في الجبن النشدر فإن L-lactate قد تتحول إلى D-lactate أو إلى خلات بواسطة بكتريا حمض اللاكتيك من غير البادىء (NSLAB) .

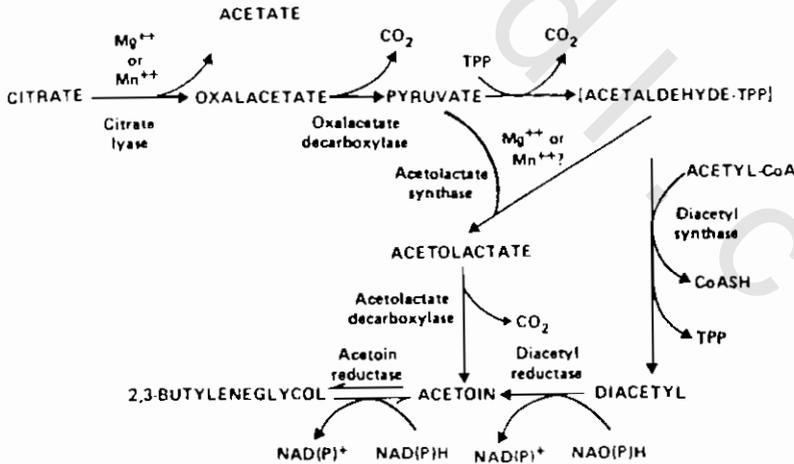
٤-٣- تمثيل السترات Citrate metabolism

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

من بين بإدات LAB فإن البكتريا المنتجة لمكونات الطعم فقط (*Cit⁺ L.lactis subsp. lactis*) وكذلك (*Leuconostoc spp.*) في المزارع المحبة لدرجات الحرارة المعتدلة تخمر السترات ، حيث لا يستخدم السترات كمصدر للطاقة ولكن يتخمر بسرعة في وجود كربوهيدريت قابلة للتخمر بأتباع المسار الموضح في الشكل (رقم ٤-٣) . وينتقل السترات إلى داخل الخلايا بواسطة أنزيم permease ويتحلل إلى oxalacetate بواسطة (*citrate lyase (CL)* . ويتكون هذا الأنزيم (CL) في خلايا *Cit⁺ lactococci* ويمكن حثه في *Leuconostoc spp.* حيث يحتاج إلى عملية acetylation بواسطة أنزيم آخر (*citrate lyase ligase*) لتنشيطه :



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



شكل ٤-٣: تمثيل السترات فى *Lactococci, Leuconostoc*

كما يمكن إنتاج الـ acetoin من ثنائي الأسيتيل بواسطة أنزيم acetoin dehydrogenase (الاسم القديم diacetyl reductase) و (BG) 2,3-butylene glycol من الـ acetoin بواسطة أنزيم BG dehydrogenase (الاسم القديم acetoin reductase). وقد وجد أن هذه التفاعلات تتم بواسطة أنزيم واحد في *Enterobacter aerogenes* و *Saccharomyces cerevisiae* وبواسطة أنزيمين في *E. coli*. وفي *L. lactis* subsp. *lactis* Cit⁺ يمكن عزل وتنقية أنزيمين من BG dehydrogenase و كلا منهما يؤثر على acetoin & diacetyl. بالرغم من أن التأثير على diacetyl أكبر بكثير منه على acetoin في مخلوط منهما إلا أن الـ acetoin له الأسبقية في الاختزال. درجة pH المثلى للأنزيم I ١٠,٠ و للأنزيم II ٨,٥ عندما يختبر مع BG ٦,١ ، ٧,٠ ، عندما يختبر مع acetoin ٨,٥ ، ٦,١ ، عندما يختبر مع diacetyl على الترتيب. والنواتج التي تتكون من diacetyl بواسطة أنزيم I كانت meso-BG, acetoin والتي تتكون بواسطة أنزيم II كانت BG, acetoin نشطاً ضوئياً. وقد يتكون مشابهي من acetoin (L & D) وثلاث مشابهي من BG (L, D & meso) ويعتقد أن الأنزيم I, II مسئولين عن إنتاج مشابهي مختلفه من الـ acetoin.

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

المزارع النقية من Cit⁺ lactococci والـ Leuconostocs تختلف تماماً في سلوكها في تمثيل السترات. الميكروب الأول (Cit⁺ lactococci) لا ينتج diacetyl وينتج كمية ضئيلة من acetoin من السكريات في غياب السترات ومع ذلك فإنه من الضروري أن تتوفر الأنزيمات ومادة التفاعل (البيروفات) ويعزى ذلك إلى حاجة الميكروب إلى تحويل كل البيروفات إلى لاكتات حتى يمكن إنتاج NAD⁺ اللازم لاستمرار تحليل السكريات glycolysis. عندما تستهلك السترات فإن Cit⁺ lactococci تنتج كميات كبيرة من acetoin والخلات وكميات ضئيلة من diacetyl و BG. وجود hemin⁺, Fe²⁺, Cu²⁺. أيضاً يزيد من إنتاج diacetyl بواسطة Cit⁻ lactococci بينما في نفس الوقت يحدث انخفاض في استهلاك السترات. وعلى العكس ينتج Leuconostocs اللاكتات والأيثانول

وغاز CO₂ بكميات مولية متساوية من الجلو كوز ولاتنتج أيثانول ، diacetyl, acetoin, أو 2,3-BG من تمثيل الجلو كوز والسترات معاً ونتيجة لذلك فإن الخلات واللاكتات تنتج بكميات أكبر من المتوقع بالنسبة للسترات والسكر المستخدم. والبيروفات الناتجة من السترات وكذلك الناتجة من الجلو كوز يختزلان إلى لاكتات مع زيادة في إنتاج اللاكتات و NAD⁺.

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

يتوفر قدر محدود من المعلومات عن تمثيل السترات في الجبن ويعتقد أن diacetyl, يساهم في طعم جبن التشدر ولكن هناك قليل من النتائج تؤكد إنتاج ثنائي الأستيل ، acetoin, BG في الجبن ولم تشير إلى اختفاء السترات وقد وجد حوالي ١ ميكروجرام ثنائي الأستيل/ جرام في الجبن الناتجة باستخدام Cit⁻ lactococci . وقد وجد أن الجبن المصنعه باستخدام Cit⁻ L. lactis subsp. cremoris AM2 تحتوي في البداية على كميات كبيرة من acetoin (تصل إلى ٨٠ ميكروجرام/جرام) ولكن سرعان ما يختفي acetoin خلال التسوية والذي يكون مصحوباً بزيادة مقابلة في تركيز BG وفي الجبن الناتجة باستخدام Cit⁺ L. lactis subsp. cremoris HP يتكون مستوى منخفض من acetoin (حوالي ٣٠ ميكروجرام / جرام) الذي ينخفض بدرجة بطيئة جداً خلال التسوية ولم يتكون BG . وعندما تصنع الجبن باستخدام Cit⁺ L. lactis subsp. lactis DRCI فإن تركيز diacetyl يصل إلى ١١,٣ ميكروجرام/جرام بعد ٥ أيام من التسوية ثم ينخفض إلى حوالي جزء واحد في المليون بعد ١٠٠ يوم وقد كان مستوى الـ acetoin ثابت عند حوالي ١٥ ميكروجرام / جرام خلال فترة التسوية بينما مستوى BG يختلف من ١٠٠ إلى ١٨٠ ميكروجرام/جرام . ومن غير الطبيعي لسلاسلات Cit⁻ lactococci أن تنتج كميات كبيرة من acetoin ومع ذلك فإن بكتريا حمض اللاكتيك من غير البادىء (NSLAB) مثل mesophilic Lactobacilli & Pediococci يمكن أن تصل إلى أعداد كبيرة (حوالي ١٠^٨/جرام) في الجبن وتكون قادرة على تمثيل السترات .

