

## Determining Optimal Conditions of Diacetyl Production Produced by *Lactococcus Lactis* Bacteria

Samira Al-Kotami<sup>1</sup>, Sayah Abou Ghorra<sup>2</sup> and Sabah Yuzaji<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Basic Science, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria

<sup>2</sup>Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria

## تعيين بعض الظروف المثلى لإنتاج ثنائي الأستيل من قبل بكتيريا *Lactococcus Lactis*

سميرة القطامي<sup>1</sup> وصباح أبو غرة<sup>2</sup> وصباح يازجي<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>قسم العلوم الأساسية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سوريا  
<sup>2</sup>قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سوريا



LINK  
الرابطة  
<https://doi.org/10.37575/b/agr/2159>

ACCEPTED  
القبول  
09/04/2020

PUBLISHED ONLINE  
النشر الإلكتروني  
01/12/2020

ASSIGNED TO AN ISSUE  
الإجابة لعدد  
01/12/2021

NO. OF WORDS  
عدد الكلمات  
4122

NO. OF PAGES  
عدد الصفحات  
4

YEAR  
سنة العدد  
2021

VOLUME  
رقم المجلد  
22

ISSUE  
رقم العدد  
2

### ABSTRACT

Diacetyl is considered one of the most important flavor compounds in dairy products due to its vital effects. The main objective of this study is to increase the productivity of diacetyl, which is produced by the lactic acid bacterium, *Lactococcus lactis*. This is done by determining the optimal conditions for its production, which can be shown using a statistics-based program called Response Surface Methodology (RSM), which was demonstrated at the Biotechnology Library 'National Commission' during 2019. Results reveal that the productivity of diacetyl improves by approximately 180% when the optimum conditions are applied to amounts of 65.39 mg /L. In comparison, diacetyl productivity before applying these optimal conditions only obtains a value of 36.21 mg/L. The results also reveal that the maximum quantity of produced diacetyl is 65.39 mg/L at a temperature of 37 °C, an acidity level (PH) of 5.5, a citrate concentration at 6 g/L, and a glucose concentration of 15 g/L. The statistical analysis has shown an incorporeal relationship between temperature, acidity, citrate concentration and glucose, with a confidence level of 5%. Therefore, it is recommended that work on *L. lactis* bacteria should be continued to increase the productivity of diacetyl.

### المخلص

يعد ثنائي الأستيل من أهم مركبات النكهات في منتجات الألبان المتخمرة نظراً لتأثيراته الحيوية المختلفة، لذلك هدف هذا البحث والذي أجري في مخبر التقانات الحيوية بجامعة دمشق خلال عام 2019، إلى رفع إنتاجية مركب النكهة ثنائي الأستيل المنتج من قبل بكتيريا حمض اللبن *Lactococcus lactis*، وذلك من خلال تعيين بعض الظروف المثلى لإنتاجه باستخدام البرنامج الإحصائي (RSM). حيث أظهرت النتائج أنّ إنتاجية ثنائي الأستيل بلغت عند تطبيق الظروف المثلى (65.39 ملغ/ل)، مما يعني أنّ الإنتاج ازداد بنحو 180% مقارنةً بذلك قبل تطبيق هذه الظروف المثلى، حيث بلغت كمية ثنائي الأستيل المنتجة من قبل بكتيريا حمض اللبن *L. lactis* (36.21 ملغ/ل). كما بينت النتائج أنّ كمية ثنائي الأستيل المنتجة كانت في حدها الأقصى بقيمة (65.39 ملغ/ل) عند درجة حرارة 37 °م ودرجة الحموضة (pH) 5.5 وتركيز السترات 6 غ/ل وتركيز سكر الغلوكوز 15 غ/ل. أظهر التحليل الإحصائي وجود ارتباط معنوي لكل من درجة الحرارة ودرجة الحموضة وتركيز السترات وسكر الغلوكوز بمستوى ثقة 5%. لذلك يوصى بضرورة الاستمرار بالعمل على بكتيريا *L. lactis* للحصول على سلالات ذات إنتاجية أعلى من ثنائي الأستيل.

### KEYWORDS

#### الكلمات المفاتيحية

Flavor compounds, increase productivity, lactic acid bacteria

بكتيريا حمض اللبن، رفع الإنتاجية، مركبات النكهة

### CITATION

#### الإحالة

Al-Kotami, S., Abou Ghorra, S. and Yuzaji, S. (2021). Taeyin bed alzuruf almuthalaa li'aintaj thunayiyin al'astil min qibal bikatiryaa *Lactococcus Lactis* 'Determining optimal conditions of diacetyl production produced by *Lactococcus lactis* bacteria'. *The Scientific Journal of King Faisal University: Basic and Applied Sciences*, 22(2), 16–9. DOI: 10.37575/b/agr/2159 [in Arabic]

القطامي، سميرة، أبو غرة، صباح و يازجي، صباح (2021). تعيين بعض الظروف المثلى لإنتاج ثنائي الأستيل من قبل بكتيريا *Lactococcus Lactis*. *المجلة العلمية لجامعة الملك فيصل: العلوم الأساسية والتطبيقية*، 22(2)، 16-19.

