تأثير الراشح البكتيري الناتج من *Pediococcus acidilactici* في البكتيريا الموجودة في اللحم والجبن

علاء كريم نعيمة الخزاعي آمال كاظم غضبان الاسدي إبراهيم احمد محمود القيسي

الملخص

بينت الدراسة أن إضافة الراشح المنتج من بكتيريا *Pediococcus acidilactici* إلى عينات اللحم المثروم والجبن الطري قد خفض من أعداد بكتيريا الهوائية الكلية وبكتيريا القولون الكلية وبكتيريا **Staphylococci**, ثم ارتفعت أعداد البكتيريا بعد **14** يوماً ولكن بعد **28** يوماً من الخزن لم تصل إعداد البكتيريا إلى الإعداد الموجودة في بداية التجربة وازداد هذا الانخفاض بزيادة تركيز الراشح المضاف إلى العينات وكانت اعداد بكتيريا **Staphylococci** هي الأكثر تأثراً. أظهرت نتائج التقويم الحسي لعينة الجبن المصنعة مختبرياً المضاف إليها **1%** الراشح البكتيري والمحفوظة بالتبريد ولمدة 7 أيام عدم وجود فروق في الصفات الحسية مقارنة بعينة السيطرة اذ بلغت قيم التقويم الحسي **86** لكلا العينتين وان أعداد البكتيريا انخفضت فيها بصورة كبيرة مقارنة مع عينة السيطرة التي ازدادت فيها أعداد البكتيريا وكان لوغاريتم إعداد البكتيريا الهوائية الكلية **4.8** و**4.71** لوغاريتم وحدة تكوين مستعمرة/غم لعينة السيطرة وعينة الراشح البكتيري على التوالي بعد التصنيع وانخفض لوغاريتم أعداد البكتيريا الهوائية الكلية ليبلغ **2.6** لوغاريتم وحدة تكوين مستعمرة/غم ولم تظهر أي أعداد لبكتيريا **Staphylococci** بعد الخزن مقارنة مع عينة السيطرة اذ ارتفع لوغاريتم العدد الكلي للبكتيريا إلى **6.04** لوغاريتم وحدة تكوين مستعمرة/غم وكان أعداد **Staphylococci 2.49** لوغاريتم وحدة تكوين مستعمرة/غم بعد الخزن، بينما لم تظهر أي أعداد لبكتيريا القولون بعد التصنيع وأثناء الخزن في عينة الراشح البكتيري أو عينة السيطرة.

المقدمة

ازداد القلق في العقد الأخير من القرن الماضي من وجود المضافات الكيميائية في الأغذية لظهور العديد من الإمراض، ويعتقد أن المضافات الكيميائية من المسببات المباشرة أو غير المباشرة لتلك الإمراض لذا بدا البحث عن الأغذية الطبيعية أو الطازجة غير الحاوية على المضافات واقترن هذا بالطلب المتزايد على الأغذية في العالم لذا حفز الباحثين على اكتشاف مواد طبيعية تكون ذات فعالية عالية في حفظ الأغذية ومنها البكتريوسينات المنتجة من بكتيريا حامض اللاكتيك، إذ يعتقد أنها مواد حافظة طبيعية أو مواد حافظة حيوية **Biopreservatives** وهذه المواد يمكن أن تستعمل فيها الكائنات الحية المجهرية أو منتجاتها الايضية لمنع وتثبيط الأحياء المجهرية غير المرغوب فيها في الأغذية وتحسن من سلامة الغذاء وتطيل عمره الخزني (**12**).

استعمل **Motlagh** وجماعته (**6**) عمل البديوسين في تثبيط بكتيريا *Listeria monocytogenes* في عدد من منتجات الألبان مثل جبن **Cottage** والايس كريم وجبن **sauce** ولوحظ انخفاض في أعداد البكتيريا بين الدالة الحامضية (**5.5** و**7**) وفي درجة حرارة 4 م و**32** م بالرغم من ارتفاع إعداد البكتيريا بعد 7 أيام في المعاملة 4 مْ، إلا أن بقية المعاملات قد انخفضت بها الأعداد البكتيرية.