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

يمكن أن تحول اللاكتات إلى خللات وتوقف الكمية الناتجة على أعداد ونوع البكتريا وعلى معدل انتقال الأوكسجين خلال أغشية التغليف ويبدو أن الأوكسجين ضرورى لتكوين الخللات بواسطة *Pediococci* وليس ضرورياً لـ *Lactobacilli* .

٤-٤- تمثيل البروتين Protein metabolism

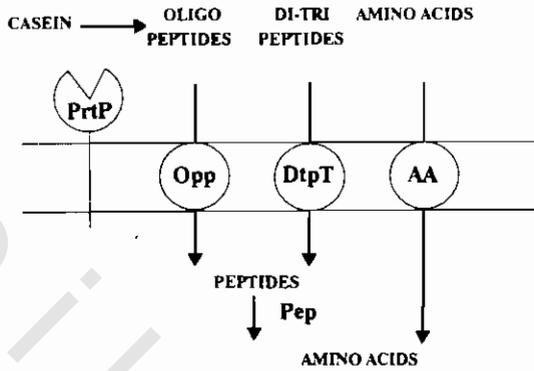
من المعروف أن نمو سلالات *Lactococci* المختلفة تحتاج الى ٤-١٥ حمض أمينى مختلف سواء فى صورة حرة أو بيتيدات قابلة للهضم . وتركيز الأحماض الأمينية الحرة والبيتيدات فى اللبن لا تكفى إلا للحصول على ٢٥٪ فقط من كتلة الخلايا الكلية التى يمكن الحصول عليها فى المزارع العادية كاملة النمو .

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

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

- ١- نظام بروتينيز والذى يحلل الكازين إلى بيتيدات عديدة .
- ٢- نظام بيتديز قادر على تحليل البيتيدات العديدة إلى أحماض أمينية وبيتيدات صغيرة .
- ٣- أنظمة انتقال *transport systems* لأمتصاص الأحماض الأمينية والبيتيدات .
- ٤- أنزيمات بيتديز خلوية (داخلية) *intracellular peptidases* لتحليل البيتيدات إلى الأحماض الأمينية المكونه لها .

والشكل (٥-٣) يبين تخطيطاً لتحلل الكازين خارج الخلية وانتقال نواتج التحلل وتغللها داخل الخلية في الـ Lactococci .



شكل ٥-٣ : رسم تخطيطي للخطوات المختلفة لتحلل الكازين في Lactococci

PrtP : أنزيم بروتينيز موجود في غلاف الخلية

Opp : نظام انتقال الببتيدات العديدة oligopeptides

DtpT : حامل انتقال ثنائي- ثلاثي الببتيدات

AA : أنظمة انتقال لمختلف الأحماض الأمينية

Pep : أنزيمات بيتديز

٤-٤-١- أنزيمات بروتينيز Proteinases

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

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

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

and β -caseins - α_1 بالإضافة إلى κ -casein .

٣- PII (PI/PIII) . درجة pH المثلى قريبة من التعادل (٦,٥) ودرجة الحرارة المثلى ٣٠م ونشاطه النوعى بين النوعين السابقين ويعتقد أن نشاط PII قد يعزى إلى التباين

فى ثبات PI تحت ظروف التفاعل المستخدم لتمييز PI و PIII .

يوجد تكافل بين *S.salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* فى بادئات الحرارة المرتفعة حيث ينتج Lactobacilli أحماض أمينية وخاصة glycine, valine, histidine التى تنشط Streptococci وخاصة نشاط أنزيم proteinase . تنتج Streptococci غاز CO₂ وفورمات من السكر الذى ينشط Lactobacilli .

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

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

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

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

٤-٤-٣- أنزيمات الببتيداز Peptidases

تتضمن الخطوة الثانية في الاستفادة من الكازين لتحليل الببتيدات العديدة الكبيرة نسبياً إلى مركبات أصغر بواسطة أنزيمات peptidases . ولا يوجد نشاط لأنزيم carboxypeptidase في بادئات LAB ولكن يمكن تنقية أنزيمات amino peptidases di-and tri-peptidases و عدة أنزيمات أخرى تقوم بتحليل الببتيدات المحتوية على بروتين . ونظراً لارتفاع محتوى الكازين من البرولين فقد أهتم الباحثون بالتعرف على أنزيمات peptidases التي تعمل على بيئات محتوية على بروتين وقد أمكن تنقية ٥ أنواع من الأنزيمات : a proline imino peptidase, an amino peptidase P, an imidodipeptidase(prolidase), an imidodipeptidase(prolinase), X-prolydipeptidyl aminopeptidase(XPDAP). بعض هذه الأنزيمات توجد في غلاف الخلية ولكن XPADP يوجد داخل الخلية وتختلف أنزيمات peptidases في الوزن الجزيئي من ٣٦ الى ٩٥ kD كما أنها قد تكون من نوع serine أو metallo . وقد أمكن عزل وتنقية أنزيمات XPDAPs من عدة بادئات LAB وتشمل Lactococci *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* *Lb.delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb.helveticus*, وكذلك *S.salivarius* subsp. *thermophilus*.

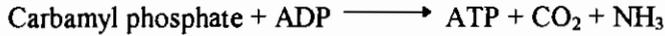
٤-٤-٤- انتقال الأحماض الأمينية والببتيدات

Amino acid and peptide transport

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

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

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



والأنزيمات المشتركة هي : arginine deiminase, ornithine transcarbamylase,

carbamate kinase, على التوالي مع إنتاج ATP . وأحد الصفات الرئيسية التي تميز

L.lactis subsp. *cremoris* من *L.lactis* subsp. *cremoris* هو القدرة على تمثيل الأرجنين .

جميع سلالات *L.lactis* subsp. *cremoris* خالية من نشاط أنزيم deiminase كما أن

البعض خالي من أنزيم transcarbamylase . جميع السلالات تحتوي على نشاط أنزيم

carbamate kinase .

٤-٥-٤ المرارة Bitterness

تعتبر المرارة مشكلة في بعض أنواع من الجين التي تصنع باستخدام بادئات الحرارة

المرتفعة وقد يعزى ذلك إلى إنتاج ببتيدات مرة bitter peptides ، التي يسود فيها الأحماض

الأمينية الكارهه للماء hydrophobic amino acids، بفعل المنفحة وبكتريا البادئ.

تشير كثير من النتائج أن جميع سلالات البادئ تسبب مرارة ويمكن أن لاتسبب

مرارة إذ تم مراقبة معدل تكاثرها أثناء صناعة الجين (مثلاً باستخدام درجات حرارة عالية

في الطبخ أو في وجود الفاج) حتى تصبح أعداد الخلايا في الخثرة قليلة نسبياً . تظهر

المرارة نتيجة زيادة تحليل الببتيدات المرة وغير المرة بواسطة الأعداد المرتفعة من الخلايا .

يوجد عدد من البادئات تنتج ببتيدات مرة فقط ولكن يمكنها أن تحلل هذه

الببتيدات . الملح يقلل نفاذية خلايا بكتريا البادئ وتزيد من الارتباط بين الببتيدات المرة.

كل من هذين العاملين يؤدي الى تقليل الببتيدات المتاحة لأنزيمات البروتينيز المرتبط بغشاء

الخلية . ويؤدي تراكمها إلى إنتاج جين ذات طعم مر . المصادر الرئيسية للببتيدات المرة

تكون في المنطقة الواقعة من ٨٤-٨٩ و ١٩٣-٢٠٩ في السلسلة الببتيدية للـ β -casein .

٤-٥-٤ الأستالدهيد Acetaldehyde

ينتج الأستالدهيد بواسطة كل من بادئات الحرارة المعتدلة mesophilic والحرارة

المرتفعة thermophilic ولكن تنتج بادئات النوع الثاني كميات أكبر (تصل إلى حوالي ٢٠

ميكروجرام/مل) ويعتبر الأستالدهيد مكون هام من مكونات الطعم في اليوجهورت ولكن

قد يسبب طعم غير مرغوب فيه off-flavors في الألبان المتخمرة الناتجة باستخدام البادئات

المحبة للحرارة المعتدلة وخاصة إذا إنخفضت النسبة بين ثنائي الأستيل والأستالدهيد إلى ١:٣ . والنسبة المثالية بينهما يجب أن تكون ١:٤ .

