المؤتمر العلمي الخامس لكلية الزراعة – جامعة تكريت للمدة من 26 ولغاية 27 نيسان 2011
5th Scientific Conference of College of Agriculture -Tikrit University From 26 to 27 April 2011

# أختبار بعض العزلات من بكتيريا Lactococcus و Leuconostoc في قابليتها لإنتاج مركبي النكهة ثنائي الاسيتل والاسيتيون

كركز محمد ثلج زبيدة عدنان خضير أحسان عرفان حسين
كلية الزراعة–جامعة تكريت كلية التربية–جامعة تكريت كلية التربية(ابن الهيثم) جامعة بغداد

**الخلاصة:** تضمنت الدراسة عزل اربعة سلالات من نوعين لبكتيريا حامض اللاكتيك وهي *Lactococcus lactis subsp. diactylactis* و *Lactococcus lactis subsp. Lactis* و *Leuconostoc mesentroides subsp. Mesentroides* و *subsp. Cremories* *Leuconostoc mesentroides* من منتجات الالبان المتخمرة المحلية. تم تشخيص العزلات بأستخدام الاختبارات المورفولوجية والمزرعية والبايوكيميائية. حددت قابلية السلالات المعزولة على انتاج كل من مركبي النكهة ثنائي الاسيتل والاسيتيون بعد تنميتها على وسط MRS السائل وتحضينها عند 30° م لمدة 24 ساعة. تبين من النتائج ان جميع السلالات كان انتاجها من مركب الاسيتيون اعلى معنويا عند ($p<0.05$) مما لمركب ثنائي الاسيتيل , وقد أظهرت سلالة البكتيريا *Lactococcus lactis ubsp . diactylactis* انتاجا اعلى معنويا من مركب ثنائي الاسيتل بينما كانت السلالة *Leuconostoc mesentroides subsp cremories* اعلى انتاجا" للاسيتيون مقارنة مع بقية السلالات. شملت الدراسة ايضا محاولة تحسين الانتاجية للسلالات الاربعة المعزولة من خلال استخدام نوعي المطفرات الكيميائية من المركبين 5- Bromouracil و Orange Acridine حيث تم الحصول على ثمان عزلات جديدة بعد التطفير، التي تم اختبار قابليتها في انتاج مركبي النكهة ثنائي الاسيتيل والاسيتيون الذي كان اعلى معنويا مقارنة" مع السلالات الابوية فضلا عن الثباتية العالية لها في انتاج المركبين الذي لم يتغير معنويا عند اعادة زراعتها خمسة عشر نقلة.

# Assay the Ability of production Diacetyl and Acetoin Flavour compounds by some Isolates of Lactococcus and Leuconostoc Bacteria

**Karkaz M. Thalij** **Zubeda A. Ktheer** **Ehsan A. Huseen**
**College of Agriculture College of Education College of Education (Ibn-Al-Hytham)**
**Tikrit University Baghdad University**

**Abstract** :This study was included the isolation of four strains from two species of lactic acid bacteria which as *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis; Lactococcus lactis* subsp. *lactis; Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, were isolated from locally fermented diary products. The isolated were identified by using morphological, cultural and biochemical tests. Their abilities to producing flavor compounds as each Diacetyl and Acetoin after cultured on MRS broth media and incubation at 30 °c for 24 hours. The results indicated that's all strains were produced the acetoin significantly ($P<0.05$) more than diacetyl compound. The production of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* from Diacetyl were significantly higher than Acetoin compound, while *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* revealed higher production of Acetoin in comparison with the other isolated strains.The current study included the mutagenesis of the four isolated strains by using two chemical mutagens, the 5-Bromouracil and acridine orange. Eight derivates strains were obtained by using this technique. Diacetyl and Acetoin compounds production were estimated for these derivates. In general, all the eight derivates strains showed more productivity of flavor compounds in comparisons with the parental strains with a high stability for flavor compounds production of these derivates strains after 15 translocates.

**المقدمة**

عرف الإنسان الحليب منذ أقدم العصور التاريخية وأستخدمه في غذائه قبل أكثر من 6000 سنة قبل الميلاد، وقد عرف كذلك في ان المنتجات اللبنية لاسيما منها الزبد والجبن في أمتلاكها قابلية الحفظ والتخزين والاستساغة أكثر مقارنة مع الحليب الخام وبهذا فهو يوفر غذاء مقبولا وذا قيمة غذائية ويمكن حفظه لمده أطول، اذ ان تواجد مركبات النكهة في المنتجات اللبنية لاسيما المنتجة من قبل الأحياء المجهرية يعتبر من الحالات التي تحدد مدى أستساغة المنتج اللبني من قبل المستهلك (Tamineو Robinson 2000 و Savadogo واخرون، 2004). عرفت اهمية بكتيريا حامض اللاكتيك في الحليب عام 1780م (Narayanan واخرون، 2004) وأهمها تلك القادرة على إنتاج مركبات النكهة لاسيما ثنائي الأسيتيل Diacetyl

*البحث مستل من أطروحة الدكتوراه للباحث الثاني.

