دراسة المقدرة التثبيطية لراشح خميرة *Debaryomyces hansenii* تجاه بكتريا الاختبار واستعمالها في تحسين خصائص البيركر الميكروبية والحسية

عامر حسين حمدان الزوبعي وإسراء ماجد محمد الأسدي

كلية الزراعة/ جامعة بغداد

الخلاصة

نميت خميرة *Debaryomyces hansenii* في وسط Malt Extract Broth في درجة حرارة 30 م لمدة 5 أيام، واختبرت الفعالية التثبيطية للراشح الخالي من خلايا خميرة *D.hansenii* Cell Free Extract (CFE) أتجاه (5) أنواع من بكتريا الاختبار وهي *Escherichia coli*، *Salmonella typhimurium*، *Bacillus cereus* ، *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas spp* وباستعمال تقنية الانتشار بالحفر، وأظهرت فعالية تثبيطية عالية ولاسيما أتجاه البكتريا الموجبة لصبغة كرام، وكان التركيز 40% هو التركيز المثبط الأدنى أتجاه بكتريا الاختبار، درس تأثير الرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة في فعالية راشح خميرة *D.hansenii* أتجاه بكتريا الاختبار، وأظهرت النتائج وجود فعالية تثبيطية لراشح الخميرة عند استعمال قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني (2، 4، 5، 6، 8)، وتزداد كفاءة التثبيط عند القيم القريبة من الرقم الهيدروجيني الأمثل لعمل الراشح (5) بالمقارنة مع القيم البعيدة عنه، أما عند تعريض الراشح لدرجات حرارية مختلفة (10، 30، 50، 70 و90) م ولمدة 10 دقائق، فقد أظهرت النتائج أن بكتريا *B.cereus* كانت أكثر بكتريا الاختبار تحسساً للراشح بكل معاملاته، إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 7.0 ملم عند تعرض الراشح إلى 90 مْ، بينما كانت بكتريا *E.coli* أكثر بكتريا الاختبار مقاومة لتأثير الراشح، إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 6.0 ملم عند المعاملة نفسها. صنع البيركر من (لحم البقر ودهن البطن) وبنسبة 3 لحم :1 دهن، وأُجريت عملية التخمير في درجة حرارة 15 م ورطوبة نسبية 85% لمدة 72 ساعة للمعاملات التي لقحت بخميرة *D.hansenii* وبنسب (2.5، 5، 7.5 و10)% لأنموذج خليط البيركر بعد أن أضيف إليها الملح والثوم والتوابل وفتات الخبز، نضج البيركر في درجة حرارة 5 م ورطوبة نسبية 80% لمدة 21 يوم وفي درجة حرارة 8 م ورطوبة نسبية 70% لمدة 54 يوماً، وأظهر البيركر الملقح بخميرة *D.hansenii* وبنسبة 7.5% تفوقاً على بقية المعاملات في المحافظة على أعلى أعداد لخميرة *D.hansenii*، فضلاً عن مقدرته في منع نمو كل من بكتريا القولون، الخمائر والأعفان، العنقوديات الذهبية، البكتريا المحبة للبرودة وبكتريا *Salmonella* لأنموذج البيركر خلال مرحلتي التخمير والإنضاج، كذلك أظهر تفوقاً على بقية المعاملات من ناحية النكهة، الطعم والتقبل العام بالمقارنة مع معاملة السيطرة (دون إضافة بادئ *D.hansenii*) والتي استبعدت أثناء مرحلة الإنضاج نتيجة التلف الميكروبي.

الكلمات المفتاحية: راشح خميرة Debaryomyces hansenii، تحسين خصائص البيركر الميكروبية والحسية.

E-mail:ameralzobaay@yahoo.com

Study the inhibitory capability of the cell free extract from *Debaryomyces hansenii* against the tested bacteria and use it as starter to improve the microbiological and sensory properties of Burger

A. H. H. Alzobaay and A. M. M.Alasady
College of Agriculture/ University of Baghdad

Abstract

The *Debaryomyces hansenii* yeast grew in malt extract broth at 30°c for 5 days, Inhibition capability of cell free *D.hansenii* extracts were tested against five species of pathogenic bacteria e.g.: *Pseudomonas. spp, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Bacillus cereus and Staphylococcus aureus,* using well diffusion method, CFE shown highly inhibition efficiency toward pathogenic bacteria, especially gram positive. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of CFE was determined, 40% was MIC. The effect of pH and temperature on CFE of *D.hansenii* against tested bacteria shown decline inhibitory activity against tested bacteria at different pH values (2, 4, 5, 6 and 8), inhibitory efficiency was increased at pH values near the optimum pH (5) comparing with other pH values, when CFE treated with different temperatures (10, 30, 50, 70 and 90 °c) for 10 min, it was found that *B.cereus* was the most effective bacteria, since the average of inhibition zone was 7.0 mm when the CFE was exposure to 90 °c, while *E.coli* was the most resistant bacteria, since the average of inhibition zone was 6.0 mm for the same treatment. Burger was manufactured from (beef and abdominal fat), the ratio 3:1. Fermentation process was carried out at a temperature in 15 c˚ and 80-85% relative humidity for 72 hours after inoculation individually with (2.5, 5, 7.5 and 10)% of *D.hansenii* in sample of burger mixing. Burger matured at 5c˚ and 80% relative humidity for 21 days, 8 c˚ and 70% relative humidity for 54 days. Burger with starter 7.5% *D.hansenii* gave better results than other treatments in maintaining the highest numbers of starter yeast and prevention the growth of coliform, yeast, molds, *Staphylococcus aureus*, psychrotrophic bacteria and *Salmonella* in sample of burger which manufacture from beef in the two stages of fermentation and maturation, as well as its gave better results than other treatments in flavor, taste and general acceptance compared with control treatment (without adding *D.hansenii* starter) the resulted was exclude according to high account of biological spoilage.

Keywords: Extract from Debaryomyces hansenii, improve the microbiological and sensory properties of Burger

المقدمة

تعد خميرة *Debaryomyces hansenii* من الخمائر المحبة للحرارة المتوسطة Mesophilic، وأفضل درجة حرارة لنموها هي 30 م، ولها مدى معين من الرقم الهيدروجيني يتراوح ما بين 4–6 ونشاط مائي 0.99، وتصنف على إنها متحملة للملوحة، وذلك لمقدرتها على النمو في تركيز ملحي يتراوح ما بين 3–5%، فضلاً عن مقدرتها على النمو في الظروف الهوائية واللاهوائية إلا ان النمو في الظروف اللاهوائية يكون اقل سرعة مما في الهوائية، ويكون أسلوب تغذيتها متغايراً Heterophic بسبب عدم احتواء خلاياها على الكلوروفيل (1). تتميز خميرة *D.hansenii* بكونها كائنات آمنة الاستعمال وغير ممرضة، ويمكن وجودها في المواد ذات النشاط المائي المنخفض مثل ماء البحر واللحوم والفواكه والتربة (2). ذكر (3) أن خميرة *D.hansenii* تمتلك عدة خصائص مضادة للأحياء المجهرية منها المنافسة على المغذيات وتغيير الرقم الهيدروجيني وإنتاج تراكيز عالية من كحول الايثانول وتحطيم السموم البكتيرية بوساطة إنزيمات التحلل البروتيني التي تنتجها الخميرة وتثبيط الارتباط بالخلايا المعوية. تشكل خميرة *D.hansenii* تحولاً كبيراً في إمكانية استعمالها بادئاً مهماً من الخلايا حقيقية النواة ولدورها

