



إنتاج متعدد حامض اللاكتيك من حامض اللاكتيك المنتج من عزلة محلية لبكتريا حامض اللاكتيك وإستعماله في تحضير أغشية نانوية وتطبيقه في تغليف خلال البرحي

أطروحة مقدمة الى

مجلس كلية الزراعة - جامعة البصرة

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه فلسفة في

العلوم الزراعية - علوم الاغذية

تقانات إحيائية

من قبل الطالب

زينب عبد علي حسن

ماجستير علوم زراعية

2001

بإشراف

أ.د.وداد صالح حنوش

آب 2021م

أ.د. علاء كريم نعيمه

محرم 1443هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

رَبِّ أَوْزِعْنِي أَنْ أَشْكُرَ نِعْمَتَكَ الَّتِي أَنْعَمْتَ عَلَيَّ
وَعَلَىٰ وَالِدَيَّ وَأَنْ أَعْمَلَ صَالِحًا تَرْضَاهُ وَأَدْخِلْنِي
بِرَحْمَتِكَ فِي عِبَادِكَ الصَّالِحِينَ

صدق الله العلي العظيم

سورة النمل الآية ١٩



بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المشرف

نشهد بأن إعداد هذه الأطروحة الموسومة (إنتاج متعدد حامض اللاكتيك من حامض اللاكتيك المنتج من عزلة محلية لبكتريا حامض اللاكتيك وإستعماله في تحضير أغشية نانوية وتطبيقه في تغليف خلال البرحي) المقدمة من قبل الطالبة (زينب عبد علي حسن) قد تم تحت إشرافنا في جامعة البصرة / كلية الزراعة / قسم علوم الأغذية وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة علوم الأغذية.

التوقيع :

التوقيع:

الاسم : أ. د. وداد صالح حنوش

الاسم: أ. د. علاء كريم نعيمه

المرتبة العلمية: أستاذ

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية العلوم-جامعة البصرة

العنوان: كلية الزراعة-جامعة البصرة

التاريخ: / / 2021

التاريخ: / / 2021

توصية رئيس القسم

بناءً على التوصية المقدمة من قبل الأستاذ المشرف أحيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع :

الاسم: أ. م. د. وسن كاظم عبدالرزاق

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية الزراعة - جامعة البصرة

التاريخ: / / 2021

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار لجنة مناقشة

نشهد بأننا لجنة المناقشة قد اطلعنا على رسالة الطالبة زينب عبد علي حسن (إنتاج متعدد حامض اللاكتيك من حامض اللاكتيك المنتج من عزلة محلية لبكتريا حامض اللاكتيك وإستعماله في تحضير أغشية نانوية وتطبيقه في تغليف خلال البرحي) وقد ناقشناها في محتوياتها وفيما له عالقة بها ووجدنا أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الدكتوراه في علوم الاغذية والتقانات الإحيائية وبتقدير (امتياز).

رئيس اللجنة

التوقيع :
الاسم : أ.د. علي حسين عبد الكريم
المرتبة العلمية : أستاذ
الاختصاص الدقيق : كيمياء تحليلية
التاريخ : 2021 / 9 /

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : أ.د. سرمد غازي محمد
المرتبة العلمية : أستاذ
الاختصاص الدقيق : تقانات احيائية
التاريخ : 2021 / 9 /

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : أ.د. الهام اسماعيل طامي
المرتبة العلمية : أستاذ
الاختصاص الدقيق : تقانات احيائية
التاريخ : 2021 / 9 /

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : د. وسن جعفر ابراهيم
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
الاختصاص الدقيق : تقانات احيائية
التاريخ : 2021 / 9 /

عضو اللجنة

التوقيع :
الاسم : د. ايمان عبد الله جعفر
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
الاختصاص الدقيق : كيمياء لعضوية طبية
ومواد نانوية
التاريخ : 2021 / 9 /

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع :
الاسم : أ.د. وداد صالح حنوش
المرتبة العلمية : أستاذ
الاختصاص الدقيق : كيمياء بوليمرات
التاريخ : 2021 / 9 /

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع :
الاسم : أ.د. علاء كريم نعيمه
المرتبة العلمية : أستاذ
الاختصاص الدقيق : احياء البان
التاريخ : 2021 / 9 /

مصادقة عميد الكلية

التوقيع :
الاسم : د. ساجد سعد حسن
المرتبة العلمية : أستاذ
التاريخ : 2021 / /

الشكر والتقدير

بسم الله الرحمن الرحيم

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد المرسلين نبينا محمد (صلى الله عليه وعلى اله الطيبين الطاهرين).

أتقدم بخالص الشكر والامتنان الى مشرفي أستاذتي الافاضل الدكتور علاء كريم نعيمه والدكتور وداد صالح حنوش لما ابدوه لي من اراء وتوجيهات علمية خلال فترة البحث .

ومن الوفاء والعرفان لابد ان أتذكر المرحومة الدكتورة آمال كاظم غضبان الاسدي وأرجو من الله العزيز التقدير أن يتغمد الفقيدة برحمته الواسعة أنه سميع مجيب .

كما اتقدم بوافر الشكر والتقدير الى رئيس لجنة المناقشة الدكتور علي حسين عبد الكريم لقبوله مناقشة اطروحتي وكذلك أعضاء لجنة المناقشة الدكتورة الهام إسماعيل طامي لتحملها عناء السفر والأستاذ الدكتور سرمد غازي محمد والدكتورة وسن جعفر إبراهيم لتحملها عناء السفر والدكتورة ايمان عبدالله جعفر.

كذلك لا يسعني إلا ان أتقدم بالشكر الجزيل الى عمادة كلية الزراعة والى رئاسة قسم علوم الأغذية والى جميع الأساتذة الافاضل وزميلاتي واخص منهم دكتورة نجلاء حسين صبر والست مريم عبد الباري والست كفاء علي لما ابدوه لي من مساعدة طيلة فترة البحث .

واتقدم بوافر الشكر والتقدير الى الست خلود عبد الكريم /كلية التمريض لمساعدتي في اجراء التشخيص الجيني للبكتريا وجزيل الشكر الى الدكتور عبد الكريم محمد قسم البستنة لاجراء التحليل الاحصائي والدكتورة خولة حمزة قسم البستنة والدكتورة منتهى قسم الثروة الحيوانية والى جميع زملائي طلاب الدراسات العليا وكل من مد يد العون لإتمام هذا البحث .

الباحثة

عزلت 81 عزلة من بكتريا حامض اللاكتيك Lactic acid bacteria من مصادر مختلفة شملت (حليب الابقار وحليب الجاموس وجبن بقر محلي ولبن رائب بقري ولبن رائب جاموس وقيمر ومخلل زيتون ومخلل خضروات ومخلل لهانة)، شخّصت اعتماداً على النمو في وسط MRS الصلب إضافة الى الفحوصات المظهرية والمجهريّة المتضمنة اشكال المستعمرات وفحص الحركة وتصبيغ كرام والاختبارات الكيموحيوية ومنها اختبار الكاتاليز وتحلل الجيلاتين وإنتاج غاز CO₂ من الكلوكوز وإختزال الأمونيا من الأرجنين وفحص النمو بدرجات حرارية وتراكيز ملحية مختلفة وإختزال النترات إلى النتريت والنمو على أس هيدروجيني مختلف وإنتاج الامونيا من الارجنين وفحص تخمر الكربوهيدرات .

تم غربلة العزلات على اساس إنتاج الحامض واختيرت العزلة الأكثر إنتاجاً للحامض وتم تشخيصها جينياً . اذ أظهرت نتائج التشخيص بوساطة تقنية تفاعلات السلسلة للأنزيم المبلمر الحصول على عزلة محلية جديدة عزلت من اللبن الرائب للجاموس (*Lactobacillus paraplantarum* strain LP IQ (YL4) بنسبة تطابق 100% مع سلالة مرجعية لبكتريا *Lactobacillus paraplantarum* وسجلت في بنك الجينات الياباني تحت الرقم MT622658 .

تم تشخيص حامض اللاكتيك المنتج من وسط الشرش بتقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة وتشابه زمن احتجاز ظهور قمة الحامض المنتج من العزلة مع وقت ظهور عينة من الحامض القياسي والذي كان 5.361 دقيقة.

شخص الحامض ايضاً بجهاز طيف الرنين النووي المغناطيسي وتبين وجود الحزم في الموقع (1-1.5) ppm تعزى الى مجموعة CH₃ بينما الحزمة (4-4.5) ppm تعود الى بروتون ذرة الكربون الثانية.

الخلاصة

Summary

درست الظروف المثلى من الأس الهيدروجيني و درجة الحرارة وحجم لقاح و فترة التخمير لايجاد افضل الظروف لانتاج الحامض وكانت افضل النتائج عند أس هيدروجيني 6.5 ودرجة حرارة 30 م وحجم لقاح 2% وفترة تخمير 48 ساعة.

تمت بلمره حامض اللاكتيك بطريقة تفاعلات التكتيف اذ تم الحصول على متعدد حامض اللاكتيك بشكل مسحوق ابيض مائل للاصفرار. تم قياس وزنه الجزيئي بجهاز GPC اذ بلغ 39.139 كيلودالتون.

أكد بلمره حامض اللاكتيك الى متعدد حامض اللاكتيك بتقنية FTIR اذ تغير مواقع وشدات الحزم الاساسية مقارنة بالحامض اذ تناقصت شدة حزمة الهيدروكسيل من 3510 سم⁻¹ في الحامض الى 3506 سم⁻¹ في المتعدد اضافة الى ازاحة حزمة مجموعة الكربونيل من موقع 1751 سم⁻¹ في الحامض الى الموقع 1759 سم⁻¹ في المتعدد وبشدة اقوى.

بلغت درجة الانتقال الزجاجي للمتعدد 65.89 م° والحرارة النوعية 0.67 جول/غم ودرجة انصهار 158 م° عند قياسها بجهاز المسح التفاضلي المسعري .

تم حساب درجة التبلور 28.07% اما قيمة معامل التشتت المتعدد 2.581. وقدرت نفاذية الغشاء لبخار الماء وكانت 1.1021×10^{-7} غم/ م . باسكال. ساعة.

أستعملت جسيمات السليكا النانوية في تحضير خلأط متعدد اللاكتيك و قدر حجم الجسيمات باستخدام المجهر الالكتروني الماسح (29.2 نانوميتر).

حُضرت اغشية متعدد حامض اللاكتيك بإستعمال طريقة الصب والمدعمة بنسب مختلفة من جسيمات السليكا

Summary

الخلاصة

النانوية (5,3,1)% وتميزت الاغشية بالشفافية واللمعان والمرونة وبكونها غير هشّة وعدم ذائبيتها بالماء.

أظهرت نتائج تحليل التحلل الحراري الوزني ان درجة التفكك الحراري لمتعدد اللاكتيك عند 402 °م اما متعدد حامض اللاكتيك المدعم بجسيمات السليكا النانوية كانت 448 °م .

فُدر سمك الاغشية وتفق الغشاء المدعم بنسبة 5% جسيمات السليكا النانوية معنوياً إذ حصل على اعلى قيمة بلغت 0.1567 مايكرومتر بينما حصل غشاء PLA على اقل سمك للغشاء وبلغ 0.1133.

أرتفعت قوة الشد لغشاء حامض اللاكتيك عند اضافة نسب مختلفة من جسيمات السليكا النانوية (5,3,1) % من 19.8 الى (21.6 و 24.8 و 31.8) ميكا باسكال على التوالي. كما أختبر التحلل البايولوجي للاغشية وتفق الغشاء المدعم بجسيمات السليكا النانوية معنوياً على الغشاء متعدد حامض اللاكتيك اذ بلغت النسبة المئوية للفقد 4.46% للغشاء المدعم و2.8% لمتعدد حامض اللاكتيك خلال 28 يوم.

أستعملت الاغشية المدعمة بتراكيز من جسيمات السليكا النانوية (5,3,1) % خلال فترة خزن ثمار البرحي في مرحلة الخلال لمدة 28 يوم اذ سُجلت فروق معنوية بينها وبين غشاء متعدد اللاكتيك واكياس متعدد الاثيلين وقد تفوقت الاغشية المدعمة معنوياً على باقي الاغشية في تقليل الفقد بالوزن وطول وقطر الثمار والمواد الصلبة الذائبة والحموضة. كما أتسمت بالحفاظ على المظهر الخارجي ولون الثمار طيلة فترة الخزن.

قائمة المختصرات list of abbreviations

التسمية الكاملة	المختصر
American Society for Testing and Materials	ASTM
Base pair	bp
Basic Local Alignment Search Tool	BLAST
Colony Forming Unit	CFU
Poly lactic acid	PLA
De Man, Rogosa and Sharpe	MRS
Deoxy ribonucleic acid	DNA
Deterium oxide	D ₂ O
Di methyl formamide	DMF
Ethylene Di-amine Tetra Acetic Acid	EDTA
Fourier-Transform Infrared Spectroscopy	FTIR
Forward primer	F
Gel permeation chromatography	GPC
High Density Poly Ethylene	HDPE
High Performance Liquid Chromatography	HPLC
Lactic acid bacteria	LAB
<i>Lactobacillus paraplantarum sp.</i>	<i>L.paraplantarum</i>
Low Density Poly Ethylene	LDPE
National Center Biotechnology Information	NCBI
Poly dispersity index	PDI
Poly D-lactic acid	PDLA
Poly DL-lactic acid	PDLLA
Poly L-lactic acid	PLLA
Proton Nuclear Magnetic Resonance	H-NMR
Polymerase chain reaction	PCR
Reverse primer	R
16 subunit ribosomal Deoxy ribonucleic acid	16s rDNA
Silica nanoparticles	Si NPs(SiO ₂)
Statistical Package for Social Science	SPSS
Tris –Borate-EDTA	TBE

قائمة المحتويات list of content

الصفحة	العنوان	التسلسل
3-1	المقدمة	1
4	مراجعة المصادر	2
4	بكتريا حامض اللاكتيك	1-2
5	مصادر العزل	1-1-2
6	نبذة تاريخية عن بكتريا حامض اللاكتيك	2-1-2
8	اهمية بكتريا حامض اللاكتيك	3-1-2
11	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	2-2
12	حامض اللاكتيك	3-2
14	استخدامات حامض اللاكتيك	1-3-2
15	تحضير حامض اللاكتيك	2-3-2
16	الاحياء المجهرية المنتجة لحامض اللاكتيك	3-3-2
18	مصادر الكربون	4-3-2
19	الشرش	5-3-2
19	متعدد حامض اللاكتيك	4-2
20	بلمرة حامض اللاكتيك	1-4-2
23	طرق بلمرة حامض اللاكتيك	1-1-4-2
23	الخواص الفيزيائية لمتعدد اللاكتيك	2-4-2

26	التحاليل الحرارية	3-4-2
27	تطبيقات متعدد اللاكتيك	4-4-2
27	التغليف	5-2
29	الاعلفة الحيوية	1-5-2
31	خلائط PLA	1-1-5-2
32	طرائق تحضير المواد النانوية	2-1-5-2
33	الاعلفة النانوية	3-1-5-2
36	المواد وطرائق العمل	3
36	المواد	1-3
39	الاجهزة المخبرية	1-1-3
39	طرائق العمل	2-3
40	جمع مصادر العزلات	1-2-3
41	تحضير الاوساط الزرعية	2-2-3
41	وسط MRS الصلب	1-2-2-3
41	MRS-L.Cysteine.HCl broth	2-2-2-3
41	MRS +CaCO3	3-2-2-3
41	الحليب الفرز	4-2-2-3
42	ماء البيبتون	5-2-2-3
42	وسط استهلاك المسترات	6-2-2-3
42	وسط الجيلاتين	7-2-2-3

42	وسط اختزال النترات	8-2-2-3
42	وسط انتاج الامونيا من الارجنين	9-2-2-3
43	وسط تخمر الكاربوهيدرات	10-2-2-3
43	وسط اختبار تحمل الحموضة	11-2-2-3
43	وسط اختبار تحمل الملوحة	12-2-2-3
43	الكواشف والمحاليل الكيميائية المستعملة	3-2-3
43	محلول هيدروكسيد الصوديوم	1-3-2-3
44	محلول حامض الهيدروكلوريك (1 عياري)	2-3-2-3
44	محلول بيروكسيد الهيدروجين	3-3-2-3
44	كاشف اختزال النترات	4-3-2-3
44	كاشف نسلر	5-3-2-3
45	دليل الكلوروفينول الأحمر	6-3-2-3
45	كاشف الفينولنفثالين	7-3-2-3
45	محلول صبغة بروموفينول الزرقاء	8-3-2-3
45	محلول صبغة Ethidium Bromide	9-3-2-3
46	محلول دارى الفوسفات الملحي	10-3-2-3
46	محلول الترحيل الكهربائي	11-3-2-3
47	مخطط طرائق العمل	
50	عزل بكتريا حامض اللاكتيك	4-2-3

50	اغناء البكتريا في الاوساط السائلة	1-4-2-3
50	تنقية المستعمرات	2-4-2-3
50	حفظ العزلات البكتيرية	5-2-3
51	الفحوصات التشخيصية	6-2-3
51	الفحوصات الشكلية	1-6-2-3
51	الفحص المجهرى	2-6-2-3
51	الاختبارات الكيموحيوية	7-2-3
51	انتاج الحامض	1-7-2-3
52	إنتاج الغاز من الكلوكوز	2-7-2-3
52	فحص الكاتليز	3-7-2-3
52	فحص استهلاك السترات	4-7-2-3
52	اختبار تسييل الجيلاتين	5-7-2-3
53	فحص اختزال النترات	6-7-2-3
53	فحص إنتاج الأمونيا من الأرجنين	7-7-2-3
53	فحص تخمر السكريات	8-7-2-3
54	فحص النمو عند درجات حرارية مختلفة	9-7-2-3
54	تأثير الأس الهيدروجيني في نموالبكتريا	10-7-2-3
54	وسط اختبار تحمل الملح	11-7-2-3
54	تقدير الحموضة الكلية	12-7-2-3

55	قياس الأس الهيدروجيني	13-7-2-3
55	اختبار <i>16s rDNA</i>	8-2-3
55	استخلاص الحامض النووي DNA لعزلات بكتريا حامض اللاكتيك	1-8-2-3
57	الكشف عن الحامض النووي DNA بتقنية الترحيل الكهربائي باستعمال هلام الاكاروز	2-8-2-3
57	التشخيص الجيني <i>16S rDNA</i> بتقنية تفاعلات السلسلة للأنزيم المبلمر	3-8-2-3
59	الترحيل الكهربائي	4-8-2-3
59	قراءة تتابعات القواعد النيتروجينية	5-8-2-3
59	إنتاج حامض اللاكتيك	3-3
59	تحضير وسط التخمر	1-3-3
59	الشرش	1-1-3-3
60	تحضير اللقاح	2-3-3
61	طريقة التخمر	3-3-3
61	أستخلاص حامض اللاكتيك	4-3-3
61	تقدير وتشخيص حامض اللاكتيك بوساطة تقنية الكروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة	1-4-3-3
62	تحليل حامض اللاكتيك بجهاز (NMR)	2-4-3-3
62	حساب النسبة المئوية لكفاءة التحويل	3-4-3-3
63	دراسة الظروف المثلى لإنتاج حامض اللاكتيك	5-3-3

63	الاس الهيدروجيني الامثل	1-5-3-3
63	درجة حرارة التخمر المثلى	2-5-3-3
63	حجم اللقاح الامثل	3-5-3-3
63	فترة التخمر المثلى	4-5-3-3
64	بلمرة حامض اللاكتيك	4-3
64	حساب الوزن الجزيئي للبوليمر	1-4-3
66	تصنيع غشاء متعدد حامض اللاكتيك	5-3
66	تصنيع خلائط مع متعدد اللاكتيك	6-3
66	تحضير النانو سليكا	1-6-3
67	تصنيع خلائط نانوية مع متعدد اللاكتيك	2-6-3
67	مواصفات غشاء متعدد اللاكتيك	7-3
67	تقدير سمك الغشاء	1-7-3
67	التحلل الحراري الوزني	2-7-3
68	تقدير قابلية الأغشية على الاذابة بالماء	3-7-3
69	تقدير نفاذية الغشاء لبخار الماء	4-7-3
70	تقدير قوة الشد ونسبة الاستطالة إلى حد القطع	5-7-3
71	المسح التفاضلي المسعري	6-7-3
72	تشخيص المجاميع الفعالة بتقنية طيف الاشعة تحت الحمراء	7-7-3
72	تحلل غشاء PLA في التربة	8-7-3
73	تطبيقات متعدد اللاكتيك PLA في حفظ الاغذية	8-3

73	تحضير الثمار للتغليف	1-8-3
74	التغير في وزن الثمار	1-1-8-3
74	تقدير الحموضة الكلية	2-1-8-3
74	قياس ابعاد الثمار	3-1-8-3
75	المواد الصلبة الذائبة الكلية	4-1-8-3
75	التحليل الاحصائي	9-3
76	النتائج والمناقشة	4
76	عزل بكتريا حامض اللاكتيك	1-4
77	تنقية العزلات	1-1-4
78	تشخيص بكتريا حامض اللاكتيك	2-4
78	الفحص المظهري	1-2-4
79	الفحص المجهرى	2-2-4
80	الاختبارات الكيموحيوية	3-4
84	تشخيص بكتريا حامض اللاكتيك باستعمال تقنية PCR	4-4
84	استخلاص الحامض النووي DNA لبكتريا حامض اللاكتيك	1-4-4
84	تضخيم الجين <i>16S rDNA</i> بتقنية PCR	2-4-4
85	تتابع القواعد النتروجينية Sequencing	3-4-4
87	انتاج حامض اللاكتيك	5-4
87	تشخيص حامض اللاكتيك بجهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة	1-5-4
88	تقدير الحموضة وكمية الحامض المنتج	2-5-4