والأسيتيون Acetoin في منتجات الألبان مثل بعض أنواع الأجناس Lactobacaillus و Lactococcus و Leuconostoc و Pediococcus التي تتصف بأنها غير مرضية للإنسان وذات قابلية عالية وسريعة على تخمير العديد من المواد الغذائية لاسيما المنتجات اللبنية، فضلا عن رخص مصادر الحصول عليها بأعداد كبيرة وسهولة عزلها ( Narayana و 2004 Moineau و Vadeboncoeur ، 2004 و Guessas و Kihal، 2004 و ErdoGrul و Erblr 2006) أن إنتاج مواد النكهة من قبل بعض الأنواع من أجناس بكتيريا Lactococcus و Leuconostoc تكون متعددة وذات أنواع مختلفة قد تصل إلى أكثر من 21 نوع منها في جبن الشيدر وحده (Urbach ، 1995 و McSweeney و Sousa 2000). أن النوع المهم من مركبات النكهة هو المركب ثنائي الأسيتيل الذي يعد من أكثر المركبات أهمية في أعطاء النكهة للعديد من المواد الغذائية لاسيما منتجات الألبان كالزبد واللبن المتخمر والقشطة والمثلجات اللبنية، فضلا" عن كون متايضاته تتمكن من منع نمو العديد من الأحياء المجهرية الملوثة للمواد الغذائية (Levata-Jovanovic و Sandine ، 1997 و Curic واخرون، 1999 و Drider واخرون، 2004). يتصف ثنائي الأسيتيل بأنه مركب رباعي الكاربون، وأن هناك أكثر من مسلك أيضي لتكوينه داخل الخلية البكتيرية وصيغته الكيميائية CH3COCOCH3 وله تسميات أخرى مثل 2,3-Butadion و Biacetyle.أما مركب الأسيتيون فانه يعتبر مركبا قريبا من الأسيتون في طبيعة إنتاجه ومراحل أيضه في داخل الخلية البكتيرية إضافة إلى التشابه في التركيب الكيميائي والتواجد المشترك في كثير من المواد الغذائية لإعطاء النكهة، ولكن الأخير لايتواجد وحده لإعطاء النكهة. يعد حامض الستريك (Citric acid) المركب الوسطي في المسالك الأيضية الخاصة بإنتاجهما داخل الخلية البكتيرية، أما على النطاق التجاري فأن أهم الأحياء المجهرية التي تستخدم في إنتاجهما هما بعض السلالات من بكتيريا *Lactococcus lactis* و *Leuconostoc mesenteroides* (Curic واخرون، 1999 و-Lonvaud Funel ، 1999).أن من أهم التقنيات الحديثة التي أستخدمت في محاولة زيادة الإنتاج من مركبات النكهة لهذه الخلايا البكتيرية هو أستخدام التطفير (Mutation) بإستخدام العوامل المطفرة الفيزيائية أو الكيميائية والتي يكون من السهل السيطرة عليها مقارنة مع العوامل الأخرى (Curic واخرون، 1999). نظرا لأهمية مركبات النكهة لاسيما ثنائي الأسيتيل والأسيتيون المنتجة من قبل أنواع بكتيريا *Lactococcus lactis* و *Leuconostoc mesenteroides* في منتجات الألبان، فأن الهدف من هذه الدراسة كان في تحديد قابلية سلالات النوعين أعلاه في انتاجهما من مركبات النكهة ثنائي الأسيتيل والأسيتيون ومحاولة إستخدام المطفرات الكيميائية كمحاولة لإيجاد سلالات جديدة ذات إنتاجية عالية ودراسة ثباتية انتاجيتهما مقارنة مع السلالات الأبوية للأستفادة منها في زيادة الإنتاج.

**المواد وطرائق البحث**

تم جمع ثمانية نماذج من الألبان المتخمرة المحلية من محافظة صلاح الدين/العراق. وقد تم عزل جنسي بكتيريا Lactococcus و Leuconostoc من هذه المنتجات وكما جاء في Olsen واخرون، (1978)اذ تم أخذ 10 غم من كل عينة من العينات أعلاه التي نقلت إلى قنينة حجمية تحوي على 90 مل من المحلول الفسيولوجي Normal saline الحاوي على 0.85% من NaCl ثم أكملت التخافيف لغاية مستوى تخفيف $10^7$. تم سحب 1 مل من أنابيب التخفيفان $10^6$ و $10^7$ وزرعت العينات بطريقة الأطباق المصبوبة على الوسطين الزرعيين الصلبين MRS و M17 المجهزين من شركة HiMedia (الهند). حضنت الأطباق لمدة 48 ساعة هوائيا ولاهوائيا على التوالي. تم نقل كل مستعمرة مختلفة في الشكل والقوام والصفات الظاهرية إلى أنبوبة ذات حجم 10 مل تحوي على الوسط الزرعي الصلب MRS وتم تنميتها عند 30 $^{o}$م لمدة 48 ساعة لتهيئتها للفحوصات الكيموحيوية للوصول الى الانواع والسلالات من بكتريا حامض اللاكتيك وكما في Harrigan and McCance ، (1976) و Atlas واخرون، (1995).تم استخلاص وتقدير مركبي النكهة ثنائي الاسيتل والاسيتيون كما جاء في الطريقة المعتمدة في Kobayashi ، (2005)اذ تم استخلاص مركب ثنائي الاسيتل بعد ترشيح الوسط الزرعي المستخدم لانتاج مركب النكهة الداي استيل بأستخدام ورق ترشيح من نوع Whattman 2 ، ثم تم تقطير الراشح بأستخدام جهاز المبخير الدوار Rotay evaporater عند درجة حرارة 88 م لحين الحصول على 5 مل منه ثم يحفظ الراشح عند درجة 4 م لحين الاستخدام. اما في حالة استخلاص وتقدير مركب الاسيتيون فانه بعد ترشيح الوسط الزرعي المستخدم لانتاجه من خلال اوراق الترشيح تم اضافة الكحول الاثيلي بحجم مساوي لحجم الراشح الذي مزج جيدا" باستخدام الرج لمدة 5 دقائق ثم وضعت العينة في جهاز المبخر الدوار لحين الحصول على 5 مل من الراشح المقطر الذي حفظ على درجة 4 م لحين الاستخدام.ولاكمال الاستخلاص والتقدير لكلا مركبي النكهة فقد تم خلط 0.5 مل من كل من الراشح المقطرمن ثنائي الاسيتل والاسيتيون مع 0.5 مل محلول فوسفات البوتاسيوم (1µ) وضبط رقم الهيدروجين عند 7، ثم اضيف 2 مل من 2-Pentanone و 0.5 مل من Ethyl acetate ومزجت العينة جيدا" مع الرج لمدة 2 دقيقة بعدها اجري لها النبذ المركزي على سرعة 10000 دورة/دقيقة واخذت الطبقة العضوية العليا في انبوب النبذ.تم تقدير مركبي النكهة في العينات بأستخدام جهاز كروموتوغرافيا السائل ذو الاداء الفائق High performance liquid chromatography method (HPLC) نوع SHIMADZU (ياباني المنشأ) واستخدم عمود الفصل من نوع Shim-Pack 15c-07/51504 mn وجهاز الكاشف Detecter نوع Fluorescence اما جهاز الضخ فكان من نوع SHIMADZU وتم ضبط معدل جريان

