التغيرات التركيبية في الآيزوفلافونات والسكريات قصيرة السلسلة في تخمرات حليب الصويا باستعمال بكتريا حامض اللاكتيك

خلف نهر أحمد وموفق محمود أحمد

قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة والغابات – جامعة الموصل

الخلاصــة

استخدمت ثلاثة أنواع من بكتريا حامض اللاكتيك وهي *Lactobacillus rhamnosus* و *L. bulgaricus* ATCC 118 و *Bifidobacterium bifidoum* التي أظهرت في تجارب أولية قدرتها على انتاج انزيمي ألفا– كالاكتوسيديز (α-galactosidase) وبيتا– كلوكوسيديز (β-glucosidase) في الوسط المختبري، في تخمير حليب الصويا لغرض التحويل الحيوي للآيزوفلافونات وتحليل السكريات قصيرة السلسلة. في التجربة الأولى استخدمت البكتريا لتحويل مركبات الآيزوفلافونات الكلايكوسيدية غير الفعالة إلى مركبات أكلايكونية فعالة في الحليب. دلت النتائج على قدرة سلالات بكتريا حامض اللاكتيك الثلاث المستعملة على التحويل الحيوي للآيزوفلافون الكلايكوسيدي الجينستين (Genistin) الذي انخفض تركيزه تدريجياً في الحليب بزيادة مدة التخمير. كانت أفضل بكتريا في التحويل هي *L. bulgaricus* ATCC 118، وخفضت تركيز المركب بمقدار 0,158 ملغم/ 100مل حليب بعد 48 ساعة من التخمير مقارنة مع عينة السيطرة. وقد زاد تدريجياً تركيز كل من الآيزوفلافونات الأكلايكونية الديادزئين (Daidazein) والجينستئين (Genstein)، بزيادة مدة التخمر أيضاً ولغاية 48 ساعة. وكانت أفضل بكتريا في زيادة تركيز الديادزئين هي *L. rhamnosus* و *L. bulgaricus* ATCC 118 اللتين زادتا تركيز المركب بمقدار 0,295 ملغم/ 100مل حليب لكل منهما، بينما كانت أفضل بكتريا في زيادة مركب الجينستئين هي *L. bulgaricus* ATCC 118 وقد زادت تركيزه بمقدار 0,390 ملغم/ 100مل حليب. أجريت التجربة الثانية لتحليل السكريات القصيرة السلسلة، المسببة لسوء الهضم والانتفاخ للمستهلكين، الرافينوز والستاكيوز في حليب الصويا. دلت نتائج هذه التجارب على كفاءة سلالات بكتريا حامض اللاكتيك المستعملة على تحليل هذه السكريات وخفض تركيزها في الحليب تدريجياً بزيادة مدة التخمر. وكانت أفضل بكتريا في تحليل سكر الرافينوز هي *L. rhamnosus* وقد خفضت تركيزه بمقدار 1,87 ملغم/ 100مل حليب، بينما كانت أفضل بكتريا في تحليل مركب الستاكيوز هي *L. bulgaricus* ATCC 118 التي خفضت تركيزه بمقدار 2,83 ملغم/ 100مل حليب الصويا، وذلك بعد 48 ساعة من التخمير.

الكلمات المفتاحية:
بكتريا حامض اللاكتيك، أيزوفلافونات، سكريات قصيرة السلسلة .

للمراسلة :
خلف نهر احمد
قسم علوم الاغذية ، كلية الزراعة والغابات ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق .

Compositional Changes in Isoflavones and Oligosaccharides in Soymilk Fermentations by Lactic Acid Bacteria

Khalaf N. Ahmad & Moafak M. Ahmad

Food Sciences Dept., College of Agric. and Forestry, Univ. of Mosul .

ABSTRACT

Three species of lactic acid bacteria namely, *Lactobacillus rhamnosus*, *L. bulgaricus* ATCC 118 and *Bifidobacterium bifidoum*, which in preliminary experiments showed ability to produce α-galactosidase and β-glucosidase in laboratory media, were used in soymilk fermentation for biotransformation of isoflavones and degradation of oligosaccharides. In the first experiment, lactic acid bacteria were used in the biotransformation of glycosidic isoflavones to aglyconic bioactive compounds in soymilk. Results indicated the ability of the selected bacteria to convert the glycosidic isoflavone genistin, as its concentration reduced gradually during fermentation. *L. bulgaricus* ATCC 118 was the best and reduced this compound by 0.158mg/ 100ml after 48hrs of fermentation. On the other hand, the concentration of the aglyconic isoflavones daidazein and genstein were gradually increased as fermentation proceeded up to 48hrs. For daidazein, *L. rhamnosus* and *L. bulgaricus* ATCC 118 were the best and they increased the concentration of the compound by 0.295mg/ 100ml, while for genistein, *L. bulgaricus* ATCC 118 was the best and increased its concentration by 0.386mg/ 100ml. In the second experiment, lactic acid bacteria were

Key words:
Lactic Acid Bacteria, Isoflavones, Oligosaccharides

Correspondence:
Khalaf N. Ahmed
Food Sciences Dept., College of Agric. and Forestry, Univ. of Mosul , Mosul, IRAQ.

used for the hydrolysis of the oligosaccharides that cause digestion disturbance and flatulence, raffinose and stachyose, in soymilk. Results indicated that the bacterial strains were effective in reducing their concentration. For raffinose, *L. rhamnosus* was the best and reduced raffinose concentration by 1.87mg/ 100ml, while *L. bulgaricus* ATCC 118 was the best in reduction of stachyose as its concentration was reduced by 2.83mg/ 100ml, after 48hrs of fermentation.

