عزل وتشخيص عزلات محلية من بكتريا *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* وتقييمها كبادئات في صناعة جبن *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* و الشدر

عبد الملك محمد مسعد عمران غياث حميد مجيد
قسم علوم الاغذية والتقانات الاحيائية –كلية الزراعة – جامعة البصرة
البصرة – العراق

الخلاصة

تم عزل وتشخيص بكتريا *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* و *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* من الجبن الابيض الطري والجبن المظفور. نمت العزلتان ضمن Lac. *Lactis* مدى حراري ١٠ – ٤٥ م وتركيز ملحي ٥% كلوريد الصوديوم وقاومت العزلة subsp. *lactis* درجة حرارة البسترة (٦٣ م لمدة ٣٠ دقيقة) والمعاملة الحرارية على درجة ٦٥ م لمدة ١٥ دقيقة. قاومت العزلة Lac. *Lactis* subsp. *cremoris* تركيز سكري مقداره ٢٥%. استخدمت هاتان السلالتان كباديء لصناعة جبن الشدر (١:١) وبنسبة ٠.٥ % حيث اثبتت كفاءة تصنيعية عالية من خلال تطور الحموضة وعدم ملاحظة وجود صفة المرارة في نماذج جبن الشدر المنضج ، بالرغم من انها ذات قدرة تحلليلية عالية نسبياً لبروتين الكازين ، وهذا يساعد في سرعة انضاج الجبن.

المقدمة

تعرف البادئات بانها مزارع من الاحياء المجهرية غير الضارة تنمى في الحليب او الشرش لكي تعطي بعض الصفات المرغوبة لمنتجات الالبان المتخمرة وذلك تحت ظروف مسيطر عليها. وتكون البادئات من سلالة واحدة نقيـــة (Single strain culture) واكثر من سلالة (Mixed strain culture) (Kosikowiski, 1970).

للبادئات اهمية في صناعة الاجبان حيث يعتمد على نشاطها في حدوث تغيرات مرغوبة في هذه المنتجات والتي تشمل تطور الحموضة او النكهة او الاثنين معا". يســـاعد حامض اللاكتيك الناتج من تخمر سكر اللاكتوز على تكوين خثرة الجبن واعطاءها القوام المناسب من خلال زيادة فعالية انزيم الرنين ، ويزيد من نضوح الشرش اضافة الى دور حامض اللاكتيك في تثبيط نمو بعض الاحياء المجهرية المرضية (Svanberg et al., 1992) . كما ان بكتريا البادىء تفرز بعض الانزيمات المحللة للبروتينات والدهون المرغوبة خلال عملية الانضاج ،

اضافة الى قدرة بعض انواع البادئات على تكوين بعض المركبات الطيارة مثل ثنائي الاسيتيل والاستلدهيد والتي تعطي النكهة المرغوبة (Tamime, 1983).

تنتشر بكتريا حامض اللاكتيك بشكل واسع في الطبيعة ويمكن عزلها من الحليب ومنتجاته الذي يعتبر مصدرا" جيدا" للفيتامينات والقواعد النايتروجينية اللازمة لنموها.وتتضمن بكتريا حامض اللاكتيك عائلة المكورات المسبحية Streptococaceae والتي تتضمن الاجناس التالية: *Pediococcus* و *Leuconostoc* و *Streptococcus* و *Lactococcus* (Salminen *et al.*, 1992) .

وتهدف هذه الدراسة الى عزل وتشخيص انواع بكتريا *Lactococcus* من الجبن الابيض الطري والجبن الابيض المظفور والتي تشمل نوع *lactis* وتحت نوع *lactis* و *cremoris* ودراسة صفاتها الفسلجية وامكانية استخدامها كبادئات في صناعة جبن الشدر (Cheddar cheese). للاستعاضة عن تلك البادئات المستوردة

المواد وطرائق العمل

جمع العينات ومعاملتها:

عينات الجبن

تم اختيار اربع عينات من الجبن الابيض الطري المعروض للبيع في مدينة البصرة واربع عينات من جبن الظفائر ذات النكهة المرغوبة وبوزن ½ كغم لكل عينة . وضعت باكياس البولي اثلين وحفظت بالتبريد في الثلج ونقلت مباشرة الى المختبر. قطعت قوالب الجبن وظفائر الجبن كلا" على حدة الى قطع صغيرة باستخدام سكين معقم ، وهرست في خلاط معقم. وزن ٢٥ غم من الجبن المهروس وسحق بالهاون الخزفي المعقم و اذيب في ٢٢٥ مل من محلول سترات الصوديوم تركيز ٢ % ولمدة عشرين دقيقة واجريت التخافيف اللازمة.

عينات الحليب

جمعت اربع من عينات حليب الجاموس الخام من محطة الهارثة وبواقع ١ لتر لكل عينة باستخدام اوعية من الالمنيوم المعقمة ، حلبت الحيوانات بطريقة الحلب اليدوي بعد تنظيف ايدي الحلاب وضرع البقرة. حفظت العينات بالتبريد باستخدام حاوية ثلج ونقلت مباشرة الى المختبر ثم وزعت في قناني زجاجية معقمة سعة ٢٥٠ سم وحضنت في درجات حرارية مختلفة (٥،٣٠،٤٥)م لحين حدوث التخثر. ثم اجريت التخافيف اللازمة.

عزل البكتريا

حضر الوسط الزرعي Azide Agar Base (AAB) والمجهز من شركة Biolife حسب التعليمات المثبتة على العبوة ، واستخدمت طريقتين في عملية العزل من عينات الجبن والحليب المخثر وهما :طريقة صب الاطباق وطريقة التخطيط.(Seely & Vandermark, 1972)

حضنت الاطباق على درجات حرارية مختلفة:

١٥ م لمدة ٥ ايام ، ٣٠ و ٤٥م لمدة ٤٨ –٧٢ ساعة مع ملاحظة النمو.

تنقية المستعمرات البكتيرية:

اختيرت المستعمرات النامية المختلفة من حيث الشكل واللون والحجم ثم اجريت عملية التنقية ثلاثة مرات على الوسط AAB.

التشخيص:

شخصت البكتريا بدراسة الصفات الشكلية واجراء بعض الفحوصات استنادا" الى كرر Holt et al. (1994) و Hardie (1986) و Buchnan and Gibbons(1974) التشخيص مرتين.

أ – الصفات الشكلية

١–صبغة كرام (Cowan and Steel,1974)

٢– حركة الخلايا (Seely and Vandemark, 1972)

ب – الصفات الفسلجية

رزعت الانابيب الحاوية على الوسط Yeast Glucose Agar (YGA) بمزارع بكتيرية عمرها ٢٤ ساعة وبمعدل مكررين لكل عزلة. حضنت الانابيب على درجات حرارية مختلفة هي ١٠ م لمدة ٥ ايام و ٣٠ و٤٥ م لمدة ٤٨ – ٧٢ ساعة.ا

ج – الاختبارات الكيموحيوية

١– اختبار انتاج الغاز (Harrigon and Maccance, 1976)

٢– تخمر السكريات (Hardie,1986)

٣– انتاج الكاتليز

٤– انتاج الامونيا من الارجنين (Collee et al., 1996)

٥– استهلاك السترات

د –اختبارات التحمل

١– النمو في تراكيز مختلفه من كلوريد الصوديوم (Jelinkova and Rotta, 1978

(Sharpe, 1979)٢- النمو في رقم هيدروجيني ٩.٦

(Sharpe, 1979)٣- تحمل حرارة ٦٠ مْ (

دراسة بعض الصفات الفسلجية:

اجريت التجارب لكل عزلة بكتيرية على حدة وبمعدل ثلاث مكررات:

١- تحديد مدى النموالحراري للعزلات

Lactococcus تم تحديد مدى النمو في درجات حرارية مختلفة للعزلات التابعة للجنس وذلك بحضنها في درجات حرارية تراوحت بين ٢ – ٥٨ م مع ملاحظة النمو ولفترات زمنية مختلفة تراوحت بين ٢ – ٧ ايام.