89	تحليل حامض اللاكتيك بجهاز H-NMR	3-5-4
90	طيف الأشعة تحت الحمراء FTIR-analysis	4-5-4
91	دراسة الظروف المثلى لإنتاج حامض اللاكتيك	5-5-4
91	الأس الهيدروجيني الابتدائي الأمثل	1-5-5-4
92	درجة الحرارة المثلى	2-5-5-4
93	حجم اللقاح الأمثل	3-5-5-4
95	فترة التخمير المثلى	4-5-5-4
96	بلمرة الحامض	6-4
97	تحليل طيف متعدد اللاكتيك بجهاز FTIR	1-6-4
99	المسح التفاضلي المسعري	2-6-4
100	قياس الوزن الجزيئي لـ PLA	3-6-4
102	تحليل النانو سليكا	7-4
102	التحليل بجهاز المجهر الإلكتروني الماسح SEM	1-7-4
104	تحليل النانو سليكا بجهاز FTIR	2-7-4
105	تصنيع الأغشية	8-4
106	تقدير سمك الغشاء	1-8-4
106	التحلل الحراري الوزني للغشاء TGA	2-8-4
109	تقدير نفاذية الغشاء لبخار الماء	3-8-4
110	تقدير قوة الاستطالة والشد للغشاء	4-8-4
111	تقدير قابلية الأغشية على الإذابة بالماء	5-8-4

111	تحلل غشاء PLA في التربة	6-8-4
114	حفظ الثمار	9-4
114	التغير في وزن الثمار	1-9-4
115	التغير في اطوال الثمار	2-9-4
116	التغير في قطر الثمار	3-9-4
117	الحموضة	4-9-4
118	المواد الصلبة الذائبة الكلية	5-9-4
119	المظهر الخارجي	6-9-4
121	الاستنتاجات والتوصيات	5
121	الاستنتاجات	1-5
124	التوصيات	2-5
	المصادر	
	المصادر العربية	
	المصادر الانكليزية	

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	التسلسل
13	الخصائص العامة لحمض اللاكتيك	1-2
24	الخصائص الفيزيائية لأنواع متعدد اللاكتيك (D,L)	2-2

27	خواص متعدد اللاكتيك في التطبيقات المختلفة	3-2
36	المواد المستخدمة في الدراسة	1-3
39	الاجهزة والادوات المختبرية المستعملة في الدراسة.	2-3
58	خليط تفاعلات السلسلة للأنزيم المبلر المضافة في انبوب التضخيم PCR	3-3
58	خطوات عمل PCR لتضخيم 16S rDNA	4-3
60	التركيب الكيميائي للشرش	5-3
76	مصادر عزل البكتريا	1-4
81	الاختبارات الكيموحيوية للعزلات المنتخبة والعائدة لبكتريا حامض اللاكتيك	2-4
82	قابلية العزلات البكتيرية المنتخبة في تخمر انواع مختلفة من الكربوهيدرات	3-4
86	تتابع القواعد النتروجينية لعزلة بكتريا حامض اللاكتيك YL4	5-4
88	تحليل نموذج حامض اللاكتيك القياسي والحامض والمنتج من العزلة المحلية	6-4
88	كمية الحامض المنتج من العزلة وكفاءة التحويل بعد تنميتها على الشرش	7-4
101	نتائج الاوزان الجزيئية المستحصل عليها من القياس	8-4
106	تقدير سمك الاغشية	9-4
108	بعض الدوال الحرارية المستتبطة من تحاليل TGA	10-4
110	قوة الشد والاستطالة ومعامل يونك لغشاء PLA والاعشبية المدعمة بالسليكا	11-4

قائمة الاشكال

الصفحة	العنوان	التسلسل
8	مسارات تخليق حامض اللاكتيك	1-2

14	النظيران البصريان لحامض اللاكتيك	2-2
21	الخطوات الرئيسية لإنتاج PLA	3-2
22	مخطط طرق مختلفة لإنتاج متعدد اللاكتيك	1-2
25	تأثير النانوسليكا على معامل يونك	4-2
47	مخطط طرائق العمل التي أجريت خلال الدراسة	1-3
77	تنقية المستعمرات بطريقة التخطيط على وسط MRS-agar	1-4
78	المستعمرات المعزولة على وسط MRS الصلب	2-4
79	تصنيف كرام للعزلات المتحصل عليها من مصادر مختلفة	3-4
83	الفحوصات البايوكيميائية للعزلات المعزولة من مصادر مختلفة	4-4
84	الترحيل الكهربائي للـ DNA المستخلص من العزلة البكتيرية YL4	5-4
85	تضخيم الجين <i>16S rDNA</i> للعزلة المحلية YL4	6-4
87	كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة لحامض اللاكتيك القياسي والحامض المنتج من العزلة المحلية	7-4
89	طيف حامض اللاكتيك المنتج من البكتريا بجهاز H-NMR	8-4
90	طيف FTIR للمتعهد اللاكتيك المنتج من العزلة البكتيرية	9-4
92	تأثير الأس الهيدروجيني على إنتاج حامض اللاكتيك لـ <i>L.paraplantarum</i>	10-4
93	تأثير درجات الحرارة على إنتاج حامض اللاكتيك لـ <i>L.paraplantarum</i>	11-4
94	تأثير حجم اللقاح على إنتاج الحامض لـ <i>L.paraplantarum</i>	12-4
95	تأثير فترات تخمر مختلفة على إنتاج الحامض لـ <i>L.paraplantarum</i>	13-4
96	مخطط عملية البلمرة التكتيفية لإنتاج متعدد اللاكتيك	14-4

97	a-متعدد اللاكتيك في المذيب ثنائي كلوروميثان b-مسحوق متعدد اللاكتيك	15-4
98	طيف FTIR لمتعدد اللاكتيك المنتج من العزلة البكتيرية	16-4
99	منحني DSC لمتعدد اللاكتيك	17-4
101	منحني توزيع الوزن الجزيئي لمتعدد حامض اللاكتيك بجهاز GPC	18-4
103	A-حبيبات نانوسليكا-bحجم الحبيبات-c-التوزيع الحبيبي لنانوسليكا	19-4
104	طيف النانو سليكا بجهاز FTIR	20-4
105	اشكال الاغشية المحضرة	21-4
107	التحلل الحراري الوزني للاغشية	22-4
109	نفاذية الاغشية لبخار الماء	23-4
112	النسبة المئوية لفقدان وزن الاغشية عند الطمر	24-4
117	التحلل الحيوي لغشاء PLA و PLA+NSi	25-4
114	التغير في الثمار المغلفة لانواع مختلفة من الاغلفة خلال فترة الخزن	26-4
115	التغير في اطوال الثمار خلال فترة الخزن	27-4
116	التغير في قطر الثمار خلال فترة الخزن	28-4
117	النسبة المئوية للحموضة خلال فترة الخزن	29-4
118	التغير في قيم المواد الصلبة الذائبة خلال فترة الخزن	30-4
119	ثمار خلال البرحي المغلفة بانواع مختلفة من الاغلفة خلال فترة الخزن 28 يوم	13-4

Literature Review

2- مراجعة المصادر

Lactic acid bacteria

2- 1: بكتريا حامض اللاكتيك

تمتلك بكتريا حامض اللاكتيك (LAB) Lactic acid bacteria اهمية كبيرة لإنتشارها وإستعمالها في مجال التخمير فقد استمر العمل بها في إنتاج الالبان والاجبان المتخمرة وذلك بترك الحليب مدة من الزمن الى أن تتكاثر منتجة حموضة تستخدم في صناعة المنتجات المتخمرة ، استمرت طريقة العمل هذه الى أن تم أكتشافها لأول مرة عام 1780 من قبل العالم Scheel في اللبن وتمكن العالم جوزيف ليستر في 1873 من الحصول على اول مزرعة بكتيرية نقية من الحليب كوسط مغذٍ واقترح تسميتها *Bacterium lactis* ثم سميت بعد ذلك *Streptococcus lactis* (Al-Mariri, 2008).

بالرغم من التغير المستمر في تصنيف بكتريا حامض اللاكتيك إلا ان اغلبها تتفق مع ماذكر في Vandamme *et al.*, (1996) الى انها تعود الى الشعبة Firmicutes والرتبة Lactobacillales مقسمة الى 6 عوائل تضم 30 جنس واكثر من 300 نوع. اهم اجناسها *Lactobacillus* *Tetragenococcus* , *Pediococcus* , *leuconostoc* إضافة الى *Weissella* , *Carnobacterium*, *Enterococcus* , *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Vagococcus* (O'Bryan *et al.*, 2015).

يُعد الجنس *Lactobacillus* الأكثر عددا ضمن عائلة Lactobacillaceae، تتميز خلاياها بكونها ذات محتوى منخفض من القواعد النيتروجينية (ساييتوسين/كوانين) ، موجبة لصبغة كرام غير مكونة للسبورات، عصوية او كروية، مفردة او ثنائية او تشكل سلاطات قصيرة ، قلما تكون متحركة، متحملة للحموضة ، لاهوائية اختياريًا او آلفة للهواء القليل Microaerophilic، غير مسيلة للجلاتين، غير مختزلة

للنترات، تتميز بعدم انتاجها لانزيم الكاتليز والاندول، وغير منتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين وتنمو في مديات واسعة من درجات الحرارة والملوحة والأس الهيدروجيني ، تقتقد الى Cytochrome كما انها ذات متطلبات غذائية معقدة لعدم قدرتها على التخليق الحيوي إذ تحتاج إلى مدى واسع من المركبات العضوية واللاعضوية للنمو وتتمثل هذه المتطلبات بالفيتامينات والأحماض الامينية والبيورين والبايريبيدين (Willey et al., 2008).

يُعد اختيار الوسط الزراعي الملائم هو امر اساسي نظراً لكون LAB مجموعة بكتيرية واسعة وبالتالي فإن لها ظروف نمو متنوعة وان عملية العزل هي الخطوة الاولى لدراسة البكتريا. وتعد اوساط De-Man Rogosa Sharpe(MRS) و Lactobacillus selection (LBS) و M17 اكثر الاوساط المستخدمة ، كما توجد اوساط خاصة اختيارية مثل Selective media acidic tomato/grape و Fructose MRS لعزل انواع خاصة من LAB مثل *L.bulgaricus* إذ تتميز باحتوائها على مواد غنية بالمغذيات فقط وإنعدام المضادات الحيوية . كما يدعم الوسط بـ10ملغم/ لتر من كل من أزيد الصوديوم وسايكلوهكسامايد لمنع نمو البكتريا الهوائية والاعفان ولتمييز بكتريا حامض اللاكتيك عن البقية يضاف كربونات الكالسيوم بنسبة 5غم / لتر الى الوسط حيث تتكون هالة شفافة حول المستعمرات نتيجة لانتاج الحامض (Endo et al.,2019).

1-1-2 : مصادر العزل

تعد النباتات والجهاز الهضمي للإنسان والحيوان والاعذية المتخمرة مصادر لعزل بكتريا حامض اللاكتيك اضافة الى الحليب ومنتجات الالبان لكونها غنية بالمكونات الغذائية ففي دراسة قام بها العطار (2015) حصل على 65 عزلة من منتجات الالبان السورية 73% منها تابعة لاجناس البكتريا الكروية *Enterococcus*(22%) و *Lactococcus*(22.9%) و *Leuconostoc*(12.5%) و *Aerococcus*

(%8.3) و (*Streptococcus*) (%6.2) ووجد ان نسبة البكتريا العصوية *Lactobacillus* (%27) مع سيادة الانواع *L.plantarum* (%41.1) و *L.paracasei* (%23.5).

عُزلت *L.plantarum* و *Pediococcus acidilactici* من حليب الماعز في جنوب افريقيا (Makette et al.,2016). اضافة الى عزل *Lactobacillus* و *Enterococcus* و *Lactococcus* و *Leuconostoc* و *Weissella* و *Fructobacillus* من عينات الفواكه البرية والزهور في شمال الارجننتين (Ruiz Rodrigues et al.,2019).

تم عزل الانواع التابعة لبكتريا حامض اللاكتيك *L.plantarum* و *L.graminiso* و *L.rossiae* و *L.sanfranciscensis* من العجائن المتخمرة (Ripari et al.,2016). إضافة الى عزلها من عينات اسنان الاطفال وبعد تشخيصها كانت (24)عزلة *L.acidophilus* و (29)عزلة *L.rhamnosus* و (17) عزلة *L.casei* و (21) عزلة *L.plantarum* و (22)عزلة *L.fermentus* (Ahirwar et al.,2017). تمكن العديد من الباحثين من عزل البكتريا من اللحوم (Da costa et al., 2019) . والصوصج (Laslo et al., 2019; Borovic et al., 2019) وكذلك عزلها من الاسماك عند درجة حرارة 37 م° تحت ظروف لاهوائية (Alkalbani et al., 2019). وعزلت ايضاً من الجهاز الهضمي لافراخ الدجاج (Ruben, 2019). ومن براز الدواجن (Salehizadeh et al.,2020) .

عُزلت بكتريا حامض اللاكتيك المحبة للملوحة Halophilic lactic acid bacteria من المخلاتات (Kumar et al.,2017). والزيتون والتي تنمو بتوفر ملح كلوريد الصوديوم في الوسط متحملةً للتراكيز العالية من الملح (Yalcinkaya and Kilik, 2019).

2-1-2: تصنيف بكتريا حامض اللاكتيك

تم تطوير العديد من انظمة التصنيف منذ الوصف الاول للجنس *Lactobacillus* عام 1901 من قبل العالم Beijerinck بعدها قدم العالم Orla-jensen خلال دراسته التي استمرت من 1919-1943 المشار له في (Kandler and Weiss, 1986) اول تصنيف للجنس الى ثلاث مجاميع حسب درجة الحرارة المثلى للنمو ونوع تخمر الكربوهيدرات وهي:

المجموعة الاولى Thermobacterium تضم الانواع متجانسة التخمر اجباريا والقادرة على النمو في درجات الحرارة العالية Obligately homofermentative .

المجموعة الثانية Streptobacterium تضم الانواع غير متجانسة التخمر اختياريًا Facultatively heterofermentative التي عرفت سابقا ببكتريا Streptobacterium.

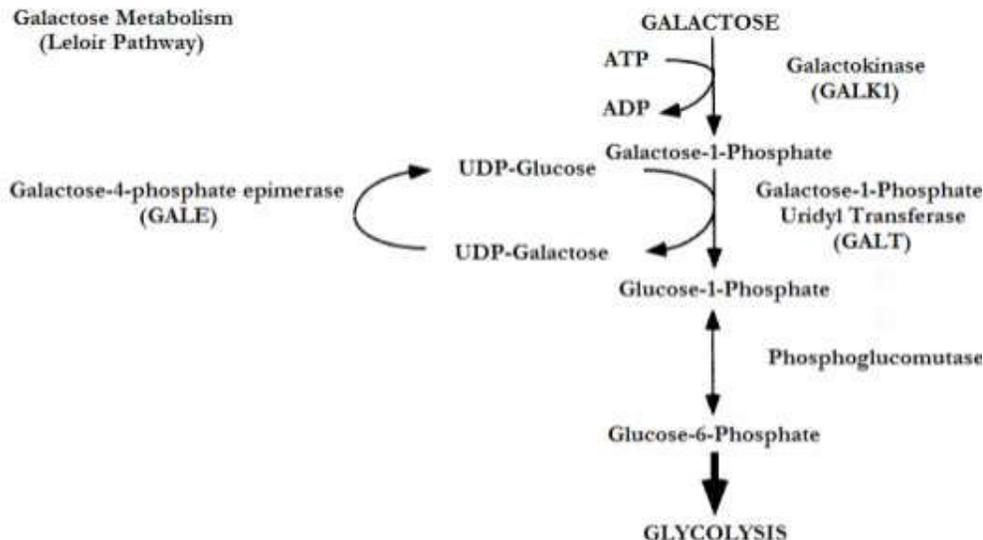
المجموعة الثالثة Betabacterium انواع بكتريا هذه المجموعة غير متجانسة التخمر إجبارياً Obligately heterofermentative (Duar et al., 2017).

تنقسم بكتريا حامض اللاكتيك الى مجموعتين ، المجموعة الاولى متجانسة التخمر homofermentative حيث تعمل على تخمير الكلوكوز عن طريق مسارامبدن- مايرهوف Embden-Meyerhof pathway ويكون الناتج الرئيسي حامض اللاكتيك عند نهاية عملية التخمر، مثال على هذه البكتريا *L. acidophilus* , *L. casei*, *S. thermophilus*, *L. helveticu* *L. bulgaricus* , *L. paracasei* , *Lactococcus lactis* , *L. salivarius* , *L. rhamnosus*, *Leuconostoc*,

في حين المجموعة الثانية تكون غير متجانسة التخمر الاجبارية Obligately hetero- fermentative لعدم احتواءها على انزيم Aldolase حيث تكون نسبة حامض اللاكتيك بحدود 50% اضافة الى انتاج CO₂ وحامض الخليك والايثانول وحامض الفورميك ، مثال على هذه البكتريا *L. plantarum* ,

(Hutkins,2019) *L.reuteri* , *L.fermentum*, *L.casi*, *L.brevis*,*L.saki* وكما موضح في

الشكل (1-2) .



شكل (1-2): مسارات تخليق حامض اللاكتيك (Hutkins,2019)

3-1-2: اهمية بكتريا حامض اللاكتيك

تعد اغلب انواع بكتريا حامض اللاكتيك غير ممرضة وآمنة صحيا Generally Regarded As Safe (GRAS) وتستعمل بشكل واسع في التطبيقات الصناعية ابتداءً من البادئات في معامل الألبان الى البكتريا العلاجية المستعملة في المكملات الغذائية وفي التحويل الحيوي Bioconversion agents اذ يجري حالياً تطوير أنظمة الانتاج في تكنولوجيا الحيوية الصناعية لتحفيز وتحويل المواد المتجددة الاولية الى منتجات كيميائية وصحية ذات قيمة عالية (Hatti-Kaul *et al.*, 2018)

أشارت الدراسات الى اهمية عدد من السلالات المناسبة والمختارة علمياً المضافة للمنتجات كبادئات لانتاج الحموضة وتطوير النكهة والطعم مع تحسين النسجة اضافة للدور المهم في اطالة العمر الخزني للأغذية ويأتي ذلك بإنتاجها العديد من النواتج الأيضية الطبيعية سواء انتاج الحوامض وبيروكسيد

الهيدروجين او البكتريوسينات المثبطة لنمو البكتريا الموجبة والسالبة المسببة للتلف. إضافة الى السيطرة الحيوية على البكتريا المرضية المنتقلة عبر الغذاء عن طريق الاحماض والبيبتيدات وثنائي الاسيتيل والحد من استخدام المضافات الكيماوية المفضلة من قبل المستهلك للحصول على منتجات غذائية طبيعية وصحية (Mokoena , 2017; Arena *et al.*, 2016).

في دراسة قام بها Adesulu-Dahunsi *et al.* (2018) عن الاغذية المتخمرة المصنوعة من الحبوب في نيجيريا للكشف عن اهمية السكريات المتعددة الخارجية (EPS) Exopolysaccharide المنتجة من البكتريا حيث تم عزل 63 عزلة *L.plantarum* و *Pediococcus pentosaceus* تميزت بانتاج EPS على وسط مدعم بالسكرز بكمية عالية. كما أظهرت قدرة على تحمل العصارات المعدية وظيف واسع كمضادات حيوية وأقترح امكانية استعمالها كمعززات حيوية وتكنولوجية في تسويق طعام وظيفي بفوائد صحية وتحسين سلامة الغذاء لتلبية متطلبات الأسواق الحديثة .

توصل عماش (2019) الى استخدام سلالات محلية من LAB تم عزلها من اللبن الرائب *L.plantarum* و *L.rhamnosus* و *L.acidophilus* و *L.crispatus* وأختبار فاعليتها كمعززات حيوية حيث أبدت كفاءة عالية في تحمل الأس الهيدروجيني الواطئ 2 والمستوى العالي من املاح الصفراء اضافة الى قدرتها على تثبيط البكتريا المرضية المسببة لمرض التيفويد *Salmonella typhimurium*.

أشار (2019) Gavrilova *et al.* الى عزل سلالات جديدة لبكتريا حامض اللاكتيك من علف البرسيم وظهرت نواتج البكتريا فاعليتها كمضاد بكتيري ضد البكتريا المرضية *Staphylococcus aureus*, بسبب الحموضة العالية التي تنتجها LAB والقضاء على الغشاء الحيوي Biofilm *Escherichia coli* المتكون من قبل الخلايا المرضية. بالاضافة الى استعمالها كمعزز حيوي Probiotic للحفاظ على الاغذية من التلوث والامراض المنقولة بالغذاء بسبب البكتريا.