المقدمـة :

حظيت بكتيريا حامض اللاكتيك باهتمام كبير في مجالات صناعة الألبان والصناعات الغذائية الأخرى كصناعة منتجات الصويا المتخمرة، وقد شغلت مساحة واسعة في دائرة البحوث الطبية والصيدلانية والزراعية لحل العديد من المشاكل الصحية، وذلك لما تتمتع بهِ من صفات ساعدت في حل العديد من المشاكل منها نموها بوجود الهواء وعدم وجوده وعدم انتاجها للسموم ومقاومتها للحموضة، فضلاً عن الفعل التضادي الذي تبديه تجاه العديد من الأحياء المجهرية من خلال إنتاجها للعديد من المواد الأيضية ذات التأثير التثبيطي كالحوامض العضوية (اللاكتيك والخليك والبروبيونيك) وبيروكسيد الهيدروجين والبكتريوسينات (Devuyst و Vandamme، 1994)، مما شجع على استعمالها في الحفاظ على التوازن الطبيعي للنبيت المعوي، وعلاج حالات الإسهال وتقليل نسبة الكولسترول في الدم وتحسين الإستجابة المناعية والتقليل من نسبة الإصابة بالسرطان، لاسيما سرطان القولون والثدي، فضلاً عن استعمالها في حفظ الأغذية لقدرتها على التنافس مع الأنواع البكتيرية الأُخرى في البيئة (Rolfe، 1991).

نظراً لأهمية فول الصويا الغذائية ومحتواه العالي من البروتينات والدهون غير المشبعة فقد استغل في مجال تصنيع الأغذية على نطاق واسع منها مضاهيات اللحوم (Meat analogs) مثل البيركر (Liu، 2001) ومضاهيات الألبان (Dairy analogs) التي تُعد مصدراً مهماً للبروتين في البلدان التي لا تستطيع سد احتياجاتها من منتجات الألبان، ويعد حليب الصويا (Soymilk) وجبنة الصويا التوفو (Tofu) من أهمها (Shi و Ren، 1993). يُعد حليب الصويا من المواد الغنية بالحامض الدهني غير المشبع اللينوليك الذي يعمل على التقليل من مستوى الكولسترول في الدم (الخطابي، 2005). كما أن هذا الحليب لا يحتوي على سكر اللاكتوز الموجود في الحليب الحيواني، وبذلك يكون مفيداً للمرضى الذين يعانون من متلازمة عدم تحمل اللاكتوز (Bozanic وآخرون، 2011). ويحتوي فول الصويا على الآيزوفلافونات (Isoflavones) التي هي عبارة عن مركبات فينولية مشابهة لهرمون الاستروجين، لذا فهي تدعى بالأستروجينات النباتية التي تعمل على تقليل أعراض سن اليأس لدى النساء وتقليل مشاكل تنخر العظام وخفض مستوى الكولسترول في الدم، فضلاً عن قدرتها على تقليل خطر الإصابة بسرطان الثدي والرحم والبروستات (Alekel وآخرون، 2000). وتوجد هذه الآيزوفلافونات بالشكل الكلايكوسيدي غير الفعال وقليل الامتصاص بنسبة أكبر (83%) من الشكل الأكلايكوني الفعال المفيد لصحة الجسم. كما يحتوي حليب الصويا على بعض المواد غير المرغوب فيها مثل سكريات الرافينوز (Rhafinose) والستاكيوز (Stachyose)، وهي من السكريات قصيرة السلسلة غير القابلة للهضم، ووجود حامض الفايتيك الذي يعمل على تكوين معقدات غير ذائبة مع الأيونات الثنائية مسبباً تقليل امتصاصها ومن ثم خفض جاهزيتها الحيوية في الجسم (Beleia وآخرون، 1995).

ولغرض النهوض بصناعة منتجات فول الصويا استعملت طرق عدة من أجل تقليل أو إزالة تلك المحددات التغذوية من بذور الصويا التي منها إزالة القشور والنقع والمعاملات الحرارية والكيميائية (Richards و Steggerda، 1996؛ Anderson، 1992). وقد استعملت عملية التخمير لخفض تركيز العديد من المحددات التغذوية، واعتمد ذلك على نوع الأحياء المجهرية المستعملة. وقد استعملت بكتريا حامض اللاكتيك (Lactic acid bacteria) في تقليل مستوى الرافينوز والستاكيوز وكذلك التقليل من عدد من المركبات المسؤولة عن الطعم غير المرغوب في حليب الصويا (Tsangalis و Shah، 2004). كما تعمل بكتريا حامض اللاكتيك لاسيما الـ *Bifidobacteria* والـ *Lactobacillus* على تحويل الآيزوفلافونات من الشكل الكلايكوسيدي غير الفعال إلى الشكل الأكلايكوني الفعال بفعل إنزيم (β-glucosidase) الذي تنتجه هذه البكتريا، إذْ إن المتناظرات الأكلايكونية لها

القابلية على الارتباط على مواقع مستقبلات الأستروجين وبذلك تقوم بنفس وظائف الإستردايول (Esterdiol) في جسم الإنسان (Setchell، 1998).