هناك القليل من أنواع بكتيريا حمض اللبن قادرة على إنتاج ثنائي الأستيل (Hugenoltz, 1993). من هذه الأنواع *Lactococcus lactis* و *Leuconostoc mesenteroides* التي تستقلب السترات بوجود السكر المتخمر، حيث يؤدي استخدام السترات إلى تجمعات داخل الخلايا من البيروفات، وفيما بعد مجموعة متنوعة من نواتج الاستقلاب. تستخدم سلالات *Lactococcus* على نطاق واسع في الصناعات الغذائية لقدرتها على تحويل السترات إلى مركبات نكهة وثاني أكسيد الكربون، مما يساهم في تعزيز الخصائص الحسية للمنتجات المتخمرة. تنقسم سلالات *Lactococcus* إلى نوعين *L. lactis* subsp. *Lactis* و *L. lactis* subsp. *cremoris* الذي يعرف بـ *L. lactis* subsp. *diacetylactis* نظراً لقدرته على تحويل السترات إلى ثنائي الأستيل (Bandell et al., 1998).

ينتج ثنائي الأستيل بشكل طبيعي بفعل بكتيريا حمض اللبن، خصوصاً *L. lactis* subsp. *diacetylactis*، عن طريق استخدام السترات بحضور اللاكتوز، فيما بعد أصبحت كفاءة إنتاجه من اللاكتوز بدلاً من السترات الهدف لعدة دراسات. *L. lactis* يولد أيضاً حمض اللبن وبالتالي لديه القدرة على التغلب على الانخفاض الحمضي المفروض ذاتياً. تستخدم سلالات *L. lactis* subsp. *diacetylactis* كبادئات منتجة للنكهة في منتجات الألبان المتخمرة. هذه الأنواع البكتيرية هي أحياء دقيقة متجانسة التخمر

### 1. المقدمة

تعد مركبات النكهة من أكثر المنتجات المستخدمة على نطاق واسع في الصناعات الغذائية. حيث يمكن الحصول عليها إما عن طريق الاصطناع الكيميائي، وبالتالي تسمى النكهات الاصطناعية. أو عن طريق التخمر عندئذ تسمى النكهات الطبيعية، التي تعد مرغوبة بشكل أكبر من قبل المستهلك، وبالتالي زيادة الطلب في الحصول عليها. إحدى هذه المنتجات هو ثنائي الأستيل، الذي يشكل عنصراً هاماً في نكهة الزبدة، وإن كان بعضها الآخر، مثل أسيتوبن، الأستيل الدهيد و 2-3 البيوتانديول أيضاً تلعب دوراً في النكهة، رغم وجودها في كميات ضئيلة. وبالتالي فإن خليط من كل هذه المركبات التي تنتج أثناء التخمر اللبني بنسب مناسبة هو ما يعطي الزبدة نكهته المميزة. تعد بكتيريا حمض اللبن المنتجة للنكهة هي المسؤولة عن تخمر السترات إلى ثنائي الأستيل، الذي يعطي طعم مميز ونكهة لمنتجات الألبان المتخمرة حتى عند تواجده بتركيز منخفضة جداً (1-2 ملغ/ل) (Bakirci et al., 2002).

ارتبطت علاقة بكتيريا حمض اللبن بإنتاج ثنائي الأستيل منذ زمن بعيد. حيث خلص Hammer (1980) إلى أنّ الكائنات الحية الدقيقة في مزارع الزبدة كانت مسؤولة عن الحموضة، الرائحة ونكهة منتج الألبان المتخمر.

محلول 0.5% أرجينين، تتبع بإضافة 1 مل من 5%  $\alpha$ - نفتول محلول ضمن 2.5 NaOH نظامي محضر أنياً ثم تركت العينة لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة الغرفة 22 $^{\circ}$ C، حيث تتحد مجموعة غوانيدينو من الأرجينين خلال هذه الفترة الزمنية مع ثنائي الأستيل في وجود الكاشف و يعطي لون أحمر أرجواني. حسبت كمية ثنائي الأستيل الكلية حسب طريقة Westerfeld (1945)، والتي تعتمد على المعادلة الآتية:

$$(y = 0.0213x + 0.0902, (R^2 = 0.999))$$

حيث X كمية ثنائي الأستيل الكلية (ملغ/ل) = (Y - 0.0902)/0.0213

حيث 0.0902 ثابت، Y قيمة الامتصاصية الضوئية على طول موجة 535 نانومتر.