وجد (2018) Ren et al. ان العزلات *L.plantarum* و *P. pentosaceus* و *L.paracasei* المعزولة من خمسة اصناف مختلفة من الاغذية المتخمرة المنزلية في شمال الصين قد ادت الى زيادة قطر تثبيط البكتريا المرضية *S.aureus* و *Salmonella* .

أظهرت السلالات *L.fermentum* و *L.plantarums* و *L.helviticus* و *L.casei* و *S.thermophilus* و *L.lactis subsp cremoris* و *L.lactis subsp.lactis* عند استعمالها في تصنيع منتجات اللبن الايراني المحلي kashks السائل والمجفف صفات جيدة مثل النكهة والطعم كما قللت من المحتوى الميكروبي بعد 28 يوم فترة خزن بالتبريد (Jafari et al.,2019).

توصل (2020) Huang et al. الى استعمال *L.plantarum* و *L.fermentum* لانتاج اللحم المتخمر بوصفها بدائل عن اضافة الاملاح والنترت. اذ اثبتت تأثيرها المضاد للبكتريا وإكساب اللحم لون زاهي ونكهة جيدة علاوة على صلاحية أطول مقارنة مع اللحم المعامل بالملح والنترت .

استعملت بكتريا حامض اللاكتيك المعزولة من الجهاز الهضمي لافراخ الدجاج في تحسين انتاج الدواجن والسيطرة على مسببات الامراض فيها اذ تتضمن فعالية مضادة للبكتريا سواء كان مصدرها حيواني او المنقولة بالغذاء ومن ثم انتقالها للانسان وذلك من خلال تجمعها وتحملها النمو في العصارة المعدية بأس هيدروجيني 2 واملاح الصفراء والتنافس مع البكتريا المرضية ومنعها من الالتصاق بالخلايا السطحية الطلائية للدجاج (Reuben et al., 2019).

أظهرت *L.plantarum* و *L.buchneri* قدرتها على تثبيط نمو الفطريات المنتجة للسموم الفطرية Mycotoxins والسيطرة على التسمم الفطري لتجنب تلف الغذاء والاعلاف اعتماداً على قدرة السلالات على انتاج حامض اللاكتيك، اذ استعمل الراشح الخالي من الخلايا (CFS) Cell-free supernatants

لتثبيط النمو الاولي للفطر *Penicillium nordium* بنسبة 20% وتثبيط انتاج السم الفطري Ochratoxin A(OTA) بنسبة 60% (Guimarães et al.,2018).

أشار Nazir et al. (2018) الى أهمية بكتريا حامض اللاكتيك كمعزز حيوي ودورها في التقليل من مخاطر الامراض المزمنة مثل امراض السرطان ،ارتفاع كولسترول الدم ، الحساسية وتحسين صحة الامعاء بالحفاظ على توازن الفلورا المعوية وإنتاج المواد المضادة للميكروبات الضارة.

ذكر Kargozari et al. (2015) إمكانية استخدام LAB المعزولة من الجبن الايراني التجاري كبادئ في صناعة الصوصج المتخمّر لما أبدته من صفات تكنولوجية أدت الى تحسين وسلامة الغذاء مثل النمو وسرعة انتاج حامض اللاكتيك في مستويات عالية من الملوحة تصل الى 10% وتضادها للبكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام *E.coli* و *S.aureus* و *Listeria monocytogenes* في أس هيدوجيني واطئ اثناء عملية التخمّر.

2-2: *Lactobacillus paraplantarum*

عُزلت لأول مرة في فرنسا عام 1996 من البيرة وبراز الانسان. تنتشر هذه البكتريا انتشاراً واسعاً في البيئات الطبيعية ولها دور كبير في الاغذية المتخمرة . أُعتبرت معزراً حيوياً لتأثيرها الايجابي على صحة الانسان (Herias et al.,1999).

تتميز خلايا هذا النوع بكونها غير متحركة عديمة الأسواط عصوية الشكل مفردة او ازواج واحيانا تشكل سلاسل قصيرة. تتميز بكونها غير متجانسة التخمّر إختيارياً، غير ممرضة يمكن عزلها من الانسان والحيوان والاغذية اضافة الى الاغذية التالفة ، ويُعد الوسط MRS و Rogosa agar افضل الاوساط لنموها، عند عزل البكتريا مختبرياً يجب التحضين على درجة 37 °م ولمدة 2-4 أيام تحت ظروف لاهوائية.

تكون المستعمرات بعد فترة الحضانة على وسط MRS صغيرة دائرية ملساء ذات لون حليبي وبقطر 0.5 ملم، لها القدرة على النمو بمديات حرارية 15-40 °م ، تنمو ببطأ على درجة حرارة 15 م وأس هيدروجيني 5-7 كما يمكن ان تتحمل النمو في تركيز ملحوظة 8% وغير منتجة الامونيا من الارجنين، ولا تمتلك انزيم الكاتاليز ، تحلل الاسكولين ، تنتج D, L حامض اللاكتيك ويقدر محتوى الكوانين والساييتوسين (C+G) في الحامض النووي DNA بنسبة (44-45) مول% ، يكون البيبتيدوجلايكان من نوع حامض Meso-diaminopimelic(DAP) وترتبط *L.paraplantarum* ارتباط وثيق مع *L.plantarum* في صفاتها لذا اعتمدت اساليب التشخيص الجيني باستعمال اختبار 16s rDNA للتفريق بين الانواع (Curk et al., 1996).

اثبت ان استعمال المنتجات الايضية لبكتريا *L.paraplantarum* فاعليتها كمضاد للفطريات اذ أثرت على تقليل انتاج السموم الفطرية وإطالة العمر الافتراضي لحبوب القمح وملاءمتها كمادة حافظة حيوية في المنتجات الغذائية والزراعية (Shehata et al., 2019).

2-3: حامض اللاكتيك

حامض اللاكتيك $CH_3CHOHCOOH$ (2- ألفا هيدروكسي حامض البروبيونيك) حامض عضوي له مجموعة ألفا-هيدروكسيل واحدة وذرة كاربون غير متناظرة Asymmetrical carbon atom ويعد حامض اللاكتيك أول حامض عضوي تم انتاجه على المستوى التجاري من الأحياء المجهرية ، اذ اكتشف من قبل الكيميائي السويدي C.W. Scheele وذلك عام 1780 واشتقت تسميته من التسمية اللاتينية للحليب . يتواجد حامض اللاكتيك في العديد من الأغذية وخصوصا منتجات الالبان بسبب التخمر الحاصل بوجود الاحياء المجهرية مثل اللبن الرائب والالبان المتخمرة (Komesu et al., 2017a) .

قُدِّر انتاج حامض اللاكتيك بـ 713 الف طن عام 2013 ويتوقع ان يصل الى 1,960.1 الف طن عام

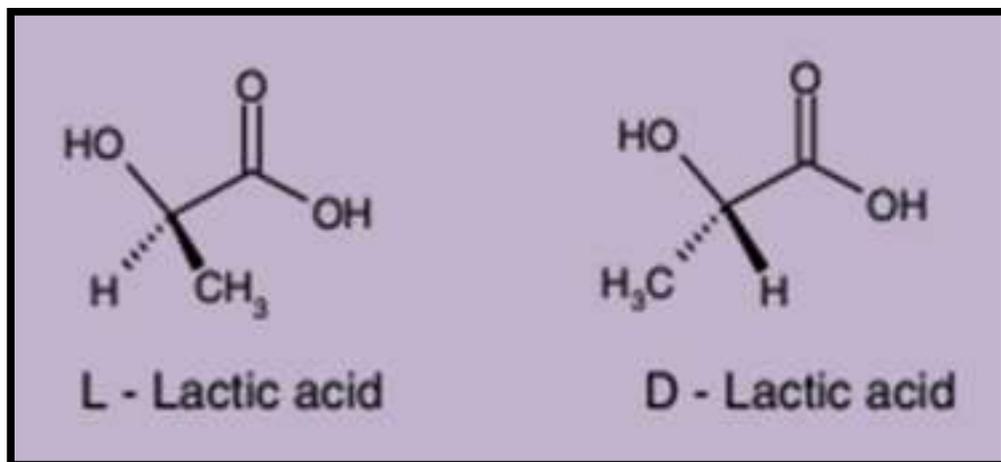
2020 ومن ناحية اخرى تزايد حجم الاستثمار في السوق العالمية ففي عام 2018 كان بنحو 2.64 مليار دولار امريكي ومن المتوقع تزايد معدل النمو السنوي الى 18.7% للفترة 2019-2025 (Komesu et al., 2017b).

تعتمد الصفات الفيزيائية للحامض على نوع النظير البصري وبصورة عامة يكون الحامض عديم الرائحة وقابل للإمتزاج بالماء والإيثر والكحول ولا يذوب في الكلوروفورم وقليل التطاير ضعيف التفكك ($K=1.38 \times 10^{-4}$) لا يتبلور من المحلول كالأحماض الأخرى واغلب املاحه قابلة للذوبان في الماء اضافة الى إمكانية بلمرته (Vaidya et al., 2013). يوضح الجدول (2-1) الخصائص العامة للحامض (Narayanan et al., 2004).

الجدول (2-1) الخصائص العامة لحامض اللاكتيك

اللون	عديم اللون الى الاصفر الفاتح
الصيغة الجزيئية	$C_3H_6O_3$
الحالة الفيزيائية	سائل
درجة الانصهار	17°م
درجة الغليان	122°م
الوزن النوعي	1.2 غم/سم ³
الاستقرارية	مستقر بالظروف الاعتيادية

يمتلك حامض اللاكتيك نظيران بصريان (+) L و (-) D، وعادةً ما يكون الحامض التجاري غير نشط بصرياً inactive optically كما في الشكل (2-2).



شكل(2- 2): النظيران البصريان لحمض اللاكتيك (Gupta and Kumar,2007)

2-3-1: استخدامات حامض اللاكتيك

تشير الدراسات الى اكتشاف تطبيقات جديدة سنوياً للحامض لما له دور أساسي في العديد من المجالات . ففي التطبيقات الصيدلانية يستعمل في المستحضرات الدوائية ومواد التجميل لكونه مادة مرطبة تساعد على تحسين الجلد وتجديد خلاياه ومعالجة مشاكل البشرة وحب الشباب يعمل على تقشير البشرة وله طيف واسع ضد الاحياء المجهرية. كما يستعمل في محاليل غسل الكلى وتحضير الاملاح والخيوط الجراحية والمراهم الجلدية ضد التآليل ومحاليل الحقن داخل الاوردة (VickRoy,1985) .

يستعمل في التطبيقات الصناعية اذ تبلغ نسبة استعماله في التصنيع الغذائي 75% إذ يُعد اول منتج أُدخل ضمن GRAS و FDA لمضافات الأغذية كعوامل استحلاب (استرات حامض اللاكتيك والاحماض الدهنية طويلة السلسلة) خصوصاً في منتجات المخازن، وتحسين النكهة للحلويات والمشروبات ومنتجات الالبان وعامل تمييز يساهم في التحكم بالأس الهيدروجيني للغذاء وإطالة العمر الخزني للأغذية .ويستعمل كمكمل غذائي للحيوانات يساعد على التوازن في الجهاز الهضمي للحيوان وحمائته من المسببات المرضية (Kumesu et al.,2017a).

يستعمل في مجال الصناعات الكيماوية في مواد التنظيف وصناعة المذيبات والمعدّات الفلزية ومنظمات الحموضة وفي صناعة المواد الاولية مثل صناعة الاستيلديهايد وحامض البروبيونيك واوكسيد البروبيلين وحامض الاكرليك وصناعة لاكتات الاثيل (Ryu et al.,2003).

يساهم حامض اللاكتيك في تثبيط نمو الاحياء المجهرية المرضية مثل *Listeria monocytogenes* و *E.coli* و *Clostridium botulinum* (Kasra and Mobarak,2015).

يُعد حامض اللاكتيك الوحدة الاساسية لانتاج متعدد اللاكتيك المتحلل حيوياً مما جعل له سوق واعدة في السنين المقبلة لامتثاله لقوانين البيئة الخضراء والمنتجات المتجددة والقابلة للتحلل Biodegradable polymer (Komesu et al., 2017a; Manandhar and Shah, 2020).

2-3-2: تحضير حامض اللاكتيك

يحضر الحامض اما عن طريق التخليق الكيماوي Chemical synthesis من تفاعل Acetaldehyde مع حامض Hydrocyanic acid لانتاج Lactonitrile الذي يتحلل مائياً الى حامض اللاكتيك .اذ يكون الناتج من التخليق الكيماوي خليط من النظيران البصريان الذي يتميز بصعوبة السيطرة على التفاعلات الفيزيائية والكيميائية له (Wasewar,2005).

أو يحضر عن طريق التخمر الميكروبي Microbial fermentation بفعل الاحياء المجهرية . اذ يقدر 90% من الانتاج السنوي العالمي لحامض اللاكتيك من التخمر اللاكتيكي وذلك بسبب الميزات الاضافية مثل اختيار سلالات ميكروبية معينة لانتاج نظير بصري نقى L أو D لحامض اللاكتيك في حين التخليق الصناعي يكون خليط للنظيرين ، استهلاك اقل للطاقة ، استخدام المواد الرخيصة المتجددة (Oliveira et al., 2016).

أستعملت عزلات مشتركة من بكتريا حامض اللاكتيك Co-culture في انتاج حامض اللاكتيك. إذ ازداد

انتاج الحامض مع نواتج عرضية قليلة (Zhang and Vadlani.,2014).

تم انتاج الحامض من البكتريا *Enterococcus faecium* و *Lactococcus lactis* sub sp.lactis

(Al-hilfi, 2014).

2-3-3: الاحياء المجهرية المنتجة لحامض اللاكتيك

تُعد بكتريا حامض اللاكتيك في مقدمة الاحياء المجهرية المنتجة للحامض تجارياً إضافة الى الخمائر والاعفان إذ يعد الحامض من منتجات الايض الاولية حيث يتحول جزء من الكربون المستخدم الى كتلة حيوية Biomass باختلاف مصدره من قبل الكائن المجهرى ، والقسم المتبقي يتحول الى حوامض ونواتج اخرى . بشكل عام تعمل البكتريا على تخمير السكريات الخماسية والسداسية وتحويلها الى حامض اللاكتيك اما عن طريق التخمير المتجانس او التخمير غير متجانس وتكون الانزيمات Phosphoketolase و transaldolase و Xylose isomerase و L-and D-Lactate dehydrogenase هي الانزيمات الرئيسية التي تؤثر على طرق انتاج حامض اللاكتيك (Juou and Wu,2016).

استعملت سلالات من الجنس *Bacillus* في انتاج حامض من نوع L - لاكتيك النقي وظهرت زيادة في النمو وقابليتها على استخدام مصادر مختلفة من المصدر الكربوني وتحمل درجات حرارة عالية اضافة الى احتياجها الى متطلبات غذائية بسيطة (Poudel et al.,2016).

كما أنتج الحامض من الخمائر *Saccharomyces cerevisiae* المعدلة وراثيا لزيادة فعالية انزيم L- dehydrogenase (L-ldh) lactate (Turner et al.,2015).

واستعملت الفطريات في انتاج الحامض مثل الفطر Yuwa- *Rhizopus microspores* LTH23 (Yuwa and Chookietwatana, 2018).

تميز الفطر *Rhizopus oryzae* NCIM 1009 بانتاجه لحامض اللاكتيك بكمية كبيرة وذلك لإملاكه

إنزيم L- Lactate dehydrogenase (Manneputa *et al.*, 2015).

استعملت الطحالب في إنتاج حامض اللاكتيك لتقليل تكلفة المادة الخام لقابليتها على النمو في بيئات رخيصة وتقليل وقت الانتاج (Nguyen *et al.*, 2012) .

اعتمدت الابحاث مؤخراً على تقنية تخمير المزارع المشتركة Co-culture باستخدام نوعين أو اكثر من الاحياء المجهرية لزيادة كفاءة انتاج حامض اللاكتيك .اذ يؤدي الى استهلاك اكثر للسكر ومن ثم زيادة انتاج الحامض والتقليل من المنتجات الثانوية للبكتريا غير متجانسة التخمر التي تنتج مواد ايض ثانوية مثل حامض الخليك والايثانول مما يؤدي الى قلة الانتاجية وزيادة التكلفة لعمليات الفصل والتنقية (Zhang *et al.*, 2019).

2-3-4: مصادر الكربون

إزداد الاهتمام بالإنتاج الميكروبي للحامض النقي في السنوات الاخيرة لكثرة الطلب على منتجات صديقة للبيئة، إذ تعددت مصادر التخليق الحيوي لحامض اللاكتيك من المواد السليلوزية والنشوية والتي تركز بصورة أساسية على التحلل المائي للمصادر المستديمة واختيار سلالات ميكروبية فعالة لعملية التخمير وتنقية المنتج إضافة الى البحث عن المواد الاساسية الخام المتوفرة بكثرة ورخيصة الثمن فضلاً عن القدرة على الانتاج السريع من دون نواتج عرضية ومحتوى اقل من الملوثات لغرض الانتاج التجاري للحامض (Ghaffar *et al.*, 2014).

أستعمل الايثانول الناتج من مخلفات مصفاة انتاج الايثانول الحيوي في تايلند بوصفها مصدراً وحيداً للكربون (50-100%) من الايثانول و(0-5غم/لتر) مستخلص الخميرة وبأس هيدروجيني (4-9) وأظهرت النتائج ان اعلى انتاج للحامض (94.68±0.006 ملغم/لتر) باستعمال 50% ايثانول و2.5 غم/لتر مستخلص الخميرة وبأس هيدروجيني 6.5 (Choonut *et al.*, 2016).

تستعمل السكريات سداسية الكربون مثل السليلوز والهيميسليلوز خماسية الكربون لزيادة انتاج حامض اللاكتيك مع نواتج عرضية قليلة (Oliveira et al.,2016).

يُعد المولاس الذي يمثل الناتج العرضي من معامل صناعة السكر سواء بالبنجر السكري Sugar beet او قصب السكر Cane molass من اهم المواد المستخدمة مصدراً كربونياً في عملية التخمير لانتاج الحامض اذ تتراوح نسبة الكربوهيدرات الكلي 45-65%، كما يتم تدعيم وسط التخمير المولاس بمستخلص الخميرة وكربونات الكالسيوم من اجل زيادة كفاءة انتاج الحامض (Vidra et al.,2017).

استعمل الرز البني كوسط تخمير لانتاج النظير البصري D لحامض اللاكتيك النقي وباستخدام سلالات بكتيرية معدلة وراثياً (Okano et al.,2016).

أختبرت اوساط اخرى كبديل عن MRS باستعمال (الصويا، مستخلص الخميرة، الكلوكوز) للحصول على اعلى نمو للبكتريا وتبين أن مستخلص الخميرة كان الأعلى قوة وتأثيراً على نمو البكتريا يليه الكلوكوز (Yoo et al.,2018).

2-3-5: الشرش Whey

الشرش هو السائل المتبقي بعد تخثر كازين الحليب أثناء عملية تصنيع الجبن التقليدي يحتوي على كميات كبيرة من اللاكتوز الذي يتحلل مائياً الى كلوكوز وكاللاكتوز ويصل الانتاج العالمي 145 مليون طن سنوياً (Siso,1999).

يستعمل الشرش وسط لنمو لبكتريا حامض اللاكتيك وذلك لاحتوائه على المواد الغذائية الضرورية مثل الكربوهيدرات والفيتامينات والبيبتيدات والاحماض الأمينية اضافة الى الاملاح المعدنية.

تم اعتماده خلال العقود الاخيرة في التكنولوجيا بعد ان كان منتجاً ثانوياً يطرح مع النفايات عند صناعة الاجبان وتصدرت بروتينات الشرش التي تمثل 20% من بروتينات الحليب وما تحتويه من معادن في قائمة

المواد الغذائية كما استعمل كمادة خام لصناعة اللاكتوز ، إضافة الى استعماله كمنتج مرغوب بسبب الخصائص الوظيفية التي يعطيها للأطعمة (Ryu *et al.*,2003).

يُعد الشرش المادة الأساس في تخمرات حامض اللاكتيك ويفضل استخدامه لكونه رخيص الثمن ومتوفر بكميات كبيرة كنتاج عرضي من مصانع الاجبان ويمكن تجفيفه واستخدامه بشكل مسحوق (Božanić *et al.*,2014).

يتم تدعيم الشرش بمصادر مغذية اضافية لزيادة انتاج الحامض مثل مستخلص الخميرة والكازين وفول الصويا ومستخلص الذرة اضافة الى الاملاح المعدنية $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ و $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (Ibrahim *et al.*, 2017).

2-4: متعدد حامض اللاكتيك (PLA) Poly lactic acid

نظراً للانتشار الواسع للمتعددات لما تتمتع به من خواص صناعية واقتصادية مميزة اذ تعد العقود الاخيرة ثورة في استعمال المتعددات بامتياز ولكن المشكلة الاخطر التي واجهت البشرية هي عدم قابلية معظم المتعددات على التحلل البيولوجي ماجعلها تهديداً كبيراً للسلامة البيئية على الارض. وانطلاقاً من هذه المشكلة بدأ البحث عن متعددات صديقة للبيئة يمكن تحللها بايولوجياً ومن هذه المتعددات والاكثرها شيوعاً هو متعدد حامض اللاكتيك ، اذ يتحلل حيويّاً الى CO_2 وماء ، نسبة CO_2 لاتزداد في الطبيعة لانها تستهلك من قبل النبات ويتمتع بالعديد من المزايا مقارنة بالمتعددات الأخرى حيث يستهلك كميات من ثاني أكسيد الكربون أثناء الإنتاج وقابل لإعادة التدوير (Zhou *et al.*, 2016).