١- مقاومة الحرارة

مزجت المزرعة البكتيرية جيدا" للحصول على معلق متجانس . لقحت الانابيب الحاوية على ١٠ مل من الحليب بـــ ١ مل من المزرعة البكتيرية. وضعت الانابيب مبا شرة في حمام مائي درجة حرارته ٦٠ م (مع بقاء انبوبة سيطرة دون معاملة حرارية). رفعت الانابيب خلال فترات زمنية مختلفة تبدأ بعد الوصول الى درجة حرارة ٦٠ْم (٢٥،٢٠،١٥،١٠،٥و٣٠) دقيقة وبردت مباشرة باستخدام حمام ثلجي. حضرت التخافيف اللازمة وتم الزرع مباشرة على الاطباق الحاوية . حضنت الاطباق لمدة ٢٤–٤٨ ساعة. عدت المستعمرات النامية في YGAعلى الوسط الاطباق المزروعة وتم حساب العدد (كررت التجربة باستخدام درجة حرارة ٦٣ و٦٥ مْ مع نفس الفترات الزمنية).

٣- النمو في قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني

الى ٢ ، ٣، ٤، ٥، ٦، ٧، ٨، ٩، و ١٠. مزجت YGA ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط المزرعة البكتيرية للحصول على معلق متجانس. حضرت التخافيف اللازمة ، ثم زرعت الاطباق. حضنت في الدرجات الحرارية المثلى للنمو لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة. عدت المستعمرات النامية في الاطباق المزروعة وتم حساب العدد الكلي.

٤ – النمو في تراكيز ملحية مختلفة من كلوريد الصوديوم

بتراكيز من كلوريد الصوديوم ١، ٢.٥ ، ٥، ٦، ٧، ٨ و١٠%. YGA حضر الوسط مزجت المزرعة البكتيرية للحصول على معلق متجانس. حضرت التخافيف اللازمة ، ثم زرعت الاطباق وحضنت على الدرجات الحرارية المثلى لنمو العزلات لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة. عدت المستعمرات النامية في الاطباق المزروعة ، ثم حسب العدد الكلي.

١

- النمو في تراكيز مختلفه من السكروز

اتبعت نفس الطريقة السابقة (٤) مع استخدام التراكيز السكرية التالية ٥، ١٠ ، ١٥ ، ٢٠، ٢٥ و٣٠%.

استخدام العزلات في صناعة جبن الشدر

صنع جبن الشدر حسب ما ورد في Kosikowski (1970) ، اضيف بكتريا البادیء بنسب مختلفة ٥ر٠ ، ١، و ٢% من وزن الحليب وبمعدل مكررين.

تقدير النايتروجين اللابروتيني

استخدمت طريقة Vanderporten and Wecks (1972) ، وقيس مقدار النيتروجين الكلي بطريقة كلداهل الدقيقة.

التقييم الحسي لنماذج الجبن

اجري التقييم الحسي لنماذج جبن الشدر في نهاية قراءة الانضاج من قبل المتخصصين وذوي الخبرة في قسم الصناعات الغذائية والالبان في كلية الزراعة / جامعة البصرة ومنحت الدرجات حسب الطريقة التي ذكرها Nelson and Trout (1964).

التحليل الاحصائي

اجري التحليل الاحصائي وفقا" للتصميم العشوائي الكامل CRD ضمن التجارب العاملية بوجود عامل و احد (البادیء) لنتائج التقييم الحسي لنماذج جبن الجدر واستخدم برنامج Minitab في تحليل البيانات. وقورنت المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي معدل RLSD (1987) (الراوي وخلف الله ، ١٩٨٠)

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص

تم عزل وتشخيص عزلة واحدة من بكتريا *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* من الجبن الابيض المظفور وعزلتان من بكتريا *Lact. lactis* subsp. *cremoris* الجبن الطري ، ولم يتم عزلهما من حليب الجاموس المتخثر ، وتم التشخيص اعتمادا" على Holt et al., (1994) . يلاحظ ان كل العزلات التابعة للجنس *Lactococcus* هي تابعة للنوع *La. Lactis* والتي عزلت من نوعي الجبن الابيض الطري والمظفور والتي قد يكون لها دورا" في اعطاء النكهة المميزة لهما.