## 2.4. دراسة الظروف المثلى لإنتاج ثنائي الأستيل باستخدام التصميم الاحصائي RSM:

درست الظروف المثلى لإنتاج ثنائي الأستيل (درجة الحرارة، درجة الحموضة، تركيز السترات وتركيز الغلوكوز) باستخدام برنامج Minitab والتصميم الإحصائي RSM. حيث درس تأثير كل متغير عند ثلاثة مستويات - (+1, 0, -1) لكل من درجات الحرارة (31, 34, 37) $^{\circ}$ C، ودرجات الحموضة (pH) (5, 5.5, 6)، وتركيز السترات (4, 6, 8) غ/ل وتركيز سكر الغلوكوز (5, 10, 15) غ/ل. ويعدد 30 معاملة لكافة التصميم. قيم المتغيرات المدروسة ومستوياتها موضحة في الجدول (1). كما يبين الجدول (2) طريقة التصميم المعتمدة في هذه الدراسة.

الجدول (1): المتغيرات المدروسة ومستوياتها

مستويات المتغيرات بصورة رمز	درجة الحرارة ( $^{\circ}$ C)	درجة الحموضة	تركيز السترات (ل/غ)	تركيز سكر الغلوكوز (ل/غ)
-1	31	5	4	5
0	34	5.5	6	10
+1	37	6	8	15

الجدول (2): التصميم الإحصائي للتجربة

العدد	تركيز سكر الغلوكوز (ل/غ)	تركيز السترات (ل/غ)	درجة الحموضة	درجة الحرارة ( $^{\circ}$ C)
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1	-1
3	-1	-1	1	1
4	-1	1	-1	-1
5	-1	1	-1	1
6	-1	1	1	-1
7	-1	1	1	1
8	1	-1	-1	-1
9	1	-1	-1	1
10	1	-1	1	-1
11	1	-1	1	1
12	1	1	-1	-1
13	1	1	-1	1
14	1	1	1	-1
15	1	1	1	1
16	1	-1	1	-1
17	1	-1	1	1
18	1	1	-1	-1
19	1	1	-1	1
20	1	1	1	-1
21	1	1	1	1
22	0	0	0	0
23	0	-1	0	0
24	0	1	0	0
25	0	0	-1	0
26	0	0	1	0
27	0	0	0	-1
28	0	0	0	1
29	0	0	0	0
30	0	0	0	0

## 3. النتائج والمناقشة

### 3.1. كمية ثنائي الأستيل المنتجة من قبل بكتيريا حمض اللبن L. lactis:

من خلال دراستنا تمكنا من تحديد بعض الظروف المثلى التي أدى تطبيقها على البكتيريا المختبرة *L. lactis* إلى الحصول على أعلى إنتاجية لثنائي الأستيل بلغت (65.39 ملغ/ل)، عند استخدام البرنامج الإحصائي Minitab والتصميم الإحصائي Response Surface Methodology (RSM). حيث يبين الجدول (3) نتائج كمية ثنائي الأستيل المنتجة من بكتيريا حمض اللبن *L. lactis* حسب التصميم الإحصائي المعتمد في الجدول (2) من حيث تركيز السترات، تركيز سكر الغلوكوز، درجة حموضة الوسط (pH) ودرجة

تستقلب الجلوكوز والسترات لإنتاج مركبات النكهة من خلال المسار الحيوي ثنائي الأستيل/أسيتوين (Davidson *et al.*, 1995).

وفقاً لدراسات عديدة، يعتمد إنتاج ثنائي الأستيل بواسطة بكتيريا حمض اللبن على عدة عوامل مثل السلاطة، تركيز السترات أو البيروفات، تركيز السكر الأولي، إضافة أيونات المعادن، تركيز الأكسجين الأولي ووسط الزرع، درجة pH ودرجة الحرارة. كما تتوقف إنتاجية بكتيريا حمض اللبن من هذا المركب على معدل وكفاءة استقلاب حمض الستريك، لذلك من الضروري لزيادة معدل الإنتاج توفير كميات كافية من حمض الستريك في وسط الزرع المستخدم عن طريق إضافة حمض الستريك أو حمض البيروفيك كطالغ لإنتاج ثنائي الأستيل (Kaneko *et al.*, 2011). حيث تعتمد الاختلافات بين البكتيريا بخصوص استخدام السترات على وجود أو غياب إنزيم أكرالوأسيئات ديكربوكسيلاز، في حال تواجد هذا الإنزيم يقود تمثيل السترات إلى زيادة مجمع البيروفات الذي يؤدي بدوره إلى إنتاج ثنائي الأستيل و الأسيتوين. وفي حال غياب هذا الإنزيم يكون الطريق البديل هو مسار إنتاج حمض السكسينيك (Wessels *et al.*, 2004).