تم تحضير متعدد اللاكتيك لأول مرة عام 1845 من قبل العالم Theophile-Jules من خلال تكثيف حامض اللاكتيك حيث اقتصر استعماله خلال العقود الماضية للاستعمالات الطبية ونتاج PLA لأول مرة

ينتج حامض اللاكتيك من نشاء الذرة أو مولاس سكر القصب باستخدام التخمر البكتيري وبما أن حامض اللاكتيك المتشكل لا يمكن أن يتبلر مباشرة لأن كل تفاعل بلمرة يولد جزيء من الماء، حيث أن وجود الماء يعيق تشكل سلسلة البوليمر بحيث لا يتشكل إلا بعض الأوزان الجزيئية المنخفضة، فبدلاً عن ذلك يتم الحصول على حامض اللاكتيك (Oligomerized) ثم تشكيل مركب حلقي من اللاكتايد (dimerized). وعلى الرغم من أن تشكيل اللاكتايد (dimerization) يولد الماء أيضاً، إلا أن الماء الناتج يمكن فصله قبل البلمرة (Thomas, 2010) .

أشار (Lasprilla *et al.* (2012) أن PLA يعد من المتعددات القلائل الذي يمتلك تركيبة كيميائية فراغية Stereochemical structure يمكن تعديلها عن طريق السيطرة خلال عملية البلمرة على مزيج ايزومرات L و D لانتاج متعدد ذو وزن جزيئي عالي متبلور او غير متبلور.

البوليمرات المتجانسة لحامض اللاكتيك لها درجة انتقال زجاجي 55 م ودرجة انصهار 175م أما بلمرة المزيج غير متجانس من L,D لاكتايد ينتج بنية غير متبلورة تقود الى انتاج متعدد درجة معاملته الحرارية اقل مقارنة بالمتعدد المتجانس وتفضل هذه الخاصية صناعياً لأنها تحافظ على وزن الجزيئي العالي للمتعدد وعدم تفككه بسبب الحرارة (Hu *et al.*,2016).

2-1-4-1: طرائق بلمرة حامض اللاكتيك

1-البلمرة التكثيفية Polycondensation

تتم أما مباشرةً بلمرة الحامض وتكوين البوليمر عن طريق ربط جزيئات الوحدات الاساسية (المونومرات) مع بعضها عن طريق ربط مجموعات الكربوكسيل والهيدروكسيل باستخدام الحرارة وعامل مساعد حامضي ترافقها تكوين نواتج عرضية مثل الماء والكحول يتم إزالتها بعملية التقطير الايزوتروبي اثناء عملية البلمرة ،

Enzymatic polymerization او تجري عملية البلمرة الحيوية للحامض بإستخدام بعض الانزيمات (Gupta and kumar, 2007).

2-تفاعل فتح حلقة اللاكتيد Ring opening polymerization

تجري من خلال تحويل حامض اللاكتايد أولاً الى اللاكتايد الحلقي ومن ثم فتح حلقة اللاكتايد بإستخدام عوامل مساعدة عضوية معدنية وان الاكثر شيوعاً مادة اوكتانوات الكوبلت او القصدير لتكوين البوليمر (Fukushima and Kimura,2008).

2-4-2: الخواص الفيزيائية لمتعدد حامض اللاكتيك PLA Physical properties of PLA

يُعد متعدد حامض اللاكتيك بوليمر متلدن حرارياً وذو خصائص ميكانيكية متوسطة ويمكن ان يكون نصف بلوري او اقل او غير بلوري حسب درجة البلمرة ، وتتأثر درجة حرارة الانتقال الزجاجي ودرجة حرارة التبلور ودرجة الانصهار بدرجة البلمرة ونسبة التبلور والمورفولوجيا وكذلك وجود الشوائب. أن الخصائص النهائية للبوليمر تحددها مجموعة من العوامل منها درجة التبلور ، نسبة الايزومر الموجودة ضمن السلسلة البوليمرية بالإضافة الى الوزن الجزيئي للبوليمر. حيث تعد درجة الانصهار البلورية (T_m) ونسبة التبلور للبولي لاكتايد المتبلور من العوامل الرئيسية التي تؤثر على كثير من الخصائص مثل الصلادة Hardness ومعامل المرونة Modulus وقوة الشد Tensile strength في حين أن هناك بعض الخصائص الفيزيائية مثل الكثافة ، السعة الحرارية Heat capacity والخصائص الريولوجية Rheological properties تعتمد على درجة حرارة الانتقال الزجاجي (T_G) (Henton *et al.*, 2005; Auras *et al.*, 2011) .

بصورة عامة يذوب البوليمر في كثير من المذيبات العضوية مثل الدايميثان، الكلوروفورم، اسيتونايترايل،

ثنائي كلوروميثان، التيلوين، خلات الاثيل في حين لا يذوب في الماء والكحولات إضافة الى تأثر الاذابة

بدرجة التبلور للبوليمر. وتعد خاصية النفاذية Permeability من الخواص المهمة للبوليمر بسبب اعتماد استعماله لتغليف الاغذية على تلك الخاصية. وتتغير هذه الخاصية تبعا لنسبة D:L في البوليمر ونوع البوليمر. أما الخواص الميكانيكية لمتعدد اللاكتيك فهي تقريبا تقترب من خواص متعدد الستايرين و متعدد اثيلين الترفتالين PET لكن بسبب انخفاض درجة حرارة الانتقال الزجاجي التي تقع عادةً ما بين 50-60 م° فانه توجد بحوث كثيرة لتحضير خلائط بوليمرية من PLA وبعض البوليمرات المنسجمة معه لرفع درجة الانتقال الزجاجي له . والجدول رقم (2-2) يوضح مقارنة بين الخصائص الفيزيائية لانواع متعدد اللاكتيك (D,L) (Nampoothiri *et al.*, 2010; Lasprilla *et al.*, 2012).

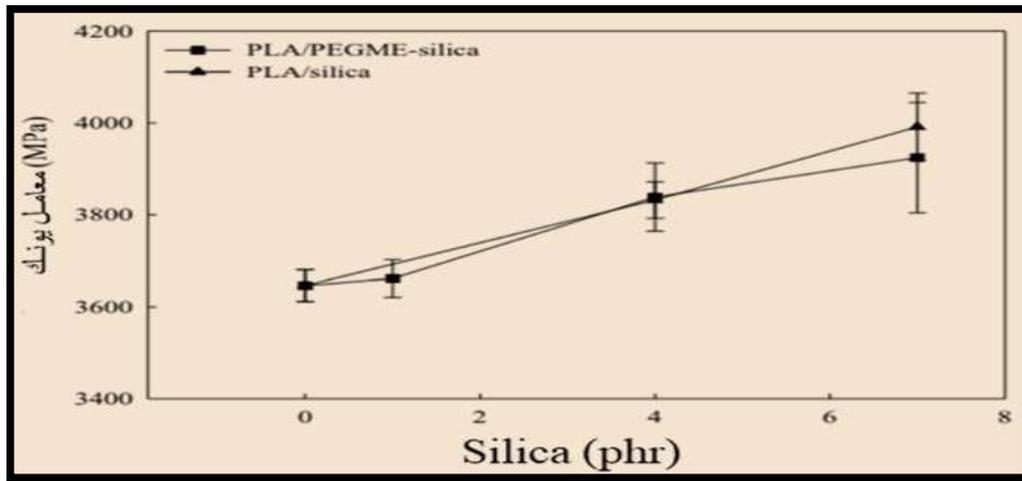
جدول (2-2) الخصائص الفيزيائية لانواع متعدد حامض اللاكتيك (D,L).

انواع متعدد اللاكتيك	درجة الانتقال الزجاجي Tg (م°)	درجة الانصهار Tm (م°)	الكثافة (غم/سم ³)	الذوبانية
PLLA	80-55	178-173	1.290	كلوروفورم, دايسولان, دايسولين, فيوران
PDLLA	53-43	170-120	1.25	مذيبات PLLA, اسيتون, لاكتات الاثيل
PDLA	50-40	150-120	1.248	لاكتات الاثيل, خلات الاثيل, N,N-ازايلين ثنائي مثيل فورماميد

دُرست الخواص الميكانيكية للبوليمر ولوحظ ان معامل يونك له علاقة طردية مع قوة الشد اذ يزداد باستخدام جسيمات السليكا النانوية مع المتعددات وهذا ما اشار اليه (Lai and Hesieh, 2016) حيث وجد ان قيمة معامل يونك تزداد بزيادة نسب جسيمات السليكا النانوية المضافة الى متعدد حامض اللاكتيك. اذ ارتفعت قيمة المعامل من 3650 ميكا باسكال للمتعدد لوحده الى 3990 ميكا باسكال للمتعدد المدعم بنسبة

7% سليكا. في حين لاحظ ومن خلال النتائج ان اضافة بعض المدنات لخليط متعدد حامض اللاكتيك مع السليكا يخفض من قيمة معامل يونك بسبب الزيادة في مرونة السلاسل البوليمرية.

كما تضاف مواد بوليمرية اخرى لتحسين خاصية الاستطالة حيث أستعمل Sprenger(2020) احد انواع الإيبوكسي بإضافته بنسب معينة الى PLA ليرفع فيه الاستطالة الى قيمة 114% عندما تكون نسبته في الخليط 5% . اذ تعمل هذه المادة على تقليل من القوة الجزيئية بين سلاسل PLA وزيادة في حرية حركة سلاسل PLA وبالتالي تزداد الاستطالة. وكذلك هناك نقطة ضعف اخرى بالنسبة PLA وهي قوة الصدمة Impact strength التي تكون قليلة 1-0.25 كيلوجول /م² مقارنةً ببوليمرات متعدد الاثيلين ومتعدد بروبالين و PET. لذلك يتم تحسين قوة الصدمة اما بإضافة بعض المواد المقوية او بإجراء عملية المعاملة الحرارية Annealing بدرجات حرارة اقل من 100°م.



شكل (2-4): تأثير النانو سليكا على معامل يونك (Lai and Hesieh(2016)

3-4-2: التحاليل الحرارية Thermal analysis

تُعرف التحاليل الحرارية على انها مجموعة من الطرق التي يتم بواسطتها قياس بعض التغيرات الفيزيائية

والكيميائية وبشكل مستمر كدالة لدرجة الحرارة اثناء تعريض البوليمر لتغير مسيطر عليه من درجة الحرارة ومن خلال تلك التحاليل يمكن معرفة تحمل المتعدد لدرجات الحرارة التي يتعرض لها اثناء التطبيقات الصناعية (Gedde, 1999).

كما يمكن بواسطتها حساب كثير من الدوال الحرارية مثل درجة الانصهار البلورية (Tm)، درجة الانتقال الزجاجي (Tg) ، ودرجة حرارة التفكك وطاقة التشييط ، اضافة الى بعض التغيرات الكيميائية التي تحدث مثل تفاعلات التقسية او التشابك. ومن اهم التقنيات المستخدمة في التحاليل الحرارية للبوليمرات هي:

1- التحليل الحراري الوزني (TGA) Thermogravemetric Analysis

2- المسح التفاضلي المسعري (DSC) Differential Scanning Calarometry

3- التحليل الحراري الميكانيكي (TMA) Thermal Mechanical Analysis

تعتمد هذه الطرق على المتغيرات الكيميائية والفيزيائية التي تطرأ على المادة ويصاحب هذه التغيرات تغير في الكتلة او انبعاث او امتصاص طاقة او تغير في الحجم والابعاد (Hatakeyama and Quinn, 1994).

2-4-4: تطبيقات متعدد اللاكتيك

استعمل متعدد اللاكتيك طبيياً داخل الجسم الحي *In vivo* لأول مرة من قبل Kulkarni في عام 1966 عندما قام بحقن مسحوق من PLA في داخل جسم الفئران واثبت عدم وجود اي تاثير سام بعد تقادم البوليمر، واستعمل (1971) Hunsuck البوليمر كخيوط لتثبيت العظام وفي تقطيب الجروح. ويفضل في الوقت الحاضر استخدام العديد من القطع المصنعة من البوليمر كمواد تدخل في جسم الانسان بدلاً من

المثبتات المعدنية لعدم حاجتها لاجراء عمليات جراحية ، مثل الشبكات الموسعة للشرايين والاورار وبراعي العظام المتضررة. يستهلك 70% من الحامض في التغليف والمواد الصيدلانية والمستهلكات الطبية وخاصةً استخدامه في نظام نقل الادوية Drug delivary system ويبين الجدول (2-3) اهم خواص متعدد اللاكتيك في التطبيقات المختلفة (Panseri et al., 2018).

جدول (2-3): خواص متعدد اللاكتيك في التطبيقات المختلفة

التغليف	النسجية	الزراعية	الطبية	الالكترونية
خفيف الوزن	محببة للماء	قابل للتفكك	قابل للامتصاص	الشفافية
المتانة	الكثافة واطنة	أعطية قابلة للتحلل	تحمل ميكانيك عالي	خفيف الوزن
الاداء الميكانيكي	قوة انحناء وشدة عاليين	قليل السمية	التحلل البيولوجي	المرونة
اللدونة والصلبة			التوافق الحيوي	يصنع على شكل اعضية
مقاومة الحرارة				له خواص كهربائية يمكن ان توظف في تصنيع الاجهزة الالكترونية

2-5: التغليف Packaging

هي المرحلة النهائية بعد تعبئة المنتجات اذ تمثل احد اهم الاركان الاساسية في نجاح صناعة الأغذية اذ تعمل على حفظ الغذاء وسهولة نقله وتداوله بشكل صحي لحين وصولها الى المستهلك ويتحدد نجاح المنتجات الغذائية بجودة وكفاءة مواد التعبئة والتغليف وان اختيار مادة التغليف هي الخطوة الاولى والمهمة في الحفاظ على المنتجات الغذائية من الاضرار الكيميائية والفيزيائية والاحيائية بعد انتاجها وطيلة فترة الخزن اضافة الى تأثيرها على المستهلكين لشراء المنتجات (Sand,2018).

اقتصرت استعمال مواد بسيطة في تغليف المنتجات الغذائية كالمعادن مثل العلب والصناديق المعدنية أو استعمال رقائق الألمنيوم والقصدير أو مواد من الزجاج كما في العبوات والقناني الزجاجية إضافة إلى الكرتون والورق والخشب والبلاستيك.

قسمت المغلفات إلى أنواع اعتماداً على التماس مع المواد الغذائية هي:

1- التغليف الأساسي أو الأولي Primary package تكون مواد التغليف بتماس مباشر مع المادة الغذائية وعادةً ماتحمل المنتج وتكون بشكل رقائق أو اغلفة.

2- التغليف الثانوي Secondary package تكون المغلفات خارج التغليف الأساسي وإيضاً يستخدم لتجميع حزم المغلفات الأولية معاً مثل استخدام العلب الكرتونية لتغليف رقائق الذرة Cornflaxe.

3- المغلفات الثلاثية Tertiary package تحتوي على المغلفات الثانوية وتسهل التداول مثل الصناديق الخشبية (Majid et al.,2018).

استعملت الاغلفة البلاستيكية منذ القرن التاسع عشر لتغليف المواد الغذائية وتتضمن اغلفة متعدد الاثيلين ومتعدد البروبيلين ومتعدد فنيل كلورايد. ويعد متعدد الاثيلين Polyethylene(PE) من ابسط انواع البلاستيك المستعملة على نطاق واسع في تغليف المنتجات الغذائية وينتج من بلمرة الاثيلين وهناك انواع من هذا المتعدد، متعدد الاثيلين منخفض الكثافة Low density polyethylene(LDPE) الذي يكون شفاف نسبياً ومرن وسهل الاغلاق يستعمل لحفظ الاطعمة المجمدة. ومتعدد الاثيلين عالي الكثافة High density polyethylene(HDPE) الذي يتميز بمقاومته للمواد الكيميائية وصلابته وتكون نقطة الانصهار اعلى من متعدد الاثيلين المنخفض الكثافة يستعمل لصنع الاكياس وزجاج العصير والحليب (Sarkar and Kuna,2020).

تمثل المواد البتروكيميائية المصدر الرئيسي لانتاج البلاستيك المستخدم لتغليف المنتجات الغذائية . تتميز هذه المواد بالتركيب الكيميائي المعقد ومقاومة للظروف البيئية كما يكون القسم الاكبر غير متحللة طبيعياً وغير قابلة للتدوير، وتحتل المخلفات البلاستيكية نسبة عالية منها كما أن لها العديد من المساوئ لكونها غير متجددة وتترك اثر كبير على البيئة اضافة الى عدم استقرار اسعارها و انتاج نسبة عالية من CO₂ خلال عملية الانتاج المسبب الرئيسي للاحتباس الحراري . علاوةً على ذلك سمية المواد الاساسية للمتعدد بعد عملية البلمرة ودرجة نفاذيته لغاز الاوكسجين والمركبات الطيارة وبخار الماء وامكانية انتقاله الى المواد القابلة للاكل اثناء التغليف في فترة الخزن (Ingrao et al., 2015).

يُعد نخيل التمر البرحي *Phoenix dactylifera L.* من اقدم النباتات في العالم وتحظى ثمار التمر على اقبال واسع وذلك للقيمة الغذائية والوظيفية وتعد عملية تغليف التمور ركناً مهماً للحفاظ عليها من التلف وضمان جودتها اضافة الى ان تصميم شكل العبوات تعزز من المبيعات واقبال المستهلكين عليها اذ توفر عملية التعبئة والتغليف عدة انواع من العلب وذلك تماشياً مع شكل المنتج اذ تعبأ بشكلها الطازج او مجففة. تتم عملية الخزن على درجة حرارة اقل من 10م لغاية الصفر وبرطوبة نسبية 65-75% مع استعمال اكياس داخل الصناديق الخشبية لضمان تقليل الفقد بالمياه بسبب ان درجة الحرارة وسرعة التبريد تؤثر على الظواهر الفسيولوجية مثل تبلور السكر الناتجة عن حرية انتقال الماء داخل او خارج الثمرة بسبب تحطم جدران الخلايا وتهشم جلد الثمرة (Glasner et al. , 1999).

2-5-1: الاغلفة الحيوية Biological packaging

ظهر مفهوم التعبئة الخضراء خلال العقود الاربعة الاخيرة وتطوير العديد من التقنيات والبرامج لتحسين انظمة التغليف والتعبئة وذلك لتزايد المخاوف من قبل المزارعين واصحاب مصانع التغليف والمستهلكين والتركيز على الجوانب البيئية والحفاظ عليها من التلوث (Chonhenchob et al., 2013).

تتطلع المراكز البحثية وشركات البلاستيك لان تكون المتعددات الطبيعية والمتعددات الحيوية والمتعددات المصنعة ذات المصادر الطبيعية المتجددة مهيمنة على الصناعات البلاستيكية في مجال التعبئة والتغليف لما تحمله من مزايا عديدة منها كما أشار لها; (Collazo-Bigliardi *et al.*,2020) (Singh *et al.*,2019)

1- المصادر المتجددة Sustainable sources للمونمرات Monemer (الوحدات الاساسية او المواد الخام التي يتكون منها البوليمر)، ويمكن الحصول عليها من تخمر السكريات والنشويات على عكس المصادر الاحفورية لمونمرات المواد البلاستيكية الاخرى غير المتجددة (الفحم الحجري، المشتقات النفطية، الغاز الطبيعي) التي يتطلب الحصول عليها طاقة ذات تكاليف مرتفعة اضافة الى كونها مسبب اضافي للتلوث البيئي بسبب تصريف الكميات الهائلة من النفايات والغازات وخاصة النفايات البلاستيكية التي تشكل نسبة عالية منها .كما انها تبقى لفترة طويلة في البيئة بسبب عدم قابليتها للتحلل بالإضافة إلى أن بعض المونمر السام المستخدم في إنتاج البلاستيك قد ينتقل إلى المواد الصالحة للأكل عند استخدامها لتغليف المواد الغذائية .

2- قابلية التحلل الحيوي Biodegradability عند الانتهاء من استخدام البلاستيك. على عكس انواع البلاستيك ذات المصدر الاحفوري ، وتعتبر القدرة على التفكك بفعل الانزيمات في الطبيعة حلاً لأهم مشاكل تراكم مختلف انواع البلاستيك في الطبيعة .

3- التوافقية الحيوية Biocompatibility ضمن الاوساط الحيوية *In vivo* ما يسهل من استخدامها في الاجسام الحية .هذه السمات شجعت الشركات على تصنيع البوليمرات ذات المصادر الطبيعية وخصوصاً متعدد حامض اللاكتيك لجعله متوفر في السوق المحلية.

تصنف المتعددات الحيوية اعتماداً على مصدرها الى متعددات يتم استخلاصها مباشرة من الكتلة الحيوية (السكريات المتعددة والبروتينات والببتيدات والنيوكليتيديات المتعددة) . ومتعددات تنتج من

التخليق بالطرق الكيميائية التقليدية باستعمال مواد خام متجددة ذات اصل بايولوجي او خليط من اصل بايولوجي ومصادر احفورية (متعدد حامض اللاكتيك ومتعدد الاستر). كذلك يمكن ان تنتج المتعددات من الاحياء المجهرية او البكتريا المحورة جينياً (متعدد هيدروكسي بيوترات ، السليلوز البكتيري، الزانثان والبولان) (Sorrentino *et al.*,2007).