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

٤-٦- قياس النمو Measurement of growth

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

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

$$m = K/2.303$$

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

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

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

يمكن قياس قيم pH بسهولة وعادة يستخدم الأنخفاض فى pH نتيجة لإنتاج حمض اللاكتيك فى قياس النمو . ومع ذلك فإن pH ليس مرتبطاً ارتباطاً مباشراً بأعداد الخلايا أو إنتاج حمض اللاكتيك ولا يمكن استخدامه فى حساب GTs . وبادئات LAB تنتج كميات كبيرة من حامض اللاكتيك لذلك فإن بيئات النمو يجب أن تنظم buffered بطريقة مناسبة . اللبن وخاصة الذى يرفع فيه الجوامد اللادهنية إلى ١٠-١٢٪ يحتوى عادة على قوة تنظيمية جيدة . وينخفض pH المزارع النامية فى اللبن تماماً من ٦.٥ فى البداية إلى ٤.٥ ، ٤.٥ ، ٣.٥ فى النهاية وذلك للمزارع المحبة للحرارة المعتدلة ، *S.salivarius* subsp. *thermophilus* والمحبة للحرارة المرتفعة من Lactobacilli على التوالي ومثل هذه المزارع تحتوى على عدد من الخلايا حوالى ١٠^٩/مل .

درجة النمو عند أى نقطة تحدّد بواسطة ٣ عوامل : معدل التلقيح ، درجة حرارة ومدة التحضين . وفى بادئات الحرارة المعتدلة يكون معدل التلقيح ٠.٥٪ ودرجة حرارة التحضين ٢١°م لمدة ١٦ ساعة . تحت هذه الظروف يتجبن اللبن فى ١٦ ساعة حيث ينخفض خلالها pH إلى ٤.٥ ويرتفع تركيز اللاكتات إلى حوالى ٠.٧٪ . بفرض أن الحموضة فى البداية فى اللبن كانت ٠.١٥٪ وهذا يعادل حموضة كلية تقدر - ٠.٨٥٪ فإن إنتاج حمض اللاكتيك يتوقف عند ٠.٤-٠.٥٪ (٤.٨-٥.٠ pH) .
ضمن بادئات الحرارة المرتفعة بصفة عامه عند ٤٠-٤٥°م لمدة ٦ ساعات مع التلقيح بمعدل ٠.٥٪ . تحت هذه الظروف *S.thermophilus* تنتج حوالى ٠.٥٪ حامض لاكتيك

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

٥- مثبطات نمو البادئات Inhibitors of culture growth

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

٥-١- المضادات الحيوية Antibiotics

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

٥-٢- البكتريوسينات Bacteriocins

البكتريوسينات عبارة عن بروتينات لها تأثير مثبط bacteriostatic أو قاتل bactericidal ضد البكتريا المرتبطة وهذه البكتريوسينات التى تفرزها بكتريا حمض اللاكتيك ثم تنقيتها ودراسة أهم صفاتها (جدول ٤-٣) . وجميع هذه البكتريوسينات

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

المركوب	البكتريوسين	البكتريا الحساسة	البكتريا القوية	أسلوب التأثير	الوزن الجزيئي	التأثيرية الحيوية
سلالات مختلطة من <i>Lh. acidophilus</i>	Lactacin B & F	Thermophilic Lactobacilli Pantococci	Mesophilic Lactobacilli Clostridia Enterobacteria <i>Pr. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> Lactococci	Bactericidal and Bacteriostatic	٢٠٠٠-٢٥٠٠	١ ساعة ١٠ x ١٠ ^٦ دقيقة
سلالات مختلطة من <i>Lb. helveticus</i>	Lactocin & Helveticin	Thermophilic Lactobacilli	<i>En. faecalis</i> Mesophilic Lactobacilli	Bacteriostatic and Bactericidal	١٢٤٠٠-٢٧٠٠٠	١٠٠٥ x ١٠ ^٦ ساعة ١٠ ^٦ ساعة
<i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i>	Nisin	Lactococci Clostridia Staphylococci	-	Bactericidal	٢٥٠٠	١٥ x ١٠ ^٦ دقيقة
<i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i> biov. <i>diacetylactis</i>	Bacteriocin	Listeria Other Lactococci <i>Str. thermophilus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>S. aureus</i>	Thermophilic Lactobacilli <i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i> Streptococci	-	-	١٠٠-٢٥ x ١٠ ^٦ ساعة
سلالات مختلطة من <i>L. lactis</i> spp. <i>cremoris</i>	Lactococcin, Diphlococin & Lactostreptin	Enterobacteria Other Lactococci	*Gram negative Bacilli Macrococci Enterococci Pseudomonas Faltobacteria Lactococci Staphylococci Micrococci Thermophilic Lactobacilli, Salmonella <i>E. coli</i> , <i>Yersinia</i>	Bactericidal	-	١ x ١٠ ^٦ ساعة ١٠ ^٦ ساعة
سلالات مختلطة من <i>Ped. acidilactici</i>	Pediocin & Bacterocin	Other neutrococci <i>L. monocytogenes</i> <i>L. autototococci</i> Mesophilic Lactobacilli <i>S. aureus</i> <i>Cl. perfringens</i> <i>Pr. putida</i>	Bactericidal and Bacteriostatic	-	١٢٥٠٠-٢٧٠٠	١٥ x ١٠ ^٦ دقيقة

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

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

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

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

وفي عام ١٩٨٨ وافقت إدارة الأغذية والأدوية FDA في الولايات المتحدة الأمريكية على استخدام النيسين في عدد محدود من مفروقات الجبن المبستر *pasteurized cheese spreads* حيث أن المحتوى المرتفع من الرطوبة والمحتوى المنخفض من الصوديوم لا يمنع مخاطرة تكوين سم البوتيلين *botulinal toxin* في الناتج .

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

الفاج عبارة عن دقائق أو جسيمات *particles* بالغة الصغر في الحجم بدرجة لا يمكن رؤيتها إلا بالميكروسكوب الإلكتروني بعد استخدام طرق صبغ مناسبة . وجميع الفاجات لها رأس منشورية متعدد الأوجه يتراوح طول مقطعها العرضي بين ٥٠-١٠٠ ملليميكرن عبارة عن غلاف بروتيني يوجد بداخلها جزيء مفرد من DNA ويمثل في حجمه العديد من البلازميدات . وفي معظم هذه الفاجات يلحق بالرأس ذيل يتكون من أنبوبة مركزية حلزونية (التي يمر من خلالها DNA الفاج عند غزو الخلية البكتيرية) محاطة بطبقة حلزونية قابلة للتقلص متصلة من أسفلها بصحيفة قاعدية *base plate* تتصل بألياف ذيلية رفيعة وطويلة ، وهذه الألياف هي أعضاء الأنتصال بالخلية العائل.