تعد القدرة على استقلاب السترات إلى CO<sub>2</sub>، أسيتات، أسيتوين، ثنائي الأستيل وأحياناً 3.2- بيوتانديول هي سمة شائعة للعديد من بكتيريا حمض اللبن، بشكل خاص *Lactococcus* و *Leuconostoc spp.* التي تتواجد في بعض مزارع البادئ، بينما لم يتم توثيق استقلاب حامض الستريك بواسطة *Lactobacillus spp.* بشكل جيد، على الرغم من أن الجوانب المختلفة منه قد تم تناولها في العديد من الدراسات الحديثة (Hugenholz, 2014).

تعد الطريقة التقليدية المستخدمة في أمثلة ظروف التجربة عن طريق تثبيت كافة المتغيرات عند مستوى واحد وتغيير متغير واحد فقط في كل مرة، من الأمور الصعبة والطويلة وعادةً ما تقود إلى استنتاجات غير دقيقة. لذلك هدف هذا البحث إلى تعيين الظروف المثلى لإنتاج ثنائي الأستيل من قبل بكتيريا حمض اللبن *Lactococcus lactis* باستخدام البرنامج الإحصائي RSM، الذي صمم ليس لتقليل عدد التجارب المستخدمة في عملية الأمثلة فحسب وإنما لإعطاء نتائج أكثر منطقية ووضوح من الطريقة التقليدية عن طريق دراسة تأثير كل عامل على حده وتأثير العوامل المتفاعلة مع بعضها البعض (Pardeep and Satyanarayana, 2006).

## 2. المواد وطرق العمل

### 2.1. الكائن الحي الدقيق المستخدم:

استخدمت بكتيريا حمض اللبن *L. lactis* المعزولة من الحليب البقري، حيث عُزلت مسبقاً في مخابر كلية الزراعة/ قسم علوم الأغذية خلال عامي 2011-2012، وصنفت اعتماداً على تقنية *API 20 Strep* للتمييز بين أنواع المكورات اللبينية المعزولة من بيئة M17، و *API 50 CHL* للتمييز بين أنواع العصيات اللبينية المعزولة من بيئة Rogosa. كما حُفظت في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية في المجمدة عند درجة حرارة -80 $^{\circ}$ C (Al-kotami *et al.*, 2015).

### 2.2. إنتاج ثنائي الأستيل وفقاً لتعيين الظروف المثلى:

نُميت بكتيريا حمض اللبن *L. lactis* حسب (Macciola *et al.*, 2008)، من خلال التخمر هوائياً في دوارق مخروطية سعة 250 مل تحتوي على 50 مل من وسط حليب منزوع الدسم المعقم و 1% (حجم/ حجم) لقاح بكتيري نشيط بعمر 16-18 ساعة (ما يعادل 10<sup>8</sup> CFU/مل حيث تصل بعض اللقاحات إلى هذا التعداد خلال 16 ساعة و بعضها خلال 18 ساعة). ضبطت درجات حرارة التحضين والحموضة (pH) وتركيز السترات والغلوكوز حسب التصميم الإحصائي المعتمد في الجدول (1).

### 2.3. تقدير ثنائي الأستيل:

قيست كمية ثنائي الأستيل المنتجة من قبل بكتيريا حمض اللبن *L. lactis* باستخدام جهاز المطياف الضوئي على طول موجة 535 نانومتر (Nadal *et al.*, 2009). حيث مُزج 5 مل من الطافي الناتج عن عملية التثفيل 9000 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 4 $^{\circ}$ C، في أنبوب اختبار مع 1 مل من

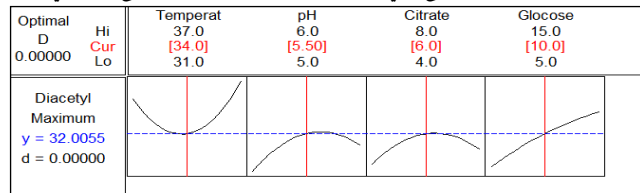
## الحرارة المثوية.

*lactis* subsp. *lactis* وبالتالي إنتاجية أفضل لثنائي الأستيل مقارنة بالجلوكوز وحده في الوسط وهذا يتوافق مع Divies و Schmitt (1992). كما أشار Goupy وزملائه (2000)، إلى أن وجود الكربوهيدرات ساهم بنسبة 65 % من مصدر الكربون لتشكيل مركبات منتجة للنكهات.