يتكون البديوسين من سلسلة ببتيدية تتألف من **44** حامضاً أمينياً وتكون خالية من الأحماض الامينية المحورة الموجودة في النايسين ومن الخصائص التي تمتلكها هذه الجزئية هي غياب الأحماض الامينية **proline**، **arginine** ،

جزء من اطروحة الدكتوراه للباحث الاول.

كلية الزراعة– جامعة البصرة– البصرة، العراق.

phenylalanine وleucine ووجود 4 جزيئات lysine و3 جزيئات histidine وجزيئة من حامض aspartic، وأكدت نتائج تقدير الكتلة للبديوسين بوجود dithiothreitol على وجود 4 جزيئات من cysteine وهي تكون أواصر ثنائية الكبريت في الموقع (C9-C14) والموقع (C24-C44)، ويظهر من التركيب الأساس للبديوسين انه مادة سامة لخلايا البكتيريا الحساسة (2).

استعمل Wan وجماعته (16) النايسين المقيد بالجينات الكالسيوم في إيقاف نمو بكتيريا *Lactobacillus curvatus* و*Brochothrix thermosphacta* المسببة لتلف اللحوم في الأنظمة النسيجية للحوم والأسطح الداخلية لقطع اللحم والشرائح. وان إنتاج البكتريوسينات من بادئات بكتيريا حامض اللاكتيك الى اللحوم المصنعة أدت إلى منع نمو بكتيريا *L. monocytogenes* و*L. innocua* كما أن نوع اللحم المصنع ودرجة حرارة الخزن كان لهما دوراً مهماً في قدرة البكتيريا على إنتاج البكتريوسينات وتثبيط البكتيريا الضارة (9).

اكدت الدراسات ان البكتريوسينات وخاصة النايسين و البديوسين هي مواد حافظة في العديد من الأغذية مثل الصوصج المتخمر والخضراوات المتخمرة ومنتجات الألبان، إذ تضاف البكتيريا المنتجة لها بصورة بادئات تنتج البكتريوسين أثناء عمليات التخمر وأحيانا تضاف بشكل محاليل بعد أن يتم استخلاصها وتنقيتها (3). البديوسين ومجموعة البكتريوسينات التي ينتمي إليها بقدرتها التثبيطية لبكتيريا *L.monocytogenes* لذا تسمى anti-listerial وتعد هذه البكتيريا من الأنواع المتلفة للغذاء وتوجد في منتجات الألبان واللحوم (8).

ولأجل الحصول على مادة حافظة طبيعية تكون بديلاً للمواد الكيميائية المستعملة في حفظ الأغذية جاءت هذه الدراسة التي هدفت الى استعمال البديوسين في حفظ بعض الأغذية.

المواد وطرائق البحث

العزلة البكتيرية

تم الحصول على عزلة بكتيرية محلية من بكتيريا *Pediococcus acidilactici* من اللحم المتخمر واجريت عليه الاختبارات المظهرية والمجهرية والفحوصات البايوكيميائية للتأكد منها ومقارنتها مع ما جاء في Holzapfel وجماعته (5).

انتاج الراشح البكتيري

تمت تنمية بكتيريا *Pediococcus acidilactici* في 250 مل من وسط الشرش 20% المحضر بالطريقة الحامضية ولقح بنسبة 1% من المزرعة المنشطة في الوسط M.R.S. السائل وكان عدد الخلايا 22 $\times 10^8$وحدة تكوين مستعمرة/مل وحضنت عند 37مْ لمدة 48 ساعة وفي ظروف لاهوائية وباستعمال حاوية لاهوائية Anaerobic jar لمنع تكون بيروكسيد الهيدروجين ومن ثم السيطرة على أي تثبيط يحتمل حدوثه بسبب إنتاجه عند تقدير الفعالية التثبيطية للراشح البكتيري المتوقع إنتاجه وبعد انتهاء مدة الحضن اجري النبذ المركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق، ثم رشحت المزارع من خلال وحدة ترشيح مايكروبية دقيقة Millipore filtration unit وباستعمال أوراق ترشيح ذات مسامية 0.22 مايكرومتر المجهزة من شركة Millipore الانكليزية للحصول على راشح خالٍ من خلايا البكتيريا، ثم جفد الناتج (11).