هدف البحث إلى استخدام ثلاث من سلالات بكتريا حامض اللاكتيك في تحويل عدد من الآيزوفلافونات في حليب فول الصويا من الشكل الكلايكوسيدي غير الفعال إلى الشكل الأكلايكوني الفعال الذي له تأثير ايجابي في صحة المستهلك. وكذلك إلى إزالة بعض المحددات التغذوية والمركبات غير المرغوب فيها من حليب الصويا ومنها السكريات قصيرة السلسلة الرافينوز والستاكيوز.

مواد البحث وطرائقه :

بكتريا حامض اللاكتيك: استعملت السلالات التي أظهرت أعلى نشاط أنزيمي بتقدير الفعالية الإنزيمية في تجارب أولية وكانت *Lactobacillus rhamnosus* و *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 118 و *Bifidobacterium bifiduom* (التي تم الحصول عليها عن طريق قسم علوم الأغذية كلية الزراعة والغابات/ جامعة الموصل من مركز تجميع المزارع (Gazi culture collection GCC) جامعة غازي/ أنقرة (تركيا).

فول الصويا: تم الحصول على بذور فول الصويا (*Glyacine max*) صنف (Lee74) من كلية الزراعة– جامعة السليمانية.

تحويل مركبات الآيزوفلافونات الكلايكوسيدية إلى مركبات أكلايكونية في حليب الصويا:

تحضير حليب الصويا: حضر حليب الصويا (Soy milk) حسب ما ورد في Sumarna (2008). لتحضير 4 لتر من حليب الصويا أستعمل 500 غم من بذور فول الصويا الجافة، إذْ تم غسل البذور جيداً بالماء الدافئ ثم وضعت في وعاء مناسب ونقعت بكمية كافية من الماء على درجة حرارة 27مْ وبمقدار أربعة أضعاف حجم البذور لمدة 12 ساعة. تم غسل البذور المنقوعة بالماء الدافئ عدة مرات للتخلص من القشور والرائحة غير المقبولة ثم طحنت البذور المنقوعة مع لتر من الماء باستعمال الخلاط الكهربائي للحصول على عصير متجانس، ثم أضيفت كمية الماء المتبقي 3 لتر. سخن العصير إلى درجة حرارة 60مْ مع التحريك المستمر ثم أستخلص حليب الصويا بالترشيح باستعمال قطعة من الململ لغرض التخلص من المواد غير الذائبة وحفظ بالتبريد على درجة 4مْ لحين الاستعمال.

تخمير حليب الصويا: تم تخمير حليب فول الصويا حسب ما جاء في Sumarna (2008)، إذْ وزع حليب فول الصويا على دوارق مخروطية سعة 250مل في كل دورق 100مل ثم سخنت على درجة حرارة 100مْ لمدة 30 دقيقة ثم بردت ولقحت تحت ظروف معقمة بـ 1٪ (حجم/ حجم) من كل مزرعة بكتيرية وحضنت على 37مْ بمكررين وعلى 6 مدد تخمير هي صفر، 6، 12، 24، 36 و 48 ساعة.

استخلاص الآيزوفلافونات وتقديرها:

استخلاص الآيزوفلافونات: تم استخلاص الآيزوفلافونات حسب طريقة Otieno وآخرون (2006)، إذْ تم تجفيد عينات حليب الصويا المخمر وغير المخمر (عينة السيطرة) وأخذ 1غم من الحليب المجفد لجميع العينات ولكل أوقات التخمير وأضيف لها 50 مل من الميثانول في دورق غليان سعة 150 مل وتم الغلي على مصدر حراري مع وجود مكثف عاكس لمدة ساعة واحدة. نقل المزيج إلى أنابيب طرد مركزي سعة 50 مل وأجري الطرد المركزي على سرعة 14000× g لمدة 30 دقيقة وعلى درجة حرارة 10مْ. أخذ 2 مل من المحلول الرائق وبخر لحين الجفاف باستخدام المبخر الدوار (شركة Heidolph الألمانية). أذيبت المادة الجافة بكمية 1 مل من محلول الطور المتحرك ونقلت إلى أنابيب ابندورف وطردت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 14000× g لمدة 30 دقيقة وبعدها أخذ المحلول الرائق ورشح بغشاء مرشح دقيق ذي فتحات بقطر 0,45 مايكرومتر ثم نقلت إلى أنبوبة سعة 5 مل وحفظت بالتبريد لحين التقدير.

تقدير الآيزوفلافونات: قدرت الآيزوفلافونات باستخدام جهاز كروماتوكرافي السائل ذي الضغط العالي (High pressure liquid chromatography, HPLC) (شركة Shimadzu اليابانية، موديل LC-2010 AHT) وحسب طريقة Donkor و Shah

(2008) باستعمال عمود فصل مكون من حبيبات dedocyl silanol:C18 بقطر 5 مايكرومتر وبأبعاد 250 ملم × 4,6 ملم (شركة Machry-nojel الألمانية) وطور متحرك مكون من إذابة 50 ملغم من ثلاثي فلور حامض الخليك (Trifluoro-acitic acid, TFA) في 50٪ محلول خلات الأمونيوم المنظم (100مليمولار) و50٪ ميثانول، وبسرعة جريان 1مل/ دقيقة على درجة حرارة الغرفة ولمدة 45 دقيقة. وقدرت الآيزوفلافونات بالمقارنة مع قمم المركبات القياسية (شركة Sigma الألمانية) وعبر عنها بالملغم/ 100 مل حليب فول صويا.