## 3.2. تعيين الظروف المثلى لإنتاج ثنائي الأستيل بوساطة البرنامج الإحصائي RSM:

يبين الشكل (1) الظروف المثلى لإنتاج ثنائي الأستيل من بكتيريا حمض اللبن *L. lactis* بوساطة البرنامج الإحصائي RSM، حيث يلاحظ بأن إنتاج ثنائي الأستيل كان في حده الأقصى عند درجة حرارة 37°م ودرجة الحموضة (pH) 5.5 وتركيز السترات 6 غ/ل وتركيز سكر الجلوكوز 15 غ/ل، ويبين التحليل الإحصائي وجود ارتباط معنوي لكل من درجة الحرارة ودرجة الحموضة وتركيز السترات وسكر الجلوكوز بمستوى ثقة 5% (جدول (4)).

الشكل (1): الظروف المثلى لإنتاج ثنائي الأستيل من *L. lactis* بوساطة البرنامج الإحصائي RSM



## 3.3. نتائج تحليل وتفسير البرنامج الإحصائي RSM في إنتاج ثنائي الأستيل:

يبين الجدول (4) تأثير العوامل المدروسة (كل عامل على حدة، ومربع العوامل، والعلاقة بين العوامل) في إنتاج ثنائي الأستيل، نلاحظ من الجدول أن قيمة  $P$  لكل المتغيرات الأربعة أقل من 5% ( $P < 0.05$ ) وبالتالي هناك تأثير خطي معنوي لكل من هذه المتغيرات في كمية ثنائي الأستيل المنتجة كعوامل منفردة، وكانت قيمة  $P$  لتأثير مربع العوامل  $A^*A$ ،  $B^*B$ ،  $C^*C$  و  $D^*D$  أقل من 5% وهذا يعني أن هناك تأثير معنوي لهذه العوامل المربعة الأربعة في إنتاج ثنائي الأستيل، والعلاقة بين العوامل المربعة الأربعة وكمية ثنائي الأستيل الناتجة على شكل منحنى (قطع مكافئ). أما في تأثير العوامل المترابطة (المتداخلة) في إنتاج ثنائي الأستيل في الجدول (4) أن علاقة درجة الحرارة كانت معنوية مع درجة الحموضة pH، وعلاقة درجة الحموضة pH معنوية مع تركيز السترات ( $P < 0.05$ )، بينما كانت العلاقات الأخرى غير معنوية. معامل التحديد  $R^2 = 88.95\%$  وهذا يدل على أن معادلة الانحدار للعوامل المتغيرة تؤثر بنسبة 88.95% على مقدار التغير في كمية ثنائي الأستيل المنتجة.

واعتماداً على الجدول (4) يمكن كتابة معادلة إنتاج ثنائي الأستيل كالتالي:

$$Y = 32.006 + 1.992X_1 + 3.017X_2 + 1.734X_3 + 6.250X_4 + 10.028X_1^2 - 5.632X_2^2 - 5.297X_3^2 - 1.277X_4^2 - 1.163X_1X_2 - 1.224X_1X_3 + 4.596X_1X_4 + 4.261X_2X_3 + 2.516X_2X_4 - 0.8154X_3X_4$$

الجدول (4): تأثير العوامل المدروسة على إنتاج ثنائي الأستيل من *L. lactis*

P	T	Coef	Term
0.000	7.608	32.006	Constant
0.022	0.758	1.992	A
0.015	1.148	3.017	B
0.001	0.660	1.734	C
0.033	2.379	6.250	D
0.005	1.433	10.028	A*A
0.012	-0.805	-5.632	B*B
0.023	-0.417	-1.163	A*B
0.002	-0.757	-5.297	C*C
0.048	-0.183	-1.277	D*D
0.668	-0.439	-1.224	A*C
0.123	1.649	4.596	A*D
0.050	1.529	4.261	B*C
0.383	0.903	2.516	B*D
0.775	-0.292	-0.815	C*D

A\* درجة الحرارة، B درجة الحموضة، C تركيز السترات، D تركيز الجلوكوز، (T) الخطأ المعياري للمعامل، الاحتمالية (P)

من النتائج المتحصلة عليها من البحث تبين أن:

- هناك تأثيراً معنوياً لكل من درجة الحرارة، درجة الحموضة، تركيز السترات وتركيز سكر الجلوكوز في كمية إنتاج ثنائي الأستيل.