تتضمن المتعددات مجموعة كبيرة مثل Polyhydroxy butyrate(PHB), Polylactide(PLA), Polyethylene glycol(PEG), Polysacchrides, Polyglycolide (PGA) التي تكون قابلة للتحلل الحيوي وصديقة للبيئة (De Moura *et al.*,2015).

2-5-1-1: خلاط متعدد حامض اللاكتيك

لغرض تطوير جودة متعدد اللاكتيك تضاف وحدات اساسية Monomer او متعددات Polymers تؤدي الى تحسين الخصائص الميكانيكية والحرارية وتقليل تكلفة الانتاج. اذ وجد ان استعمال خليط النشا و متعدد اللاكتيك ادى الى زيادة معامل المرونة مقارنة مع استعمال اغشية النشا فقط. وتناقصت قيم النفاذية لبخار الماء مع زيادة نسبة الخلاط المضافة الى المتعدد حيث انخفضت بنسبة 20-50%. كما ان نفاذية الاغشية للاوكسجين قد انخفضت التي تلعب دوراً هاماً في تلف الاغذية المحفوظة (Collazo *et al.*,2019).

ذكر (Leu *et al.*,2019) ان اضافة متعددات ملدنة مثل متعدد اثيلين جلايكول (PEG) لغرض تحسين خصائص الاغلفة من ناحية نفاذية الاوكسجين وبخار الماء و متانة الشد والاستطالة اضافة الى قابلية التحلل الحيوي بعد دفنها وتحللها الى مواد صديقة للبيئة وامكانية استخدامها في تغليف الاغذية .

أدى استعمال الملدنات مثل متعدد بروبيلين جلايكول والكليسيرول كخلاط مع متعدد اللاكتيك الى زيادة المرونة وذلك لدورها في زيادة حركة السلاسل البوليمر وسهولة تشكيله اضافة الى مقاومة درجات الحرارة

المنخفضة وتقليل لزوجة المواد (Courgneau *et al.*, 2011).

كما وجد ان اضافة الزيوت مثل زيت جوز الهند الى المتعدد اسهمت في تحسين الخواص الميكانيكية وزيادة مقاومة الشد والمرونة وزيادة شفافية الغشاء كما قلت النفاذية لبخار الماء بسبب زيادة الاواصر الكارهة للماء كما تتصف الزيوت بإنخفاض تكلفتها وعدم سميتها ساعدت على استخدامها في تغليف الاغذية (Bhasney *et al.*, 2017).

2-1-5-2: طرائق تحضير المواد النانوية Preparation of Nanomaterials

تُحضّر المواد النانوية اما بطريقة فيزيائية من الاعلى الى الاسفل (Top- down) حيث يتم تحويل ابعاد جزيئات المواد الكبيرة الى ابعاد أصغر وصولا الى المقياس النانوي (Gregorczyk and Knez, 2016) مثل الاقتلاع بالليزر Laser ablation باستعمال اشعة ليزر بتسخين المواد التي يراد تحضيرها. او تستعمل طريقة الطحن Ball milling اذ يتم طحن المادة وتحويلها الى مسحوق بحجم نانوي بواسطة كرة ذات طاقة عالية (Hu *et al.*, 2009).

تُنتج المواد بحجم النانو باستخدام طرق كيميائية من الاسفل للاعلى (Bottom-up) مثل استعمال المايكرويف Microwave irradiation اذ يحدث تفاعل كيميائي بمساعدة اشعة المايكرويف بحرارة عالية في زمن قصير. تتميز هذه الطريقة بكونها غير ملوثة للبيئة Green and clean سريعة واقتصادية غير مكلفة (Zhu *et al.*, 2009).

استعملت الموجات فوق الصوتية Ultrasonic method او الطرق الحرارية المائية Hydrothermal method إضافة الى استعمال المؤصدة اذ يحدث تفاعل كيميائي عن طريق الحرارة العالية والضغط داخل المؤصدة (Sahu *et al.*, 2012).

2-5-1-3: الاغلفة النانوية Nano package

أزداد الاهتمام في العقود الاخيرة لاجاد تقنيات حديثة بديلة لتغليف المواد الغذائية تعمل كمواد حافظة لاطالة العمر الخزني وحفظ الغذاء مصنعة من مصادر حيوية متجددة تتصف بعدم سميتها لجسم الانسان وغير ملوثة للبيئة وتكون منخفضة التكاليف ومن هذه التقنيات استعمال تقنية النانو المتضمنة عملية التحكم في حجم وشكل المواد على المستوى الذري او الجزيئي بمدى (1-100) نانومتر. والنانومتر هو جزء من المليون من المليمتر او الف من المايكرومتر (Duran and Marcato,2013).

تظهر المتعددات التي تحتوي على جزيئات نانوية خصائص فريدة لا يمكن تحقيقها باستخدام المواد التقليدية. اذ تغير هذه الخلائط الجديدة خصائص المتعدد بأكملها ، وفي نفس الوقت تعمل على اضافة وظائف جديدة بسبب تركيبها الكيميائي ومكوناتها النانوية (Avella et al.,2011).

تقدم هذه التقنية تطورات كبيرة في صناعة المواد الغذائية من خلال مواد وظيفية جديدة تستجيب لمتطلبات الجسم وتوفير عناصر غذائية بكفاءة اكبر. اضافة الى تصميم الأساليب والأجهزة الخاصة بسلامة الأغذية والأمن البيولوجي . كما تقدم مواد تعبئة من الجيل الجديد تطوير التغليف الذكي لتحسين العمر الافتراضي للمنتج كعوامل حماية ضد البكتيريا المسببة للأمراض أو تأخير الاكسدة (Greenwood and Levan,2006).

يمكن ان يؤثر تنافذ الغازات كالأوكسجين وثنائي أو كسيد الكربون على ثباتية الأغذية عند الخزن ، إذ يعد الأوكسجين ضرورياً لمعظم الكائنات الحية بالإضافة إلى كونه عاملاً هاماً في تفاعلات الأكسدة. وإزالة الأوكسجين من داخل العبوات يمكن ان يحد من التأثيرات السلبية المختلفة التي تتلف نوعية الغذاء وسلامته وبالنتيجة إطالة العمر الخزني للغذاء (Han,2014).

يشترك الأوكسجين في العديد من تفاعلات التحلل في الغذاء ومنها التزنخ التأكسدي للدهون والزيوت وتلف

الفيتامينات والصبغات ومركبات النكهة وتفاعلات الاسمرار وغيرها ، ولهذه الأسباب تعتمد العديد من إستراتيجيات التعبئة على استبعاد الأوكسجين لاجل حماية المنتج الغذائي من التلف. لكن بعض النفاذية للغازات وبشكل خاص ثنائي أوكسيد الكربون تكون ضرورية للمواد الغذائية ذات الأنسجة الحية المستمرة بالتنفس كالفواكه والخضراوات الطازجة. في هذه الحالة تكون العبوات ذات قابلية الحجز المتوسطة للغازات هي الأكثر ملائمة للاستعمال (Gontard *et al.*,1996) .

تُعد عملية تغليف الفواكه والخضراوات الطازجة لإبطاء التنفس الهوائي بشكل مماثل للخبز في الظروف الخاضعة للسيطرة ستكون له فائدة اقتصادية كبيرة إذ تنتفي الحاجة إلى مخازن خاصة للخبز في ظروف مسيطر عليها (Controlled atmosphere) إضافة إلى ان هذا الأسلوب سيسمح ببقاء السيطرة على التنفس أثناء عملية توزيع المنتج (Kester and Fennema,1986).

وفرت تقنية النانو لانظمة التعبئة والتغليف حلاً لبعض المشاكل مثل تحسين صفة النفاذية وزيادة خصائص الحاجز الميكانيكية والكيميائية والحرارية والميكروبية .والتحكم في التبادل الغازي بين العبوات والبيئة المحيطة بها اضافة الى مقاومة الحرارة وتطوير مضادات الميكروبات و الأسطح المضادة للفطريات والاستشعار وكذلك الإشارات الميكروبيولوجية والتغيرات البيوكيميائية مما ساهم في تقليل الطاقة اللازمة لتصنيع المغلفات وخفض كمية المواد الخام اضافة الى خفض اجور النقل، كما بينت العديد من الدراسات ان الاغلفة المستخدمة لتغليف المواد الغذائية و المدعمة بجسيمات نانوية Nanoparticles من معادن الفضة والسليكا والزنك اتصفت بكونها ذات وزن خفيف واكثر مقاومة للحرارة مع المتانة العالية، وان إضافة جسيمات السليكا النانوية حسنت من صفات البوليمر من حيث الاستقرار الحراري و تبلور المزيج علاوةً على ذلك تحسين الصفات الميكانيكية بشكل كبير من حيث الاستطالة عند الكسر (Jeziorska *et al.*,2018).

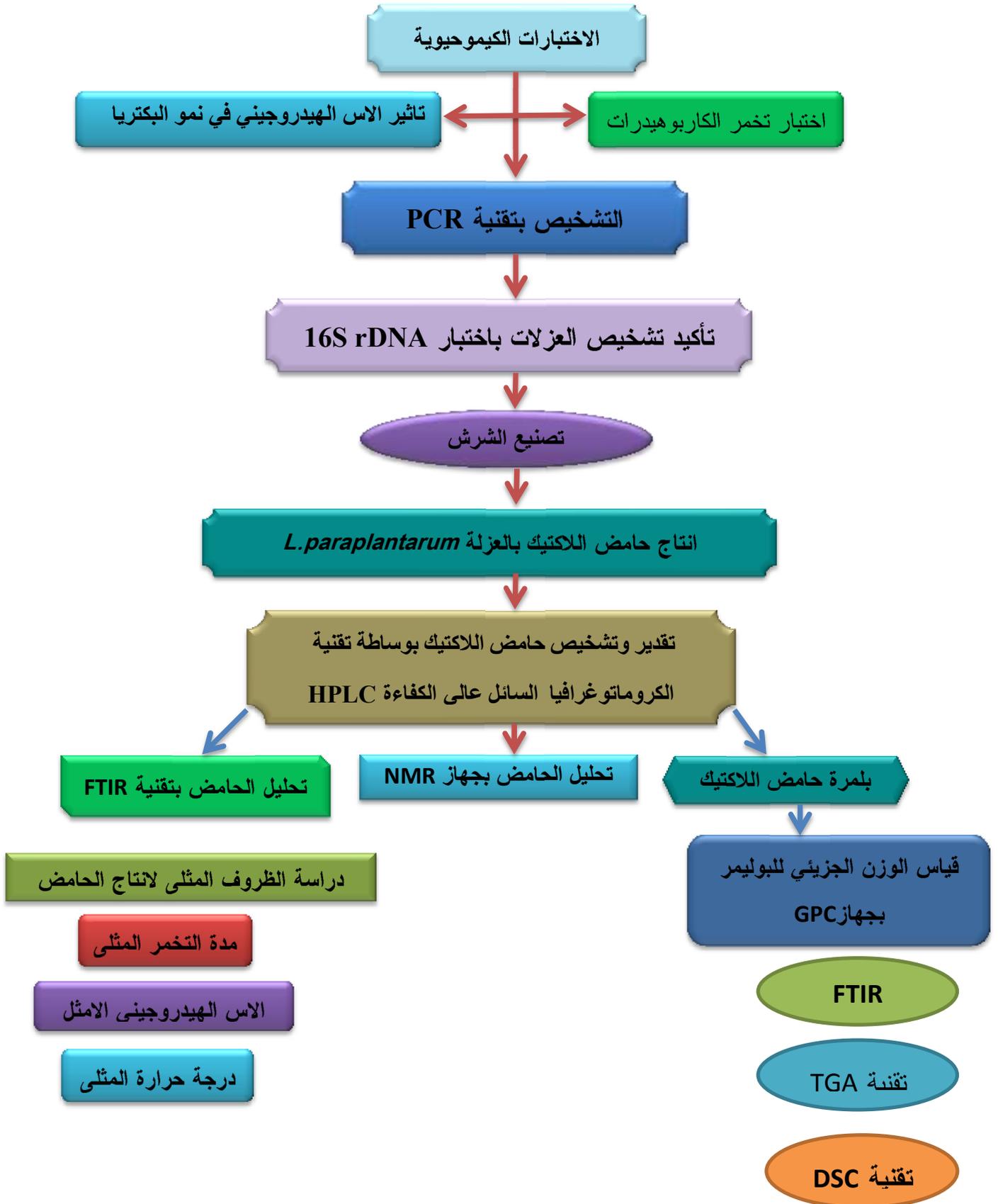
تتميز جسيمات السليكا النانوية بانها غير قابلة للهضم من قبل الجهاز الهضمي وأمنة عند إستعمالها

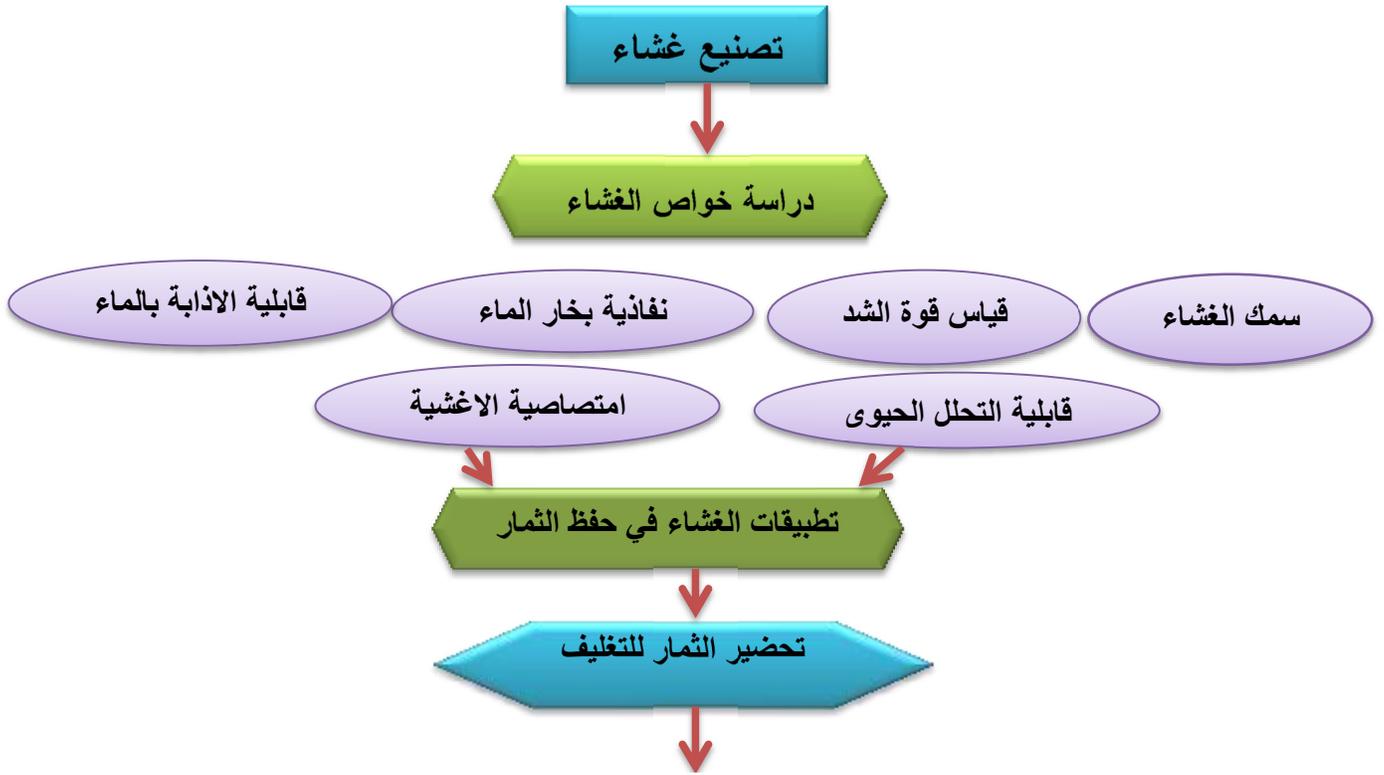
لذلك أوصي باستخدامها كمضافات للاغذية حسب منظمة الغذاء والدواء Food and Drug Administration (FDA) (Zhang *et al.*,2019).

وجد Yee *et al.*(2016) ان إضافة جسيمات السليكا النانوية ادت الى تحسن في الخواص الميكانيكية وإنخفاض قيمة النفاذية بسبب الاواصر غير محبة للماء Hydrophobicity كما قلت درجة التبلور اضافة الى زيادة الاستقرار الحرارية بسبب تقييد حركة سلاسل المتعدد.

تلعب الجسيمات النانوية المستخدمة في التغليف سواءً التغليف النشط او التعبئة المضادة للميكروبات دور في اطالة العمر الخزن للمواد الغذائية وتقليل مخاطر الامراض وتسمم الغذاء . حيث بينت نتائج دراسة قام بها Al-morshedy,(2020) بإستعمال اغلفة الفضة النانوية لاطالة فترة الخزن للحم البقري المفروم وصدور الدجاج أنخفاض قيمة الحامض TBA اذ كانت في بداية فترة الخزن 0.007 ملغم مالون الديهايد / كغم دهن لتصل الى 0.0269 ملغم مالون الديهايد / كغم في نهاية الفترة. وحافظ الغشاء على العدد الكلي للبكتريا 7.33 دورة لوغاريتمية بينما تجاوزت عينة السيطرة الحد المسموح به 8.6 دورة لوغاريتمية، كما إنخفضت اعداد بكتريا القولون والبكتريا المحبة للبرودة في لحم صدور الدجاج المغلف بغشاء الفضة النانوي مقارنة مع العينات غير المغلفة. اضافة الى تفوقه معنوياً في نتائج التقييم الحسي من حيث الشكل العام ، الرائحة ، القوام واللون .







الوزن قياس أبعاد الثمار تقدير الحموضة الكلية المواد الصلبة الذائبة

شكل () : مخطط طرائق العمل التي أجريت خلال الدراسة

Materials and Methods

3- المواد وطرائق العمل

1-3: المواد Materials

يبين جدول رقم (1-3) المواد الكيميائية والبكتريولوجية المستخدمة في الدراسة.

جدول (1-3) المواد المستخدمة في الدراسة

المنشأ	الشركة المجهزة	المادة
India	Thomas baker	Acetic acid CH_3COOH
England	BDH	Acetonitrile CH_3CN
India	Hi media	Agarose
England	BDH	Ammonium Sulfate $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$
England	BDH	Arabinose, Maltose, Fructose, Cellobiose, Mannose, Ribose, Melibiose, Sucrose, Galactose, Raffinose, Glucose, Lactose, Sorbitol, Mannitol, Xylose
Korea	Macrogen	Blue master mix
England	BDH	Boric acid H_3BO_4
Switzerland	Fluka	Calcium Carbonate CaCO_3
India	Hi media	Cycloheximide
Switzerland	Fluka	3,5 Di-nitro salicylic acid
Korea	Bioneer	DNA Lader Markers
India	Hi media	Ferric chloride 6-hydrate $(\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$
India	Hi media	glycerol $(\text{CH}_2\text{OHCHOHCH}_2\text{OH})$
India	Hi media	Hydrochloric acid (HCl) 35%
England	BDH	Hydrogen peroxide H_2O_2

India	Thomas baker	Lactic acid $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$
Germany	Fluka	L-arginine mono hydrochloride
India	Hi media	L-Cysteine HCl
England	BDH	Magnesium nitrate $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$
England	BDH	Mercuric chloride HgCl_2
Ispan	Scharlru	Methyl alcohol CH_3OH
Switzerland	Fluka	α - naphthol
England	BDH	N,N – di methyl-p-phenylenediamine
England	BDH	Phenol
Switzerland	Fluka	Phenolphthalein indicator
England	BDH	Phosphoric acid (H_3PO_4)
England	BDH	Potassium bromide KBr
India	Hi media	Potassium chloride (KCl)
India	Hi media	Potassium hydroxide (KOH)
England	BDH	Potassium iodide KI
India	Hi media	Potassium nitrate KNO_3
Switzerland	Fluka	potassium phosphate dihydrogen (KH_2PO_4)
England	BDH	Potassium-Sodium Tartarate
India	Hi media	sodium acetate (CH_3COONa)
England	BDH	Sodium azide NaN_3
Switzerland	Fluka	Sodium chloride (NaCl)
England	BDH	Sodium glutamate
India	Hi media	Sodium hydroxide (NaOH)
England	BDH	Sulfonic acid
India	Himedia	Sulfuric acid (H_2SO_4)
Switzerland	Fluka	Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
المنشأ	الشركة	المواد البكتريولوجية
India	Hi media	Agar
India	Hi media	Beef extract
Switzerland	Fluka	Bromocresol green
India	Hi media	Bromocresol purple

England	BDH	Bromo phenol blue
Switzerland	Fluka	Bromo thymol blue
England	BDH	Chlorophenol red
England	BDH	Ethidium bromide
Switzerland	Fluka	Gelatin
Switzerland	Fluka	Gram stain
India	Hi media	Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)
Switzerland	Fluka	Iodine solution
India	Hi media	Peptone
Japan	Meito	Rennet
England	Oxoid	Simmon citrate agar
India	Hi media	Tryptone
Switzerland	Fluka	Yeast extract

3-1-1: الأجهزة المختبرية:

جدول (3-2) الاجهزة والادوات المختبرية المستعملة في الدراسة.