الصفات الفسلجية

Lactococcus اوضحت الدراسة ان المدى الحراري لنمو عزلتي المكورات المسبحية اللبنية تراوح بين ١٠ – ٤٠ م والدرجة الحرارية المثلى لنموهما هي ٣٠ م وهذا يتوافق مع ما ذكره Holt et al., (1994).

بدرجة حرارة ٦٣ْم حيث يتضح *Lactococcus* يوضح الشكل (١) منحنى البقاء لبكتريا تقاوم درجة حرارة البسترة ولمدة ٣٠ دقيقة بينما تقاوم Lac. *Lactis* subsp *lactis* ان هذه الدرجة الحرارية لمدة ٢٠ دقيقة فقط وهذا يخالف *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* تقاوم لمدة ١٠ دقيقة فقط في الحليب ويعزى lactis في ان العزلة Tamimi (1989) ما ذكره ذلك الى حالة التكيف العالية للعزلات للظروف البيئية الحارة لمدينة البصرة. ويوضح الشكل (٢) منحنى البقاء للعزلة *Lac. Lactis subsp lactis* عند درجة حرارة ٦٥ م حيث تقاوم هذه العزلة هذه الدرجة الحرارية لمدة ١٥ دقيقة.

تاثير الرقم الهيدروجيني

مختلفة. حيث اظهرت pH في قيم *Lactococcus* يوضح الشكل (٣) منحنيات النمو لـــ ، ويوضح الشكل قدرة Hardei 1986) ٧ وهذا مطابق لما ذكره pH العزلات افضل نمو عند ٩ وتنخفض سرعة النمو بشكل كبير عند pH على النمو عند *cremoris* و *lactis* تحت النوع ١٠ ، ويتضح من ذلك ان مدى النمو pH الوسط من ٦ الى ٤ ويتوقف نموها عند pH تغير Payne (1979). ٤ – ٩ وهذا متوافق مع ما ذكره pH يتراوح من

الضغط الازموزي

، يتضح من الشكل ان *Lactobacillus* يوضح الشكل (٤) منحنيات النمو لعزلات بكتريا عند *Lact. Lactis subsp. cremoris* كل العزلات تقاوم تركيز ملحي ٥ % ويتوقف نمو *العزلة Lac. Lactis subsp.* ، بينما تقاوم العزلات Hardei (1986) تركيز ملحي ٥% وهذا يتفق مع التركيز الملحي ٥% ويتوقف نموها عند *Lactis Lac subsp. Lactis* و *cremoris A4, A5* تركيز ملحي ٦%، وهذا يعود الى قدرة العزلات المحلية على التكيف مع الظروف البيئية حيث تصل نسبة الملوحة في منطقة البصرة الى ١٣ ديسيمنز (السليماوي، ١٩٩٨). ويوضح الشكل (٥) منحنيات النمو للعزلات في تراكيز مختلفة من السكروز، حيث ان كل العزلات قاومت حتى حيث قاومت حتى *Lac. Lactis subsp. cremoris A3* تركيز سكري ٢٠% عدا العزلة تركيز سكري ٢٥% وهو تركيز عالي وقد يعزى السبب الى تكيف العزلات لتحمل الضغط الازموزي العالي بسبب الظروف البيئية للمنطقة.

استخدام العزلات في صناعة جبن الشدر

يتبين من نتائج التقييم الحسي لنماذج جبن الشدر من قبل ٥ مقيمين بمعدل مكررين والباديء المحلي *الخليط* Calf rennet والمصنع من حليب بقر باستخدام المختر التقليدي *Lact.* ان درجات التقييم كانت: *Lactis subsp. Lactis*

صفة الطعم : ٤٣ درجة، القوام: ٣٠ درجة ، درجة التقبل العام : ١٨ درجة وبذلك يكون المجموع ٩١% وهذه نتيجة ممتازة طبقا" لطريقة Nelson and Trout (1964) ولم يلاحظ أي اثر للمرارة في كل نماذج الجبن مما يعكس مدى الكفاءة العالية للباديء المحلي في صناعة جبن الشدر.