الجدول (3): كمية ثنائي الأستيل المنتجة من *L. lactis* بعد تعريضها لعدة متغيرات

رقم التجربة	درجة الحرارة (°م)	درجة الحموضة	تركيز السترات (ل/غ)	تركيز سكر الجلوكوز (ل/غ)	ثنائي الأستيل (ملغ/ل)
1	37	5	4	5	20.57
1	31	6	4	5	29.39
1	31	5	8	5	29.32
1	37	6	8	5	16.09
1	31	5	4	15	30.79
1	37	6	4	15	33.86
1	37	5	8	15	20.22
1	31	6	8	15	42.66
1	34	5.5	6	10	30.38
1	34	5.5	6	10	30.52
2	31	6	4	5	10.85
2	37	6	4	5	14.48
2	37	5	8	5	20.44
2	31	6	8	5	35.38
2	37	5	4	15	43.6
2	31	6	4	15	28.28
2	31	5	8	15	21.16
2	37	5.5	8	15	65.39
2	34	5.5	6	10	31.24
2	34	5.5	6	10	30.6
2	31	5.5	6	10	28.88
2	37	5.5	6	10	57.91
2	34	5	6	10	34.87
2	34	6	6	10	20.6
2	34	5.5	4	10	31.88
2	34	5.5	8	10	24.26
2	34	5.5	6	5	30.56
2	34	5.5	6	15	33.62
2	34	5.5	6	10	31.4
2	34	5.5	6	10	41.73

يلتزم تفاوت وتباين في كمية ثنائي الأستيل المنتجة في كافة المعاملات بلغت في الحد الأقصى بالمعاملة رقم 18 وكمية إنتاج بلغت (65.39 ملغ/ل) عندما كان تركيز سكر الجلوكوز وتركيز السترات ودرجة الحموضة ودرجة الحرارة المثوية 15 غ/ل، 8 غ/ل، 5.5 و 37°م على التوالي، بينما كانت في حدها الأدنى بالمعاملة رقم 11 وكمية إنتاج بلغت (10.85 ملغ/ل) عندما كان تركيز سكر الجلوكوز وتركيز السترات ودرجة الحموضة ودرجة الحرارة المثوية 5 غ/ل، 4 غ/ل، 6 و 31°م على التوالي. ويعود الانخفاض الشديد في المعاملة السابقة إلى انخفاض تركيز السترات إلى 4 غ/ل وبالتالي انخفاض كمية ثنائي الأستيل المنتجة وهذا يتوافق مع Kaneko وزملائه (2011).

توافقت نتائجنا مع ما توصل إليه Medina وزملائه (2001)، في دراسة تأثير درجة الحرارة على إنتاج مركبات النكهة من السترات بواسطة *Lb. rhamnosus*، فتبين أن الإنتاج الحيوي للأستيل ازداد بشكل متزامن مع النمو عند 30°م و 37°م، بينما كان الإنتاج منخفضاً عندما كانت درجة الحرارة 45°م. في درجات الحرارة الأخرى كانت القيم أعلى ولكن لم تظهر أي فروق ذات دلالة إحصائية بين بعضها البعض. ومع ذلك، تم الحصول على أعلى كفاءة لتحويل السترات إلى ثنائي الأستيل عند 37°م بفسر ذلك: إلى أنه عند درجة الحرارة هذه لوحظ الحد الأقصى لنشاط إنزيم citrate lyase الذي يساهم في انتقال السترات إلى داخل الخلايا واتحاده مع أكرالوأسيتات وبالتالي تشكل البيروفات التي تعد الركيزة الأساسية في إنتاج ثنائي الأستيل والأستيتون (Wang et al., 2017). كما توصل Habil وزملائه (1982)، إلى أنه عندما ارتفعت درجة حرارة التحضين من 23 إلى 30°م، تم الحصول على حوالي 30 % زيادة في إنتاج ثنائي الأستيل، حيث يكون نشاط diacetyl reductase بحده الأدنى عند درجة الحرارة هذه مما يقلل من مستوى تحول ثنائي الأستيل المنتج إلى الأستيتون.

تماثلت نتائجنا أيضاً مع ما توصل إليه Palles وزملائه (1998) في دراسة تأثير درجات pH مختلفة تراوحت بين 4 و 6 على إنتاج ثنائي الأستيل من قبل بكتيريا *Lb. plantarum* و *Lb. casei*، فكانت 5.5 هي درجة الـ pH المثالية للنمو وإنتاج أعلى كمية من ثنائي الأستيل يفسر ذلك: إلى أن الاستهلاك الأمثل للسترات ومصادر الكربون من قبل بكتيريا حمض اللبن وبالتالي تراكم ثنائي الأستيل في الوسط لا يتم إلا عند قيم الـ pH المنخفضة والتي تتراوح من 4-5.5 (Rea and Cogan, 2003).