تأثير إضافة الراشح البكتيري في الأغذية

استعمل 250 غم من اللحم المثروم البقري و250 غم من الجبن الأبيض الطري المتحصل عليهما من سوق العشار في البصرة ووضعت في أكياس من البولي اثلين ونقلت مباشرة إلى المختبر، قطع الجبن بواسطة سكين معقمة إلى قطع صغيرة ووزعت بأنابيب اختبار بواقع 10غم لكل أنبوبة، كما وزع اللحم المثروم بالطريقة نفسها. كما استعملت عينة الجبن الأبيض الطري الذي صنع في مختبرات قسم علوم الأغذية والتقانات الإحيائية–كلية الزراعة–جامعة البصرة. حسبت إعداد البكتيريا الهوائية الكلية والعدد الكلي لبكتيريا القولون والعدد الكلي للمكورات العنقودية **Staphylococci** في الأغذية المذكورة آنفاً، ثم أضيف محلول الراشح البكتيري الحاوي على فعالية مقدارها 3000 وحدة/مل والمقدرة حسب ما ذكر في **Si-kyung** وجماعته (13) وبنسب 5، 10، 15، 20 و25% (حجم/حجم) على التوالي إلى أنابيب الاختبار تحتوي 10غم من اللحم المثروم أو الجبن الأبيض (الطري) وحفظت في الثلاجة لمدة 4 أسابيع، حسبت أعداد البكتيريا كل أسبوع (1).

أضيف 1% من الراشح البكتيري المجفد إلى عينة الجبن الأبيض الطري المصنع مختبرياً وحفظ في الثلاجة لمدة 7 أيام وبوجود عينة سيطرة وحسبت أعداد البكتيريا الهوائية الكلية والعدد الكلي لبكتيريا القولون والعدد الكلي للمكورات العنقودية **Staphylococci** بعد التصنيع وبعد الخزن. واستعملت استمارة التقويم الحسي (جدول 1) المعدة من قبل **Nelson** و **Trout** (7) لتقويم عينة الجبن وعينة السيطرة بعد الخزن وكان عدد المقيمين 12 خبير.