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

أ - دورة التحلل : *Lytic cycle*

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

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

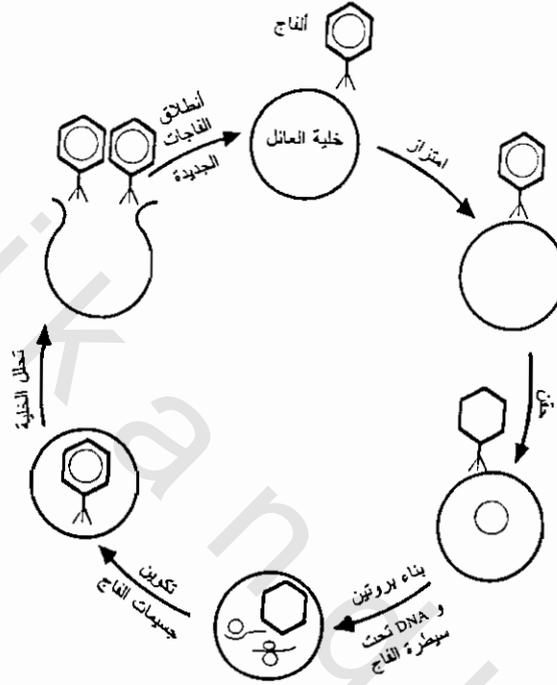
يتولى السيطرة على وظائف الخلية لكي يقوم ببناء DNA وبروتينات الفاج لمضاعفة نفسه بمعدل أكبر من خلايا العائل وأخيراً تنفجر الخلايا وينطلق منها جسيمات فاج حر يمكن أن تصيب خلايا جديدة لذلك يطلق على هذه الفاجات "الفاجات الضاربه virulent phages" وتعرف الفترة من الإصابة بالفاج حتى انطلاق الفاج بفترة التحضير latent period وعادة تكون قصيرة (٤٥-٦٠ دقيقة) ويكون عدد الفاجات الناتجة عند الانفجار مرتفعاً حيث يصل إلى ٢٠٠/خلية لذلك فإن إصابة الخلايا بمثل هذه الفاجات يمكن أن تؤدي إلى أضرار قدرتها خلايا البادئ تماماً على النمو وإنتاج حامض اللاكتيك وقد وجد أن فترة دورة التحلل للفاج PI-1 الذي يصيب *Lb. casei* ٢٧٠ دقيقة وعدد الفاجات الناتجة ٢٠٠/خلية بينما للفاج LL-N الذي يصيب *Lb. lactis* فهي ٢٤٠ دقيقة وعدد الفاجات الناتجة ١٠٠/خلية أما بالنسبة ل*Lactococci* فإن متوسط دورة التحلل ٤٥ دقيقة (تتراوح من ٣٢-٥٦ دقيقة) وعدد الفاجات الناتجة ٣٥/خلية (تتراوح من ٢-١٠٥).

التباين في معدلات نمو الفاج وخلايا العائل يوضح حساسية المزارع النامية للإصابة بالفاج. الأنزيمات المحللة المرتبطة بالفاج (lysins) قد تكون مسئولة عن تثبيط المزارع المختلطة التي يكون فيها أحد السلالات المكونة قد أصيبت بفاج محلل lytic phage يؤدي إلى إنتاج كميات كبيرة من lysin الذي قد يؤثر على غيرها من السلالات.

ب - الدورة اللايسوجينية (الدورة المولدة للتحلل) Lysogenic cycle

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

الأخر متعدد اللايسوجينية multilyogenic أى يفرز اثنين أو أكثر من الفاجات المختلفه وعموماً فإن الفاجات عادة ما تصيب نوع واحد فقط من البكتريا وأن كان من الممكن أن يصيب عدد من الفاجات نوعاً واحداً من البكتريا .



شكل ٦-٣: دورة تحلل خلية العائل المصابه بالفاج

الطبيعة اللايسوجينية lysogenic nature لمعظم السلالات قد تؤدي إلى الاعتقاد أن مثل هذه السلالات هي المصدر الرئيسي للفاجات الضارية virulent phage في تخمرات الألبان وأن التخلص من السلالات التي تفرز الفاج تلقائياً من باديئات الجين تساهم في خفض مستويات الفاج في البيئة . كما وجد آخرون أنه لا يوجد تشابه بين فاجات اللايسوجينية lysogenic وفاجات التحلل lytic لعدد من سلالات Lactococci مما يدل على أن الفاجات المعتدل temperate ليست مصدراً لفاجات التحلل (الضارية) وبالرغم من أن الفاجات قد وجدت في بعض الباديئات مختلطة السلالة إلا أن مصدرها الأساسي مازال يحتاج إلى تحديد .

ما زالت المعلومات محدودة فيما يتعلق بأعداد الفاج التي تسبب مشاكل فى صناعة الجين. تلوث المزرعة نفسها بالفاج تعتبر أكثر أهمية من تلوث لبن الجين. وقد أشار البعض إلى أن ما بين ٦٠٠ إلى ٦٠٠٠ فاج/مل يكون ضرورياً لإبطاء صناعة الجين بينما أوضح البعض أن عدد ١٠٠ فاج/مل فى البداية مع معدل تكاثر 1×10^7 قد يؤثر بشدة على إنتاج الحموضة أثناء صناعة الجين كما وجد الباحثين أن متوسط أعداد الفاج 1×10^4 /مل، $4, 2 \times 10^4$ /مل فى الشرش الناتج عند صرف الشرش وعند الطحن على التوالي. هذه المستويات تدل على أن العدد الأولي يتراوح بين ٥-٥٠٠٠٠ فاج/مل وعند المستوى الأقل فإن ذلك يعادل حوالى ٠.١ مل من الشرش الناتج عند مرحلة الطحن لكل ٦٠٠٠ لتر من اللبن. ومن الواضح أن هذا المعدل يعتبر مستوى منخفض جداً من التلوث والأمر يحتاج إلى اتخاذ إجراءات وقائية مناسبة للحد من هذا التلوث.

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

هناك طريقتان مختلفتان لكشف وعد الفاج لبكتريا حمض اللاكتيك المصابه وتبسيط إنتاج الحموضة وبصرف النظر عن الطريقة المستخدمة فإن مصدر الفاج يجب أن يتم ترشيحه من خلال مرشحات معقمة ($0.45 \mu m$) قبل اختبارها. وتجرى عملية طرد مركزى لبادئ الصناعة bulk starter قبل أن يتم ترشيح الرائق، بينما الشرش عادة يرشح مباشرة ومثل هذا الشرش قد يسد غشاء المرشحات ولكن يمكن التغلب على ذلك بإجراء طرد مركزى أو ترشيح أولى للشرش خلال مرشح عادى قبل مرشح التعقيم. يعتبر أيونات الكالسيوم (Ca^{2+}) ضرورياً لعملية التصاق الفاج بسطح خلايا العائل ولكن يرسب فى بيئات تحتوى على منظم فوسفات phosphate buffer وقد أمكن التغلب على ترسيب (Ca^{2+}) باستخدام بيئات تحتوى على منظم glycerophosphate التى تستخدم لـ Lactococci ، *S.salivarius* subsp. *thermophilus* ولكنها مثبطة لعديد من أنواع thermophilic lactobacilli ويفضل بيئة MRS لهذه الأنواع من البكتريا.

فى طريقة plaque يضاف التخفيف المناسب للمصدر المراد تحليله والذى سبق ترشيحه بمرشحات تعقيم مع Ca^{2+} والبكتريا العائل إلى بيئة آجار معلق (معلق M17 أو MRS تحتوى على ٠,٧٪ آجار) الذى يصب بسرعة على آجار صلب فى طبق بترى. وبعض أنواع الفاج المحب للحرارة المعتدلة mesophilic phage يتضاعف بدرجة أسرع عند $21^{\circ}C$ بينما البعض الآخر عند $35^{\circ}C$ لذلك فإن الأطباق يجب أن تحضن عند $21^{\circ}C$ ، $30^{\circ}C$ ، $37^{\circ}C$. عند درجة $30^{\circ}C$ ، $37^{\circ}C$ يمكن رؤية البلاك plaque بعد ٥ ساعات تحضين (ويعنى

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

في طريقة تثبيط الحموضة acid inhibition method يضاف التخفيف المناسب للمصدر المراد اختياره والذي سبق ترشيحه. عرشحات تعقيم الى عينات من اللبن المبيستر واللبن المعقم ويلقح بيكتريا العائل المناسب . ومن الأمور المهمة التحضين على درجات حرارة مختلفة ، كما سبق الإشارة ، وعادة يحضن عند ٢١°م لمدة ١٢ ساعة ، ٣٠°م لمدة ٦ ساعات وعند درجات الحرارة المستخدمة في صناعة الجبن لمدة ٦ ساعات (٩٠ دقيقة عند ٣٠°م يتبعها رفع درجة الحرارة الى ٣٩°م في خلال ٤٥ دقيقة ويحافظ على هذه الدرجة للفترة المتبقية وهي ٣ ساعات و ٤٥ دقيقة) وذلك للمزارع المحبة للحرارة المعتدلة. وتحضن المزارع المحبة للحرارة المرتفعة عند ٤٢°م لمدة ٤ ساعات . وبعد التحضين يقدر pH ويقارن بـ pH في عينه المقارنه والتي لا تحتوي على شرش . الاختلاف في حدود ٠,٣ وحدة pH أو أكثر عن عينة المقارنة يدل على احتمال الإصابة بالفاج .