النموذج على 2 مل /دقيقة.وقد تم استخدام المحاليل القياسية لمركبي ثنائي الاسيتل والاسيتيون المجهزة من شركة Fluka الامريكية. لإجراء تطفير السلالات التي هي قيد البحث تم اتباع ماجاء فيVadeboncoeur and Moineaus ، (2005) اذ تم تنمية كل من مستعمرات السلالات الأربع في انبوب زجاجي يحتوي 10 مل من الوسط الزرعي السائل MRS عند 30 °م لمدة 6 ساعات، ثم اجري النبذ المركزي للخلايا البكتيرية عند سرعة 3500دوره/ دقيقة ومن ثم غسلها بإستخدام 10 مل من المحلول المنظم فوسفات الصوديوم Sodium phosphate buffer (100 ملي مولار وأس هيدروجيني 7)، ثم اعيد تعليقيها في 1 مل من المحلول المنظم. بعدها تم مزج عالق الخلايا مع 1 مل لكل من المادتين المطفريين Bromouracil- أو Acridine orange والمجهزين من شركة Riedel Dehane الألمانية ليصبح التركيز لكل منها 100 مايكروغرام/مل ثم حضن المزيج عند حرارة 30 °م لمدة ساعة. بعدها أجريت عملية النبذ المركزي للمحلول, ثم تم غسله بـ 2 مل من المحلول المنظم وأعيد تعليق الخلايا في 10 مل من الوسط الزرعي السائل MRS. الخلايا المتحصل عليها والمعاملة بالمطفرات تم تخفيفها 100 مرة بإستخدام المحلول المنظم من فوسفات الصوديوم وتم خلطها لمدة دقيقة واحدة ثم زرعت على الوسط الزرعي الصلب MRS للحصول على أعداد ما بين 75–100 مستعمرة في كل طبق بتري. ثم أخذت مستعمرتين ناميتين من كل مزرعة لكل معاملة من المطفرات أعتمادا على الصفات الظاهرية وأعطيت لها رموزا خاصة وأستخدمت في التجارب اللاحقة وكما في الجدول (4–20). كما تم عمل مزارع حفظ في أنابيب محكمة الغلق من السلالات المطفرة والتي حفظت في الثلاجة عند درجة حرارة 4م°، والتي اعيد تجديدها كل 4 أسابيع.

حُضر 100 مل من الوسط الزرعي السائل MRS, والذي لقح بمقدار 10 مل من السلالات البكتيرية المطفرة. بعد الحضن لمدة 18 ساعة في درجة حرارة 30°م تم أستخلاص كل من ثنائي الأسيتيل والأسيتيون الناتجان وقد كررت العملية لغاية خمسة عشر نقلة.

تم تحليل نتائج التجارب بإستخدام طريقة النموذج الخطي العامGeneral linear model ضمن البرنامج الأحصائي الجاهز (SAS ، 2001) لغرض دراسة تأثير العوامل وفق التصميم العشوائي الكامل Complete random design (CRD) مع التداخلات. كما أجري أختبار دنكن (Duncan ، 1955) لتحديد معنوية الفروقات ما بين متوسطات العوامل المؤثرة على الصفات المدروسة عند مستوى أحتمالية (0.05).