تحليل السكريات قصيرة السلسلة في حليب الصويا:

تخمير حليب الصويا: تم تخمير حليب فول الصويا كما جاء في الفقرة السابقة.

استخلاص سكريات الرافينوز والستاكيوز وتقديرها:

استخلاص السكريات: تم استخلاص السكريات حسب الطريقة المذكورة في Tasngallis و Shah (2004)، فقد أخذ 3 مل من معاملات التخمير للسلالات المستخدمة ومن عينة المقارنة وأجريت لها عملية الطرد المركزي بسرعة 14000× g لمدة 30 دقيقة لإزالة البروتين ثم رشحت بغشاء ترشيح دقيق ذي فتحات 0,20 مايكرومتر وحفظت في قناني صغيرة (Vials) سعة 5 مل في التجميد لحين التحليل.

تقدير السكريات: قدرت السكريات بجهاز كروماتوكرافي السائل ذي الضغط العالي وعمود الفصل المستعملين في الفقرة السابقة وحسب طريقة Sumarna (2008) باستعمال طور متحرك أسيتونايترايل وماء مقطر لا أيوني (75:25) وبسرعة جريان 1 مل بالدقيقة وتم حقن 20 مايكرولتر من مستخلص السكريات وكذلك من المحاليل القياسية لسكريات الرافينوز والستاكيوز (شركة Sigma الألمانية) وعبر عن تراكيز السكريات بالملغم/100 مل من الحليب.

النتائج والمناقشة :

تأثير بكتريا حامض اللاكتيك في مركبات الآيزوفلافونات في حليب الصويا: تم تخمير حليب فول الصويا باستعمال سلالات ثلاث أنواع من بكتريا حامض اللاكتيك الثلاث والمنتخبة، اعتماداً على فعالية إنزيم بيتا–كلوكوسيديز (β–Glucosidase) لهذه البكتريا في دراسة أولية، وهي *Lactobacillus rhamnosus* و *Lactobacillus bulgaricus* ATCC.118 و *Bifidobacterium bifidoum* على درجة حرارة 37مْ ولمدد تخمير من صفر (عينة السيطرة) إلى 48 ساعة. يبين الجدول 1 بأن مركب الجينستين (Genstin) وهو المركب الرئيس بالشكل الكلايكوسيدي (β-glycosidic) يكون نحو 55% من مجموع الآيزوفلافونات بينما تكون المركبات الأكلايكونية (aglycones) وهي الديادزئين (Daidzein) والجينستئين (Genstein) نحو 45% منها، وهذه النتائج هي مطابقة لما وجده Tsangalis وآخرون (2002) الذين ذكروا أن المركبات الكلايكوسيدية غير المتوافرة وغير الفعالة حيوياً تكون النسبة الأكبر من تركيز متناظرات الآيزوفلافونات (83%) في معزول بروتين الصويا (Soy protein isolate) غير المخمر وأن تركيز الجينستين هو الأكبر من بينها، بينما يكون تركيز الآيزوفلافونات الأكلايكونية الفعالة حيوياً قليل جداً (8%). إن ارتفاع نسبة المركبات غير الفعالة التي ذكرها الباحثون عما وجد في هذا البحث هو ربما بسبب أن الباحثين استخدموا معزول بروتين الصويا الذي أجري له معاملات خاصة لعزل البروتينات وليس فول الصويا الطبيعي الكامل المستخدم هنا. يلاحظ من الجدول أيضاً أن أنواع بكتريا حامض اللاكتيك الثلاث قد أدت إلى حدوث تغير في تراكيز الآيزوفلافونات بشكليها الفعال حيوياً الأكلايكوني وغير الفعال الكلايكوسيدي، إذْ يظهر الجدول أن هناك ارتفاعاً في تراكيز المركبات الأكلايكونية الديادزئين والجينستئين وانخفاضاً في تركيز الآيزوفلافون الكلايكوسيدي الجينستين، وقد حدثت هذه التغيرات في تركيز مركبات الآيزوفلافونات بصورة خطية بزيادة مدة التخمر. بالنسبة للبكتريا *L. rhamnosus* فقد كان أقل تركيز للديادزئين عند وقت تخمير صفر وهو 0,055 ملغم/ 100 مل حليب صويا ووصل إلى أعلى تركيز عند مدة تخمير 48 ساعة