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

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

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

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

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

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

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

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

- ١- يجب تنشيط مزارع البادىء تحت ظروف معقمة .
- ٢- المعاملة الحرارية للبن البادىء النهائى يجب أن تكون كافية للقضاء على الفاج ، كما يجب أن يملأ خزان البادىء تماماً (سعته القصوى) وإلا فإنه من الضرورى إجراء معاملة حرارية لمدة طويلة للتخلص من الفاج فى الحيز الهوائى .
- ٣- يجب استخدام التناوب اليومى daily rotation لسلالات البادىء التى لاترتبط بالفاج أو السلالات المقاومة للفاج فى صناعة الجبن .
- ٤- الترشيح الجيد للهواء فى غرفة تحضير البادىء وفى صالة الإنتاج يساعد على السيطرة على مشكلة الفاج .
- ٥- يجب تطهير المعدات بطريقة ملائمة مثل أستعمال الحرارة أو المواد الكيماوية المطهرة .
- ٦- موقع غرفة البادىء يجب أن يكون بعيداً عن منطقة الأنتاج وصالة تداول الشرش مما يقلل من أحتمال التلوث عن طريق الهواء .
- ٧- يجب التأكد من أن عمال المصنع خصوصاً العاملون فى صالة الجبن لايسمح لهم بدخول غرفة تحضير البادىء .
- ٨- تنشيط مزرعة البادىء فى البيئات المثبطة للفاج .
- ٩- يجب عدم أستخدام سلالات مزارع البادىء الحساسة للفاج التى صنفت بأن لها فترة سكون قصيرة ولها حجم انفجار كبير .
- ١٠- رش الحيز الهوائى لغرفة تحضير البادىء بمحلول الهيبوكلورايت وأستخدام الأشعة

فوق البنفسجية للحد من الفاج في الجو المحيط .

١١- إنتاج تطوير سلالات مقاومة للفاج .

١٢- يجب استخدام البادئات المختلطة للسلالة .

٤-٥- بقايا المواد المنظفة والمطهرة

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

تلوث لبن البادئ بهذه المركبات يرجع لأخطاء بشرية أو عطل في دورة الغسيل الأتوماتيكية. لذلك يجب التأكد من أن دورة الشطف تستغرق وقتاً كافياً لإزالة هذه المركبات الكيماوية من خزان البادئ النهائي .

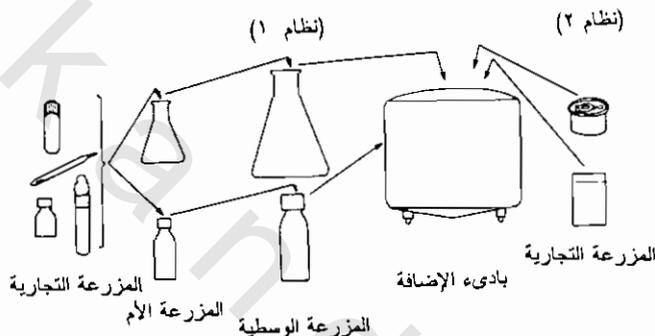
٥-٥- مواد أخرى مثبطة للنمو

يحتوى اللبن على مضادات حيوية طبيعية (لاكتينين /lactenins / اجلوتينين agglutinins) يمكنها وقف نمو مزارع البادئ . هذه المضادات حساسة للحرارة وتؤدي معاملة اللبن حرارياً الى القضاء عليها . تبتلع كريات الدم البيضاء الموجودة في لبن المواشى المصابه بمرض التهاب الضرع بكتريا البادئ ولا تؤدي المعاملة الحرارية الى تحسن ملحوظ . وقد وجد أنه بالرغم من أن مزارع بادئ البوجهورت قد يحدث له تثبيط إذا كان ٣٥٪ من اللبن يحتوي على عدد كبير من الخلايا الجسمية somatic cells ، إلا أن غلى اللبن لمدة ٢ ق أو تسخينه عند درجة ٩٠م لمدة ٢٠ ق يؤدي الى إيقاف فعل المواد المثبطة ويساعد على التكوين الطبيعي للحموضة.

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

قد يوجد مثبطات أخرى في اللبن ترجع الى التلوث البيئي مثل المبيدات والتي يمكن تنبيط نمو ميكروبات البادىء .

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



شكل ٧-٣: تحضير بادىء الاضافة Bulk starter culture

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

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

٦- إنتاج مزارع البادىء : Production of starter cultures

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

تعتبر من مصادر الخطر الرئيسية فى الصناعة إلا أنها تستخدم على نطاق واسع .
حتى بداية هذا القرن كانت صناعة الجبن تمارس على مستوى المزارع farms وكانت تنتج المزارع بالسماح لبكتريا حمض اللاكتيك الموجودة عرضاً فى اللبن لتتكاثر وتنتج كمية كافية من الحموضة لتجنبه . وعندما أصبح إنتاج الجبن على مستوى المصانع فقد انشئت الشركات والمعامل التى تقوم بإنتاج المزارع والأنزيمات وغيرها من مستلزمات إنتاج صناعة الجبن وفى البداية كانت تجهز المزارع فى اللبن المضاف عليه كربونات كالسيوم $CaCO_3$ ليتعادل جزئياً مع الحمض المتكون . هذه المزارع السائلة يكون لها فترة حفظ قصيرة (أقل من أسبوع) وأستبدلت تدريجياً بواسطة المزارع المحففة تحت تفريغ والتى تتميز بفترة حفظ أطول ولكن تحتاج إلى عدة تنشيطات لتحضير الكميات الضرورية المطلوبه لإنتاج بادئات الأضافة (الصناعة) . وعادة تستخدم المزارع بمعدل ١-٢٪ لذلك فإن المصنع الذى يقوم بتصنيع ٥٠٠,٠٠٠ لتر لبن فى اليوم إلى جبن يحتاج إلى ٥٠٠٠ لتر بادىء أضافة فى اليوم (أى ٥٠ لتر من اللقاح) . وفى منتصف الستينات أستبدلت المزارع المحففة تحت تفريغ vacuum dried cultures بالمزارع المجمدة المركزه frozen concentrated cultures وهذه المزارع تحتفظ بنشاطها لفترة طويلة تصل الى عدة شهور بالتخزين تحت ظروف التجميد ولا تحتاج عملية تنشيط subculturing وإنما تستخدم مباشرة لتلقيح بيئة بادىء الأضافة . فى خلال العشر سنوات الماضية وجد أن التجميد freeze drying له تأثير مماثل للتخزين المجد فى المحافظة على أعداد كبيرة من الخلايا مع قدرات جيدة لإنتاج الحموضة ولكن لسوء الحظ فإن جميع المزارع ليست مقاومة للتجميد وعادة تضاف المواد الواقية من التجميد cryoprotective agent إلى المزارع قبل التجميد وتتميز المزارع المحفدة بسهولة النقل والتخزين . البيئات التى تتكون أساساً من اللبن أو الشرش والمحتوية على مصادر أخرى من العناصر الغذائية (مثل مستخلص الخميرة) تستخدم للنمو. تضبط درجة الحرارة عند $30^{\circ}C$ pH ٦,٠ ل *S.salivarius* subsp. *thermophilus* وعند $42^{\circ}C$ و pH ٥,٥ لبكتريا حمض اللاكتيك العصوية المحبة للحرارة المرتفعة thermophilic lactobacilli وتستخدم الصودا الكاوية NaOH وأيدروكسيد الأمونيوم NH_4OH فى معادلة الحموضة وتحمص الخلايا من المزارع بواسطة الطرد المركزى أو بالترشيح الغشائى membrane filtration . يستخدم التخمير على دفعات مع التقليب الخفيف لخلط القلوى ويمكن أن يؤدي ذلك الى تثبيط إنتاج فوق أكسيد الأيدروجين H_2O_2 كما قد يحافظ على جو النتروجين أعلا المزارع لتمنع من دخول الأوكسجين إلى البيئة ويجب الأهتمام بتنمية المزارع عند pH ثابت حيث أنه عند pH أعلا من ٦,٠ فإن