التحلل البروتيني لجبن الشدر

يوضح الجدول (١) النسبة المئوية للنيتروجين اللابروتيني /النيتروجين (NPN) والباديء المحلي الخليط Calf rennet في نماذج جبن الشدر المصـــنع باستخدام (TN)الكلي (١:١) وبنسبة ٠.٥٠ %. ، اضيف الباديء الى الحليب المعد لصناعة جبن الشدر بنسب مختلفة وهي ٢ و ١و ٥% ولوحظ تطور الحموضة سريعا" عند استخدام ١ و٢ % وكانت افضل نسبة للباديء للحصول على ارتفاع الحموضة المطلوب هو ٠.٥ % مما يدل للنشاط العالي للباديء المحلي مقارنة بالباديء المستورد الذي استخدم من قبل الركابي (١٩٩٨).

يلاحظ من الجدول ان النسبة المئوية للنيتروجين اللابروتيني/ النيتروجين الكلي خلال اليوم الاول من الانضاج هي ٣.٧٨ وهذا يختلف مع ما وجده الركابي (١٩٩٨) عند استخدام نفس وبنسبة ١% في صناعة جبن الشدر حيث كانت S. cremoris المختر والباديء المستورد المفرد النسبة المئوية ٣.١٦. اصبحت النسبة في نهاية فترة الانضاج (١٤ اسبوعا") ٩.٠٥ بينما كانت النسبة في دراسة الركابي (١٩٩٨) ٨.٢ ويعزى هذا الى القدرة التحللية البروتينية العالية للباديء المحلي ولذا يمكن الاستفادة من هذه الخاصية في تقليل فترة انضاج الجبن.

جدول (١): النسبة المئوية للـــ TNl/NPN في نماذج جبن الشدر المصنع بـــ Calf rennet. والبادىء المحلي الخليط والبادىء المستورد

فترة الانضاج	البادىء المستورد	البادىء المحلي*
يوم واحد	3.16	3.78
اسبوعين	4.92	5.62
ستة اسابيع	7.07	7.29
عشرة اسابيع	7.96	8.26
اربعة عشر اسبوعا"	8.20	9.05

* بادىء محلي خليط بنسبة (١:١) من بكتريـــا Lac. *Lactis subsp lactis* و*Lac. Lactis* subsp *cremoris A3*

ويستنتج من هذه الدراسة ان البادئات المحلية المعزولة تعطي نتائج افضل في صناعة جـــبن الشدر ولها قدرة تحللية عالية لبروتين الكازين اضافة الى انها تتحمل درجات الحـــرارة العاليـــة نسبيا" وتتحمل مدى pH واسع اضافة الى تحملها للتراكيز العالية من الملح والسكروز.

المصادر

الركابي ، علي خضير جابر (١٩٩٧). استخدام الانزيم المخثر المستخلص من الفطر Trichoderma hamatum في صناعة جبن الشدر ودراسة دوره في الانضاج. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة البصرة.

السليماوي ، وصال فخري (١٩٩٨). تاثير نوع ومستويات ملوحة مياه الري والتسميد النيتروجيني في مفردات النمو وكفاءة استخدام السماد لنبات الشعير. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة البصرة.

Buchanan, R.E. and Gibbons. N. E. Eds. (1974). Bregeye's Mannual of Determinative Bacteriology. 8th edition. The Williams and Wilkins CO., U.S.A.

Collee, J.G.; Miles, R.S. and Batt, B.(1996). Tests for the identification of bacteria. In: Practical Medical of Microbiology 4nth Ed. Edited by: Collee, J.G. Marmion, B. P., Fraser, A. G. and Simmons, A. Mackie and McCartney. New York pp.131.