وكان 0,350 ملغم/ 100مل، وقد ارتفع تركيزه بزيادة مدة التخمير. أما الجينستئين فقد كان أقل تركيز له عند بداية وقت التخمير إذْ كان تركيزه 0,060 ملغم/ 100مل حليب عند صفر ساعة وارتفع إلى 0,310 ملغم/ 100مل بعد 48 ساعة من التخمير، وقد ارتفع تركيزه أيضاً بزيادة مدة التخمير. من جهة أخرى فقد انخفض تركيز مركب الجينستين بزيادة مدة التخمير فقد كان تركيزه عند بداية التخمير 0,140 ملغم/100 مل وانخفض تدريجياً ليصل إلى أقل تركيز عند وقت تخمير 48ساعة إذْ وصل إلى 0,030 ملغم/ 100 مل حليب. لقد جاءت هذه النتائج متفقه مع نتائج Sumarna (2010) الذي وجد أن مركب الجنستين قد انخفض تركيزه من 32,25 إلى 3,65 مايكروغرام/ مل وارتفع تركيز كل من مركبي الديادزئين والجينستئين من 15,16 و 8,46 إلى 44,70 و 34,61 مايكروغرام/ مل، على التوالي، بعد 24ساعة من التخمير باستخدام بكتريا *L. plantarum* SMN025. وتطابقت أيضاً ما ذكره Donkor و Shah (2008) أن المركبات الأكلايكونية قد ارتفع تركيزها بالتدريج مع زيادة مدة التخمير، فقد ازداد تركيزها من 0,18 إلى 0,50 مايكروغرام/ مل، وعلى العكس من ذلك فقد انخفض تركيز المركبات الكلايكوسيدية بزيادة وقت التخمير إذْ انخفض تركيزها من 0,60 إلى 0,10 مايكروغرام/ مل بعد 48ساعة عند استخدام بكتريا *L. acidophilus* L10. ويعود السبب في ذلك إلى أن إنزيم البيتا– كلوكوسيديز (β–Glucosidase) المنتج من قبل هذه البكتريا الذي يعمل عل زيادة تركيز الآيزوفلافونات الأكلايكونية الفعالة، إذْ يعمل على فصل الجزء السكري من الآيزوفلافونات الكلايكوسيدية عن طريق كسر الآصرة من نوع بيتا، وبالتالي يقلل الآيزوفلافونات الكلايكوسيدية غير الفعالة ويزداد هذا النشاط الإنزيمي بزيادة مدة التخمير (Chen وآخرون، 2011).

يبين الجدول أيضاً أن بكتريا *L. bulgaricus* ATCC.118 قد أدت إلى زيادة تركيز مركبي الديادزئين والجينستئين من 0,065 و 0,050 ملغم/ 100 مل في بداية عملية التخمر إلى 0,360 و 0,440 ملغم/ 100 مل بعد 48 ساعة وأن زيادة التركيز كان تدريجياً مع زيادة وقت الخمير. على العكس من ذلك، فقد قل تركيز مركب الجينستين من 0,190 ملغم/ 100 مل في بداية التخمير إلى 0,032 ملغم/ 100 مل حليب فول الصويا مع نهاية عملية التخمير.

وعند استخدام البكتريا *B. bifidoum* في تخمير حليب فول الصويا، فقد أدت إلى زيادة تركيز المركبين الأكلايكونيين الديادزئين والجينستئين من 0,067 و 0,063 ملغم/ 100مل حليب في بداية عملية التخمير إلى 0,240 و 0,240 ملغم/100مل حليب لكل منهما في نهاية عملية الخمير ، في حين أدت هذه البكتريا إلى خفض تركيز المركب الكلايكوسيدي الجينستين من 0,130 إلى 0,015 ملغم/ 100مل حليب الصويا. هذه النتائج اتفقت مع نتائج الدراسات التي قام بها كل من Hou وآخرين (2000) و Ashton وآخرين (2003) التي أشارت إلى أن بكتريا *B. bifidoum* كان لها دوراً فعالاً في زيادة تراكيز الآيزوفلافونات بشكلها الفعال على حساب الآيزوفلافونات بالشكل غير الفعال كلما طال وقت التخمير تحت درجة حرارة ثابته 37مْ.

كانت أفضل بكتريا في تحويل مركب الجينستين هي *L. bulgaricus* ATCC 118 التي خفضت تركيز المركب بمقدار 0,158 ملغم/ 100مل حليب بعد 48 ساعة من التخمير. بينما كانت أفضل بكتريا في زيادة تركيز الديادزئين هي *L. rhamnosus* و *L. bulgaricus* ATCC 118 اللتين زادتا تركيز المركب بمقدار 0,295 ملغم/ 100مل حليب، في حين كانت أفضل بكتريا في زيادة مركب الجينستئين هي *L. bulgaricus* ATCC 118 التي زادت تركيزه بمقدار 0,386 ملغم/ 100مل حليب فول الصويا. إن الاختلاف في مدى قدرة السلالات البكتيرية المستخدمة على تحويل الآيزوفلافونات غير الفعالة إلى الآيزوفلافونات الفعالة، ويعود هذا السبب إلى اختلاف الفعالية الإنزيمية التي تتأثر في مدى توافر الظروف المثالية الملائمة لكل سلالة (Tasngalis وآخرون، 2002؛ Otieno وآخرون ، 2005). ويعزى السبب في ارتفاع تراكيز مركبات الآيزوفلافونات الأكلايكونية الفعالة وانخفاض مركبات الآيزوفلافونات الكلايكوسيدية غير الفعالة في المعاملات إلى مستوى النشاط الإنزيمي لهذه البكتريا التي تعمل على كسر الآصرة نوع بيتا التي تربط الجزء السكري بالجزء الآيزوفلافوني والإنزيم المسؤول عن هذه العملية هو إنزيم البيتا–كلوكوسيديز (β–Glucosidase) المنتج من قبل هذه البكتريا (Matsuda وآخرون، 1994). كما يلاحظ من

الجدول أيضاً إن تركيز المركبات الأكلايكونية وهي الديادزئين والجينستئين قد ازدادت بصورة كبيرة خلال الـ 24 إلى 36 ساعة الأولى، على التوالي، أي خلال الطور اللوغارتمي لنمو البكتريا، تبعها انخفاضاً واضحاً في تركيز هذه السكريات بعد 36 و48 ساعة من التخمير، وذلك متوقعاً لأن النشاط الإنزيمي للبكتريا يكون أعلى ما يمكن في هذا الطور.