مزارع Prt⁻ (غير القادرة على تحلل البروتين) تتراكم بمعدلات مرتفعة وتؤدي الى عدم أتران بين السلالات.

كما أمكن إنتاج مزارع فائقة التركيز *superconcentrated cultures* لأستخدامها فى التلقيح المباشر للبن الجبن بطريقة مماثلة وهذه المزارع مرتفعة التكاليف ولكنها تستخدم بكثرة فى المصانع الصغيرة حيث لا تحتاج إلى وسائل إنتاج بادئات الأضافة. يحتوى بىادىء الأضافة على أعداد من البكتريا حوالى ١٠^{١٠} /مل حيث أن المزارع المركزه والفائقة التركيز تحتوى على حوالى ١٠^{١١} خلية/جرام ، ١٠^{١٣} خلية/جرام على التوالى .

٦-١- طرق حفظ المزارع *Methods of cultures preservation*

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

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

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

١- مزارع البىادىء السائل *Liquid starter cultures* .

٢- مزارع البىادىء المجفف *Dried starter cultures* .

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

ب - مركزة (مجفدة *freeze-dried*) .

٣- مزارع البادىء المجمدة Frozen starter cultures

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

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

مزارع البادىءات (١) ، (٢-أ) و (٣-أ) تستخدم عادةً لإنتاج بادىء الأضافة بالطريقة التقليدية (شكل ٧-٣ نظام ١) . مزارع (٢ب) و (٣ب) تضاف مباشرة إلى حوض بادىء الأضافة (شكل ٧-٣ نظام ٢) أو يضاف مباشرة إلى حوض الصناعة .

٦-١-١- مزارع البادىء السائل

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

المزرعة التجارية ← المزرعة الأم ← المزرعة الوسطية ← بادىء الأضافة (الصناعة) .
فعلى سبيل المثال ، تصنيع ١٠٠٠٠ لتر من اللبن إلى جبن فى اليوم بأستخدام معدل تلقيح ٢٪ ، يتطلب تنشيط تدريجى على النحو التالى :

المزرعة التجارية ١٪ ← المزرعة الأم ١٪ ← المزرعة الوسطية ٢٪ ← بادىء الأضافة (الصناعة)
٠,٤ مل ٤٠ مل ٤ لتر ٢٠٠ لتر

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

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

لاكتوز ، كمية كافية من كربونات الكالسيوم لتغطية أسفل أنبوبة الاختبار ، ٠,٢٥٪ panmede ، ١,٠٪ ليثيسين وتعقم البيئة على ١٠ رطل / بوصة^٢ لمدة ١٠ دقائق مع التحضين لمدة أسبوع على ٥٣٠م للتأكد من كفاءة عملية التعقيم . تحضن البيئة الملقحة لفترة قصيرة وتخزن تحت ظروف الثلاجة العادية ومن الضروري إعادة تنشيطها مرة واحدة كل ٣ شهور.

٦-١-٢- مزارع البادىء المجفف

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

يحلل بررتين اللبن بأنزيم التريسين Trypsin لمدة ٤ ساعات على ٣٧م

↓
يعامل اللبن بالبخار

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

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

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

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

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

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

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

وفى ضوء المعلومات المتوفرة فى مجال إنتاج مزارع البادئات بالتجفيد فإنه يمكن الإشارة الى مايلى :

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

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

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

- ٤- تعتبر pH البيئة في نطاق ٥-٦ أكثر ملاءمة للحصول على معدل أعلا من الخلايا المتبقية. ومن الضروري ضبط pH كل من بيئة النمو والتعليق.
- ٥- تختلف بيئة التعليق التي تضمن الحصول على أفضل معدل للخلايا المتبقية طبقاً للأنواع المختلفة من البكتريا ، فمثلاً لين فرز مضاف إليه مالات الصوديوم Na-malate تعتبر مناسبة لبكتريا *S.salivarius* subsp. *thermophilus* ، ومحلول اللاكتوز وهيدروكلوريد الارجنين يعطى حماية للـ *Lb.delbrueckii* subsp. *bulgaricus* وحمض الجلوتاميك للـ *Leuconostoc* .
- ٦- يجب أن يكون محتوى الرطوبة للمزرعة المجففة أقل من ٣٪ .
- ٧- أظهرت المزارع المجففة المخزنة على ٥-١٠م معدلات أعلى للخلايا المتبقية خلال التخزين لفترات طويلة مقارنة بتلك المخزنة على درجة حرارة الغرفة .
- ٨- يفضل تعبئة المزارع المجففة تحت تفريغ لأن الميكروبات المحفوظة تكون حساسة للأكسجين .
- ٩- تعتبر الأنايب الزجاجية الصغيرة افضل أنواع مواد التعبئة وأكثرها شيوعاً للمزارع المجففة ويليهما أكياس من رقائق الألومنيوم المتعددة الطبقات ، كما وجد أن استخدام عبوات من النايلون ، تسبب انخفاض معدل الخلايا المتبقية نتيجة لنفاذيتها للأكسجين من خلال مواد العبوة .
- ١٠- تجميد المزرعة عند -٢٠ إلى -٣٠م والتجفيف على درجة حرارة بين -١٠ إلى -٣٠م يؤدي إلى ارتفاع نشاط البكتريا في المزارع المجففة .
- ١١- مركبات الكربونيل carbonyl مثل البيروفات وثنائي الاستيل اللذان يتفاعلا مع مجموعات الأمين في الخلايا المحفوظة قد تؤدي الى الاسراع من موت هذه الخلايا . ويفضل فصل هذه المركبات من الخلايا التي تم حصادها . ولحفظ المزارع المجففة لفترات طويلة يجب أن تدعم بيئة التعليق بسكريات غير مختزلة وأحماض أمينية مع/أو semicarbazide .

٦-١-٣- البادئات المجمدة

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

مزارع البادىء السائلة (الأم أو الوسطية) يمكن حفظها بالتجميد على -٢٠ إلى -٤٠°م لعدة شهور . وتتبع حفظ البادىء بهذه الطريقة فى المعامل المركزية وتوزع المزارع المجمدة على مصانع الألبان عند الحاجة كملقحات مباشرة لبادىء الأضافة . قد يؤدى التجميد والتخزين لفترة طويلة على -٤٠°م الى تلف نشاط مزرعة البادىء وقد يؤدى الى أتلاف أنواع معينة من Lactobacilli ولكن استخدام بيئة تحتوى على ١٠٪ لبن فرز ، ٥٪ سكرروز ، قشدة طازجة ، ٩،٠٪ كلوريد الصوديوم أو ١٪ جيلاتين يمكن أن يؤدى الى تحسين معدل الخلايا المتبقية ، بالأضافة إلى أن الخلايا المركزه (١٠٪ - ١٠^{١١} cfu/ml) المجمدة عند -٣٠°م فى وجود خليط من مواد مبردة معينة (سترات الصوديوم ، جليسرول ، صوديوم بيتا - جليسرورفوسفات ، مستخلص حميره ، سكرروز ، لبن فرز معقم أو لاکتوز) تحتفظ بنشاطها فى حالة مزارع البكتريا المحبة للحرارة المعتدلة ومزارع بكتريا حمض اللاكتيك العصوية أو مزارع بكتريا حمض البروبيونيك .