**النتائج والمناقشة**

يبين الجدول(1)الصفات المظهرية والمزرعية والكيموحيوية للسلالات المعزولة والتي تم العزل على أساسها اذ تم الحصول على أربع عزلات من بكتيريا حامض اللاكتيك بعد تنميتها على وسط MRS والمعزولة من نماذج الألبان المتخمرة المحلية وهي: *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* و *Lactococcus lactis subsp. lactis* و *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* و *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*. تبين بعد استخدام التصبيغ بصبغة كرام بأن العزلات المتحصل عليها كانت موجبة تجاهها وعند أختبار قدرتها في تكوين السبورات تبين أنها غير مكونة للسبورات وتعطي تفاعل سلبي تجاه انزيم الكاتاليز. أن هذه الصفات هي صفات عامة لجميع أنواع بكتيريا LAB وتتطابق هذه النتائج مع ماتوصلت اليه الدراسات السابقة Tserovska واخرون، (2002) و Miyoshi واخرون، (2003) و Guessasو Kihal، (2004). أظهر جنسي Lactococcus قابليتهما على إنتاج CO2 من الكلوكوز على عكس جنسي Leuconostoc وهذا يوضح سبب استخدام المزارع المختلطةMixed cultures التي تضم كلا الجنسين في تخمير الجبن لقابلية الاولى على إنتاج CO2 التي تعطي شكل ومزجة الجبن المعروفة ولاسيما الفراغات الهوائية في بعض أنواع الجبن، أما في حالة اختبار إنتاج الامونيوم من الأرجنين فقد كانت النتيجة عكسية حيث أنتجت سلالات الجنس Leuconostoc ولم تتمكن سلالات الجنس Lactococcus من الإنتاج وقد أتفقت هذه النتيجة مع Yim و Glover ، (2005)، ويجرى هذا الفحص للتمييز بين مجموعة البكتيريا ذات التخمر المتجانس والبكتيريا ذات التخمر غير المتجانس. كما أظهرت جميع السلالات قابليتها على النمو في كل من درجات الحرارة 15 و 37م° ولم تنمو في درجة حرارة 45م° وهذا يؤكد أن هذه الأجناس هي من ضمن مجاميع البكتيريا المتوسطة درجة الحرارة( Mesophlic) Cogan واخرون، (1999 ). ومن النتائج تبين أيضا" قابلية العزلات المدروسة على النمو بتركيز 4% NaCl باستثناء بكتيريا *L. mesenteroides subsp. cremoris* , بينما لم تستطع سوى بكتيريا *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* النمو في تركيز 6.5% NaCl وذات النتيجة في قابلية هذه البكتيريا على إنتاج الدكستران (Dextran) بعد تنميتها على الوسط الزرعي MRS agar الذي يحتوي على السكروز, بينما كانت الوحيدة غير القادرة على إنتاج الأسيتيون من الكلوكوز مقارنة ببقية العزلات إذ أن العزلات التي لها هذه القدرة تنتمي إلى مجموعة البكتيريا ذات التخمر غير المتجانس والتي تنتج 2,3-Buttanediol ( Prescott ، 2005) اما لقدرة البكتيريا قيد الدراسة على تخمير السكريات المختلفة والمذكورة في الجدول 1. فقد اظهر جنسي الـ Lactococcus القدرة على تخمير جميع سكريات الاختبار وأظهرجنس *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* نتيجة مماثلة بينما لم تظهر سلالة بكتيريا *L. mesenteroides subsp. cremoris* القدرة على تخمير سكر Arabinose و Ribose ، Mannitol , Fructose , Xylose Saccharose, Cellobiose , Sorbitolو Raffinose.

**جدول 1 : الصفات المظهرية والمزرعية والكيموحيوية للسلالات المعزولة من منتجات الالبان**

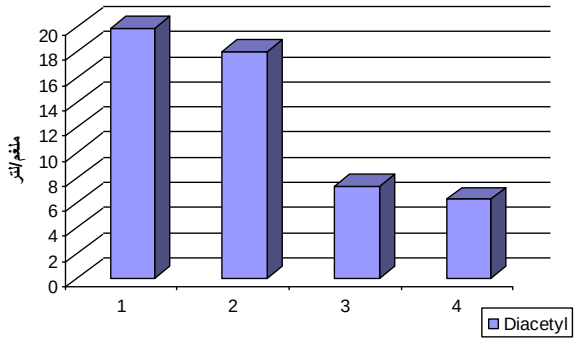
| Biochemical and cultural Characterization of strains | | *Lactococcus lactis* subsp lactis | diactylactis *Lactococcus lactis* subsp | *Leuconostoc mesenteroies* subsp *mesenteroieds* | *Leuconostoc mesentroides* subsp *cremries* |
|---|---|---|---|---|---|
| Gram stain reactions | | + | + | + | + |
| Spore formation | | − | − | − | − |
| Catalase activity | | − | − | − | − |
| Co2 from glucose | | − | − | + | + |
| NH3 from arginine | | + | + | − | − |
| Growth at temp. $^{o}$ c | 15 | + | + | + | + |
| | 37 | + | + | + | + |
| | 45 | − | − | − | − |
| Growth in medium with Nacl % | 4 | + | + | + | − |
| | 6.5 | − | − | + | − |
| Production of | Dextran from sucrose | − | − | + | − |
| | Acetoin from glucose | + | + | − | + |
| Sugar fermentation | Arabinose | + | + | + | − |
| | Ribose | + | + | + | + |
| | xylose | + | + | + | − |
| | Galactose | + | + | + | + |
| | Fructose | + | + | + | − |
| | Mannitol | + | + | + | − |
| | Sorbitol | + | + | − | − |
| | Cellobiose | + | + | + | − |
| | Maltose | + | + | + | + |
| | Lactose | + | + | + | + |
| | Melibiose | + | + | + | + |
| | Saccharose | + | + | + | − |
| | Trehalose | + | + | + | + |
| | Raffinose | + + | + + | + + | − |

***ان جميع العزلات كان شكلها بيضوي**

**إنتاج مركبي النكهة ثنائي الأسيتيل والأسيتيون من العزلات**

يظهر الشكل 1. متوسط إنتاج مركب النكهة ثنائي الأسيتيل للسلالات الأربعة المعزولة. يتبين من النتائج أن أعلى كمية منتجة من ثنائي الأسيتيل كان من قبل بكتيريا *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* وبكمية 19.9 ملغم/لتر تلتها بكتيريا *Lactococcus lactis subsp. lactis* 18.05 ملغم/لتر ثم *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* (7.3 ملغم/لتر) بينما كانت بكتيريا *Leuconostoc mesenteroides subsp. Cremoris* (6.3 ملغم/لتر). أما بالنسبة لإنتاجية هذه السلالات من الأسيتيون فقد