في النواحي التصنيعية والإنتاجية وتسهم في تعزيز النكهة في مختلف المنتجات الغذائية وذلك لمقدرتها على إنتاج مركبات النكهة وإنتاج إنزيم اللايبيز الذي له دور في تطوير النكهة في أثناء عملية تخمير اللحوم (4)، كما تسهم في تطرية اللحوم بوساطة إنتاجها أنزيمات Peptidase التي تعمل على تحويل الببتيدات المتعددة إلى ببتدات بسيطة، فضلا عن نشاطها المضاد للفطريات والسموم الفطرية عن طريق الامتزاز إلى داخل الخلايا كما في أحادي الكلايكوبروتين أو من خلال إغلاق مسار السكروز على الفطريات (5). يعد البيركر من أهم منتجات اللحوم المصنعة وأكثرها شيوعاً وتقبلاً في العالم لذا عمل الباحثون والمختصون في صناعة اللحوم على تطوير الصفات النوعية والحسية والميكروبية لهذا المنتوج من خلال إضافة مواد أخرى عند تصنيعه كالمواد المالئة مثل البروتينات النباتية والمواد المحسنة مثل منتجات الحبوب والمطيبات فضلاً عن إضافة الدهن الحيواني ووضعت معظم دول العالم مواصفات قياسية خاصة بصناعة البيركر لغرض منع التلاعب بنوعية البيركر المصنع ولحماية المستهلك، فقد حددت المواصفات الأمريكية والكندية استعمال لحوم الأبقار في صناعة منتوج البيركر (6).

المواد وطرائق العمل

أولاً: حُضر راشح خميرة *D.hansenii* (معهد ليبينز/ ألمانيا) على وفق الطريقة التي ذكرها (7) إذ نشطت الخميرة على الوسط Malt Extract Broth وحضنت في درجة حرارة 30 م لمدة 5 أيام ، بعدها أجريت عملية نبذ مركزي بواقع 2630 xg لمدة 15 دقيقة ثم فصل الراشح عن الراسب، وعقم الراشح بإمراره خلال مرشح قطره 0.22µm.

ثانياً: اختبرت الفعالية التثبيطية لراشح خميرة *D.hansenii* اتجاه (5) أنواع من بكتريا الاختبار وهي *Escherichia coli*، *Salmonella typhimurium*، *Bacillus cereus* ، *Staphylococcus aureus* (كلية الزراعة/ جامعة بغداد) و*Pseudomonas spp* (معهد الهندسة الوراثية/ جامعة بغداد) وباستعمال تقنية الانتشار بالحفر Well assay وحسب الطريقة الواردة في (8)، وباستعمال وسط الأكار المغذي وحضنت النماذج بدرجة حرارة 37 م لمدة 18–24 ساعة، ومن ثم قيست أقطار مناطق التثبيط باستعمال مسطرة مدرجة وبضمنها قطر الحفرة 5 ملم.

ثالثاً: دُرس تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية راشح الخميرة حسب الطريقة الواردة في (9)، تم تغيير الرقم الهيدروجيني لراشح الخميرة إلى (2، 4، 5، 6 و8) بإضافة 1N من NaOH أو بإضافة 1N من HCl المحضرة وحسب الرقم الهيدروجيني المطلوب، حُفظت الرواشح في درجة حرارة 5 م لمدة 24 ساعة، بعدها أعيد الرقم الهيدروجيني للرواشح إلى ما كان عليه قبل التغيير ومن ثم قُدرت الفعالية التثبيطية للراشح أتجاه بكتريا الاختبار.

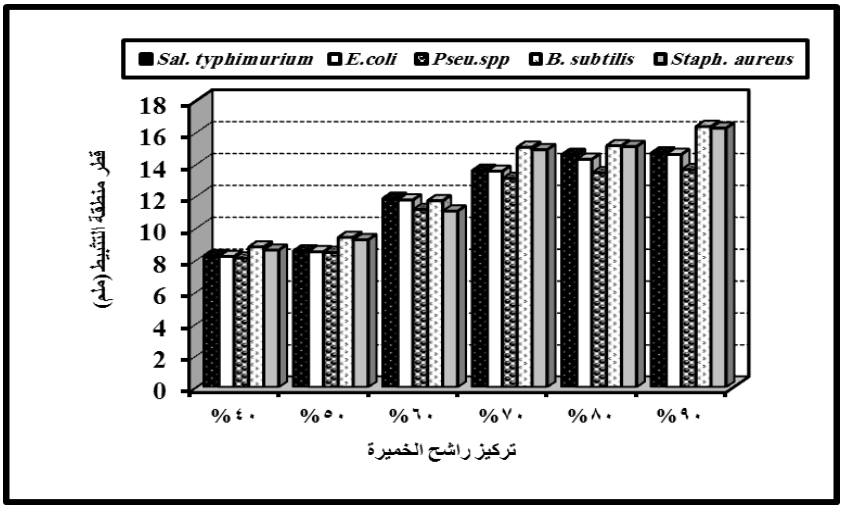
رابعاً: دُرس تأثير درجة الحرارة في فعالية راشح الخميرة حسب الطريقة الواردة في (9)، والمتضمنة أخذ 5 سم^3 من الراشح وعُومل في حمام مائي بدرجة حرارة (10، 30، 50، 70 و90) م لمدة 10 دقائق، ومن ثم برد الأنموذج وقدرت الفعالية التثبيطية للراشح أتجاه بكتريا الاختبار.

خامساً: حُضر البيركر من لحم البقر 75% مضاف إليه دهن البطن 25% وبعد عملية الفرم أضيف إليه الملح والثوم الطازج والتوابل وفتات الخبز بنسبة (1.5، 1، 0.5 و3)% وعلى التوالي ثم أضيف بادئ خميرة *D.hansenii* وبنسب (2.5، 5، 7.5 و10)% ، أجريت عملية التخمير في درجة حرارة 15 م ورطوبة نسبية 85% لمدة 72 ساعة، بعدها نضج البيركر في درجة حرارة 5م ورطوبة نسبية 80% لمدة 21 يوم وفي درجة حرارة 8 م ورطوبة نسبية 70% لمدة 54 يوماً (10)، قُدر العدد الكلي لخميرة *D.hansenii* باستعمال الوسط Rose Bengel Agar على وفق الطريقة الواردة في (11)، أما العدد الكلي للأحياء المجهرية والعدد الكلي لبكتريا

القولون والعدد الكلي للخمائر والأعفان والعدد الكلي للبكتريا المحبة للبرودة فقد قدرت حسب الطريقة الواردة في (12)، وعدد بكتريا المكورات العنقودية الذهبية حسب الطريقة الواردة في (13)، في حين أُجري فحص احتمالية وجود بكتريا الـ *Salmonella* على وفق الطريقة التي ذكرها (14)، أتبعت الطريقة التي ذكرها (15) في تقدير درجات التقييم الحسي التذوقي للمنتوج بعد عملية قليه وقد شملت الصفات كلاً من النكهة والطراوة والعصيرية والنسجة ودرجة التقبل العام.