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

يلاحظ مما سبق أن معدل الخلايا المتبقية فى مزارع البادىء المحفوظة يعتمد على ظروف التصنيع (بيئة النمو ، وجود مواد مبردة ، التجميد والتجفيف) وعلى طريقة تركيز الخلايا. وباختصار فإن الأنظمة المختلفة المستعملة فى تركيز كتلة الخلايا الحية تكون كالتالى: أولاً : طرق ميكانيكية (مثل فرازات عالية الكفاءة $g \times 5000$ ، طرد مركزى فائق عند $15000 - 20000 \times g$) التى قد تسبب بعض الضرر الفيزيائى للخلايا البكتيرية .

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

ثالثاً: تقنية المزرعة بالانتشار diffusion culture tech. وهى طريقة متطورة للتخلص من اللاكتات من بيئة النمو حتى يمكن بهذا النظام أنتاج مزارع مركزه بها ١٠^{١١} خلية/مل

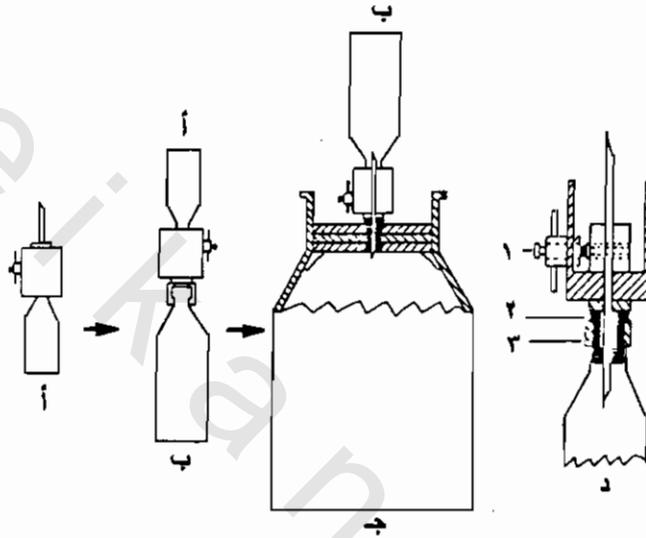
وتعرف هذه المزارع بالمزارع فائقة التركيز superconcentrated cultures ويمكن استخدامها فى التلقيح المباشر للبن الجبن (شكل ٧-٣ نظام ٢) وبالرغم من أن هذه المزارع مرتفعة التكاليف إلا أنها تستخدم بكثرة فى المصانع الصغيرة حيث لا تحتاج إلى وسائل إنتاج بادئات الأضافة (الصناعة) bulk .

٦-٢- إنتاج بادئ الأضافة Production of bulk starter

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

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

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



شكل ٩-٣ : رسم تخطيطي لنظام لويس لنقل مزرعة البادية

أ) المزرعة الأم
ب) المزرعة الوسطية
ج) بادية الأضافة
د) تركيب تفصيلي للأبرة
(١) صنبور
(٢) لحم امتل
(٣) محلول الهيبوكلورايت الصوديوم

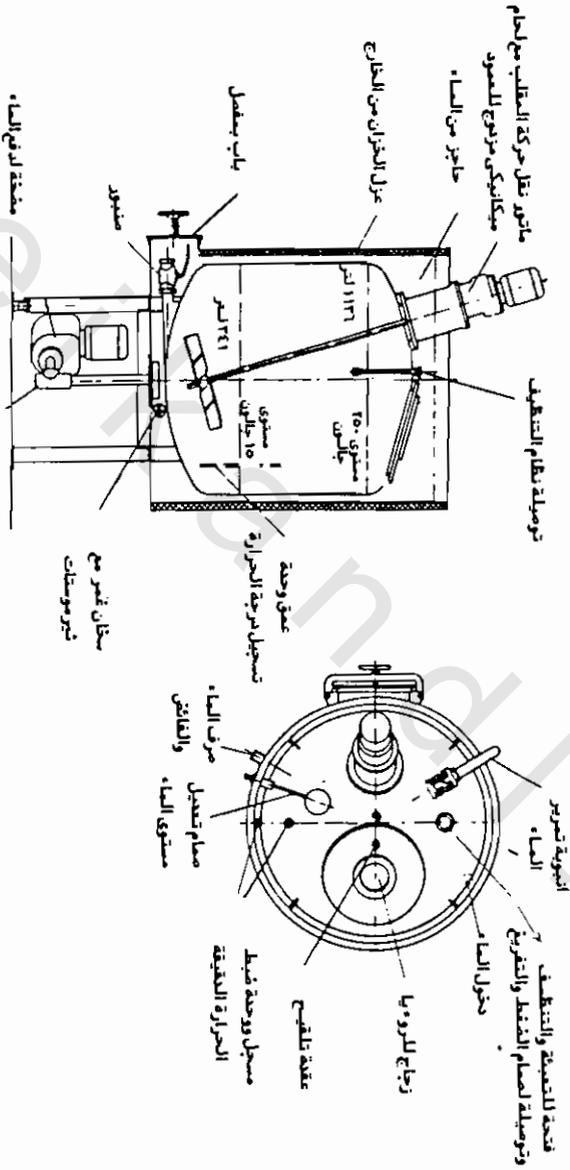
أ - نظام لويس The Lewis system

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

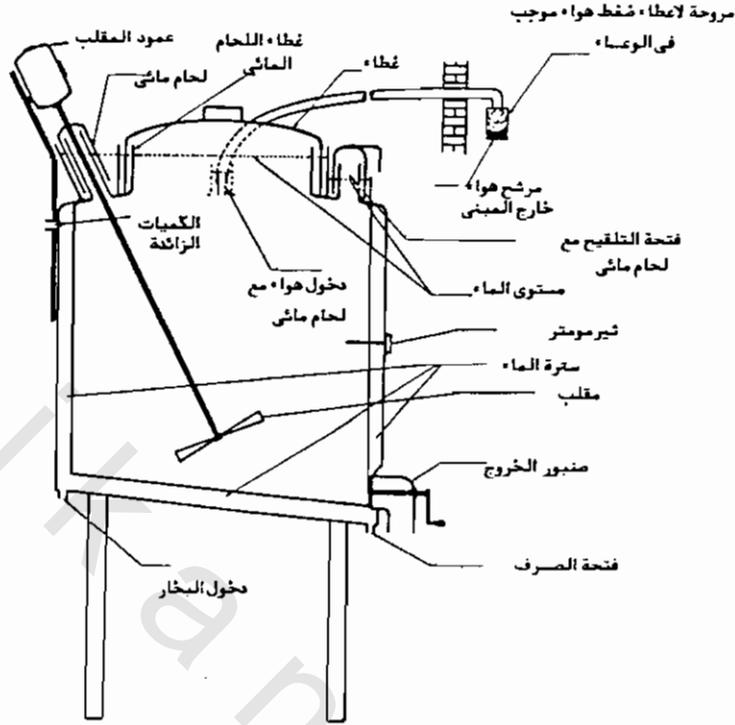
اللبن . يغطى سطح الخزان بمحلول هيبوكلورايت الصوديوم (١٠٠ ملجم / لتر) حتى يتم نقل بادىء التلقيح فى المزرعة الوسطية الى بيئة بادىء الاضافة خلال حاجز معقم . يوضح شكل (١٠-٣) مثال لهذا الخزان . ويعتمد فى نقل البادىء من وعاء لآخر فى نظام لويس على ضغط زجاجة البوليثيلين لضخ المزرعة ويمكن استخدام نظام لويس بنجاح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