المنشأ	الشركة المجهزة	أسم الجهاز	
Germany	Denver	Sensitive balance	ميزان حساس
Germany	GFL	Water bath	حمام مائي
Germany	Kottermann	Distiller	جهاز تقطير
Germany	Binder	Incubator	حاضنة
Germany	Binder	Incubator with CO ₂	حاضنة لاهوائية
Germany	Sartorius	pH-meter	مقياس الأس الهيدروجيني
Germany	Fanem	Autoclave	مؤسدة
Taiwan	Digi system	Vortex	مازج

China	Bio San	Desiccator	مجفف زجاجي
China	Lezaco	Micrometer	مايكروميتر الكتروني
Germany	Hermle	Ultracentrifuge	جهاز النبذ المركزي الفائق
Germany	Zeiss	Compound microscope	جهاز المجهر المركب
Korea	Termaks	Oven	فرن
Germany	Heldolph	Magnetic stirrer	المحرك المغناطيسي
Germany	Sartorius	Shaking incubator	الحاضنة الهزازة
U.k.	Aple	Spectrophotometry	جهاز قياس الأشعة فوق البنفسجية
Germany	Labnet	Electrophoresis system	جهاز الترحيل الكهربائي
Korea	Bioneer	PCR	جهاز
England	Bellingham	Refractometer	جهاز قياس معامل الانكسار
Germany	Funke Gerber	Lacto Flash	جهاز
Japan	Shimadzu	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	جهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة
U.S.A	Build 39	Thermogravimetric analysis (TGA)	جهاز التحلل الحراري الوزني
Japan	Jasco	Fourier-Transform Infrared Spectroscopy(FTIR)	جهاز الأشعة تحت الحمراء
Germany	Zwick Roell	Texture analyzer	جهاز تحليل الأنسجة
Germany	Zeiss	Scanning electron microscope	جهاز الماسح الإلكتروني
China	KT-903	Hydro thermometer	جهاز قياس الرطوبة
England	Whatman	Millipore filter	مرشحات بكتيرية قطر 0.22 مايكرومتر

Materials and Methods

المواد وطرائق العمل

2-3: طرائق العمل Methods

1-2-3 : مصادر العزلات Collection of isolates sources

جمعت عينات من مصادر مختلفة شملت حليب الابقار وحليب الجاموس وجبن محلي ولبن رائب محلي وقيمر ومخلل زيتون ومخلل لهانة ومخلل خسروات، نُقلت العينات الى المختبر بعبوات معقمة محكمة الغلق.

2-2-3: تحضير الأوساط الزرعية Preparation of culture media

حُضرت الأوساط الزرعية المجهزة Culture media حسب تعليمات الشركة المصنعة، عُقمت بجهاز المؤسدة بدرجة حرارة 121 °م وضغط (15باوند/ أنج²) لفترة 15 دقيقة بإستثناء بعض الأوساط.

1-2-2-3: وسط MRS الصلب De Man, Rogosa and Sharpe agar

أستعمل الوسط لعزل بكتريا حامض اللاكتيك مع إضافة 0.1 غم / لتر من المضاد الحيوي سايكلووهكسامايد بعد التعقيم لمنع نمو الخمائر حسب ما ذكره (Kalavrouzioti *et al.*, 2005).

2-2-2-3: وسط MRS-L. Cysteine.HCl broth

أستعمل الوسط في عملية تنشيط عزلات البكتريا مع إضافة المادة L-Cysteine-HCl الى المكونات السابقة لوسط MRS وبنسبة 0.05% لتقليل الاوكسجين من الوسط (Awan and Rahman, 2005).

3-2-2-3: وسط MRS +CaCO₃

أضيف 1% من كربونات الكالسيوم الى وسط MRS بعد التعقيم. صُب الوسط في الاطباق، استعمل للكشف على إنتاج الحامض من قبل العزلات.

Materials and Methods

المواد وطرائق العمل

3-2-4 : الحليب الفرز Skim Milk

أستعمل حليب الفرز كوسط لتنشيط المزرع البكتيرية حيث تم الحصول عليه من السوق المحلية وهو من إنتاج شركة (Regilait/France) تم تحضيره بإذابة الحليب الفرز المجفف بالماء المقطر بنسبة 12% وتعقيمه عند درجة 121°م ولفترة 5 دقائق .

3-2-5 : ماء البيتون Peptone water

أستعمل ماء البيتون لعمل سلسلة التخافيف العشرية لغرض عزل البكتريا من مصادرها الأصلية حيث حضر بإذابة 1 غم بيتون في لتر ماء مقطر، وزع في أنابيب مختبرية (9 مل لكل انبوبة, Azadnia and Nazer, 2009).

3-2-6 : وسط استهلاك السترات Citrate Simmons medium

أستعمل هذا الوسط لمعرفة قدرة البكتريا على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون والمحضر حسب تعليمات شركة Oxoid الانكليزية (Samelis *et al.*, 1994) .

3-2-7 : وسط الجيلاتين Gelatin media

أستعمل الوسط لإختبار قابلية العزلات على تسييل الجيلاتين، حيث حُضر بإضافة 10غم من الجيلاتين في 100 مل من وسط Nutrient broth، وتم ضبط الأس الهيدروجيني عند 6.5 . وزع الوسط في أنابيب اختبار (9) مل لكل انبوبة (Andrews, 1997) .

3-2-8 : وسط اختزال النترات Nitrate reduction

حُضر هذا الوسط بإذابة كل من المواد (3غم من مستخلص اللحم، 15غم بيتون، 1غم نترات البوتاسيوم

KNO_3 في 1 لتر ماء مقطر تم تعديل الأس الهيدروجيني الى 7 ووزع الوسط في أنابيب بواقع 5 مل لكل أنبوبة (Andrews, 1997).

3-2-2-9: وسط إنتاج الامونيا من الارجنين Ammonia production from Arginine

حُضر هذا الوسط بإذابة كل من المواد (5غم تربتون، 0.5غم كلوكوز، 2.5غم مستخلص خميرة، 2غم KH_2PO_4 الحامضية، 3غم L-arginine mono hydrochloride) في 1 لتر ماء مقطر مع ضبط الأس الهيدروجيني الى 7.2 (Andrews, 1997).

3-2-2-10: وسط تخمر الكربوهيدرات Carbohydrate fermentation medium

حضر وسط MRS broth دون إضافة سكر الكلوكوز وخلاصة اللحم مضافاً اليه دليل كلوروفينول الاحمر 2% (المحضر في الفقرة 3-2-3-6) ثم أُضيفت بعد ذلك السكريات (كلاً على حدة) وبتركيز 1% الى الوسط وضبط الأس الهيدروجيني 6.4 . اما السكريات فقد تم تعقيمها باستخدام المرشحات الميكروبية Millipore بقطر 0.22 مايكرومتر قبل إضافتها الى الوسط المعقم مسبقاً (Collee et al., 1996).

3-2-2-11: وسط اختبار تحمل الحموضة

أستعمل الوسط MRS السائل وبأسس هيدروجينية هي (3 ، 4.5 ، 9.6) لغرض معرفة مدى تحمل البكتريا لهذه الأسس. وزع الوسط في أنابيب اختبار لكل أنبوبة 5 مل وعقم بالمؤصدة.

3-2-2-12 : وسط اختبار تحمل الملوحة

حُضر وسط MRS broth بوجود تراكيز مختلفة (2 ، 4 ، 6.5) % من كلوريد الصوديوم لاختبار تحمل البكتريا لتلك التراكيز الملحية المذكورة أعلاه إذ أُضيف كلوريد الصوديوم إلى الوسط وعدل الأس الهيدروجيني الى

Materials and Methods

المواد وطرائق العمل

6.4 ثم وزع الوسط في أنابيب اختبار بحجم 10 مل لكل أنبوبة ثم عقم بالمؤصدة (Holt *et al.*, 1994).

3-2-3 : الكواشف والمحاليل الكيميائية Indicators and chemical solutions

1-3-2-3 : محلول هيدروكسيد الصوديوم Sodium hydroxide

أستخدم في تعديل الأس الهيدروجيني حيث حُضر بإذابة 4 غم من المادة في 100 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز 1 عياري.

2-3-2-3 : محلول حامض الهيدروكلوريك (1 عياري)

حضر بأخذ 8.29 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز (37 %) وأكمل الحجم الى 100 مل من الماء المقطر وأستخدم لتعديل الأس الهيدروجيني .

3-3-2-3 : محلول بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen Peroxide Solution

أستعمل بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3 % للكشف عن قدرة البكتريا على إنتاج انزيم الكاتاليز.

4-3-2-3 : كاشف اختزال النترات Nitrate reduction indicator

أستخدم هذا الكاشف لاختبار قدرة البكتريا على اختزال النترات الى نترت ويتكون من محولين هما :

محلول A : حضر بإذابة 8 غم حامض السلفانيليك Sulfanilic acid في 1 لتر من حامض الخليك بتركيز 5 عياري.

محلول B : حضر بإذابة 5 غم الفانفثايل أمين α -Naphthylamine في 1 لتر من حامض الخليك بتركيز 5 عياري (Andrews, 1997).

5-3-2-3: كاشف نسلر Nessler's Indicator

أستخدم هذا الكاشف لاختبار انتاج الأمونيا من الأرجنين حيث حضر بإذابة 8غم يوديد البوتاسيوم و11.5 غم من كلوريد الزئبق في 20 مل ماء مقطر ثم اكمل الحجم الى 50 مل. أضيف 50 مل من هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 6 عياري وتم مزج المحلول جيدا لغرض تجانس المزيج وترك لفترة 24 ساعة قبل الاستعمال (Schillinger and Lücke, 1987).

6-3-2-3: دليل الكلوروفينول الأحمر Chlorophenol red indicator

حُضر بإذابة 0.05 غم من صبغة الكلوروفينول الاحمر في 50 مل من الكحول الايثيلي ثم أكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر ومزج جيدا. أستخدم الكاشف في اختبار تخمر السكريات حيث أضيف 2مل من هذا الكاشف الى 100 مل من وسط تخمر السكريات قبل التعقيم (Collee *et al.*, 1996).

7-3-2-3 : كاشف الفينولنفتالين Phenolphthalein Indicator

حضر بإذابة 0.1 غم من صبغة الفينولنفتالين في 50 مل من الكحول الايثيلي .اكمل الحجم الى 100مل بالماء المقطر واستخدم في تقدير حامض اللاكتيك المنتج من العزلات (Horwitz, 1980).

8-3-2-3: محلول صبغة بروموفينول الزرقاء Bromophenol blue

أذيب 1غم من صبغة بروموفينول الزرقاء في 100 مل من الكليسيرول. استخدمت بتقنية الترحيل الكهربائي للكشف عن الحامض النووي DNA .

9-3-2-3 : محلول صبغة Ethidium Bromide

حُضرت هذه الصبغة بإذابة 0.05 غم من بروميد الاثيديوم في 10 مل ماء مقطر للحصول على محلول

تركيزه 0.5%، تم حفظ المحلول في الظلام بزجاجة معتمة بدرجة 4 °م ويراعى إستخدام القفازات لكون المادة سامة (Sambrook and Russell , 2001).

10-3-2-3: محلول دارى الفوسفات الملحي (PBS) Phosphate Buffer Saline

حُضر محلول دارى الفوسفات الملحي حسب ما ذكر (Garvey *et al.*(1977) بإذابة المواد التالية في 800 مل من الماء المقطر (8 غم من ملح كلوريد الصوديوم ، 0.2 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ، 0.2 غم من كلوريد البوتاسيوم و1.44 غم من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين (Na₂HPO₄) وأكمل الحجم الى 1 لتر بالماء المقطر وضبط الأس الهيدروجيني الى 7.2 وعقم بالمؤصدة، استعمل المحلول في استخلاص الحامض النووي DNA.

11-3-2-3: محلول الترحيل الكهربائي Tris-Borate-EDTA (TBE)

حضر المحلول الخزين بإذابة 1.86 غم EDTA في 20 مل من الماء المقطر وأضيف 27.5غم حامض البوريك و54 غم من Tris-base وأكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر وضبط الأس الهيدروجيني الى 8 وعقم بالمؤصدة، استخدم المحلول للكشف عن الحامض النووي DNA (Sambrook and Russell, 2001).

Materials and Methods

المواد وطرائق العمل

3-2-4: عزل بكتريا حامض اللاكتيك Isolation of Lactic acid bacteria

3-2-4-1: اغناء البكتريا في الاوساط السائلة Enrichment of bacteria in liquid media

أخذ 1 مل من العينات في انبوبة اختبار تحتوي على 9 مل من وسط MRS-L.Cysteine.HCl السائل وحضنت عند درجات الحرارة (15،37،45) م لفترة 2-5 يوم تحت ظروف لاهوائية باستخدام الحاضنة اللاهوائية المزودة بغاز CO₂ في المختبر المركزي /كلية الطب البيطري /جامعة البصرة ، ثم أجريت سلسلة من التخفيف العشرية للعينات المزروعة و نقل 0.1 مل من كل تخفيف إلى أطباق بتري معقمة وصب وسط MRS agar المذاب الخاص بالعزل، بعدها حضنت الاطباق لاهوائياً عند (15،37،45)°م لفترة 2-3 يوم .

3-2-4-2: تنقية المستعمرات Colonies purification

أختيرت المستعمرات النامية المختلفة من حيث اللون والشكل والحجم و أجريت عملية التخطيط على وسط MRS الصلب بواسطة الناقل المعدني Loop وحضنت الاطباق على درجة حرارة 37 °م لفترة 2-3 يوم وتم اجراء هذه العملية لحين الوصول الى عزلات نقية.

3-2-5: حفظ العزلات البكتيرية Cultures preservation

أستعمل الوسط MRS الصلب بشكل مائل Slant لغرض الحفاظ على العزلات البكتيرية المستخدمة للعمل اليومي Working culture حيث تم حفظ العزلات النقية في الثلاجة على درجة 4°م مع تجديد المزارع شهرياً ، أما لغرض ادامة المزارع Maintenance culture حفظت العزلات النقية المعزولة في وسط MRS السائل مع

Materials and Methods

المواد وطرائق العمل

إضافة 20% كليسيروول ووضعت بدرجة حرارة -20 م لغرض حفظها لفترة طويلة (Samelis *et al.*,1994).

Identification tests الفحوصات التشخيصية 6-2-3

Morphological characteristics الصفات الشكلية 1-6-2-3

درست الصفات الشكلية للمستعمرات المعزولة بتتميتها على الوسط الزرعي MRS الصلب والتي تضمنت شكل المستعمرات ، حجمها ، لونها ، مظهرها ، حافظتها ، ارتفاعها .

Microscopic examination الفحص المجهرى 2-6-2-3

أجري فحص المستعمرات المعزولة مجهريا بعد تصبيغها بصبغة كرام للتعرف على شكل الخلايا البكتيرية ونوع اصطباعها. كذلك تم اختبار حركة البكتريا بتقنية القطرة المعلقة Hanging drop technique باستخدام الشريحة ذات النقرع (Harley and Prescott,2002).

Biochemical tests الاختبارات الكيموحيوية 7-2-3

1-7-2-3 إنتاج الحامض

لقت الاطباق المحتوية على وسط $MRS+CaCO_3$ بمزارع بكتيرية بعمر 18-24 ساعة وحضنت عند درجة حرارة 37 °م لفترة 2-3 يوم، تكون الهالة الشفافة حول المستعمرة دلالة على إنتاج حامض اللاكتيك.

Gas production from glucose إنتاج الغاز من الكلوكوز 2-7-2-3

لقت الأنابيب الحاوية على الوسط MRS بمزارع بكتيرية بعمر 18-24 ساعة والموضوع في كل منها أنبوب

درهام للكشف عن تكون غاز CO₂، حضنت الأنابيب عند درجة حرارة 37 م لفترة 2-3 يوم. ان ظهور الفقاعات الغازية في أنبوبة درهام دليل على إنتاج الغاز من تخمر الكلوكون (Harrigan,1998).

3-7-2-3: فحص الكاتاليز Catalase test

أُخذت قطرة واحدة من المزرعة البكتيرية السائلة المنمأة على وسط MRS السائل بعمر 18-24 ساعة بواسطة الناقل المعدني Loop على شريحة زجاجية نظيفة وأضيف اليها محلول بيروكسيد الهيدروجين 3%. ان ظهور فقاعات غازية يدل على أن الفحص موجب (Murray *et al.*,2007).

3-7-2-4: اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test

زُرعت العزلات المنشطة ذات عمر 18-24 ساعة على الوسط الزرعي Citrate simmons agar المذكور في الفقرة 3-2-2-6 وحضنت الأطباق على درجة حرارة 37 م[°]. فحست يومياً ولفترة 7 أيام، ظهور النمو وتغير لون الوسط الى اللون الأزرق تعد نتيجة موجبة (Collee *et al.*, 1996).

3-7-2-5: اختبار تسييل الجيلاتين Gelatin liquefaction test

اختبرت قابلية العزلات على تسييل الجيلاتين حسب الطريقة الواردة في Harrigan and McCance,(1976) إذ لحت الأنابيب الحاوية على وسط الجيلاتين المحضرفي الفقرة 3-2-2-7 بالمزرعة البكتيرية المنشطة بعمر 18-24 ساعة بطريقة الطعن بالابرة needle وتم الحضان عند درجة حرارة 37 م[°] لفترة 7 أيام . بعد الحضان وضعت الانابيب في الثلاجة ولفترة ساعة ، ان سيلان الوسط يعد دليلاً على إنتاج البكتريا لأنزيم الجيلاتينز المحلل للجيلاتين.

3-2-7-6: فحص اختزال النترات Nitrate reduction test

لُقحت الأنابيب الحاوية على وسط اختزال النترات بمزارع منشطة بعمر 18-24 ساعة وحضنت عند درجة حرارة 37 °م لفترة 48 ساعة ثم أضيف 1 مل من كل من المحلول A و B الخاصة بالفحص والمذكور في الفقرة (3-2-3-4) وتترك لبضع دقائق ، ظهور اللون الأحمر دليل على قدرة العزلات على اختزال النترات (Collee *et al.*, 1996).

3-2-7-7: اختبار إنتاج الأمونيا من الأرجينين Ammonia production from Arginine

أُجري الاختبار باستخدام وسط الارجنين حيث لُقحت الأنابيب بمزارع عمرها 18-24 ساعة وحضنت عند درجة حرارة 37 °م لفترة 24-48 ساعة ثم وضعت قطرة من الوسط على شريحة زجاجية وأضيف عليها قطرة من كاشف نسلر ، تغير اللون من البرتقالي إلى الأحمر يعطي دلالة واضحة على إنتاج الأمونيا من الأرجينين (Harrigan and McCance, 1976).

3-2-7-8: فحص تخمر السكريات Sugar fermentation test

لُقحت الأنابيب الحاوية على وسط تخمر السكريات بمزارع عمرها 18-24 ساعة وحضنت عند درجة حرارة 37 °م لفترة 5 أيام مع فحص النتائج يومياً . تغير لون الوسط إلى اللون الأصفر يدل على أن النتيجة موجبة (Collee *et al.*, 1996).

3-2-7-9: فحص النمو عند درجات حرارية مختلفة Growth at different temperature

لُقحت الأنابيب الحاوية على وسط النمو MRS السائل بمزارع عمرها 18-24 ساعة وحُضنت عند درجات

Materials and Methods

المواد وطرائق العمل

حرارة مختلفة (10 و 15 و 37 و 45) °م لفترة 2-3 يوم ، عكارة الوسط دلالة على قدرة العزلات على النمو في تلك الدرجات الحرارية (Harrigan and McCance, 1976).

3-2-7-10: تأثير الأس الهيدروجيني في نمو البكتريا Effect of pH on bacterial growth

لُفحت الأنابيب الحاوية على الوسط بأسس هيدروجينية مختلفة بالمزارع البكتيرية بعمر 18-24 ساعة وحضنت الأنابيب عند درجة حرارة 37 °م لفترة 48 ساعة . عكارة الوسط دلالة على قدرة العزلات على النمو في تلك الأسس الهيدروجينية .

3-2-7-11: وسط اختبار تحمل الملح

لُفحت الأنابيب الحاوية على الوسط بتركيز ملحية مختلفة بالمزارع البكتيرية بعمر 18-24 ساعة وحضنت الأنابيب عند درجة حرارة 37 °م لفترة 2-3 يوم . يستدل من عكارة الوسط على قدرة العزلات على النمو في تلك التراكيز الملحية (Holt *et al.*,1994) .

3-2-7-12: تقدير الحموضة الكلية Determination of total acidity

فُدرت الحموضة الكلية بطريقة التسحيح كما ذكر (A.O.A.C.(1970) واحتسابها كحامض لكتيك ، إذ أخذ 5 مل من العينة في ورق مخروطي صغير سعة 50مل وأضيف اليه قطرات من الفينولفثالين وسحج مع محلول (هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 عياري) لحين التغير الى اللون الوردي الفاتح وسجلت القراءات وتم حساب نسبة الحموضة بالمعادلة التالية:

$$\text{نسبة الحموضة \%} = \frac{\text{حجم NaOH (مل)} \times \text{عيارية NaOH} \times \text{الوزن الملي مكافئ لحمض اللاكتيك}}{\text{وزن العينة (مل)}} \times 100$$

3-2-7-13: قياس الأس الهيدروجيني Determination of pH value

تم قياس الأس الهيدروجيني قبل وبعد التخمير اللاكتيكي باستخدام جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH-meter

(Chantawongsatorn *et al.*, 2016).