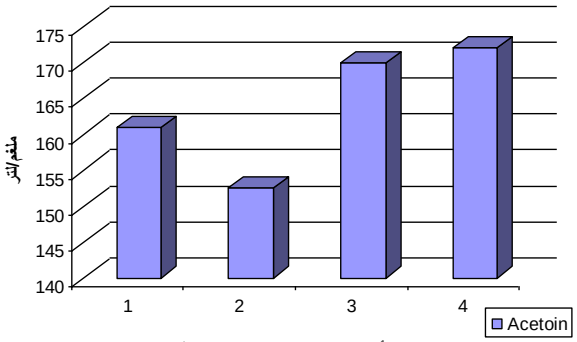
وضحها الشكل 2. من قبل نفس السلالات وشملت ظروف تنمية البكتيريا عند 30 $^{o}$م ورقم الهيدروجين 6.1 ، إذ تبين أن أعلى إنتاجية كانت لبكتيريا *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* وبكمية 172 ملغم/لتر, وان أقل إنتاجية هي لجنس *Lactococcus lactis subsp. lactis* 152.5 ملغم/لتر, بينما توسطت كل من بكتيريا *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* و *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* في إنتاج الأسيتيون بمقدار 169.9 ملغم/لتر و 160.9 ملغم/لتر على التوالي. كما لوحظ أيضا من النتائج في الشكلين بأن الكمية المنتجة من مركب ثنائي الأسيتيل كانت أقل من كمية الأسيتيون في جميع السلالات المدروسة. عند الرجوع




**الشكل 1. متوسط إنتاج ثنائي الأسيتيل للسلالات المعزولة مقدرة بملغم/لتر**

1*: Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis,*
2*: Lactococcus lactis* subsp. *lactis,*
3*: Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides,*
4*: Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*

للمسارات الأيضية لتكوين المركبين لوحظ ان الأسيتيون يعد مركبا وسطيا في عملية التخمر غير المتجانس والذي قد يتحول فيما بعد إلى 2,3-Buttanediol وهو مسار ثابت في عملية التخمر غير المتجانس بالإضافة إلى تحول ثنائي الأسيتيل إلى أسيتيون في ظروف نقص الأوكسجين لزيادة نشاط أنزيم Diacetyl reductase (Bassit et al., 1993) أما بالنسبة لثنائي الأسيتيل فان انتاجه يكون من خلال مسلك واحد هو عن طريق أكسدة المركب α–acetolactate وهو تفاعل قلق قد يتحول الى ثنائي الأسيتيل أو أسيتيون بفقدان جزيئة CO2 تلقائيا (Boumerdassi، 2007). اتفقت النتائج مع ماذكره كل من McSweeney و Sousa ، (2000) و Midje واخرون، (2000).




**شكل 2. متوسط إنتاج الأسيتيون للسلالات المعزولة مقدرة بملغم/لتر**

1*: Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis,*
2*: Lactococcus lactis* subsp. *lactis,*
3*: Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides,*
4*: Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*

**إنتاج مركبي ثنائي الأسيتيل والأسيتيون من عزلات بكتيريا حامض اللاكتيك المطفرة.**تم قياس مستوى إنتاج كل من المركبين ثنائي الأسيتيل والأسيتيون لسلالات مختلفة من بكتيريا حامض اللاكتيك المستخدمة في الدراسة والتي تم تطفيرها باستخدام مادتين مطفرتين كل منهما على حدا هما 5- Bromouracil (B) و Acridine orange (A) وتم الحصول على ثمان عزلات مختلفة الإنتاجية للمركبين. يظهر الجدول 2. إنتاجية هذه السلالات المطفرة لكل من ثنائي الأسيتيل والأسيتيون مقدرة بملغم/لتر وقد سجلت أعلى إنتاجية غير معنوية لمركب ثنائي الأسيتيل من قبل السلالة 2A (24.50 ملغم/لتر) ثم تلتها 1A (24.30 ملغم/لتر) بينما كان الفرق معنويا" مع السلالة التالية من ناحية الإنتاجية وهي 2B (20.95 ملغم/لتر) ثم تليها السلالة 1B (19.70 ملغم/لتر) واللتان لا يوجد بينهما فرق معنوي ثم تلتها وبفارق معنوي 3A و 4A و3B و4B وبتراكيز (9.15 , 8.45 , 8.30 و 7.60 ملغم/لتر) على التوالي، ولم يكن هناك فرق معنوي بين السلالات الأربعة الأخيرة. أما بالنسبة لإنتاجية هذه السلالات من الأسيتيون فقد سجلت جميع السلالات المطفرة إنتاجية أعلى مقارنة بالأبوية وكانت السلالة 4B (178.75 ملغم/لتر) أعلى إنتاجية وكانت غير معنوية مقارنة مع السلالتين التاليتين وهما 4A و 3B وبتراكيز 178.00 و 177.50 ملغم/لتر على التوالي. ثم تلتها السلالات 3A و 1 B و 1A و 2B و 2A التي اختلفت عن بعضها معنويا".أن إنتاجية السلالات المطفرة باستخدام 5-Bromouracil من ثنائي الأسيتيل سجلت أعلى إنتاجية له مقارنة بالسلالات الابوية ولجميع العزلات بأستثناء بكتيريا *L. lactis subsp. diacetylactis* . أما بالنسبة للسلالات المطفرة باستخدام Acridine orange فقد كان إنتاج جميع السلالات المطفّرة من ثنائي الأسيتيل أعلى من السلالة الأبوية ولجميع العزلات. أن استخدام المواد المطفرة قد يؤدي إلى حدوث طفرات عشوائية في الجينات المسؤولة عن بناء الأنزيمات المشاركة في أيض السترات وتكوين مركبات النكهة كتعطيل جين aldB المسؤول عن إنتاج أنزيم ALDH مما يؤدي إلى تراكم كميات كبيرة من ALD وبالتالي زيادة في إنتاج ثنائي الأسيتيل لاسيما إذا تزامنت مع ضعف في إنتاج LDH (Monnet واخرون، 2000 و Nielsen واخرون، 2003).