ب - نظام جونز The Jones system

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



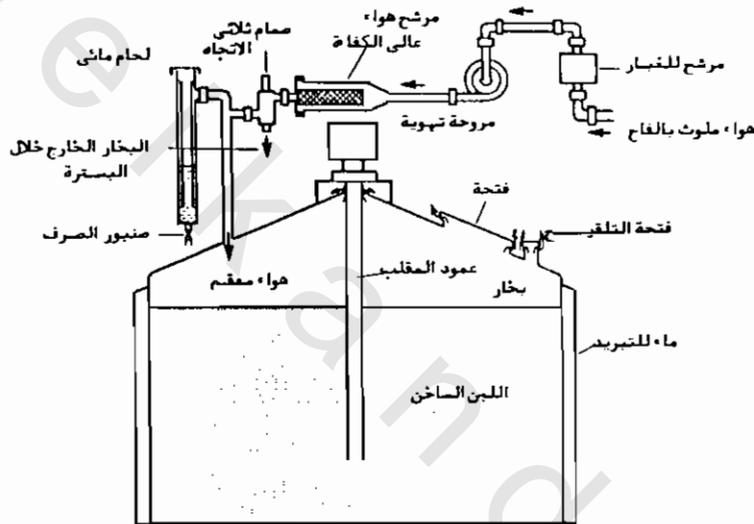
شكل ١٠-٣ : رسم تخطيطي خزّان بادي الاضافة في نظام لوريس لتحضير البادي



شكل ١١-٣ : رسم تخطيطي لخزان بادئ الاضافة من نوع جونز

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

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



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

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

كحامض لاكتيك . استمرار تخمين thermophilic lactobacilli يؤدي إلى إنتاج حموضة قدرها ٢٪ كحامض لاكتيك ويمكن حفظ كل من المزارع المحبة للحرارة المعتدلة والمرتفعة لعدة أيام عند درجة ٤م بدون حدوث فقد كبير في نشاطها أو قدرتها على إنتاج حامض لاكتيك .

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

بالإضافة إلى بادئات بكتريا حمض اللاكتيك التي تستخدم في صناعة الجبن لأنتاج الحموضة.معدلات مرغوبة خلال مراحل التصنيع المختلفة مع تباين دورها المحدود في تسوية الجبن فإنه قد يستخدم بادئات مساعدة (ثانوية) أخرى عند تصنيع أنواع معينة من الجبن بهدف إحداث تغير معين مرغوب في الجبن أثناء التسوية حتى يمكن الحصول على الناتج النهائي بالصفات والجودة المميزة لهذا النوع من الجبن . البادئات المساعدة قد تكون بكتريا ، خمائر ، فطريات أو خليط منهم حسب نوع الجبن . ويمكن الإشارة إلى أهم هذه البادئات في صناعة الجبن :

أ - البكتريا

- ١- *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* وتستخدم على نطاق واسع في صناعة أنواع الجبن السويسرية Swiss-type cheeses بهدف إنتاج غاز CO₂ لتكوين العيون في هذه الجبن خلال التسوية .
- ٢- *Brevibacterium linens* ينمو على سطح بعض أنواع من الجبن مثل اليريك Brick واللامبرجر Limburgerr ويعطى لسطح الجبن لونا برتقالياً إلى أحمر ويساهم بدرجة كبيرة في تسوية هذه الجبن لإعطاء الطعم والصفات المميزة لهذه الجبن .
- ٣- سلالات خاصة من *En. durans*, *En. faecalis* DK تستخدم في تصنيع بعض أنواع من الجبن التبشدر في الولايات المتحدة الأمريكية .
- ٤- *Bfidobacterium spp.* يستخدم في صناعة بعض أنواع من الألبان المتخمرة لأنتاج ألبان متخمرة علاجية وحالياً تجرى بعض المحاولات لادخالها في الجبن لأغراض علاجية.

ب - الفطريات

تستخدم الفطريات أساساً في صناعة بعض أنواع من الجبن الطرية والنصف طرية والهدف الرئيسي لأستخدام هذه الفطريات هي إعطاء الطعم والنكهة المرغوبة وكذلك صفات القوام والتركيب المميزة للجبين الناتج ويمكن تقسيم هذه الفطريات إلى قسمين من حيث اللون وصفات النمو :

- ١- الفطريات البيضاء وتشمل *Penicillium camemberti*, *P.caseiocolum* وتنمو على سطح جبن الكمببر Camembert والبراي Brie وتساهم بدرجة رئيسية فى التسوية لأعطاء الصفات المرغوبة للجبين الناتج من حيث الطعم والنكهة والقوام والتركيب .
 - ٢- الفطريات الزرقاء مثل *P.roqueforti* والتي تنمو داخل الجبن مثل جبن الرقفور Roquefort والسيتيلتون Stilton والجروجنزولا Gorgonzola أثناء التسوية وتشارك بصفة رئيسية فى إعطاء الجبن الطعم الحريف المرغوب وكذلك صفات القوام والتركيب المميزة لهذه الأنواع من الجبن .
- وقد توجد أجناس أخرى من الفطريات الأخرى والتي تستخدم على نطاق محدود *Mucor rasmusen* فى النرويج لصناعة جبن مسواه من لبن فرز وفطر *Aspergillus oryzae* ويستخدم فى اليابان لإنتاج جبن من فول الصويا .

ج- الخمائر

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

٦-٤- تنظيف وتطهير المعدات

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

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

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

مقدرة مزرعة البادئ على أداء عملها بكفاءة خلال عمليات التصنيع يعتمد على نشاطها ونقاوتها ، ويمكن تلخيص الخطوات الروتينية لاختبارات مراقبة جودة مزارع البادئ فيما يلي :

- ١- مزارع بادئات بكتيريا حمض اللاكتيك والبكتيريا الأخرى :
 - أ- فحص مجهرى بأستخدام صبغة جرام أو طريقة صبغة نيومان Neuman ، بكتيريا البادئ موجبة لصبغة جرام وتستخدم الطريقة الأخيرة لضبط نسبة البكتيريا الكروية الى العصوية فى مزارع اليوجهورت .
 - ب - الكشف عن الملوثات :
 - ١- يكشف عن النقاوة بأستخدام اختبار الكتاليز ، وتعتبر بكتيريا حمض اللاكتيك سالبة للكتاليز والتفاعل الموجب يدل على التلوث .
 - ٢- يدل الأختبار الموجب لبكتيريا القولون على تلوث عام .
 - ٣- يجب ألا تحتوى مزارع بكتيريا حمض اللاكتيك على الخميرة والفطريات
 - ٤- الكشف عن الفاج .
 - ج - أختبار النشاط أو الحيوية activity test يساعد على تقدير معدل تكويين الحموضة بمزرعة البادئ قبل استعمالها فى حوض التصنيع ، مثل إجراء تصنيع للجين فى المعمل على نطاق صغير أو تجريبى .
 - د- مقاومة درجات حرارة الطبخ يعتبر أختباراً مهماً لبادئات الجين .
 - هـ - اختبار فوجس - بروسكر Voges-Proskauer أو الكريتين creatine اختباراً بيوكيماويا لفحص مزارع البادئات المنتجة للنكهة ، وقد يستعمل هذا الاختبار فى بعض الأحيان للكشف عن الميكروبات المنتجة للغاز فى المزارع غير المنتجة للغاز .
- ٢- مزارع الفطريات :
 - أ - يقدر النشاط بعد الجراثيم فى معلق معقم .
 - ب - يجرى فى بعض الأحيان أختبار بكتريا القولون للكشف عن التلوث العام .
 - ٣- أختبارات المسحة swab test لمعدات مزرعة البادئ وأوعية التنشيط والأعداد تعتبر ضرورية للدلالة على فعالية الغسيل والظروف الصحية فى المصنع .