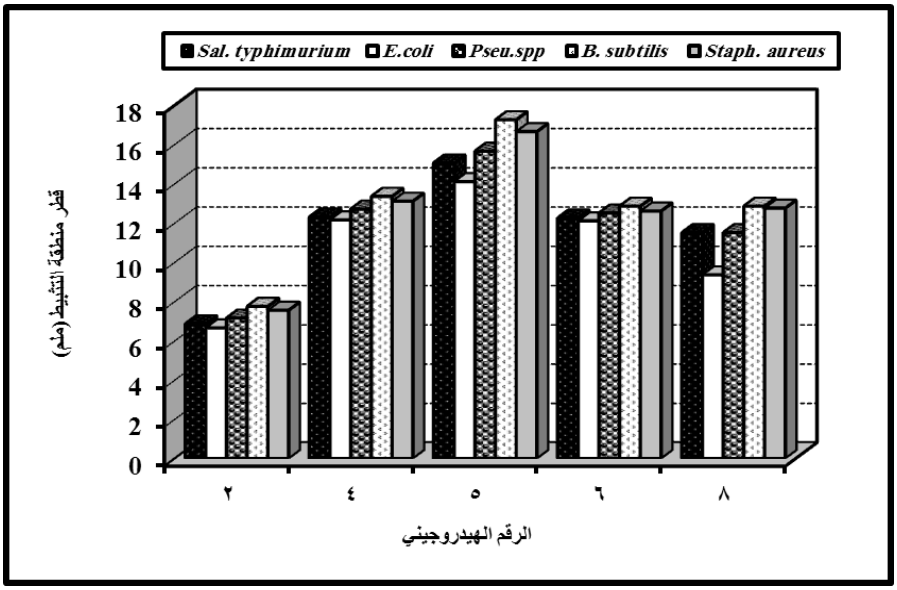
النتائج والمناقشة

يبين الشكل (1) معدل أقطار منطقة التثبيط لراشح خميرة *D.hansenii* أتجاه بكتريا الاختبار، إذ كانت (14.43، 14.89 و13.98) ملم للبكتريا السالبة لصبغة كرام *E.coli*، *Sal.typhimurium* و*Pseu.spp* وعلى التوالي، في حين بلغت أقطار منطقة التثبيط للراشح أعلاه للبكتريا الموجبة لصبغة كرام *B.cereus* و*Staph.aureus* (16.50 و16.32) ملم وعلى التوالي. أظهرت النتائج أن الانخفاض الحاصل في أقطار منطقة التثبيط يتناسب طردياً مع تركيز راشح الخميرة المستعمل أتجاه بكتريا الاختبار، إذ فقد الراشح فعاليته التثبيطية عند تركيز 30%، وعليه يكون تركيز 40% هو التركيز المثبط الأدنى (MIC) إذ بلغ معدل أقطار منطقة التثبيط (8.20 ، 8.25 و8.10) ملم للبكتريا السالبة لصبغة كرام المذكورة آنفاً، بينما كانت أقطار منطقة التثبيط للبكتريا الموجبة لصبغة كرام المذكورة آنفاً (8.80 و8.60) ملم. أشار (3) إلى أن خميرة *D.hansenii* تمتلك عدة خصائص مضادة للأحياء المجهرية منها المنافسة على المغذيات، تغيير الرقم الهيدروجيني من خلال إنتاجها للحوامض العضوية Heksanoat، Oktanoa وDekanoat، كذلك إنتاج تراكيز عالية من الايثانول، تحطيم السموم البكتيرية بوساطة إنزيمات التحلل البروتيني التي تنتجها الخميرة، تثبيط الارتباط بالخلايا المعوية، فضلاً عن مقدرتها في إنتاج بروتينات سامة أو بروتينات سكرية تسمى السموم القاتلة Killer toxin، والتي تعمل على توقف إنقسام الخلايا عن طريق منع تخليق DNA، فضلاً عن تثبيط تخليق بعض مركبات الجدار الخلوي β-(1,3) Glucan. لوحظ تباين التأثير التثبيطي لراشح خميرة *D.hansenii* باختلاف بكتريا الاختبار، إذ وجد أن أكثر أنواع البكتريا مقاومة للراشح هي بكتريا *Pseu.spp* تليها بكتريا *E.coli* في حين كانت بكتريا *B.cereus* أقل أنواع البكتريا الموجبة لصبغة كرام مقاومة لتأثير الراشح وتتوافق هذه النتائج مع ما ذكره كل من (16، 17) من أن البكتريا الموجبة لصبغة كرام أكثر حساسية من السالبة، وقد يعزى سبب ذلك إلى وجود عدة طبقات في الجدار الخلوي للبكتريا السالبة مما يعيق وصول الراشح إلى منطقة التأثير في الجدار الخلوي لبكتريا الاختبار.



شكل (1) معدل أقطار منطقة التثبيط لراشح خميرة *D.hansenii* أتجاه بكتريا الاختبار

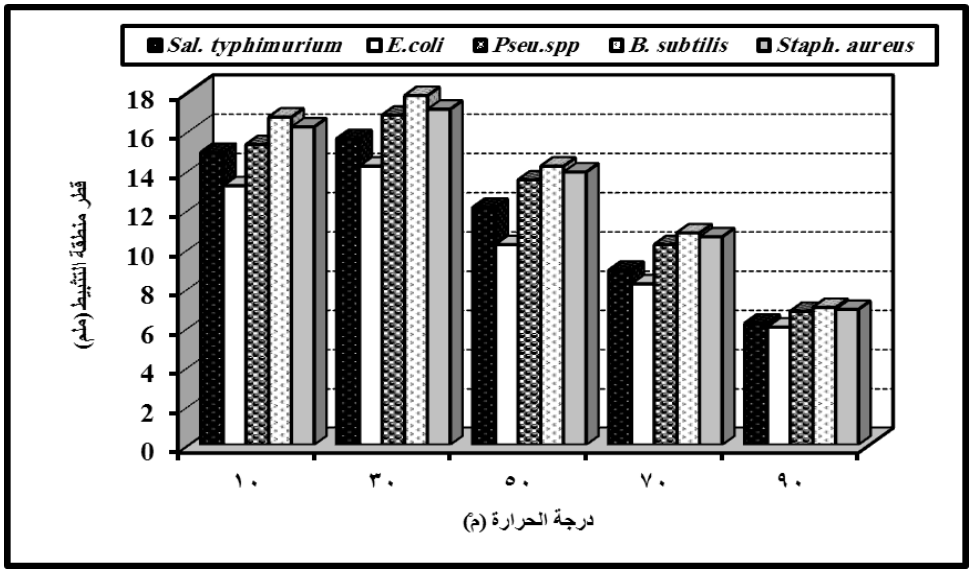
يوضح الشكل (2) تأثير الرقم الهيدروجيني في الفعالية التثبيطية لراشح خميرة *D.hansenii* أتجاه بكتريا الاختبار، إذ أظهرت النتائج وجود فعالية تثبيطية لراشح الخميرة أتجاه بكتريا الاختبار عند استعمال قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني، وتزداد كفاءة التثبيط عند القيم القريبة من الرقم الهيدروجيني الأمثل لعمل الراشح (5) مقارنة مع القيم البعيدة عنه، ويكون التثبيط عند الرقم الهيدروجيني المتعادل أو القريب من القاعدية أفضل من الرقم الهيدروجيني الحامضي المتطرف لراشح الخميرة أتجاه بكتريا الاختبار، إذ كان معدل أقطار منطقة التثبيط لراشح خميرة *D.hansenii* أتجاه البكتريا السالبة لصبغة كرام *E.coli*، *Sal.typhimurium* و*Pseu.spp* (9.35، 9.90 و11.50) ملم وعلى التوالي عند الرقم الهيدروجيني 8، في حين بلغت أقطار منطقة التثبيط للراشح المذكور (11.75 و12.15) ملم للبكتريا الموجبة لصبغة كرام *Staph.aureus* و*B.cereus* وعلى التوالي، بينما كانت أقطار منطقة التثبيط لراشح الخميرة عند الرقم الهيدروجيني 2 (6.65، 6.85 و7.15) ملم للبكتريا السالبة لصبغة كرام المذكورة آنفاً، أما أقطار منطقة التثبيط للبكتريا الموجبة لصبغة كرام الآنفة الذكر فقد كانت (7.55 و7.75) ملم.