كما بلغ إنتاج ثنائي الأستيل أقصاه عند استخدام الجلوكوز بتركيز 15 غ/ل، وذلك يعود إلى أن الكربوهيدرات وبشكل خاص سكر الجلوكوز ذات أهمية بالغة بالنسبة للتركيب الحيوي لكل من حمض اللبن ومركبات النكهة ثنائي الأستيل والأستيتون (Ines and Falco, 2018). حيث يؤدي الاستقلاب المشترك للجلوكوز والسترات في الوسط إلى تحفيز معدل نمو سلالات *L.*

- isolation of lactic acid bacteria and its use as local starters in Syrian akawi cheese processing. *International Food Research Journal*, 22(4), 1699–704.
- Al-kotami, S.S., Abou-Ghorrah, S.M. and Yazaji, S.R. (2019). Microbial diacetyl production. *Damascus University Journal for the Agricultural Sciences*, n/a(n/a), n/a. [in Arabic]
- Bakirci, I., Celik, S. and Ozdemir, C. (2002). The effects of commercial starter culture and storage temperature on the oxidative stability and diacetyl production in butter. *International Journal of Dairy Technology*, 55(4), 177–81.
- Bandell, M., Lhotte, M.E., Marty, C., Veyrat, A. and Prevost, H. (1998). Mechanism of the citrate transporters in carbohydrate and citrate cometabolism in *Lactococcus* and *Leuconostoc* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), 1594–600.
- Davidson, B.E., Llanos, R.M., Cancelli, M.R., Redman, N.C. and Hillier, A.J. (1995). Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 5(8), 763–84.
- Goupy, S., Croguennec, T., Gentil, E. and Robins, R.J. (2000). Metabolic flux in glucose/citrate co-fermentation by lactic acid bacteria as measured by isotopic ratio analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 182(2), 207–11.
- Habil, H., Oberman, A., Piątkiewicz, K. and Z. Libudzisz. (1982). Production of diacetyl and acetoin by lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7,8), 615–23.
- Hammer, B.W. (1920). Volatile acid production of *Streptococcus lacticus* and the organisms associated with it in starters. *Agricultural Experiment Station, Iowa State College of Agriculture and Mechanic Arts*, 5(63), 61-79.
- Hugenholtz, J. (1993). Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1,2), 165–78.
- Hugenholtz, J. (1993). Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis biovar. diacetylactis* and *Leuconostoc* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(n/a), 17–22.
- Ines, A. and Falco, V. (2018). *Lactic Acid Bacteria Contribution to Wine Quality and Safety. In Generation of Aromas and Flavours*. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.81168> (accessed on 05/11/2018)
- Kaneko, T., Takahashi, M. and Suzuki, H. (1990). Acetoin fermentation by citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lac* 262. *Microbiological Research*, 56(9), 2644–9.
- Macciola, V., Candela, G. and Leonardi, A.D. (2008). Rapid gas-chromatographic method for the determination of diacetyl in milk, fermented milk and butter. *Food Control*, 19(9), 873–8.
- Medina, R., Oliver, G. and Benito, L. (2001). Influence of temperature on flavor compound production from citrate by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Microbiological Research*, 155(4), 257–62.
- Nadal, I., Rico, J., Pérez-Martínez, G., Yebra, M.J. and Monedero, V. (2009). Diacetyl and acetoin production from whey permeate using engineered *Lactobacillus casei*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(9), 1233–7.
- Palles, T., Beresford, T., Condon, S. and Cogan, T.M. (1998). Citrate metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 85(1), 147–54.
- Pardeep, K. and Satyanarayana, T. (2006). Optimization of culture variables for improving glucoamylase production by alginate-entrapped *Thermomucor indicae-seudaticae* using statistical methods. *Bioresource Technology Journal*, 98(6), 1252–9.
- Rea, M.C. and T.M. Cogan. (2003). Glucose prevents citrate metabolism by Enterococci. *International Journal Food Microbiology*, 88(2,3), 201–6.
- Schmitt, P. and Divies, C. (1992). Effect of varying citrate levels on C4 compound formation and on enzyme levels in *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* grown in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology Journal*, 37(4), 426–30.
- Wang, J.Y., Wang, X.J., Hui, X., Hua, S.H., Li, H. and Gao, W.Y. (2017). determination of diacetyl in beer by a precolumn derivatization-HPLC-UV method using 4-(2,3-Dimethyl-6-quinoxaliny)-1,2-benzenediamine as a derivatizing reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(12), 2635–41.
- Wessels, S., Axelsson, L., Hansen, E.B., De Vuyst, L., Laulund, S., Lähdenmäki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S. and Wright, A.V. (2004). The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science and Technology*, 15(10), 498–505.
- Westerfeld, W.W. (1945). A colorimetric determination of blood acetoin. *Journal of Biological Chemistry*, 161(n/a), 495–502.
- علاقة درجة الحرارة كانت معنوية مع درجة الحموضة pH، وعلاقة درجة الحموضة pH معنوية مع تركيز السترات ( $P < 0.05$ ) بينما كانت العلاقات الأخرى غير معنوية.
- الظروف المثلى للإنتاج هي درجة حرارة 37°م ودرجة الحموضة (pH) 5.5 وتركيز السترات 6 غ/ل وتركيز سكر الجلوكوز 15 غ/ل.
- أمكن التوصل الى تحديد بعض الظروف المثلى للحصول على أعلى إنتاجية لثنائي الأستيل من قبل بكتيريا *L. lactis*. بلغت (65.39 ملغ/ل) عند استخدام البرنامج الإحصائي Minitab والتصميم الإحصائي (RSM) Response Surface Methodology.
- ضرورة الاستمرار بالعمل على بكتيريا *L. lactis* للحصول على سلالات ذات إنتاجية أعلى من ثنائي الأستيل، وبالتالي زيادة الكمية المنتجة من ثنائي الأستيل الذي يعد من أهم مركبات النكهة في منتجات الألبان المتخمرة. وكذلك إمكانية استخدامه على نطاق واسع في العديد من الصناعات الغذائية بشكل خاص تعزيز النكهة الطبيعية للزبدة.