3-2-8: التشخيص الجزيئي لعزلات بكتريا حامض اللاكتيك

3-2-8-1: استخلاص الحامض النووي DNA لعزلات بكتريا حامض اللاكتيك

اختيرت العزلات الأكثر إنتاجاً لحمض اللاكتيك وتم استخلاص الحامض النووي DNA من خلايا البكتريا في

مختبر كلية التمريض-جامعة البصرة. بعد تنشيط العزلات البكتيرية على وسط MRS agar ولفترة (18-24)

ساعة عند درجة حرارة 37°م باستعمال Mini DNA Bacteria Kit المجهز من شركة Geneaid Biotech

Ltd. الأمريكية وحسب الخطوات التالية :

1- نقلت المستعمرات المنشطة بواسطة الناقل المعدني Loop الى انابيب Eppendorf تحتوي على 300

مايكرو لتر ماء مقطر معقم ونبذت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 1200دورة / دقيقة لفترة 6 دقائق .

2- اضيف الاليسوزايم بفر 200 مايكرو لتر وتم التخلص من الراشح و اضيف 200 مايكرو لتر من المحلول

- المحلول الدائري GB-Buffer الى الراسب وخلط بالمازج مع ملاحظة مزجه كل دقيقتين لفترة عشر دقائق.
- 3- وضع في حمام مائي على درجة حرارة 80 °م لفترة 10 دقائق مع التقليب ثلاث مرات.
- 4- أضيف 250 مايكرو لتر من محلول الاسترداد الدائري (TE) Elution Buffer الى أنبوبة أبندروف، وضعت في حمام مائي على درجة حرارة 80 °م.
- 5- وضع عمود GD column في أنبوبة الجمع Collection Tube سعة 2 مل.
- 6- أضيف 200 مايكرو لتر من الكحول الايثيلي المطلق الى الخليط في الخطوة (3) مع الرج جيدا ومن ثم نقله الى العمود GD column .
- 7- أجري طرد مركزي بسرعة 1200 دورة / دقيقة لفترة 6 دقائق
- 8- نقل العمود GD column الى أنبوبة تجميع جديدة .
- 9- أضيف 400 مايكرو لتر من W1 الى عمود GD column وأجري طرد مركزي للخليط بسرعة 1200 دورة / دقيقة لفترة 3 دقائق .
- 10- أضيف 80 مايكرو لتر من محلول الاسترداد الدائري الى عمود GD column الموجود في أنبوبة أبندروف وتركت لفترة 5 دقائق ثم أجري طرد مركزي بسرعة 1200 دورة / دقيقة لفترة 6 دقائق ، بعدها حفظ الحامض النووي DNA بالتجميد لحين الاستعمال .

3-2-8-2: الكشف عن الحامض النووي DNA بتقنية الترحيل الكهربائي باستعمال هلام الاكاروز

اجري الترحيل الكهربائي للكشف عن DNA باستعمال هلام الاكاروز Agarose gel وفقاً لما ذكره (Sambrook *et al.* 1989)، وزن 0.2 غم من الأكاروز وأضيف له 25 مل من دارئ 1X-TBE buffer مع 0.5 مايكرو لتر من صبغة Ethidium bromide وسخن المزيج لحين اذابة جميع مكوناته، صب الهلام في نهاية القالب الذي يحتوي على المشط وترك ليتصلب ثم أضيف محلول الترحيل وهو 1X-TBE buffer ليغطي سطح الهلام مع تحريك المشط لإزالته، اخذ 6 مايكرو لتر من DNA الخلية وأضيف لها 3 مايكرو لتر من صبغة Bromo phenol blue ووضعت في الحفر الموجودة في الهلام، تم تشغيل جهاز الترحيل الكهربائي بربط الأقطاب عند 60 ملي أمبير و 85 فولت لفترة نصف ساعة، لوحظ سريان الصبغة إلى الجهة الأخرى من الهلام، ثم وضع الهلام بعد انتهاء الترحيل على جهاز الاشعة فوق البنفسجية للكشف عن الحزم المتوهجة والتي تدل على وجود DNA.

3-2-8-3: التشخيص الجيني بتقنية تفاعلات السلسلة للأنزيم المبلر 16S rDNA

أجريت تقنية تفاعلات السلسلة للأنزيم المبلر لتضخيم المورث للتأكد من نوع العزلات حيث مزجت المحاليل المحاليل والكواشف المستخدمة المذكورة في الجدول (3-4) في انبوب التضخيم ووضعت في جهاز PCR thermal cycler . وتم استعمال البرايمرات Primers الخاصة بـ (16S rDNA) حسب ماورد في (Miyoshiey *et al.*,2005) وهي:

Primer Forward B27F: 5'- AGAGTTTGATCCTGGCAG- 3'

Primer Reverse U1492R: 5'- GGTTACCTTGTTACGACTT- 3'

جدول (3-3): خليط تفاعلات السلسلة للأنزيم المبلمر PCR المضافة في انبوب التضخيم

المادة	الحجم (مايكرو لتر)
Master Mix	12.5
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
DNA sample	5
free water	5.5
Total	25

تم مزج خليط أنابيب التضخيم المحتوية على العينات بجهاز Vortex لضمان تجانس المواد . ثم وضعت

العينات بجهاز Polymerase chain reaction (PCR) التابع الى مختبر الدراسات في كلية التمريض/جامعة

البصرة. وتم اتباع البرنامج المستعمل من قبل Ruiz *et al.* (2000) والموضح في الجدول (3-4).

جدول (3-4):خطوات عمل PCR لتضخيم 16S rDNA .

عدد الدورات	الزمن	درجة الحرارة °م	الخطوات	التسلسل
1	2 دقيقة	92 °م	Denaturation1	1
30	30 ثانية	94 °م	Denaturation2	2
	45 ثانية	51.8 °م	Annealing	
	1.5 دقيقة	72 °م	Extention1	
1	5 دقيقة	72 °م	Extention2	3

3-2-8-4: الترحيل الكهربائي

اتبعت طريقة الترحيل الكهربائي لتشخيص ناتج التضخيم باستخدام هلام الأكاروز 2% إذ مزج 9 مايكرو لتر من عينات نواتج التضخيم مع 3 مايكرو لتر من محلول صبغة البروموفينول الزرقاء ثم أضيف الخليط إلى كل حفرة فضلاً عن إضافة 9 مايكرو لتر DNA ladder إلى الحفرة الأولى من bp (250-10000). بعد إجراء الترحيل نقل الهلام إلى وحدة الأشعة فوق البنفسجية للكشف عن الحزم الناتجة من الترحيل الكهربائي.

3-2-8-5: قراءة تتابعات القواعد النيتروجينية

حضرت العينات حسب تعليمات الشركة Geneaid Biotech Ltd. تمهيداً لأرسالها إلى شركة Bioneer

الكورية وشخصت انواع العزلات المحلية بعد معالجة تتابع القواعد النيتروجينية (Kerbaudy *et al.*, 2011).

3-3: إنتاج حامض اللاكتيك Lactic Acid Production

3-3-1: تحضير وسط التخدير (الشرش) Preparation of fermentation medium (Whey)

حُضِر الشرش الحلو وأُستخدِم كوسط تخمير لإنتاج الحامض حيث بُسِتر لتر من الحليب عند درجة حرارة 63 م

لفترة نصف ساعة وتُرك ليبرد إلى درجة 37°م وأضيف 1 مل من المنفحة الميكروبية مع التحريك لفترة 3

دقائق لتوزيعها بصورة متساوية. بعدها قُطعت الخثرة بواسطة السكين وتُركت لتركد لفترة 5-10 دقيقة ثم

عُبئت الخثرة في قوالب معدنية بداخلها قماش الململ ووضعت الانتقال المناسبة لغرض الضغط على الخثرة

لخروج اكبر كمية من الشرش وتُركت لفترة 2 ساعة. بعدها تم تعقيم الشرش على درجة حرارة 113°م لفترة 10

دقائق بجهاز المؤسدة ثم برد الى درجة حرارة 37 م وعدل الأس الهيدروجيني الى 6.4 . قدرت مكونات الشرش بواسطة جهاز Lacto Flash في مختبرات قسم الانتاج الحيواني-كلية الزراعة- جامعة المثنى .

3-3-2: طريقة التخمير Fermentation mode

تم التخمير حسب ماورد في (Crueger *et al.* (1990) حيث لقع وسط التخمير(الشرش) 50 مل بحجم لقاح 1% من العزلة *L.paraplantarum* والمنشطة مسبقاً لفترة 18-24 ساعة وحضنت على درجة حرارة 37 م^o لفترة 72 ساعة.

3-3-4: استخلاص حامض اللاكتيك Lactic acid extraction

أستخلص الحامض حسب ماذكر في (Kirk and Sawyer,(1991) مع اجراء بعض التحويلات (زيادة عدد دورات جهاز الطرد المركزي وتقليل زمن التسخين في الحمام المائي) . تم تسخين وسط التخمير (الشرش) في حمام مائي بدرجة حرارة 90-97 م^o ولفترة 10 دقائق وترك ليبرد بعدها استخدم الطرد المركزي 5000 دورة/دقيقة ولفترة 10 دقائق ثم استخدم ورق الترشيح رقم 1 اضافة الى مرشحات بكتيرية لاستخلاص الحامض المعقم ، حُفظ الحامض الناتج في عبوات غامقة اللون ومحكمة الغلق.

3-3-4-1: تشخيص وتقدير حامض اللاكتيك بواسطة تقنية الكروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة High

performance Liquid Chromatography

استعملت تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة في تشخيص حامض اللاكتيك المنتج من العزلات البكتيرية، اتبعت الطريقة التي ذكرها (Zamanova *et al.*(2014) في عملية الفصل والتقدير إذ استعمل جهاز

HPLC التابع الى قسم الكيمياء / وزارة العلوم والتكنولوجيا / جامعة بغداد. لتقدير تركيز حامض اللاكتيك وذلك باستعمال عمود C18 (5 مايكرون) ذي الأبعاد 4.6 × 250 ملم، وكان حجم النموذج المحقون 20 مايكرو لتر وعلى طول موجي 360 نانومتر. اجري الفصل باستخدام الطور المتحرك المتكون من خليط من مذيب Acetonitrile(CH₃CN) مع 5% حامض الفسفوريك وعند درجة حرارة الغرفة وبسرعة جريان 1 مل / دقيقة . تم تقدير كمية حامض اللاكتيك حسب المعادلة الآتية:

$$\text{تركيز المادة المجهولة (العينة)} = \frac{\text{مساحة حزمة العينة}}{\text{مساحة حزمة القياسي}} \times \text{تركيز حامض اللاكتيك القياسي}$$

3-4-2: تحليل حامض اللاكتيك بجهاز ¹H-NMR

تم تحليل نموذج حامض اللاكتيك المنتج من قبل البكتريا بجهاز طيف الرنين النووي المغناطيسي والموجود في جامعة جنوب افريقيا وبسعة 400 ميكا هرتز وباستخدام مذيب D₂O للحامض المعزول في هذه الدراسة.

3-4-3: حساب النسبة المئوية لكفاءة التحويل

تم حساب كفاءة تحويل السكريات الى حامض اللاكتيك كما ورد في (Rose, 1976) وباستعمال المعادلة الآتية:

$$\text{كفاءة التحويل \%} = \frac{\text{كمية حامض اللاكتيك}}{\text{كمية السكر الكلية}} \times 100$$

3-3-5: دراسة الظروف المثلى لانتاج حامض اللاكتيك

Study the optimum conditions of lactic acid production

3-3-5-1: الأس الهيدروجيني الابتدائي الأمثل Optimal initial pH

أستعمل وسط الانتاج الشرش بأسس هيدروجينية مختلفة هي (5, 5.5 , 6 , 6.5 , 7) لإيجاد أفضل أس

هيدروجيني لانتاج حامض اللاكتيك وبحجم لقاح 1% عند درجة حرارة 37 م وفترة تخمر 72 ساعة وقدر حامض اللاكتيك كما ذكر في الفقرة في (3-2-7-12). أعتمد الأس الهيدروجيني الأمثل لدراسة الظروف الأخرى.

3-3-5-2: درجة حرارة التخمر المثلى Optimum fermentation temperature

استخدمت عدة درجات حرارية (25،30،35،40) م لإنتاج حامض اللاكتيك من وسط الشرش للحصول على أفضل درجة حرارة لإنتاج حامض اللاكتيك عند أس هيدروجيني 6.5 وحجم لقاح 1% وفترة تخمر 72 ساعة .

3-3-5-3: حجم اللقاح الأمثل Optimum inoculum volume

استخدم لقاح بنسبة (0.5،1،2،3) % من المزرعة البكتيرية المنشطة *L.paraplantarum* بعمر 18-24 ساعة عند أس هيدروجيني 6.5 ودرجة حرارة 30م وفترة تخمر 72 ساعة.

3-3-5-4: فترة التخمر المثلى Optimal period of fermentation

تم دراسة فترات زمنية مختلفة (24،48،72،96،120) ساعة للحصول على أفضل فترة تخمر لانتاج حامض اللاكتيك عند أس هيدروجيني 6.5 ودرجة حرارة 30 م وحجم لقاح 2 %.

3-4-4: بلمرة حامض اللاكتيك Lactic acid polymerization

اخذ 30 غم حامض اللاكتيك المنتج من البكتريا والمستخلص من وسط الشرش واضيف اليه 2.5 مل حامض الهيدروكلوريك المركز (35%) وأجريت عملية البلمرة التكتيفية للمزيج Condensation Polymerization بدرجة حرارة 90-100 م لفترة ساعتين تحت جو خامل من النتروجين لتجنب حدوث

الأكسدة وخلال هذه الفترة يتم سحب الماء الناتج من عملية البلمرة ، يرد المزيج الى درجة حرارة المختبر ثم غسل بالماء الدافئ لاكثر من مرة للتخلص من اثار حامض الهيدروكلوريك وكذلك من بقايا حامض اللاكتيك غير المتبلر ، بعدها ذوب المزيج بمذيب ثنائي كلوروميثان وغُسل اكثر من مرة للتخلص نهائياً من اثار حامض الهيدروكلوريك المتبقي ومن ثم جففت طبقة ثنائي كلوروميثان بإضافة كلوريد الكالسيوم وتم الترشيح .أخذت طبقة ثنائي كلوروميثان واضيف الميثانول اليها لترسيب البوليمر المتكون على هيئة مسحوق ابيض اللون مائل للاصفرار . بعدها جفف البوليمر في فرن تحت ضغط مخلخل وبدرجة 40 م لفترة 3-4 ساعة للتخلص من اثار المذيب المتبقي واجريت على البوليمر عمليات تشخيص باستعمال الطرق الطيفية.

3-4-1: حساب الوزن الجزيئي للبوليمر

تم اخذ الحسابات الخاصة للوزن الجزيئي لمتعدد اللاكتيك بجهاز كروموتوغرافيا نفاذية الهلام Cirrus GPC/SEC-version 3.3. واستخدمت طريقة الاقصاء الحجمي في حساب الوزن الجزيئي لمتعدد حامض اللاكتيك باستعمال مذيب DMF (Baig *et al.*, 2020).

من خلال المعادلات الخاصة بحسابات الوزن الجزيئي للبوليمرات فإن المعادلة أدناه تمثل المعادلة العامة لتلك

الحسابات :

$$M = \frac{\sum N_i M_i^{n+1}}{\sum N_i M_i^n}$$

حيث ان

M_i تمثل الوزن الجزيئي للسلسلة

N_i تمثل عدد السلاسل التي لها هذا الوزن الجزيئي

لذلك: $n=1$ يكون $M=M_w$

$n=2$ يكون $M=M_z$

$n=3$ يكون $M=M_{z+1}$

ومن النتائج المستحصلة نلاحظ ان ترتيب الاوزان الجزيئية المختلفة حسب قيمها هو كالاتي :

$$M_n < M_w < M_z < M_{z+1}$$

حيث ان :

M_n تشير الى المعدل العددي للوزن الجزيئي ، M_w يشير الى المعدل الوزني للوزن الجزيئي

وهذا مطابق للترتيب العام لاغلب قياسات الوزن الجزيئي للبوليمرات .وفيما يخص قيمة معامل تشتت متعدد

حامض اللاكتيك Polydispersity index تم حسابها من المعادلة ادناه :

$$PDI = \frac{M_w}{M_n}$$

3-5: تصنيع غشاء متعدد حامض اللاكتيك Preparation of polylactic film

حُضرت الاغشية باخذ 1.5 غم من متعدد حامض اللاكتيك واضيف اليه 15مل من مذيب الكوروفورم وترك تحت التحريك المستمر لفترة ساعة كاملة لحين الاذابة الكاملة، صب المحلول في أطباق زجاجية وتُرك بدرجة حرارة المختبر لفترة يوم كامل لحين تبخر المذيب ، ثم وُضعت الاطباق الزجاجية في فرن حراري بدرجة حرارة 40 م وتحت الضغط المخلخل لفترة ثلاث ساعات في مختبر ابحاث البوليمر - كلية العلوم للتخلص نهائياً من

أي اثار للمذيب حيث تكون بعدها الاغشية جاهزة للاستعمال .

3-6: تحضير خلائط مع متعدد اللاكتيك Preparation of PLA composites

3-6-1: تحضير جسيمات السليكا النانوية Nanosilica particles preparation

تم تحضير جسيمات السليكا النانوية بطريقة التحلل المائي Hydrolysis لمادة رابع ايثوكسي السليكون بوجود محلول مخفف من حامض الهيدروكلوريك (0.1M) (Altin,2009).

3-6-2: تحضير خلائط نانوية مع متعدد اللاكتيك Preparation of the PLA Nanocomposites

تم تجفيف حبيبات متعدد اللاكتيك عند 60 °م لفترة 24 ساعة في فرن مفرغ لإزالة الرطوبة الزائدة. ثم أُذيب في مذيب ثنائي كلوروميثان وتمت إضافة (1،3،5) % من جسيمات السليكا النانوية المحضرة إلى محلول متعدد اللاكتيك ، أُذيبت لفترة ساعتين في درجة حرارة الغرفة للحصول على خلائط متجانسة ، بعدها صبت العينات في طبق بتري وحفظت في مجفف للتحكم بتبخر المذيب لفترة يومين. تم الحصول على أغشية صافية بصرياً بسماك يتراوح من 500 - 700 مايكرومتر، جففت بعد ذلك عند 80 °م تحت ضغط لفترة يومين. تم حفظ الأفلام المعدة في مجفف لاجراء التجارب الاخرى(Shojaeiarani *et al.*,2019).

3-7: مواصفات الاغشية Properties of film

3-7-1: تقدير سمك الغشاء Film thicknees determination

اتبعت الطريقة المذكورة من قبل (Zhu *et al.*,2014) لتقدير سمك الغشاء بإستعمال المايكروميتر الرقمي

تصل دقته إلى 0.01 ملم ، حيث اخذ معدل عشرة قراءات لمواقع عشوائية للغشاء .

2-7-3: التحلل الحراري الوزني (TGA) Thermo gravimetric analysis

تم وزن 50 ملغم من العينة وقدرت درجة حرارة تفكك العينات باستخدام جهاز TGAQ50V20-13 Build 39 التابع لقسم الكيمياء/ كلية العلوم /جامعة البصرة ابتداءً من درجة حرارة الغرفة الى درجة حرارة 700م وبمعدل تسخين 10 درجة / دقيقة بوجود غاز النتروجين كوسط خامل مقارنةً مع حامض اللاكتيك القياسي.

3-7-3: تقدير قابلية الأغشية على الذوبان بالماء Solubility determination

قُدرت قابلية ذوبان الغشاء بالماء كالاتي:

1- قطعت عينة من الغشاء بأبعاد 2×2 سم.

3- تقدير الوزن الابتدائي للغشاء باستعمال ميزان حساس.

4- غمرت قطع الغشاء في 50 مل ماء مقطر في قرح زجاجي ، أضيف إليها مادة Sodium azide بتركيز

0.02% وزن/حجم وذلك لمنع نمو الأحياء المجهرية ، غطيت الأقداح بورق من الألمنيوم ثم حفظت في

حاضنة بدرجة حرارة 25 °م لفترة 24 ساعة مع رج الأقداح بشكل دوري إنشاء فترة الحضانة.