شكل (2) تأثير الرقم الهيدروجيني في الفعالية التثبيطية لراشح خميرة *D.hansenii* أتجاه بكتريا الاختبار

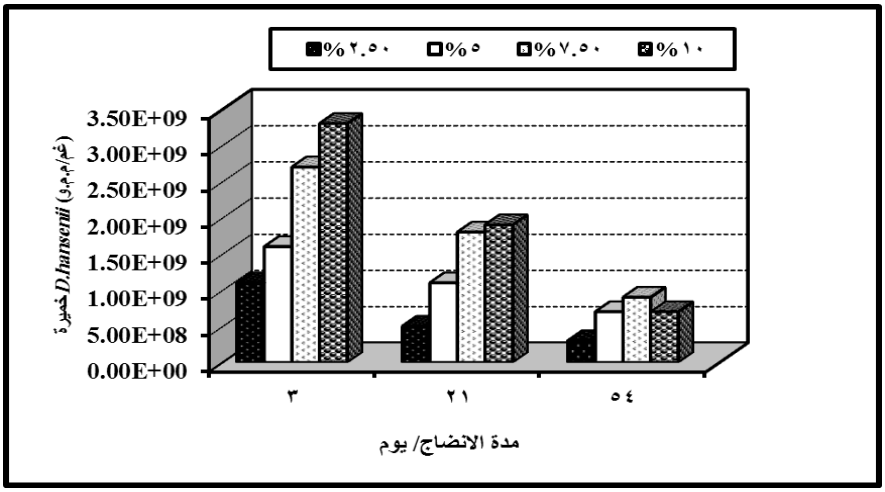
لوحظ من خلال النتائج أن الرواشح ذات القيم الهيدروجينية المعدلة يحصل لها انخفاض في فعاليتها التثبيطية أتجاه بكتريا الاختبار ولا سيما في pH القاعدي إذ يكون الراشح أقل إستقراراً، وجاءت النتائج متطابقة مع ما توصل إليه كل من (18، 19) من أن أفضل pH لنمو الخميرة يتراوح ما بين (4– 6)، وان استقرار الراشح في المحاليل الحامضية أفضل مقارنة بالقاعدية. يشير الشكل (3) إلى تأثير درجة الحرارة في الفعالية التثبيطية لراشح خميرة *D.hansenii* أتجاه بكتريا الاختبار، إذ كانت أقطار منطقة التثبيط للبكتريا السالبة لصبغة كرام *E.coli*، *Sal.typhimurium* و*Pseu.spp* (13.2، 14.9 و15.3) ملم وعلى التوالي عند درجة حرارة 10 م، في حين بلغت أقطار منطقة التثبيط (6.0، 6.2 و6.8) ملم وعلى التوالي للبكتريا السالبة عند درجة حرارة 90 م، أما أقطار منطقة التثبيط للبكتريا الموجبة لصبغة كرام *Staph.aureus* و*B.cereus* فقد بلغت (16.2 و16.7) ملم و(6.9 و7.0) ملم عند درجة حرارة (10 و90) م وعلى التوالي. أظهرت النتائج أن بكتريا *B.cereus* كانت أكثر بكتريا الاختبار تحسساً للراشح بكل معاملاته، إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 7.0 ملم عند تعرض الراشح إلى 90 مْ لمدة 10 دقائق، بينما كانت بكتريا *E.coli* أكثر بكتريا الاختبار مقاومة لتأثير الراشح، إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 6.0 ملم عند المعاملة نفسها، وجاءت النتائج متوافقة مع ما وجده (3) من أن درجة الحرارة المثلى لنمو الخميرة تتراوح ما بين (20– 30) م، إذ تعد من النوع المحب لدرجات الحرارة المتوسطة Mesophilic. تسهم

الحرارة في تحديد نشاط وفعالية الأحياء المجهرية المختلفة، لما لها من تأثير في سرعة النمو وعمليات الأيض والفعاليات الأنزيمية والصفات الفسلجية لعدد من الخمائر (19).



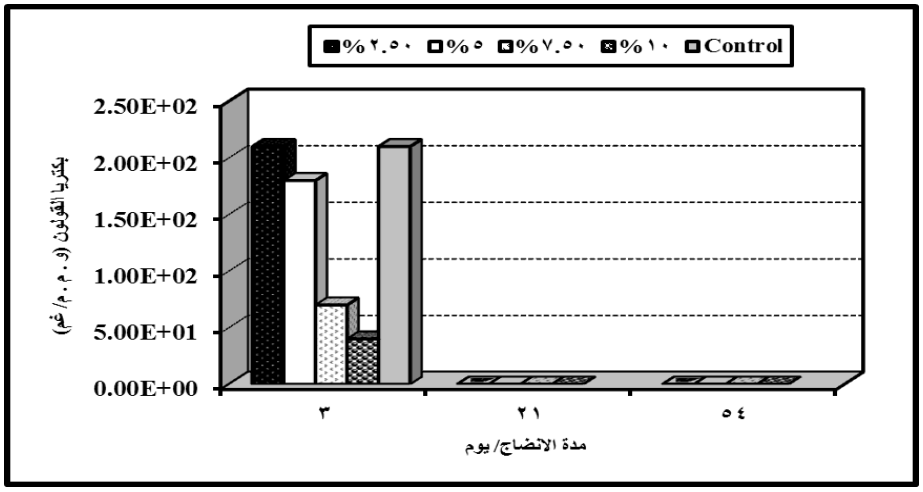
شكل (3) تأثير درجة الحرارة في الفعالية التثبيطية لراشح خميرة *D.hansenii* أتجاه بكتريا الاختبار

يوضح الشكل (4) أعداد خميرة *D.hansenii* لأنموذج البيركر المصنع من لحم البقر في مرحلتي التخمير والإنضاج، إذ بلغت الأعداد الحية بعد التخمير لمدة 72 ساعة (11×10^8، 16×10^8، 27×10^8 و33×10^8 و. م. م/ غم لأنموذج البيركر عند إضافة الخميرة بتراكيز (2.5، 5، 7.5 و10)% وعلى التوالي. ومن خلال النتائج نلاحظ انخفاضاً في أعداد الخميرة بزيادة مدة الإنضاج، إذ بلغت الأعداد الحية بعد 54 يوماً من الإنضاج (3×10^8، 7×10^8، 9×10^8 و7×10^8) و. م. م/ غم للتراكيز المذكورة آنفاً. أظهرت النتائج انخفاضاً في أعداد الخميرة أثناء مدة الإنضاج، ويعزى سبب ذلك إلى انخفاض درجة الحرارة، إذ كانت درجة الحرارة تتراوح من (5–8) م، مما يقلل من فعالية هذه الخميرة، وجاءت النتائج متوافقة مع ما ذكره (19) من أن خميرة *D.hansenii* تعد من الخمائر المحبة للحرارة المتوسطة Mesophilic، وكذلك تتفق النتائج مع ما وجده (11) من أن أعداد الخميرة تراوحت ما بين 10^8–10^9 و. م. م/ غم أثناء مدة التخمير ومن ثم استقرت الأعداد عند 10^8 و. م . م/ غم إلى نهاية مدة الإنضاج لمنتوج النقانق المخمرة.