جدول 1: استمارة التقويم الحسي

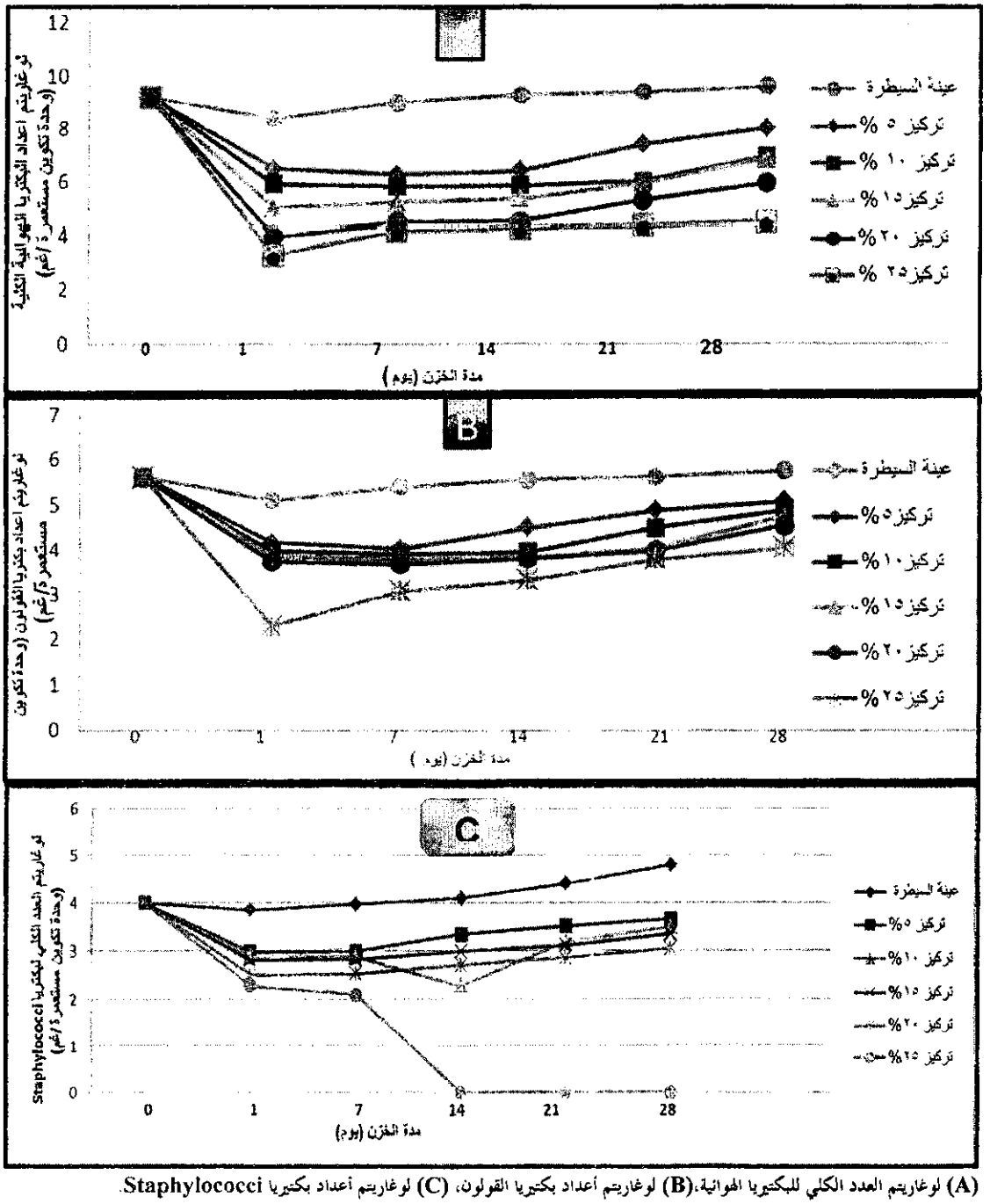
الصفة	الدرجة	الأنموذج (1)	الأنموذج (2)
اللون والمظهر الخارجي	10		
النكهة والطعم	40		
القوام	40		
القبول العام	10		
المجموع	100		

النتائج والمناقشة

إضافة الراشح البكتيري لمزرعة *P.acidilactici* إلى اللحم المثروم

يبين شكل (2) تأثير إضافة الراشح البكتيري في أعداد البكتيريا الموجودة في اللحم المثروم إذ ظهر انخفاض في أعداد البكتيريا الهوائية الكلية بعد إضافة الراشح البكتيري وازداد الانخفاض بزيادة تركيز الراشح المضاف واستمر انخفاض لوغاريتم أعداد البكتيريا الهوائية الكلية لمدة 14 يوماً، ثم بدأت الإعداد ترتفع ولكن لم تصل إلى الأعداد الموجودة في بداية التجربة كما في شكل (1-A)، كما حدث انخفاض في لوغاريتم أعداد بكتيريا القولون وعادت الإعداد للارتفاع بعد 14 يوماً من الخزن كما في شكل (1-B)، بينما انخفضت أعداد بكتيريا **Staphylococci** بزيادة التركيز واظهر التركيز 25% انخفاضاً كبيراً في أعداد البكتيريا وانعدام النمو في اليوم الرابع عشر، وقد انعدم وجود البكتيريا بعد 28 يوماً، كما في شكل (1-C). ويلاحظ التأثير الواضح للمستخلص البكتيري في لوغاريتم اعداد بكتيريا **Staphylococci** مقارنة مع بكتيريا القولون لأن الاولى بكتيريا موجبة لصبغة كرام ويمتلك الراشح فعالية اكبر إتجاه هذه المجوعة. وتوافقت هذه النتائج مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى قدرة البديوسين على تثبيط البكتيريا الموجودة في اللحوم ومنتجاتها فقد ذكر **Goff** وجماعته (4) أن البديوسين المربوط إلى الخلايا المنتجة والمقتولة حرارياً المضاف إلى لحم صدر الدجاج واللحم الخام المعقم والملوث ببكتيريا *L. monocytogenes* أدى إلى خفض