**الجدول 2. إنتاج مركبي ثنائي الأسيتيل والأسيتيون (ملغم/لتر)من عزلات مختلفة من بكتيريا حامض اللاكتيك المطفرة بكل من -5 Bromouracil وAcridine orange**

| ت | السلالات | لون المستعمرة | الكمية (ملغم/لتر) قبل التطفير من: | | الكمية (ملغم/لتر) بعد التطفير من: | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ثنائي الأسيتيل | الأسيتيون | ثنائي الأسيتيل | الأسيتيون |
| 1 | ***Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* B** | كريمي | 19.9 | 160.9 | 19.70±0.30 b | 165.90±0.80 c |
| | ***Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* A** | كريمي | | | 24.30±0.60 a | 160.70±0.30 d |
| 2 | ***Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B** | كريمي | 18.05 | 152.5 | 20.95±0.55 b | 158.90±0.30 e |
| | ***Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A** | كريمي | | | 24.50±1.30 a | 156.85±0.35 f |
| 3 | ***Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* B** | كريمي | 7.3 | 169.9 | 8.30±0.20 c | 177.50±0.60 a |
| | ***Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* A** | كريمي | | | 9.15±0.15 c | 174.95±0.35 b |
| 4 | ***Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* B** | كريمي | 6.3 | 172.0 | 7.60±0.20 c | 178.75±0.25 a |
| | ***Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* A** | كريمي | | | 8.45±0.25 c | 178.00±0.60 a |

**a–f: الأحرف المتشابهة في العمود الواحد لا تختلف معنويا عند مستوى احتمالية 0.05.**

**B= تشير إلى السلالة المطفرة باستخدام المادة الكيمياوية 5-Bromouracil. A= تشير إلى السلالة المطفرة باستخدام المادة الكيمياوية Acridine orange.**

أما بالنسبة لإنتاجية هذه العزلات المطفرة من الأسيتيون، إذ أنه فيما يخص السلالات المطفرة باستخدام 5-Bromouracil فقد أظهرت جميع السلالات زيادة في إنتاج الأسيتيون مقارنة بالسلالات الأبوية, كذلك الحال بالنسبة للسلالات المطفرة بالأكردين باستثناء بكتيريا L. lactis subsp. diacetylactis والتي أظهرت سابقا عدم حدوث تغير بالإنتاجية للثنائي الأسيتيل مقارنة بالسلالة الابوية فربما عانت هذه العزلة من حدوث طفرة في الجين المسؤول عن بناء الـ LDH وأدت إلى تعطيله مما أدى إلى زيادة إنتاج الأسيتيون مقارنة بإنتاج ثنائي الأسيتيل.، التي اتفقت مع ماوجده Goupil – Feuillerat واخرون، (2000) أو قد تسبب هذه الطفرات تسريع عملية تحول الكلوكوز إلى أسيتيون في ظروف لاهوائية وكانت متفقة مع (Boumerdassi واخرون، 1997 و Hugenholtz و Kleerebzem، 1997).

**ثباتية السلالات المطفرة بكل من 5-Bromouracil و Acridine orange في إنتاج مركب ثنائي الأسيتيل والأسيتيون بعد نقلات متعددة**

يبين الجدول 3. ثباتية السلالات المطفرة في أنتاج مركب ثنائي الأسيتيل بعد نقلات متعددة، اذ تبين وجود ثباتية عالية في الإنتاج ولجميع السلالات بعد عدة نقلات, ويظهر الجدول أيضا عدم وجود فروق معنوية في إنتاج ثنائي الأسيتيل من قبل عزلات بكتيريا حامض اللاكتيك المدروسة بعد 15 نقلة عند مستوى احتمالية ($p<0.05$). لوحظ من النتائج وجود فروقات حسابية وهي غير معنوية لبعض العزلات المطفرة تمثلت عند النقلة الخامسة عشر ولجميع السلالات الطافرة باستثناء السلالتين *L. lactis subsp. lactis* (B) و *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* (B) اللتان أظهرتا قيم منخفضه في كمية ثنائي الأسيتيل المنتج من قبل العزلات الطافرة عند النقلتين 10 و 15 دون وجود فروق معنوية. اما عن ثباتية السلالات المطفرة بكل من 5-Bromouracil وAcridine orange في إنتاج مركب الأسيتيون بعد نقلات متعددة فقد وضحها الجدول 4. اذ بين ثباتية عالية لإنتاج السلالتين المطفرتين *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* (B) و *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* (A) مع وجود اختلافات طفيفة لم تصل الى المستوى المعنوي بالنسبة للسلالة *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* (A) في النقلة 15. أما بالنسبة للسلالة *Lactococcus lactis subsp. lactis* (B) فقد كان هناك انخفاض طفيف في كمية الأسيتيون المنتج عند النقلة 15 دون وجود فرق معنوي بينما كانت الفروق معنوية للسلالة *Lactococcus lactis subsp. lactis* (A) عند النقلتين 10 و15. كما لوحظ من النتائج عدم وجود فروق معنوية في كمية الأسيتيون المنتج من قبل السلالة *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* (B) ولجميع النقلات باستثناء النقلة 15 إذ انخفضت القيمة بشكل طفيف ولكنها لم تصل الى المستوى المعنوي أيضا" للأسيتيون المنتج من قبل