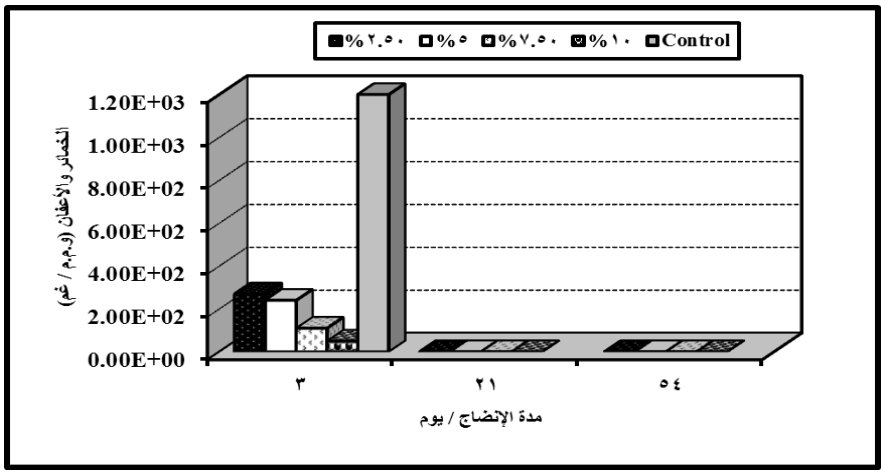
شكل (4) أعداد خميرة *D.hansenii* في أنموذج البيركر المصنع من لحم البقر

يبين الشكل (5) أعداد بكتريا القولون في أنموذج البيركر خلال مرحلتي التخمير والإنضاج، إذ بلغت أعداد بكتريا القولون بعد التخمير لمدة 72 ساعة (21× 10^1، 18× 10^1، 7×10^1 و4×10^1) و. م . م/ غم لأنموذج البيركر عند إضافة الخميرة بتراكيز (2.5، 5، 7.5 و10)% وعلى التوالي. أظهرت النتائج انخفاضاً متبايناً في أعداد بكتريا القولون لأنموذج البيركر بعد التخمير تبعاً لتركيز الخميرة المستعمل، إذ انخفضت أعداد بكتريا القولون أكثر عند التراكيز العالية، أما في مرحلة الإنضاج فنلاحظ انخفاض أعداد بكتريا القولون إلى الصفر في جميع المعاملات ولغاية نهاية مدة الإنضاج، ويعزى سبب ذلك إلى مقدرة الخميرة في تثبيط نمو بكتريا القولون (17). استبعدت معاملة السيطرة من التقويم في الأسبوع الثالث من الإنضاج، لظهور روائح كريهة وألوان غير مقبولة، ويعود السبب في ذلك إلى تجاوز أعداد بكتريا القولون الحدود القياسية للمواصفة التي تنص على أن لا تتجاوز أعداد بكتريا القولون في منتوج النقانق 10^3 و. م . م/غم (20).



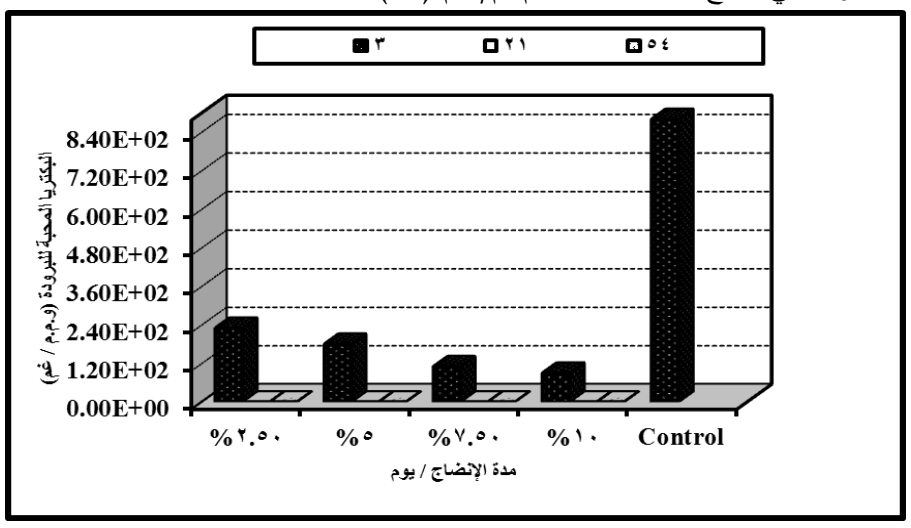
شكل (5) أعداد بكتريا القولون في أنموذج البيركر المصنع من لحم البقر

يوضح الشكل (6) أعداد الخمائر والأعفان في أنموذج البيركر في مرحلتي التخمير والإنضاج، إذ بلغت أعداد الخمائر والأعفان بعد التخمير لمدة 72 ساعة (27× 10^1، 24× 10^1، 11× 10^1 و5× 10^1) و. م. م/غم لأنموذج البيركر عند إضافة الخميرة بتراكيز (2.5، 5، 7.5 و10)% وعلى التوالي. أظهرت النتائج ارتفاعاً في أعداد الخمائر والأعفان لأنموذج البيركر بعد التخمير لمدة 72 ساعة تبعاً لتركيز الخميرة المستعمل، إذ انخفضت أعداد الخمائر والأعفان أكثر عند التراكيز العالية، أما في مرحلة الإنضاج فنلاحظ انخفاضاً في أعداد الخمائر والأعفان إلى الصفر في جميع المعاملات ولغاية نهاية مدة الإنضاج، ويعود السبب في ذلك إلى مقدرة الخميرة على إنتاج الحوامض العضوية في الوسط وجعله غير ملائم لنمو الخمائر والأعفان ولاسيما في مرحلة الإنضاج، فضلاً عن انخفاض النشاط المائي الذي يحول دون نموها (10). تتفق النتائج مع ما وجده (21) إذ لاحظ انخفاض أعداد الخمائر والأعفان إلى الصفر خلال مرحلة الإنضاج عند دراسته لأنموذج من النقانق المخمرة البرتغالية. استبعدت معاملة السيطرة من التقويم في الأسبوع الثالث من الإنضاج، لظهور روائح كريهة وألوان غير مقبولة، ويعود السبب في ذلك إلى تجاوز أعداد الخمائر والأعفان الحدود القياسية للمواصفة والتي تنص على أن لا تتجاوز أعداد الخمائر والأعفان في منتوج النقانق 10^4 و. م . م/غم (20).