أعداد هذه البكتيريا بصورة واضحة وانعدام النمو في بعض العينات. بينما وجد **Soomro** وجماعته (**14**) أن التأثير الفعال للبديوسين **PA-1/ACH** المنتج من البكتيريا ***P. acidilactici*** يمكن استعماله في السيطرة على بكتيريا ***Listeria*** ومختلف البكتيريا المرضية في اللحوم والجبن والخضراوات، بينما أشار **Pérez- Pérez** وجماعته (**10**) إلى امكان تصنيع اغلفة حاوية على البديوسين واستعمالها في حفظ و أطالة العمر أالخزني للحوم والدواجن المحفوظة عند **4** مْ لمدة **12** أسبوعاً.



(A) لوغاريتم العدد الكلي للبكتيريا الهوائية،**(B)** لوغاريتم أعداد بكتيريا القولون، **(C)** لوغاريتم أعداد بكتيريا **Staphylococci**.

شكل 1: لوغاريتم أعداد البكتيريا الموجودة في اللحم المثروم قبل وبعد إضافة الراشح البكتيري بتراكيز مختلفة أثناء مدد زمنية مختلفة.

إضافة الراشح البكتيري لمزرعة *P.acidilactici* إلى الجبن الأبيض الطري

يوضح شكل (2) تأثير إضافة تراكيز مختلفة من الراشح البكتيري الناتج من العزلة **AK** المنماة في وسط الشرش 20% وبمدد زمنية مختلفة في لوغاريتم أعداد البكتيريا الهوائية الكلية الموجودة في الجبن الأبيض الطري، تبين النتائج أن لوغاريتم أعداد البكتيريا الهوائية الكلية انخفض بعد الإضافة واستمرت الأعداد بالانخفاض لمدة **14** يوم خزن ثم بدأت لوغاريتم الأعداد بالارتفاع في التراكيز المستعملة جميعها لكن لم تصل إلى لوغاريتم العدد الموجود في بداية التجربة، وكان لزيادة التركيز تأثيراً كبيراً في خفض الإعداد البكتيرية إذ كان لوغاريتم الأعداد البكتيريا الكلي في اليوم **28** (**6**، **5.26**، **5.49**، **4.46**، **4.19**) لوغاريتم وحدة تكوين مستعمرة/غم لتراكيز محلول الراشح البكتيري (**5**، **10**، **15**، **20** و25%) على التوالي، كما في شكل (**2-A**). كما انخفض لوغاريتم أعداد بكتيريا القولون انخفاضاً طفيفاً وعاد للارتفاع مرة ثانية في يوم **14** من الخزن وكان تركيز **25**% أكثر التراكيز تأثيراً في عدد بكتيريا القولون، إذ بلغ لوغاريتم عدد البكتيريا في يوم **28** من الخزن **3.99** لوغاريتم وحدة تكوين مستعمرة/غم كما في شكل (**2-B**).