السلالة *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* (A) عند النقلتين 10 و15. أما بالنسبة للسلالة *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* (B) فلوحظ وجود انخفاض طفيف في كمية الأسيتيون المنتج عند النقلة 15 دون وجود فرق معنوي بينما كانت القيم حسابية وغير معنوية أيضا"عند($p<0.05$) بالنسبة للسلالة *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* (A) عند النقلتين 10 و15.ان ثباتية الإنتاج بعد نقلات متعددة ولجميع السلالات المطفرة ولكلا العامليّن المطفريّن دل ذلك على أن الطفرات المتحصل عليها هي من نوع الطفرات الصغرى التي تحدث على مستوى الجين والتي تتميز بثباتيتها العالية وعدم حدوث تدهور بالتغيرات التي تم الحصول عليها بالتطفير وقد دل ذلك على فعالية المطفرات المستخدمة في هذه الدراسة. أما ثباتية السلالات المطفرة في إنتاج الأسيتيون والذي أظهر ثباتية عالية للإنتاج ولجميع السلالات بأستثناء *L. lactis subsp. lactis* والمطفرة بالـ Acridine orange والتي سجلت انخفاضا بسيطا في الإنتاج في النقلة العاشرة والخامسة عشر وبواقع 155.70 و154.50 ملغم/لتر على التوالي، وكذلك الحال بـ 5-Bromouracil في النقلة 15 اذ كانت 177.70 ملغم/لتر وأكثرها تأثرا بالنقلات كانت السلالة *L. mesenteroides subsp. cremoris* المطفرة بـ Acridine orange في النقلة 15 (176.95 ملغم/لتر) وهذا يدل على أن البكتيريا التي عانت من تدهور في ثباتية الطفرة ربما كانت الطفرات التي حدثت في الجينات هي من الطفرات الكبرى Major mutantsوالتي تتغير فعاليتها بعد فترة من الزمن.

**الجدول 3. ثباتية السلالات المطفرة بكل من 5-Bromouracil وAcridine orange في إنتاج ثنائي الأسيتيل(ملغم/لتر) بعد نقلات متعددة**

| السلالات | عدد النقلات<br>كمية ثنائي الأسيتيل (mg/L) بعد نقلات متعددة | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0 | 5 | 10 | 15 |
| *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis B* | 19.70±0.30 b | 19.70±0.30 b | 19.70±0.30 b | 19.50±0.30 b |
| *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* A | 24.30±0.60 a | 24.30±0.60 a | 24.30±0.60 a | 24.00±0.50 a |
| *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B | 20.95±0.55 b | 20.95±0.55 b | 20.85±0.65 b | 20.80±0.70 b |
| *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A | 24.50±1.30 a | 24.50±1.30 a | 24.50±1.30 a | 24.35±1.15 a |
| *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* B | 8.30±0.20 c | 8.30±0.20 c | 8.25±0.25 c | 8.05±0.25 c |
| *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* A | 9.15±0.15 c | 9.15±0.15 c | 9.15±0.15 c | 9.05±0.25 c |
| *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* B | 7.60±0.20 c | 7.60±0.20 c | 7.60±0.20 c | 7.40±0.10 c |
| *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* A | 8.45±0.25 c | 8.45±0.25 c | 8.45±0.25 c | 8.40±0.20 c |

**a–c: الأحرف المتشابهة في العمود الواحد لا تختلف معنويا عند مستوى احتمالية 0.05.**

**B= تشير إلى السلالة المطفرة باستخدام المادة الكيمياوية 5-Bromouracil. A= تشير إلى السلالة المطفرة باستخدام المادة الكيمياوية Acridine orange.**

**الجدول 4. ثباتية السلالات المطفرة بكل من 5-Bromouracil و Acridine orange في إنتاج الأسيتيون(ملغم/لتر) بعد نقلات متعددة**

| السلالات | عدد النقلات: كمية ثنائي الأسيتيل (mg/L) بعد نقلات متعددة | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0 | 5 | 10 | 15 |
| *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis B* | 165.90±0.80 c | 165.90±0.80 c | 165.90±0.80 c | 164.65±0.45 c |
| *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* A | 160.70±0.30 d | 160.70±0.30 d | 160.70±0.30 d | 159.65±0.65 d |
| *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B | 158.90±0.30 e | 158.90±0.30 e | 158.90±0.30 d | 158.35±0.25 d |
| *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A | 156.85±0.35 f | 156.85±0.35 f | 155.70±1.50 e | 154.50±1.20 e |
| *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* B | 177.50±0.60 a | 177.50±0.60 a | 177.50±0.60 a | 176.95±0.05 ab |
| *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* A | 174.95±0.35 b | 174.95±0.35 b | 174.65±0.65 b | 174.20±1.10 b |
| *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* B | 178.75±0.25 a | 178.75±0.25 a | 178.75±0.25 a | 177.70±1.30 a |
| *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* A | 178.00±0.60 a | 178.00±0.60 a | 178.00±0.60 a | 176.95±0.45 ab |

**a- f: الأحرف المتشابهة في العمود الواحد لا تختلف معنويا عند مستوى احتمالية 0.05.**

**B= تشير إلى السلالة المطفرة باستخدام المادة الكيمياوية 5-Bromouracil. A= تشير إلى السلالة المطفرة باستخدام المادة الكيمياوية Acridine orange.**

**المصادر**


Atlas, R. M.; Parks, L.C. and Brown, A. E. (1995). Laboratory manual of experimental microbiology. Mosby, Year Book, Inc.USA.

Bassit, N. ; Boquien, C-Y. ; Picque, D. and Corrieu, G. (1993). Effect of initial oxygen concentration on Diacetyl and Acetoin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Appl. Environ. Microbiol.,59(6):1893-1897.