شكل (6) أعداد الخمائر والأعفان في أنموذج البيركر المصنع من لحم البقر

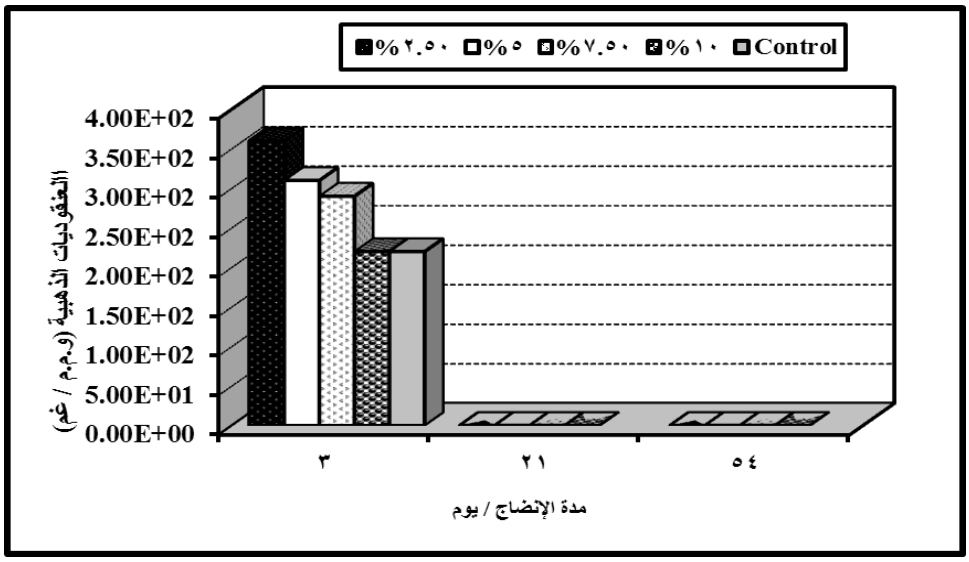
يبين الشكل (7) أعداد البكتريا المحبة للبرودة في أنموذج البيركر في مرحلتي التخمير والإنضاج، إذ بلغت أعداد البكتريا المحبة للبرودة بعد التخمير لمدة 72 ساعة (23×10^1، 18×10^1، 11×10^1 و9×10^1) و. م. م/ غم لأنموذج البيركر عند إضافة الخميرة بتراكيز (2.5، 5، 7.5 و10)% وعلى التوالي. يلاحظ من الشكل أن الانخفاض الحاصل في أعداد البكتريا المحبة للبرودة لأنموذج البيركر بعد التخمير يتناسب طردياً مع تركيز الخميرة المستعمل، إذ انخفضت أعداد البكتريا المحبة للبرودة أكثر عند استعمال التراكيز العالية، أما في مرحلة الإنضاج فنلاحظ انخفاض أعداد البكتريا المحبة للبرودة إلى الصفر في جميع المعاملات ولغاية نهاية مدة الإنضاج، ويعزى سبب ذلك إلى مقدرة الخميرة على إنتاج الحوامض العضوية في الوسط وجعله غير ملائم لنمو البكتريا المحبة للبرودة ولاسيما في مرحلة الإنضاج، فضلاً عن انخفاض النشاط المائي الذي يحول دون نموها (10). استبعدت معاملة السيطرة من التقييم في الأسبوع الثالث من الإنضاج، لظهور روائح كريهة وألوان غير مقبولة، ويعود السبب في ذلك إلى تجاوز أعداد البكتريا المحبة للبرودة الحدود القياسية للمواصفة والتي تنص على أن لا تتجاوز أعداد البكتريا المحبة للبرودة في منتوج النقانق 10^3 و. م. م/ غم (20).



شكل (7) أعداد البكتريا المحبة للبرودة في أنموذج البيركر المصنع من لحم البقر

يظهر الشكل (8) أعداد العنقوديات الذهبية في أنموذج البيركر في مرحلتي التخمير والإنضاج، إذ بلغت أعداد العنقوديات الذهبية بعد التخمير لمدة 72 ساعة (36×10^1، 31×10^1، 22×10^1 و29×10^1) و. م. م/ غم لأنموذج البيركر المصنع من لحم البقر عند إضافة الخميرة بتراكيز (2.5، 5، 7.5 و10)% وعلى التوالي.

يلاحظ أن الانخفاض الحاصل في أعداد العنقوديات الذهبية لأنموذج البيركر بعد التخمير لمدة 72 ساعة يتناسب طردياً مع تركيز الخميرة المستعمل، إذ انخفضت أعداد العنقوديات الذهبية أكثر عند التراكيز العالية، أما في مرحلة الإنضاج فنلاحظ انخفاض أعداد العنقوديات الذهبية إلى الصفر في جميع المعاملات ولغاية نهاية مدة الإنضاج، ويعود السبب في ذلك إلى مقدرة الخميرة على خفض الرقم الهيدروجيني وإنتاج المركبات المثبطة، فضلاً عن استهلاك المغذيات الضرورية لنموها مثل الفيتامينات، الحوامض الأمينية، السكريات والمعادن (17). استبعدت معاملة السيطرة من التقييم في الأسبوع الثالث من الإنضاج، لظهور روائح كريهة وألوان غير مقبولة، ويعود السبب في ذلك إلى تجاوز أعداد العنقوديات الذهبية الحدود القياسية للمواصفة والتي تنص على أن لا تتجاوز أعداد العنقوديات الذهبية في منتوج النقانق 10^3 و. م. م/ غم (20).



شكل (8) أعداد العنقوديات الذهبية في أنموذج البيركر المصنع من لحم البقر

لم تظهر النتائج بكتريا الـ *Salmonella* في نماذج البيركر المفحوصة. يشير الجدول (1) إلى قيم التقييم الحسي التذوقي في أنموذج البيركر المصنع من لحم البقر خلال مرحلتي التخمير والإنضاج، إذ كانت قيم النكهة (7.25، 7.10، 7.10 و7.0) بعد التخمير لمدة 72 ساعة لأنموذج البيركر عند إضافة الخميرة بتراكيز (2.5، 5، 7.5 و10)% وعلى التوالي. أظهرت النتائج ارتفاع قيم النكهة للمعاملات بزيادة مدة الإنضاج تبعاً لتركيز الخميرة المستعمل، إذ بلغت قيم النكهة (7.65، 7.75، 7.85 و8.00) بعد 54 يوماً من الإنضاج للتراكيز المذكورة آنفاً. أشارت النتائج إلى أفضلية التراكيز العالية في إعطاء النكهة لأنموذج البيركر المصنع من لحم البقر بالمقارنة مع التراكيز الواطئة، وجاءت النتائج متوافقة مع ما وجده (22) من إن قيمة النكهة في البسطرمة المصنعة من لحم الجاموس والملقحة ببكتريا *Staph.xylose* و*Staph.carnosus* بلغت 8.6 بعد مدة الإنضاج البالغة 28 يوماً، في حين لم تتفق النتائج مع ما توصل إليه (23) من أن قيم النكهة في نقانق السالكيكون لم تتغير عند إضافة بعض المدعمات إذ بلغت 4.2 من أصل (5). وجد (24) أن النكهة الخاصة بالنقانق تكون على ارتباط وثيق بالمركبات 3-methyl-butanal و3-methyl-butanoic acid والمشتقة من الحامض الأميني الليوسين. أشار (25) إلى أن النقانق الملقحة بالخميرة تعمل على تحرير بعض الحوامض الأمينية والدهنية التي تعمل على تحسين بعض الخصائص الحسية للمنتوج بالمقارنة مع معاملة السيطرة. ذكر (21) أن تطور النكهة في اللحوم المخمرة المنضجة يحدث نتيجة لزيادة تحرر الحوامض الامينية الكلوتامك، الأسبارتك واللايسين بفعل نشاط البادئ،

أما تطور النكهة الحامضية الخفيفة فيكون بفعل تحرر الحامضين الكلوتامك والأسبارتك، في حين تطور النكهة الحلوة يحدث بفعل تحرر الحامضين الالنين والكلايسين.

جدول (1) قيم التقييم الحسي التذوقي لانموذج البيركر المصنع من لحم البقر بعد القلي

مدة الحضن/ يوم	نماذج البيركر	التقييم الحسي التذوقي				
		النكهة (8)	الطراوة (8)	العصيرية (8)	النسجة (5)	درجة التقبل العام (8)
3	2.5%	7.25	6.40	7.35	2.25	2.25
	5%	7.10	6.50	7.25	2.20	2.20
	7.5%	7.10	6.60	7.25	2.50	2.50
	10%	7.00	6.30	7.05	2.35	2.35
	Control	7.20	6.80	7.45	2.20	2.20
21	2.5%	7.25	6.50	6.50	2.70	2.70
	5%	7.35	6.55	6.40	2.60	2.60
	7.5%	7.50	6.65	6.55	3.20	3.20
	10%	7.60	6.15	6.35	3.35	3.35
	Control	**	**	**	**	**
54	2.5%	7.65	6.40	6.40	3.45	3.45
	5%	7.75	6.15	6.40	3.45	3.45
	7.5%	7.85	6.75	6.75	3.75	3.75
	10%	8.00	6.10	6.65	3.65	3.65
	Control	**	**	**	**	**