يبين شكل (**2-C**) الانخفاض الكبير في لوغاريتم أعداد بكتيريا **Staphylococci**، إذ انعدم النمو عند إضافة التركيز **25**% منذ اليوم الأول للخزن لغاية **28** يوماً بينما انخفضت أعداد البكتيريا عند التراكيز **5**، **10** و15% وعادت للارتفاع في يوم **14** خزناً، وارتفع لوغاريتم أعداد البكتيريا **Staphylococci** في المعاملة بتركيز **20**% بديوسين بعد **21** يوماً خزنياً، وذكر **Verachia** (**15**) أن إضافة البديوسين الخام الناتج من بكتيريا ***P. pentosaceus*** **ST-13** والناتج من ***P. acidilactici*** **ST-79** أدى إلى خفض أعداد بكتيريا البادئ المضافة في صناعة جبن الكودا، كما انخفض إنتاج حامض اللاكتيك.

التقويم الحسي للجبن المصنع مختبريا والمضاف إليه الراشح البكتيري

يبين جدول (2) نتائج التقويم الحسي للجبن المصنع مختبرياً المضاف إليه نسبة 1% الراشح البكتيري مجفد ناتج من العزلة **AK** وأظهرت النتائج عدم وجود إي تأثير لإضافة الراشح البكتيري في الصفات الحسية للجبن الناتج والمخزن بالتبريد ولمدة 7 أيام، وقد اجري التقويم الحسي بعد 7 أيام وحصل على درجة 86 كما حصلت عينة السيطرة على درجة 86 وكان لوغاريتم أعداد البكتيريا الهوائية الكلية (**4.8**، **4.71**) لوغاريتم وحدة تكوين مستعمرة/غم لعينة السيطرة وعينة الراشح البكتيري على التوالي بعد التصنيع وارتفع لوغاريتم العدد الكلي للبكتيريا في عينة السيطرة ليصل إلى **6.04** لوغاريتم وحدة تكوين مستعمرة/غم كما ظهرت أعداد لبكتيريا **Staphylococci** بعد الخزن، بينما انخفض لوغاريتم إعداد البكتيريا الهوائية الكلية ليبلغ **2.6** لوغاريتم وحدة تكوين مستعمرة/غم ولم تظهر أي أعداد لبكتيريا **Staphylococci** بعد الخزن كما لم تظهر أي أعداد لبكتيريا القولون بعد التصنيع وأثناء الخزن في عينة الراشح البكتيري أو عينة السيطرة (جدول 3).

جدول 3: لوغاريتم أعداد البكتيريا الهوائية الكلية وبكتيريا القولون وبكتيريا Staphylococci لعينات الجبن المصنع المضاف إليه الراشح البكتيري وعينة السيطرة

الاختبار	أنموذج 1 عينة الراشح البكتيري		أنموذج 2 عينة السيطرة	
	بعد التصنيع	بعد الخزن	بعد التصنيع	بعد الخزن
لوغاريتم أعداد البكتيريا الهوائية الكلية	4.8	2.6	4.71	6.04
لوغاريتم عدد بكتيريا القولون	–	–	–	–
لوغاريتم عدد بكتيريا Staphylococci	–	–	–	2.49

المصادر

1- Chen, C.M.; J.G. Sebranek; J.S. Dickson and A. Mendonca (2002). Use of pediocin with other barriers for control of *Listeria monocytogenes*. Institute Foundation. Iowa State University, Project report to American meat. On ready-to-eat (RTE) processed meats, p:1-12.

2- Chikindas, M. L.; M.J. García-Garcerá; A.J.M. Driessen; A.M. Ledeboer; J. Nissen-Meyer; I.F. Nes; T. Abee; W. N. Konings and G. Venema (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. Applied and Environmental Microbiology, 59(11): 3577–3584.

3- De Vuyst, L. and F. Leroy (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production purification and food applications. Journal of Molecular Microbiology Biotechnology, 13:194–199.

4- Goff, J.H.; A.K. Bhunia and M.G. Johnson (1996). Complete inhibition of low levels of *Listeria monocytogenes* on refrigerated chicken meat with pediocin AcH bound to heat-killed *Pediococcus acidilactici* cells. Journal of Food Protection, 59: 1187–1192.