Boumerdassi, H. ; Monnet, C. ; Desmazeaud, M. and Corrieu, G. (1997). Isolation and properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CNRZ483 mutants producing Diacetyl and Acetoin from glucose. Appl. Environ. Microbiol., 6(63):1-2.

Cogan, T. M. (1999). Starter culture: cultures employed in cheese making. Encyclopedia of Food Microbiology. Printed in Academic Press.

Curic, M. ; Sturer-Lauridsen, B. ; Rennault, P. and Nilsson, D. (1999). A general method for selection of α-acetolactate decarboxylase deficient *Lactococcus lactis* mutants to improve Diacetyl formation. Appl. Environ. Microbiol., 65(3):1202-1206.

Drider, D. ; Bekal, S. and Prévost, H. (2004). Genetic organization and expression of citrate permease in lactic acid bacteria. Genet. Mol. Res., 3(2):273-281.

Duncun, B. D. (1955 Multiple). Rang and multiple F-test .Biometric 11:1-42.

ErdoĞrul, O. and Erbair, F. (2006). Isolation and characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactibacillus casei* from various foods. Turk. J. Biol., 30:39-44.

Guessas, B. and Kihal, M. (2004). Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw Goat's Milk. African. J. Biotechnol., 3(6):339-342.

Harrigan, W. F. and McCance, M. E. (1976). Laboratory methods in foods and diary microbiology, Academic Press, New York.

Hugenholtz, J.and Kleerebezem, M. (1999). Metabolic engineering of lactic acid bacteria: Overview of the approaches and results of pathway involved fermentations. Current Opinion in Biotechnol., 10:492-497.

Kobayashi, K. ; Kusaka, K. ; Takaahashi, T. and Sato, K. (2005). Method for simultaneous assay of Diacetyl and Acetoin in the presence of α-acetolactate: Application in determining the kinetic parameters for the decomposition of α-Acetolactate. J. Biosci. Bioengin., 99(5):502-507.

Levata-Jovanovic, M. and Sandine, W. E. (1997). A method to use Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris 91404 to improve milk fermentations. J. Dairy Sci., :11-18.

Lonvaud-Funel, A. (1999). *Leuconostoc*. Academic Press. USA.

McSweeney, P. L. H. and Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathway for production flavour compound in cheese during ripening: A review. Lait., 80:293-324.

Midje, D. L. ; Bastian, E. D. ; Morris, H. A. ; Martin, F. B. ; Bridgeman, T. and Vicers, Z. M. (2000). Flavour enhancement of reduced fat chedder cheese using an integrated culturing system. J. Agric. Food Chem., 48(5): 1630-1636.

Miyoshi, A. ; Rochat, T. ; Gratadoux, J. J. ; Le Loir,Y. ; Olivera, S. C. ; Langella, P. and Azevedo, V. (2003). Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. Gen. Mol. Res., 2(4):348-359.

Monnet, C. ; Aymes, F. and Corrieu, G. (2000). Diacetyl and α-acetolactate overproduction *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* mutants that are deficient in α-acetolactate decarboxylase and Activity. Appl. Environ. Microbiol., 66(12):5518-5520.

Narayanan, N. ; Roychoudhury, P. K. and Srivastava, A. (2004). L(+) lactic acid fermentation and it's product Polymerization. Electronic. J. Biotechnol., ISSN:0717-3458.

Nielsen, J. C. and Richelieu, M. (2003). Control of development in wine during and after malolatictic fermentation by *Oenococcus oeni*. Am. Sci. Microbiol., 2(65):740-745.

Olsen, N. F. ; Anderson, R. F. and Sellars, R. (1978). Microbiological methods for cheese and other cultured products ., in: Marth, E. H. (ed.), Standerd methods for the examination of dairy products, 14th ed. American Public Health Association. Washinton (D. C). :161-164.

Prescott, L. M. ; Harley, J. P. and Klein, D. A. (2005). Microbiology (Six ed.). Printed in The McGraw-Hill Companies, Inc. New York.

Rogosa, M. ;Wisbman, R. F. ;Mitchell, J. A. ;Disraely, M. N. and Beman, A. J.(1953). Species differentiation of oral *Lactobacilli* from man including description of *Lactobacillus salivarius* nov. spec. and *Lactobacillus cellobiosus* nov. spec. J. Bact., 65:681-699.

SAS Version , Statistical Analysis System 2001 . SAS Institute Inc., Cary , NC. 27512 – 8000 , U.S.A.

Savadogo, A. ; Ouattara, C. A. T. ; Savadogo, P. W. ; Ouattara, A. S. ; Barro, N. and Traore, A. S. (2004). Microorganisms involved in fulani traditional fermented milk in Burkina Faso. Pakistan J. Nut., 3(2):134- 139.

Tamine, A. Y. and Ribinson, R. K. (2000). Yoghurt: Science and Technology (2nd Edition). Press LLC-All rights reserved.

Tserovska, L. ; Stefanova, S. and Yordanova, T. (2002). Identification of lactic acid bacteria isolated from Katyk, Goats milk and cheese .J. Cul. Coll., 3:48-52.

Urbach, G. (1995). Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy product. Int. Dairy J., 5:877-903. (Cited by McSweeney and Sousa, 2000).

Vadeboncoeur, C. and Moineau, S. (2004). The relevance of genetic analysis to dairy bacteria: Building upon our heritage. Microbial Cell Factories., 3(15):1475-2859.

Yim, G. and Glover, C. (2005). Background basics and the details of cheese production. Food Microbiol.,1 :1-4.