***كل رقم يمثل معدلاً لمكررين **الأنموذج تجاوز الحدود القياسية للمواصفة**

يُظهر الجدول أعلاه قيم الطراوة إذ بلغت (6.40، 6.50، 6.60 و6.30) بعد التخمير لمدة 72 ساعة لأنموذج البيركر عند إضافة الخميرة بتراكيز (2.5، 5، 7.5 و10)% وعلى التوالي. أما بعد 54 يوماً من الإنضاج فقد بلغت قيم الطراوة (6.40، 6.15، 6.75 و6.15) للتراكيز المذكورة آنفاً. أشارت النتائج إلى أفضلية التركيز 7.5% في إعطاء الطراوة لأنموذج البيركر المصنع من لحم البقر بالمقارنة مع التراكيز الأخرى، كما يلاحظ من النتائج انخفاضاً في نسبة الطراوة في بعض المعاملات الملقحة بالخميرة لأنموذج البيركر المصنع من لحم البقر، لكنها بقيت ضمن الحدود القياسية المرغوبة في النقانق نصف الجافة، وهذا يؤكد احتفاظ المعاملات بالصفات المرغوبة للمنتوج، ويعزى سبب ذلك إلى السيطرة على ظروف الإنضاج من ناحية درجة الحرارة والرطوبة النسبية وحصول تجانس بين المركز والسطح الخارجي للمنتوج وانخفاض فقدان الرطوبة (20). جاءت النتائج متوافقة مع ما توصل إليه (26) من اختلاف قيم الطراوة في أنواع مختلفة من اللحوم إذ تتراوح ما بين 4.6–7.2، وكذلك تتفق النتائج مع وجده (27) إذ لاحظ انخفاض قيمة الطراوة في النقانق الملقحة ببكتريا *Lb.saki* إلى 4.75 بالمقارنة مع معاملة السيطرة التي بلغت 5.5. ذكر (28) أن عملية الإنضاج تحافظ على طراوة أفضل بالمقارنة مع عملية التجميد إذ بلغت قيمة الطراوة 3.57 في عملية الإنضاج بالمقارنة مع 2.75 في عملية التجميد من أصل(5)، في حين لم تتفق النتائج مع ما أشار إليه (29) من أن قيم الطراوة لم تختلف في نماذج النقانق الملقحة بأربعة أنواع من البوادئ. يظهر الجدول (1) قيم العصيرية في أنموذج البيركر المصنع من لحم البقر خلال مرحلتي التخمير والإنضاج، إذ كانت (7.35، 7.25، 7.25 و7.05) بعد التخمير لمدة 72 ساعة لأنموذج

البيركر عند إضافة الخميرة بتراكيز (2.5، 5، 7.5 و10)% وعلى التوالي. أما بعد 54 يوماً من الإنضاج فقد بلغت قيم العصيرية (6.40، 6.40، 6.75 و6.65) للتراكيز المذكورة آنفاً. تعرف العصيرية بأنها كمية الماء المتحررة من المنتوج في الفم بعد المضغ، وعادة تكون قيم العصيرية في النقانق المخمرة عالية نوعا ما (30). أشارت النتائج إلى أفضلية التركيز 7.5% في إعطاء العصيرية لأنموذج البيركر المصنع من لحم البقر بالمقارنة مع التراكيز الأخرى، كذلك يلاحظ من خلال النتائج انخفاضاً في نسبة العصيرية في بعض المعاملات الملقحة بالخميرة لأنموذج البيركر المصنع من لحم البقر، لكنها بقيت ضمن الحدود القياسية المرغوبة في النقانق نصف الجافة، وهذا يؤكد احتفاظ المعاملات بالصفات المرغوبة للمنتوج، ويعزى سبب ذلك إلى السيطرة على ظروف الإنضاج من ناحية درجة الحرارة والرطوبة النسبية وحصول تجانس بين المركز والسطح الخارجي للمنتوج وانخفاض فقدان الرطوبة (20). جاءت النتائج متوافقة مع ما وجده كل من (29، 31) من ارتفاع العصيرية في معاملات السيطرة مقارنة بالمعاملات الملقحة بالبادئ في منتجات النقانق المخمر. يبين الجدول أعلاه قيم النسجة في أنموذج البيركر المصنع من لحم البقر خلال مرحلتي التخمير والإنضاج، إذ كانت (2.25، 2.20، 2.50 و2.35) بعد التخمير لمدة 72 ساعة لأنموذج البيركر عند إضافة الخميرة بتراكيز (2.5، 5، 7.5 و10)% وعلى التوالي. أما بعد 54 يوماً من الإنضاج فقد بلغت قيم النسجة (3.45، 3.45، 3.75 و3.65) للتراكيز المذكورة آنفاً. يلاحظ من خلال النتائج أن ظهور النسجة الخشنة في المعاملات الملقحة بالخميرة لأنموذج البيركر المصنع من لحم البقر يتناسب طردياً مع تركيز الخميرة المستعمل، وتتفق النتائج مع ما توصل إليه (32) إذ تفوقت صفة النسجة لمعاملة السيطرة في منتوج النقانق بالمقارنة مع معاملات الملقحة بالبادئ، وكذلك تتفق النتائج مع ما وجده (33) من تقارب قيم النسجة في النقانق التي استعمل فيها أنواع مختلفة من البوادئ، إلا أنها تتباين باختلاف نوع اللحم المستعمل في التصنيع، إذ بلغت قيم النسجة (73.86، 74.40، 57.79 و45.40) لكل من لحم (البقر، الضبي، الحصان والماعز) وعلى التوالي. يشير الجدول (1) إلى قيم التقبل العام في أنموذج البيركر، إذ كانت (6.15، 6.35، 6.65 و6.45) بعد التخمير لمدة 72 ساعة لأنموذج البيركر عند إضافة الخميرة بتراكيز (2.5، 5، 7.5 و10)% وعلى التوالي. أما بعد 54 يوماً من الإنضاج فقد بلغت قيم التقبل العام (7.50، 7.60، 7.85 و7.60) للتراكيز المذكورة آنفاً، وتتفق النتائج مع توصل إليه كل من (26، 34) من أن قيم التقبل العام في منتجات النقانق المخمرة تختلف تبعاً لنوع البادئ المضاف ونوع اللحم المستعمل في التصنيع، وكذلك تتفق النتائج مع ما وجده (32) إذ لاحظ تفوق المعاملات الملقحة بالبادئ مقارنة مع معاملة السيطرة، ويعود السبب في ذلك إلى فعالية إنزيمات البادئ التي تعمل على تكسير الحوامض الأمينية مما يؤدي إلى تراكم المركبات الطيارة التي تحسن من درجة التقبل العام، في حين لم تتفق النتائج مع ما جاء به (27) إذ تفوقت معاملة السيطرة من ناحية التقبل العام مقارنة بالمعاملات الملقحة بالبادئ، وكذلك لم تتفق النتائج مع ذكره (31) من عدم وجود اختلاف في قيم التقبل العام بين المعاملات الملقحة بالبادئ مقارنة بمعاملة السيطرة في نقانق Salame nostrano الإيطالية.

المصادر

1. Petersen, K. M.; Westall, S. & Jespersen, L. (2002). Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surfaced-Ripened cheeses. J. Dairy Sci., 85:478-486.
2. Reyes-Becerril, M.; Ascencio-Valle, F.; Meseger, J.; Tapia-Paniagna, S. T.; Morinigo, M. A. & Esteban, M. A. (2012). *Debaryomyces hansenii* L2-enriched diet enhances the immunity status, gene expression and intestine functionality in gilthead sea bream (Sparusaurata L.). J. Aquaculture Res., 34:1107-1118.