Cowan, S. T. and Steel, K.J. (1974). Cowan and Steel Manual for the Identification of Medical Bacteria. 2nd.

Hardie, J. M. (1986). Streptococcus. In Bergey's manual of systematic bacteriology. Edited by: Sneath, P. H. A. Mair, N. S., Sharpe, M.E. and Holt, J.E. Vol. 2., Baltimore, Williams and Wilkins Co. pp: 1043-1071.

Harrigon, W.F. and Mccance, M.E. (1976). Laboratory Methods In: Food and Dairy Microbiology. Academic Press: London.

Holt, J.G., Kreig, N.R., Sneath ,P.H., Staley, J.T. and Williams. S.T. (eds.). (1994). Bergey's Manual of Determinative of Bacteriology. 9th ed. Williams and Willkins. Baltimore

Jelinkova, J. and Rotta, J. (1978). Identification and typing of enterococci, In: Methods in Microbiology, edited by: Norris, J. R. and Ribbinos, D. W.. Vol.2 London Academic Press Inc. pp: 149-220.

Kosikowski, F. (1970). Starers. In "Cheese and Fermented Milk Foods" Edwards Brothers. Inc. Ann Arbor Michigan. P14.

Nelson, J.A. and Trout, G.M. (1964). Judging Dairy Products. The Olson publishing Co. Milwankee, Wiss., U.S.A.

Payne, J. (1979). Damage and recovery in Streptococci. In: Streptococci. Edited by: Skinner, F.A. and Quesnel, L.B. London, Academic Press pp: 356.

Salminen, S. and Deighton, M. (1992). Lactic acid bacteria in the gut normal and disordered states. Dig. Dis., 10(4): 227-238.

Salminen, S. ; Deghton,A.M. ; Benno, Y. and Gortbach, L.S. (1998). Lactic acid bacteria in health and disease. In: Lactic acid bacteria, Microbiology and Functional aspects. Edited by: Salminen, S. and Wright, A. Macel Decker Inc. PP: 211-252.

Sharpe, M.E. (1979). Identification of lactic acid bacteria in: Identification methods for microbiologists. Edited by Skinner A.M. and Lovesick C.A. Academic Press. Pp: 223.

Seely, H.W. and Vandermark, P.J. (1972). Laboratory Manual of Microbiology, Microbes in action, 2nd. Ed. W.H. Freeman and Company. Sanfrancisco.

Svanberg, U., Sjogren, E., Lorri, W., Sveenerholm, A.M. and Kaijser, B. (1992). Inhibited growth of common enteropathogenic bacteria in lactic fermented cereal rules World J. Microbial. Biotechnol., 8: 601-606.

Tamime, A.Y. (1983). Microbiology of starters cultures. In: Dairy microbiology. Edited by: Robinson, R.K., Vol. 2. Appl. Sci. Pub. London. PP: 113-155.

Vanderpoorten, R. and Wecks, M. (1972). Breakdown of casin by rennet and microbial milk clotting enzymes. Neth. Milk Dairy J., 26: 47.

USING LOCAL ISOLATES OF Lactococcus lactis subsp. lactis AND Lac. Lactis subsp. cremoris AS STARTERS IN CHEDDAR CHEESE PROCCESING

G. H. Majeed ***A-M. M.Umran***

Department of Food science and Biotechnology , College of Agriculture , University of Basrah

Basrah- Iraq

SUMMURY

Lactococcus. lactis subsp lactis and Lactococcus. lactis subsp. cremoris were isolated and identified from soft white cheese and Medford cheese.

The isolates grow within a temperature range of 10-45 C and sodium chloride concentration up to 5%.

Lac. lactis subsp. lactis resisted pasteurization (63 C for 30 min) and a heat treatment at 65 C for 15 min. Lac.lactis subsp. cremoris could grow at a sugar concentration up to 25% .

The two isolates (1:1) were used as a starter for Cheddar cheese making at a percentage of 0.5% which proved a high efficiency that was noticed from fast developed acidity and no bitterness in ripened cheese, even though, they showed high photolytic activity that helped accelerating cheese ripening