إن تركيزي كل من الديادزئين والجينستئين المتحصل عليها بعد عملية التخمير هما مجموع ما هو موجود منهما أصلاً في الحليب زائداً ما هو متوفر من الديادزين والجينستين في بداية عملية التخمير. فيبين الجدول أن تركيز الجينستين في بداية التخمر هو 0,140 ملغم/ 100مل حليب وقد تحول الجزء الأكبر منه إلى الجينستئين، أما بالنسبة إلى الديادزين فهو لم يقدر لعدم توفر المركب القياسي. أما مركب الإيكول (Eqoul) فلم يعرف تأثير هذه البكتريا علية كما هو الحال في تأثير السلالات البكتيرية السابقة لعدم ظهوره في جميع المعاملات ومن ضمنها معاملة السيطرة التي لم يخمر بها حليب الصويا بأي من لبكتريا.

إن عدم ظهور المركب الإيكول في الجدول 1 هو بسبب أن هذا المركب هو من نواتج العمليات الأيضية للبكتريا المعوية على مركب الديادزئين عند تناول الأغذية التي تحتوي على فول الصويا أو مركبات الآيزوفلافونات ومدى تأثرها بمحتوى ونشاط الإنزيمات في القناة المعوية. لقد ذكر Setchell (1998) أن مركب الإيكول لم يظهر في حليب الصويا غير المخمر بسبب أنه عبارة عن ناتج ميكروبي لإختزال الديادزئين. وقد أشارت بعض الدراسات إلى أن حوالي 30–40٪ من الاشخاص البالغين لديهم القدرة على تحويل مركب الديادزئين إلى مركب الإيكول في أمعائهم (Change و Nair، 1995).

الجدول 1: تراكيز مركبات الآيزوفلافونات (ملغم/ 100 مل) في حليب فول الصويا المخمر ببكتريا حامض اللاكتيك لمدد مختلفة على درجة حرارة 37 مْ.

السلالة	مدة التخمير (ساعة)	الديادزئين	الجينستئين	الجينستين
L. rhamnosus	**0**	0,055	0,060	0,140
	6	0,068	0,095	0,099
	12	0,077	0,130	0,063
	24	0,210	0,140	0,060
	36	0,300	0,280	0,052
	48	0,350	0,310	0,030
L. bulgaricus ATCC 118	**0**	0,065	0,050	0,190
	6	0,087	0.054	0,180
	12	0,093	0,091	0,093
	24	0,180	0,250	0,089
	36	0,190	0,300	0,038
	48	0,360	0,440	0,032
B. Bifidoum	**0**	0.067	0,063	0,130
	6	0,070	0,082	0,081
	12	0,093	0,088	0,022
	24	0,140	0,095	0,020
	36	0,150	0,150	0,016
	48	0,240	0,240	0,015