## نبذة عن المؤلفين

### سميرة القطامي

قسم العلوم الأساسية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، دمشق، سوريا، 00963994273768، [samira.alkotami@gmail.com](mailto:samira.alkotami@gmail.com)

م. القطامي، سورية، بكالوريوس في الهندسة الزراعية (جامعة دمشق 2008) وماجستير قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة 2012. حاليا طالبة دكتوراه قسم علوم الأغذية. موظفة لدى جامعة دمشق / كلية الزراعة في قسم العلوم الأساسية من تاريخ 2012 حتى الآن، في الإشراف على الجوانب التطبيقية في الكيمياء العامة والتحليلية والكيمياء العضوية والإشراف على الجوانب التطبيقية في الرياضيات والفيزياء/ لطلاب كلية الزراعة سنة أولى. ساهمت في بعض المؤتمرات العلمية. عملت لدى الهيئة العامة للتقانة الحيوية خلال تنفيذ الاختبارات العملية للأبحاث.

### صباح أبو غرة

قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، دمشق، سوريا، 00963934197581، [s.aboughorrah@yahoo.com](mailto:s.aboughorrah@yahoo.com)

أ.د. أبو غرة دكتوراه (جامعة نانسى الأولى)، سوري، إجازة عامة في العلوم الزراعية، جامعة دمشق، دبلوم دراسات معقدة، كلية العلوم، جامعة نانسى الأولى، فرنسا، الدرجة العلمية: أستاذ منذ عام 2007 في قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق. الاختصاص الدقيق: كيمياء وتحليل الألبان. له عدة مؤلفات أهمها كتاب كيمياء الألبان وتحليلها الجزء النظري. كتاب كيمياء وتحليل الألبان الجزء العملي، كتاب تكنولوجيا الألبان (مشتقات الحليب الدهنية). منشورات جامعة دمشق 1995. نشر في العديد من المجالات داخل الجمهورية العربية السورية وخارجها.

### صباح يازجي

قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، دمشق، سوريا، 00963944048523، [ryazji@hotmail.com](mailto:ryazji@hotmail.com)

أ.د. يازجي دكتوراه (جامعة برلين الحرة)، سورية، إجازة عامة في العلوم الزراعية، جامعة حلب، سوريا، دبلوم في مجال ميكروبيولوجيا الأغذية جامعة برلين الحرة، ألمانيا، الدرجة العلمية: أستاذ منذ عام 2011، في قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سوريا. الاختصاص الدقيق: ميكروبيولوجيا الأغذية، نشرت أبحاث عديدة في ميكروبيولوجيا وتقانة التخمرات وهندسة الأنزيمات الميكروبية نشرت في مجلات علمية عديدة داخل الجمهورية العربية السورية وخارجها. لها عدة مؤلفات. ساهمت في العديد من المؤتمرات العلمية والندوات.

## المراجع

القطامي، سميرة سليم، أبو غرة، صباح محمد، ويازي، صباح رضا. (2019). إنتاج ثنائي الأستيل ميكروبياً. *مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية*، بدون رقم مجلد (بدون رقم عدد)، بدون أرقام صفحات.

Al-Kotami, S.S., Abou-Ghorrah, S.M. and Yazaji, S.R. (2015). Detection and