3. Hatoum, R.; Labrie, S. & Filss, I. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeast from fundamental to Novel Application. Micro., 3:421.
4. Papagora, C.; Roukas, T. & Kotzekidou, P. (2013). Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. J. Food and BioProducts Processing., 91:413-420.
5. Andrade, M. J.; Thorsen, L.; Rodriguez, A.; Cordoba, J. J. & Jespersen, L. (2014). Inhibition of ochratoxigenic moulds by *Debaryomyces hansenii* strains for biopreservation of dry-cured meat products. Inter. J. Food Micro., 170: 70-77.
6. Badaruzza, M. N. & Shafit, H. M. (2014). Determination of salt content in raw beef burger using microwave technique. Trop. Agric. & Food. Sci., 42(1):9-17.
7. Nunez, F.; Lara, M. S.; Peromingo, B.; Delegado, J.; Montero, L. S. & Andrade, M. J. (2015). Selection and evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic penicillia in dry-fermented sausages. Inter. J. Food Microbiol., 46:114-120.
8. Crespo, M. E.; Jimenez, J.; Gomis, E. & Nararro, C. (1990). Antimicrobial activity of essential oil of Tymus scrpylloides subspecies gadrensis. Micro. Bios., 61: 181-184.
9. Hsieh, P. C.; Mau, J. L. & Huang, S. H. (2001). Antibacterial effects of Various *combinations* of plant extracts. Food Microbiol. Taiwan., 18: 35-43.
10. Andrade, M. J.; Cordoba, J. J.; Casado, E. M.; Cordoba, M. G. & Rodriguez, M. (2010). Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage ‘‘salchichon”. J. Meat Sci., 85: 256-264.
11. Corral, S.; Salvador, A.; Belloch, C. & Flores, M. (2014). Effect of fat and salt reduction on the sensory quality of slow fermented sausages inoculated with *Debaryomyces hansenii* yeast. J. Food Control., 45:1-7.
12. APHA (American Public Health Association). (1978). Standard Methods for the Examination of Dairy Products.14th ed. Marth. E.H. (ed). American Public Health Association. Washington. D.C.
13. Speak, M. (1984). Compendium of method for the microbiological examination for food. 2nd Ed. Washington, D.C. USA.
14. الدليمي، خلف صوفي داود. (1988). علم الأحياء المجهرية للأغذية. مديرية دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل.
15. Peryam, D. R. (1990). Sensory evolution-The early days. Food Tech., 44:86.
16. آل شريدة، رواء محمد عبد الواحد. (2012). استعمال بعض المعززات الحيوية Probiotics والمحفزات الحيوية Prebiotics في الأغذية المخمرة العلاجية. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة، جامعة بغداد.
17. Banjara, N. (2014). *Debaryomyces hansenii*: A foodborne yeast that produces Anti-*candida* killer toxin. Dissertations & Theses in Food Science and Technology.
18. الزوبعي، عامر حسين حمدان. (2006). تأثير مستخلصات بذور الخردل الأبيض في بعض الأحياء المجهرية واستخدامها في حفظ الحليب الخام والقشدة. رسالة ماجستير. كلية الزراعة، جامعة بغداد.
19. Breuer, U. & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii*- an extreme- philic yeast with biotechnological potential. J. Yeast., 23:415-437.
20. الزوبعي، عامر حسين حمدان. (2010). استعمال المعززات الحيوية Probiotics في إنتاج البسطرمة العراقية. أطروحة دكتوراه. كلية الزراعة، جامعة بغداد.

21.Roserio, L. C.; Gomes, H.; Goncalves, H.; Sol, M.; Cercas, R. & Santos, C. (2010). Effect of processing on proteolytic and amines formation in a Portuguese traditional dry-fermented ripened sausage" Chourico Grosso de Estremoz e Borba PGI". J. Meat Sci., 84:172-179.

22.Zafer, G.; Yeliz, Y.; Nurhan, E. & Filiz, K. (2009). Effects of starter culture use on some quality parameters of pastrami manufactured from water Buffalo meat. Anim. Vet. Advan., 8(10):2094-2099.

23.Rubio, B.; Martínez, B.; Sánchez, M.; García-Cachán, M. D.; Rovira, J. & Jaime, I. (2007). Study of the shelf life of a dry fermented sausage "salchichon" made from raw material enriched in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids and stored under modiWed atmospheres. J. Meat Sci., 76:128-137.

24.Leroy, F.; Verluyten, J. & Vuyst, L. D. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. Inter. J. Food Microbiol., 106:270-285.

25.Patrignani, F.; Lucci, L.; Vallicelli, M.; Guerzoni, M. E.; Gardini, F. & Lanciotti, R. (2007). Role of surface-inoculated *Debaryomyces hansenii* and Yarrow a lipolytic a strains in dried fermented sausage manufacture. Part 1: Evaluation of their effects on microbial evolution, lipolytic and proteolytic patterns. J. Meat Sci., 75:676-686.

26.Wang, S.; Bunch, T. D.; Evans, R. C.; Brennand, C. R.; Whittier, D. R. & Taylor, B. J. (2003). Cholesterol level and sensory evolution for lambs of various hair X wool sheep crosses. Proceeding, Western Section, American Society of Animal. Sci. Vol. 54.

27. Zdolec, N.; Hadzˇiosmanovic, M.; Kozacˇinski, L.; Cvrtila, Z.; Filipovic, I.; Mario, S. & Leskovar, K. (2008). Microbial and physicochemical succession in fermented sausages produced with bacteriocinogenic culture of *Lactobacillus sakei* and semi-purified bacteriocin mesenterocin Y. Meat Sci., 80:480-487.

28. Vieira, C.; Diaz, M. T.; Martinez, B. & Garcia-Cachan, M. D. (2009). Effect of frozen storage conditions (temperature and length of storage) on microbiological and sensory quality of rustic crossbred beef at different states of ageing. Meat Sci., 83:398-404.

29. Klingberg, T. D.; Axelsson, L.; Naterstad, K.; Elsser, D. & Budde, B. B. (2005). Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. Inter. J. Food Micro., 105:419-431.

30. Spaziani, M.; Torre, M. D. & Stecchini, M. L. (2009). Changes of physicochemical, microbiological, and textural properties during ripening of Italian low-acid sausages. Proteolysis, sensory and volatile profiles. Meat Sci., 81:77-85.

31. Cenci-Goga, B. T.; Ranucci, D.; Miraglia, D. & Cioffi, A. (2008). Use of starter cultures of dairy origin in the production of Salame nostrano, an Italian dry-cured sausage. J. Meat Sci., 78:381-390.

32. Herranz, B.; Ferna´ndez, M.; Hierro, E.; Bruna, J. M.; Ordo´ n˜ ez, J. O. & Hoz, L. (2003). Use of *Lactococcuslactis subsp. cremoris* NCDO 763 and a-ketoglutarate to improve the sensory quality of dry fermented sausages. J. Meat Sci., 66:151-163.

33. Todorov, S. D.; Koep, K. S. C.; Van Reenen, C. A.; Hoffman, L. C.; Slinde, E. & Dicks, L. M. T. (2007). Production of salami from beef, horse, mutton, Blesbok (Damaliscus dorcas phillipsi) and Springbok (Antidorcas marsupialis) with bacteriocinogenic strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus*. J. Meat Sci., 77:405-412.

34. Kenneally, P. M.; Schwarz, G.; Fransen, N. G. & Arendt, E. K. (1998). Lipolytic starter culture effects on production of free fatty acids in fermented sausages. J. Food Sci., 63(3):538-543.