تأثير بكتريا حامض اللاكتيك في السكريات قصيرة السلسلة في حليب الصويا: يبين الجدول 2 تأثير بكتريا حامض اللاكتيك المستعملة في الدراسة في تراكيز السكريات قصيرة السلسلة التي توجد في حليب الصويا عند تخميره على درجة حرارة 37مْ. فعند استخدام سلالة بكتريا *L. rhamnosus* في عملية التخمير لوحظ انخفاض تراكيز كل من الرافينوز والستاكيوز بشكل تدريجي بزيادة مدة التخمير، إذْ كان أعلى تركيز للرافينوز والستاكيوز في بداية التخمير 3,73 و 6,19 ملغم/100 مل حليب الصويا، على التوالي، وبعد 48 ساعة وعند نهاية عملية التخمير انخفض تركيزهما إلى 1,86 و 4,34 ملغم/100 مل حليب. أما عند استخدام بكتريا *L. bulgaricus* ATCC 118 فقد انخفض تركيز كل من السكرين الرافينوز والستاكيوز أيضاً بصورة تدريجية مع زيادة مدة التخمير إلاّ أنه في نهاية عملية التخمير قد انخفض تركيزهما إلى 1,91 و 3,36 ملغم/100 مل، على التوالي. كما استخدمت في هذه التجربة بكتريا *B. bifidoum* وكان تأثيرها في السكرين مشابهاً لتأثير السلالتين السابقتين وهو خفض تراكيزهما بزيادة مدة التخمير إلى أن وصل تركيزهما بعد 48 ساعة من التخمير 2,16 و 4,56 ملغم/ 100مل حليب فول صويا، على التوالي.. اتفقت هذه النتائج مع نتائج كل من Sumarna (2008) و Omogbai وآخرين (2005) الذين ذكروا أن السكريات القصيرة السلسلة قد انخفض تركيزها عند تخمير فول الصويا باستخدام بكتريا *L. casei subsp* و *L. rhamnosus* FNCC 098 فقد انخفض تركيز الرافينوز من 3,79 إلى 1,99 ملغم/ 100مل وانخفض تركيز الستاكيوز من 6,17 إلى 4,45 ملغم/100 مل بعد 48 ساعة من التخمير باستخدام السلالة نفسها. كذلك انخفض تركيزهما عند استخدام سلالات أخرى من بكتريا حامض اللاكتيك مثل *L. delbruekii subsp bulgaricus* FNCC 0045 و *Streptococcus thermophiles* 001 وكان الانخفاض تدريجياً بزيادة مدة التخمير. إن بعضاً من سلالات بكتريا حامض اللاكتيك لها القدرة على انتاج إنزيم الألفا– كالاكتوسيديز(α–galactosidase) الذي يعمل على تحليل السكريات القصيرة السلسلة (Scalabrini وآخرون، 1998). إن هذا الإنزيم يكون متخصصاً بكسر الآصرة من نوع ألفا التي تربط السكريات المكونة للسكريات قصيرة السلسلة مما ينتج عنه انخفاض تركيز هذه السكريات. وقد كانت أفضل بكتريا في تحليل سكر الرافينوز وخفض تركيزه هي *L. rhamnosus* إذْ خفضت تركيزه بمقدار 1,87 ملغم/ 100 مل حليب، أي انخفض محتوى السكر إلى النصف تقريباً، بينما كانت أفضل بكتريا في تحليل سكر الستاكيوز هي *L. bulgaricus* ATCC 118 إذْ أدت إلى خفض تركيزه بمقدار 2,83 ملغم/ 100 مل حليب صويا، أي انخفض المحتوى إلى النصف تقريباً أيضاً. إن هذه النتائج متطابقة مع ما وجده الباحثون Scalabrini وآخرون (1998) الذين أشاروا إلى أن محتوى كل من الرافينوز والستاكيوز قد انخفض إلى النصف بعد 24 و 48 ساعة من التخمير سلالات من جنس Bifidobacteria. إن نمو بكتريا حامض اللاكتيك في حليب الصويا ربما يؤدي إلى خفض الأس الهيدروجيني إلى درجة حدوث تخثر الحليب، وهذا ما حدث في هذا البحث إذْ أنه بعد 36 ساعة وصل الأس الهيدروجيني الى4,19–4,33. فقد ذكر Tsangalis وآخرون (2002) أن بعض سلالات بكتريا Bifidobacteria قد خفضت الأس الهيدروجيني من 6,70 إلى 5,56 بعد 24 ساعة من التخمير مما أدى إلى تخثر الحليب وحدوث النضح في المدة ما بين 24 و 48 ساعة من الحضين. وهذا الخفض في الأس الهيدروجيني هو بسبب انتاج حامضي اللاكتيك والخليك في الحليب المخمر. بصورة عامة فإن 2 مول من الكلوكوز تأيض لإنتاج 3 مول حامض خليك و 2 مول حامض لاكتيك، إلاّ أن ذلك يختلف كثيراً بين السلالات المختلفة (Ballongue، 1993). إن عدم تخثر حليب الصويا في بعض البحوث باستعمال بعض السلالات التي أظهرت أعلى انتاج لإنزيم البيتا– كلوكوسيديز ربما بسبب أن الانتاج العالي لهذا الإنزيم قد لا يحفز نمو البكتريا كثيراً وذلك ربما بسبب تركيز سكري الرافينوز والستاكيوز السائدين في الحليب الذي يحتاج إلى فعالية إنزيم الألفا– كالاكتوسيديز لأيضهما (Scalabrini وآخرون، 1998). إن وجود السكريات القصيرة السلسلة وبصورة خاصة الرافينوز والستاكيوز قد تسبب مشاكل معوية نتيجة الغازات الناتجة من تخمير تلك السكريات من قبل النبيت المعوي في الجهاز الهضمي للأشخاص المستهلكين لحليب فول الصويا. ولمعالجة مثل هذه المشاكل أجريت الدراسات التي استخدمت بكتريا حامض اللاكتيك للحصول على سكريات بسيطة سهلة الهضم والامتصاص من قبل الامعاء لدى المستهلكين (Bordignon وآخرون، 2004).

من النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة يستنتج أن أنواع بكتريا حامض اللاكتيك المستعملة كانت ذات كفاءة عالية في التحويل الحيوي (Biotransformation) للآيزوفلافونات من الشكل الكلايكوسيدي إلى الشكل الأكلايكوني الفعال عن طريق فعالية الإنزيم بيتا – كلوكوسيديز (β-glucosidase) المنتج من قبل هذه السلالات. كما أن قدرة بكتريا حامض اللاكتيك المستعملة على تحليل السكريات قصيرة السلسلة الموجودة في حليب الصويا الرافينوز والستاكيوز بواسطة الإنزيم ألفا– كالاكتوسيديز (α-galactosidase) المنتج من قبل هذه البكتريا كانت عالية أيضاً.

الجدول 2: تراكيز السكريات قصيرة السلسلة (ملغم/ 100مل) في حليب فول الصويا المخمر ببكتريا حامض اللاكتيك لمدد مختلفة على درجة حرارة 37 مْ.

السلالة	مدة التخمير (ساعة)	رافينوز	ستاكيوز
L. rhamnosus	0	3,73	6,19
	6	3,96	6,18
	12	3,12	5,78
	24	1,92	4,39
	36	1,87	4,36
	48	1,86	4,34
***L. bulgaricus* ATCC 118**	0	3,73	6,19
	6	3,70	6,17
	12	3,18	5,87
	24	1,97	5,19
	36	1,93	4,38
	48	1,91	3,36
B. Bifidoum	0	3,73	6,19
	6	3,70	6,17
	12	3,23	5,81
	24	2,88	5,65
	36	2,18	4,61
	48	2,16	4,58

المصادر :

الخطابي، نوف فالح صالح. (2005). تأثير فول الصويا على تغذية النباتيين. رسالة ماجستير. كلية التربية والاقتصاد المنزلي. جامعة أم القرى. السعودية.