5- Holzapfel, W.H.; C.M.A.P. Franz; W. Ludwig and L. M.T. Dicks (2009). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.3 (section Phylum XIII) Williams and Wilkins, U.S.A., p:1422.

6- Motlagh, A.M.; S. Holla; M.C. Johnson; B. Ray and R.A. Field (1992). Inhibition of *Listeria* spp. in sterile food systems by pediocin AcH, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* H. Journal of Food Protection, 55: 337-343.

7- Nelson, J.A.Y. and G.M. Trout (1964). Judging dairy products. The Olsen Publishing Co. Milwaukee. Wis. 53212. U.S.A.

8- Nissen-Meyer, J.; P. Rogne; C. Oppegård; H.S. Haugen and P.E. Kristiansen (2009). Structure function relationships of the non-lanthionine containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. Current Pharmaceutical Biotechnology, 10(1):19-37.

9- Panayach, R. (1998). *Listeria monocytogenes*: growth and control in vacuum packaged ground beef. M. Sc. Thesis. University of Alberta, Canada.

10- Pérez-Pérez, C.; C. Regalado-González; C.A. Rodríguez-Rodríguez; J. R. Barbosa-Rodríguez and F. Villaseñor-Ortega (2006). Incorporation of antimicrobial agents in food packaging films and coatings In: Advances in Agricultural and Food Biotechnology. Eds. (Gerardo,R. González ,G. and Pacheco ,I.T.) Kerala, India, p: 193-216.

11- Pucci, M.J.; E.R. Vedamuthu; B.S. Kunka and P.A. Vandenbergh (1988).Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. Applied and Environmental Microbiology, 54(10): 2349-2353.

12- Schillinger, U.; R. Geisen and W.H. Holzapfel (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. Trends In Food Science and Technology, 7: 158-164.

13- Si-Kyung lee, H.S.; C. Ho Lee; S. Gi Min; J.S. Park and H.Y. Kim (2007). Morphological Changes Induced in *Listeria monocytogenes* V7 by a Bacteriocin Produced by *Pediococcus acidilactici.* Journal of Microbiology and Biotechnology, 17(4): 663–667.

14- Soomro, A.H.; T. Masud and K. Anwaar (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health. A review. Pakistan Journal of Nutrition, 1(1): 20-24.

15- Verachia, W. (2005). Application of *Pediococcus* spp. as adjunct cultures in Gouda cheese. M.Sc. Thesis Department of Food Science, Faculty of Natural and Agricultural, University of Pretoria, Pretoria, 79 P.

16- Wan, J.; J.B. Gordon; K. Muirhead; M.W. Hickey and M.J. Coventry (1997). Incorporation of nisin in micro-particles of calcium alginate. Letters in Applied Microbiology, 24:153-158.

EFFECT OF *Pediococcus acidilactici* CULTURE EXTRACT ON *Bacterial count* OF MEAT AND CHEESE

A.K.N. Al-Kuzayi A.K. Al-Asady I.A.M. Al-Kasy

ABSTRACT

The study showed that the addition of bacterial extract to meat and cheese reduced the bacterial counts. The counts increased after 14 days, without approaching the initial count, this reduction increased with increasing bacterial extract concentration in the samples. Staphylococci were found to be the most affected bacteria.

The results of sensory evaluation of the cheese sample processed in laboratory by adding 1% bacterial extract and kept at 4-7C for 7 days showed no differences in sensory properties as compared with the control, both samples obtained a mark of 86% as the taste panel suggested. After manufacturing cheese. The total count bacteria Log. Was (4.8 and 4.71) cfu/gm for control sample and test sample, respectively.

After storage the reduction of the bacterial count increased, however bacterial count increased in the control sample, total count bacteria Log was 6.04 cfu/gm and Staphylococci No. 2.49 cfu/gm, while the results showed that the test sample total count of bacteria Log was 2.6 cfu/gm, non-growth Staphylococci. The Coliform bacteria showed no growth for both control and test sample.

Part of Ph.D. Thesis for the first author.
College of Agric.- Basra Univ.- Basra, Iraq.