Alekel, D. L., Germai, A. S., Peterson, C. T., Hanson, K. B., Stewart, J. W. and Toda, T. (2000). Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of premenopausal women. Am J Clinical Nutr. 72(3): 844-52.

Anderson, R. L. (1992). Effect of steaming on soy bean proteins and trypsin inhibitors. Am J Oil Chem. 69(8): 1170-1176.

Ashton, J. F., Tsangalis, D., Mcgill, A. E. and Shah, N. P. (2003). Biotransformation of isoflavones by bifidobacteria in fermented soymilk supplemented with D-glucose and L-cystein. J. Food Sci. 68: 623-631.

Ballongue, J. 1993. Bifidobacteria and Probiotic Action. Cited in: Salminen, S. and Von Wright, A. editors. Lactic acid Bacteria. New York: Marcel Dekker. P 519-587.

Bayer, T., Colnot, T. and Dekant, W. (2001). Disposition and biotransformation of the estrogenic isoflavone daidzein in rats. J Toxicol Sci. 62: 205-211.

Beleia, A., Thu-Thao, L. and Ida, E. I. (1995). Lowering phytic phosphorus by hydration of soy bean. J Food Sci. 2: 375-388.

Bordignon, J. R., Nakahara, K., Yoshihashi, T. and Nikkuni, S. (2004). Hydrolysis of isoflavone and consumption oligosaccharides during lactic acid fermentation of soybean. Food and technology Division, (JIRCAS), Tsukuba, Ibaraki 305-8686.

Bozanic, R., Lovkovic, R. and Jelie, I. (2011). Optimizing fermentation of soy with probiotic bacteria. Czech. J Food Sci. 29(1): 51-56.

Change, Y.C and Nair, M. G. (1995). Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria. J Nat Pro. 58: 1892-1896.

Chen, T. R., Weig, Q. K. and Chi, Z. X. (2011). Effect of oligosaccharides and isoflavones aglycones in defatted soy meal fermented by *Bifidobacterium longum*. Taiwan Republic of china. Afric J Microbiol Res. 5(15): 2011-2018.

Devuyst, L. and Vandamme, E. J. (1994). Bacteriocin of lactic acid bacteria. Microbiology, Genetics and Applications.1st ed. Chapman and Hall book, Tokyo.

Donkor, O. N and Shah, N. P. (2008). Production of β-glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobactrium lactis* and *Lactobacillus casie* in soymilk. J Food Sci. 73: 526-332.

Hou, J. W., Yu, R. C., and Chou, C. C. (2000). Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. Food Res Internat. 33: 393-397.

Liu, K. (2001). Soy Bean Chemistry, Technology and utilization. ITP. International Thomson Publishing, Chapman and Hall book, Tokyo.

Matsuda, S., Norimoto, F., Matsumoto,Y., Ohba, R., Teramoto, Y., Ohta, N. and Ueda, S. (1994). Solubilization of a novel isoflavone glucoside hydrolyzing b-glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. rhamnosus. J Fermentation Bioeng. 77: 439-441.

Omogbai, B. A., Ikenebomeh, M. J. and Ojeaburn, S. I. (2005). Microbial utilization of stachyose is soy milk yogurt production. Afric J Biotechnol. 4(9): 905-908

Otieno, D.O., Ashton, J. F., Shah, N. P., (2005). Stability of β-glucosidase activity produced by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. in fermented soymilk during processing and storage. J Food Sci. 70 (4): 236–241.

Otieno, D. O., Ashton, J. F., Shah, N. P. (2006). Evaluation of enzymic potential for biotransformation of isoflavone phytoestrogen in soymilk by *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. Food Res Internat. 39: 394-407.

Richards, E. A. and Steggerda, F. R. (1996). Production and inhibition of gas in various regions in the intestine of the dogs. Soc Exp Biol Med. 122: 573.

Rolfe, R. D. (1991). Population dynamics of the intestinal tract. In: Blankenship, L. C. editor. Control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry. Academic press. Inc., San Diego, USA., 59-75

Scalabrini, P., Rossi, M., Spettoli, P. and Matteuzzi, D. (1998). Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. Internat J Food Microbiol. 39: 213-219.

Setchell, K. D. R. (1998a). Dietary estrogens a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. Journal of Gastroenterology, (93):225-233.

Setchell, K. D. R. (1998). Phytoestrogens: the biochemistry and implications for human health of soy isoflavones. Am J Clin Nutr. 68(suppl): 1333S-1346S.

Shi, Y. G. and Ren, L. (1993). Soy Food Technology (Chinese). China's light industry publisher, Beijing, China.

Sumarna. (2010). Hydrolysis of bioactive isoflavones soy milk fermented with β-glucosidase producing lactic acid bacteria fermented foods of Indonesian. Malaysian J Microbiol. 2 (1): 30-40 .

Sumarna. (2008). Changes of raffinose and stachyose in soymilk fermentation by foods of Indonesian. Malaysian J Microbiol. 4(2): 26-34.

Tsangalis, D., and Shah, N. P. (2004). Metabolism of oligosaccharides and aldehydes and production of organic acids in soy milk by probiotic. J Food Sci Technol. 69: 11-14.

Tsangalis, D., Ashton, J. F., Mggill, A. E., and Shah, N. P. (2002). Enzymic transformation of isoflavone phytosetrogens in soymilk by β-glucosidase–producing Bifidobacteria. J Food sci. 67: 3104-3113.