5- اخرجت العينات بعد انتهاء فترة الحضانة وغسلت بالماء المقطر ، وضعت في الفرن على درجة حرارة 100-

105م، اعيد وزن العينات لتقدير الوزن النهائي للعينة الذي يمثل وزن المادة الجافة الغير ذائبة بالماء. وتم

حساب ذائبية الغشاء في الماء حسب المعادلة الآتية: (Choi and Han, 2001)

$$100 \times \frac{\text{الوزن الابتدائي للعينة (غم) - الوزن النهائي للعينة (غم)}}{\text{الوزن الابتدائي للعينة (غم)}} = \text{قابلية الغشاء على الذوبان بالماء (\%)}$$

4-7-3: تقدير نفاذية الغشاء لبخار الماء Water Vapor Permeability (WVP)

تم اختبار نفاذية غشاء PLA لبخار الماء حسب الطريقة القياسية (ASTM,E96-00;Teo and Chow,2014) ، وضع 10 مل من الماء المقطر في طبق بتري (قطره 8 سم وبعمق 1.5سم) ، وضغط البخاري النسبي = 1 يحتوي على ماء مقطر بعمق 1.3سم ثم غطيت فوهة القدح بالغشاء المحضر وأحكم الغلق باستعمال زوج من المطاط الدائري ، بعدها وزن الطبق مع محتوياته لأقرب 0.01 غم ووضع في مجففة Desiccator إضافة الى استعمال مادة التجفيف كبريتات الكالسيوم اللامائية من اجل ضبط الرطوبة النسبية 0% عند درجة حرارة 25 ± 1 م . وتمت متابعة الفقد بالوزن كل ساعة وبعدها تمت المتابعة مرة واحدة لفترة 6 ايام . بعد ثبات الوزن حسبت نفاذية بخار الماء للأغشية المحضرة كما يأتي:

أولاً : رسم العلاقة بين الفقد بالوزن (غم) مقابل الوقت (ساعة) لتقدير الإنحدار Slope من المنطقة

الخطية وكان معامل الارتباط 0.992 ولتقدير معدل انتقال بخار الماء WVTR استخدمت المعادلة رقم 1

$$WVTR = \frac{Slope}{Film\ area} \frac{gm}{m^2.h} \quad (1)$$

WVTR = معدل انتقال بخار الماء (غم/ م² ساعة)

Film area = مساحة الغشاء = مساحة فوهة القدح من القطر الداخلي م²

بعدها تم تقدير نفاذية بخار الماء للغشاء (WVP) كالآتي:

$$WVP = \frac{WVTR}{S(R_1 - R_2)} \times d \quad (2)$$

اذ ان:

S : الضغط الجوي = 10⁵ باسكال R1 : الرطوبة لتكيف الغشاء

R2: الرطوبة داخل الوعاء d : سمك الغشاء

3-7-5: تقدير قوة الشد ونسبة الاستطالة إلى حد القطع

Determination strength and percentage of elongation at break

قيست قوة الشد ونسبة الاستطالة حتى القطع لغشاء PLA باستخدام جهاز Texture analyzer التابع لمركز أبحاث البوليمر/ جامعة البصرة ، وحسب المواصفة الأمريكية للفحص والمواد American Society for Testing and Materials (ASTM) ذات الرقم D-882.91 لسنة 1996 كما وصفها (Sothornvit and Krochta ,2000). قطع الغشاء على شكل اشربة بطول 80 ملم وعرض 20.5 ملم ، لصقت عدة طبقات من الشريط اللاصق على الشريط الغشائي لغرض تثبيته بصورة جيدة بين مقبضي الجهاز وكانت المسافة بين المقبضين 60 ملم والذي يمثل الطول الابتدائي للغشاء و كانت سرعة السحب 50 ملم / دقيقة ويتم حساب قوة الشد والاستطالة الى حد القطع من منحنى الاجهاد والمطاوعة Strees-strain Curve والتي رسمها الجهاز بشكل خط بياني يمثل العلاقة ما بين القوة المسلطة على العينة ومقدار الاستطالة التي

تحدث للغشاء. تم حساب مقاومة الشد للعيونة الغشائية باستعمال المعادلة الآتية:

$$T.S = \frac{F_{max}}{A}$$

إذ أنّ

T.S : مقاومة الشد (ميكا باسكال)

F_{max} : المقاومة القصوى اللازمة لقطع العينة (نيوتن)

A : مساحة المقطع العرضي للعينة (ملم²) وتساوي السمك × عرض العينة

أما النسبة المئوية للاستطالة حتى القطع (E) فقد حسبت بقسمة قيمة الاستطالة في لحظة انقطاع العينة على

الطول الابتدائي للعينة وضرب الناتج في 100 ، كما في المعادلة الآتية :

$$E\% = \frac{\Delta L}{L - L_0} \times 100$$

إذ أنّ

E % : النسبة المئوية للاستطالة حتى القطع

L : التغير في طول العينة (ملم)

L_0 : الطول الابتدائي (ملم)

3-7-6: المسح التفاضلي المسعري (DSC) Differential Scanning Calorimetry

أستخدم جهاز DSC الموجود في مختبر ابحاث البوليمر/ جامعة البصرة لحساب درجة الانصهار والنسبة

المئوية لتبلور PLA ، حضرت العينة بشكل مسحوق واخذ 10 ملغم منها ووضعت في وعاء من الالومنيوم

وثبت في وحدة التسخين في الجهاز، تمت معايرة الجهاز باستعمال مادة Indium ، استعمل مدى من درجات

Materials and Methods

المواد وطرائق العمل

الحرارة تراوحت من درجة حرارة الغرفة إلى 300 م وبمعدل تسخين 10 درجات 1 دقيقة وتركت لفترة دقيقة واحدة لتقدير درجة حرارة الانصهار للعينات وحسبت النسبة المئوية للتبلور من المعادلة التالية (Battezzore *et al.*,2011).

$$X_c \% = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_f} \times 100$$

حيث ان

X_c درجة التبلور المئوية

ΔH_m حرارة انصهار البوليمر

ΔH_f حرارة انصهار البوليمر المتبلور كلياً

3-7-7: تشخيص المجاميع الفعالة بتقنية طيف الاشعة تحت الحمراء

Analysis by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

شخصت المجاميع الفعالة بجهاز الاشعة تحت الحمراء (FTIR) المجهز من شركة Jasco اليابانية ذي الرقم 4200 التابع الى مركز ابحاث البوليمر/ جامعة البصرة. تم تجفيف الغشاء وطحنه بشكل مسحوق جاف ثم خلط مع بروميد البوتاسيوم اللامائي بنسبة 100:1 ثم وضع الخليط بالمكبس وتم ضغطه تحت ضغط عالي 2500كغم/سم² لغرض الحصول على قرص صغير بقطر 1 سم وسمك 1-2 ملم ، وضع القرص في المكان المخصص له في الجهاز . قُدرت النسبة المئوية للنفاذية المنتقلة تجاه الطول الموجي الممتص في منطقة بين 400-4000 سم⁻¹ .

3-7-8: تحلل غشاء PLA في التربة Biodegradation PLA film in soil

تمت دراسة تحلل الاغشية في التربة بوضع الغشاء بمعدل مكررين داخل التربة بعمق 17 سم ، وكان الأس

الهيدروجيني 7.6. تراوحت النسبة المئوية للرطوبة 18-22% ودرجة حرارة 20 م ولفترة 28 يوم، تم غسل الغشاء من الاتربة بعد رفعه من التربة وتجفيفه بقطعة قماش جافة ثم ترك ليجف. تم حساب النسبة المئوية لمقدار الفقد في الوزن كل 7 ايام (Martucci and Ruseckaite, 2009). حسب المعادلة التالية:

$$Weight\ loss(\%) = \frac{W_o - W_f}{W_o} \times 100$$

أذ ان:

W_o : وزن الغشاء الابتدائي قبل عملية الطمر داخل التربة.

W_f : وزن الغشاء بعد فترة زمنية من عملية الطمر.

3-8: تطبيقات متعدد حامض اللاكتيك PLA في حفظ الاغذية

3-8-1: تحضير الثمار للتغليف

تم شراء ثمار التمر وهي في مرحلة الخلال صنف (البرحي) من الاسواق المحلية في البصرة، جلبت الثمار الى المختبر باكياس بلاستيكية محكمة الغلق وفرزت الثمار حيث تم استبعاد التالف منها واختيار الاحجام المتقاربة، ثم غسلت لإزالة الأتربة والاساخ وتركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة، تم تغليف ثمار خلال البرحي بالاغشية على شكل اكياس صغيرة وكبست حرارياً، حُزنت العينات في الثلاجة على درجة حرارة 1 ± 6 ° م لفترة 4 اسابيع مع اخذ الفحوصات كل 7 ايام.

المعاملة الاولى: عينة السيطرة بدون غشاء

المعاملة الثانية: غشاء بولي اثيلين عالي الكثافة HDPE film

المعاملة الثالثة: غشاء بولي اثيلين واطى الكثافة LDPE film

المعاملة الرابعة: غشاء متعدد اللاكتيك PLA film

المعاملة الخامسة : غشاء متعدد اللاكتيك (1%Si NPs) + PLA film

المعاملة السادسة : غشاء متعدد اللاكتيك (3%Si NPs)+ PLA film

المعاملة السابعة : غشاء متعدد اللاكتيك (5%Si NPs)+ PLA film

3-1-8-1: التغير في وزن الثمار

تم وزن العينات اسبوعياً باستعمال ميزان حساس.

3-1-8-2: تقدير الحموضة الكلية Determination total acidity

أتبعت الطريقة الواردة في A.O.A.C.(1970) في تقدير الحموضة الكلية بالطريقة التسحيحية اذ تم هرس 5غم

من الثمرة واطافة 50 مل ماء مقطر واططها بخلاط كهربائي Blender ثم ترشيتها بورق ترشيش واخذ 10 مل

من الراشع وتسحيحه مقابل القاعدة NaOH عيارية 0.1 بوجود الدليل الفينونفثالين لحين تغير اللون (ظهور اللون

الوردي) . تم حساب الحموضة وفق المعادلة التالية :

$$\text{الحموضة الكلية \%} = \frac{\text{حجم NaOH (مل)} \times \text{عيارية القاعدة} \times 0.064}{\text{حجم العينة}} \times 100$$

محسوبة على اساس حامض الستريك

3-1-8-3: قياس أبعاد الثمار

تم قياس طول الثمرة وقطرها بواسطة Vernier

3-8-1-4: المواد الصلبة الذائبة الكلية Total soluble solid

وُزن 5 غم من ثمار الخلال وقطعت واضيف اليها 15 مل من الماء المقطر، هرسست جيداً باستعمال هاون خزفي ثم رشحت بواسطة اوراق ترشيح رقم 1 ، قدرت نسبة المواد الصلبة الذائبة باخذ قطرة من العصير ووضعها على عدسة جهاز الرفركتوميتر الرقمي Digital Refractometer إعتماًداً على طريقة (Shirokov,1968).

3-9: التحليل الاحصائي

تم تحليل النتائج احصائياً بإستعمال التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (CRD) واختبرت العوامل المدروسة بالاعتماد على اقل فرق معنوي بين المتوسطات (L.S.D) عند مستوى احتمالية (0.01) وإجراء التحليل الاحصائي بإستخدام Genstat (Sahoki and Wahib, 1990).

Results and Discussion

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

4- النتائج والمناقشة

1-4 : عزل بكتريا حامض اللاكتيك Isolation of LAB

تم اختيار 81 عزلة من المستعمرات النامية على وسط العزل MRS مختلفة من ناحية الشكل والحجم واللون التي شملتها الدراسة ويبين الجدول (1-4) المصادر التي تم استعمالها في عزل بكتريا حامض اللاكتيك.

جدول (1-4) : مصادر عزل بكتريا حامض اللاكتيك

عدد العزلات	رمز العزلة	مصادر عزل البكتريا
11	YL	لبن رائب جاموس
11	YD	لبن رائب بقري
7	MC	حليب بقر
11	C	جبين
9	MB	حليب جاموس
7	K	قيمر
9	F	مخلل لهانة
9	PO	مخلل زيتون
7	S	مخلل خسروات
81		المجموع

Results and Discussion

النتائج والمناقشة

1-1-4: تنقية العزلات

أُجريت عملية تنقية العزلات باستخدام طريقة التخطيط كما موضح في الشكل (1-4) لحين الحصول على مزارع نقية Pure cultures ذات مستعمرات متجانسة من حيث اللون والشكل والحجم لإجراء الفحوصات التشخيصية عليها.



شكل (1-4): تنقية المستعمرات بطريقة التخطيط على وسط MRS agar

2-4: تشخيص بكتريا حامض اللاكتيك Identification of Lactic acid bacteria

1-2-4: الفحص المظهري (الصفات المظهرية) Morphological tests

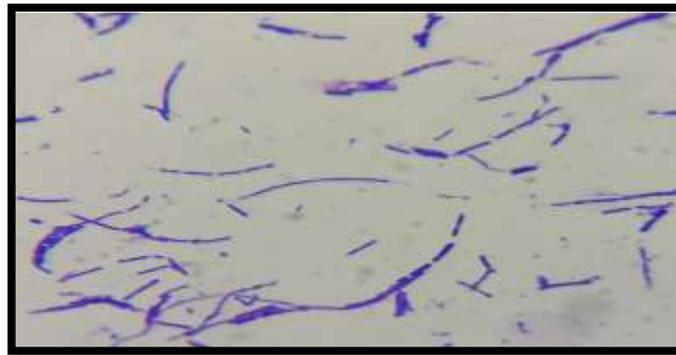
يبين الشكل (2-4) بعض اشكال العزلات البكتيرية مظهرياً ، اذ تميزت العزلات النامية على وسط MRS الصلب بكونها بيضاء إلى صفراء فاتحة اللون Creamy، دائرية بعضها محدبة الشكل والأخرى مسطحة نسبياً ، ذات حافة ملساء، غير لماعة (Holt et al., 1994).



شكل (2-4): المستعمرات المعزولة على وسط MRS الصلب

2-2-4: الفحص المجهرى Microscopic test

اظهر الفحص المجهرى كما موضح في الشكل (3-4) بأن جميع العزلات موجبة لصبغة جرام ، غير متحركة قسم منها تعود لجنس مكورات بكتريا حامض اللاكتيك ، كروية إلى بيضوية الشكل وتتنظم بشكل أزواج أو سلاسل قصيرة او بشكل رباعي Tetrad. والقسم الاخر تعود لجنس عصيات بكتريا حامض اللاكتيك ، عصوية الشكل وتتنظم بشكل عصيات قصيرة أو طويلة مفردة او مزدوجة او بهيئة سلاسل قصيرة من 3-5 خلايا وهذا يتفق مع ما ذكره (Wassie and Teketay, 2016 ; Holt *et al.*,1994) .



شكل (3-4): تصبغ كرام للعزلات المتحصل عليها من مصادر مختلفة

3-4 : الاختبارات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية Biochemical tests

بينت نتائج غربلة الاولية للعزلات عند اختبار انتاج الغاز من الكلوكوز ان 42 عزلة كانت موجبة للفحص وبالتالي قابليتها على انتاج الغاز وهذا يدل على انها تابعة الى مجموعة بكتريا غير متجانسة التخمر و39 عزلة سالبة الفحص لعدم تمكنها من انتاج غاز CO₂ وهذا يؤكد تابعيتها الى بكتريا متجانسة التخمر (Wassie and . Wassie, 2016).

أكدت النتائج أن عزلات بكتريا حامض اللاكتيك كانت سالبة غير مستهلكة للسترات اذ لم يتحول اللون الاخضر الى اللون الازرق وهذا يعد فحصاً سالباً وكانت النتائج متفقة مع ما ذكره (Holt *et al.* (1994). بينت نتائج اختبار تسييل الجيلاتين ان جميع العزلات اعطت نتيجة سالبة بسبب عدم تمكن العزلات من تسييل الجيلاتين لافتقارها الى انزيم الجيلاتينز.

أكدت النتائج أن جميع العزلات اعطت فحصاً سالباً وغير مختزلة للنترات وذلك لعدم قدرتها على افراز إنزيم Nitrate reductase الذي يعمل على اختزال النترات الى النتريت.

بينت النتائج أن جميع العزلات غير منتجة للأمونيا من الأرجنين حيث أعطت فحصاً سالباً لفحص انتاج الامونيا من الارجنين كما كانت نتائج اختبار الكاتاليز سالبة وهي مطابقة لما وجدته (Mithun *et al.*, 2015). اكدت نتائج تشخيص انتاج الحامض من خلال تنمية العزلات على وسط MRS-CaCO₃ الصلب ان جميع العزلات تابعة الى الاجناس العائدة لبكتريا حامض اللاكتيك والتأكد من تكوين هالة شفافة clear zone حول المزارع البكتيرية بسبب الحامض المنتج من قبل البكتريا (Teusink and Molenaar, 2017; Mahulette *et al.*, 2016).

تم غربلة العزلات واختيار 9 عزلات الأكفأ انتاجاً لحامض اللاكتيك اعتماداً على تكوين الهالة ذات القطر الأكبر إضافة الى تقدير الحموضة الكلية وإحتسابها كحامض اللاكتيك، ومتابعة إجراء الفحوصات الكيموحيوية اللاحقة.

Results and Discussion

أظهرت نتائج النمو في دوال حامضية مختلفة ان عزلات بكتريا حامض اللاكتيك لها قدرة متباينة على النمو في دالة حامضية 3 و4.5 و9.6، إذ لم تنمو على الأس الهيدروجيني 3 و9.6 بينما جميع العزلات أظهرت نمو جيد عند 4.5 كما موضح في الجدول (2-4). وتباينت قابلية عزلات بكتريا حامض اللاكتيك النمو على درجات حرارة (10 و15 و37 و45)°م كما موضح في الجدول (2-4). كما اختلفت في قابلية نموها في التراكيز الملحية (2 و4 و6.5) % كما موضح في الجدول (2-4).

جدول (2-4): الاختبارات الكيموحيوية للعزلات المنتخبة والعايدة لبكتريا حامض اللاكتيك

رقم	رمز العزلة	انتاج الحامض	انتاج الغاز	استهلاك السترات	انتاج الكايز	تسييل الجيلاتين	انتاج الأمونيا	اختزال نترات	درجة الحرارة (م)				تحمل الاس الهيدروجيني			تحمل الملح		
									45	37	15	10	9.6	4.5	3	6.5	4	2
1	YD1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
2	YD2	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
3	YL3	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
4	YL4	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
5	MC5	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
6	MC6	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
7	MB7	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
8	MB8	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
9	MB9	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-

(-) عدم النمو (+) وجود نمو

يبين الجدول رقم (3-4) اختلاف قابلية العزلات البكتيرية على تخمر السكريات والذي يعد من الأختبارات المهمة

Results and Discussion

التي تؤكد تشخيصها على مستوى النوع. ان إنتاج الحوامض العضوية نتيجة تخمر السكريات يعمل على تغير لون الوسط من اللون الاحمر الى اللون الاصفر نتيجة التغير في الأس الهيدروجيني لوسط النمو والذي يعد نتيجة موجبة. وبالاعتماد على التشخيص المذكور في (Schleifer.,2009).

وتمكنت العزلتين (YL4،YL3) من تخمر السكريات الواردة في الجدول (3-4) ماعدا سكر الزيلوز فهي تشابه النوع *L.paraplantarum*. اما العزلتين (MC6 ، MC5) أظهرت قدرتها على تخمير جميع السكريات وهي تشابه في ذلك النوع *L.plantarum*.

جدول (3-4) قابلية العزلات البكتيرية المنتخبة في تخمر انواع مختلفة من الكربوهيدرات

العزلة	كلوكوز	ارابينوز	مانتوز	مانيتول	زيلوز	فركتوز	مانوز	رايبوز	سليبيوز	كالأكتوز	مليبيوز	سكروز	سوربيتول	لاكتوز	رافينوز
YD1	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
YD2	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
YL3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YL4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MC5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MC6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MB7	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
MB8	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
MB9	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-

Results and Discussion

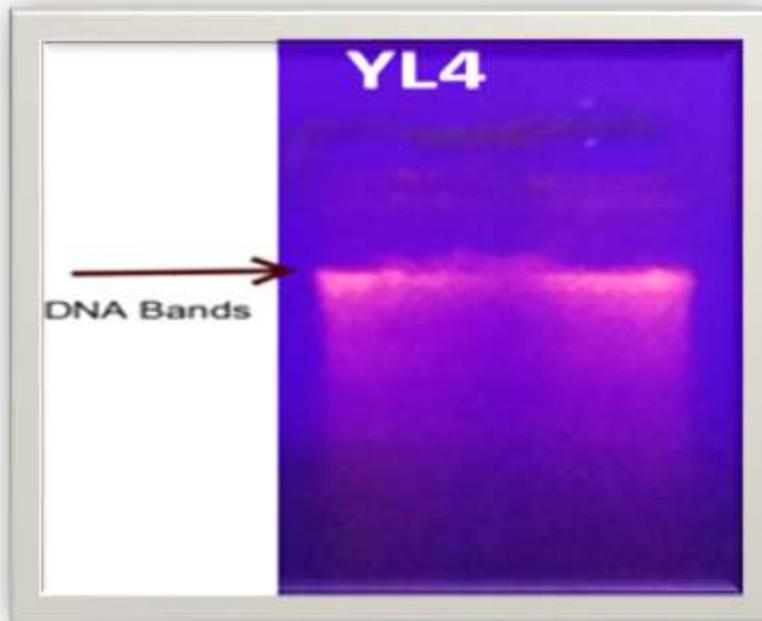
أما العزلتان (YD1، YD2) فقد تبين عائدتها الى النوع *L.bulgaricus* حيث أستطاعت تخمر السكريات الكلوكوز واللاكتوز والفركتوز ولم تستطع تخمر بقية السكريات.

وإِعتماداً على صفات تخمير السكريات تبين ان العزلات (MB7، MB8، MB9) تعود الى النوع *L.casei* حيث خمرت جميع السكريات في الجدول ماعدا السكريات الأرابينوز الرافينوز والزايروز والمليبوز.

4-4: التشخيص الجيني

4-4-1 : استخلاص الحامض النووي DNA لبكتريا حامض اللاكتيك

بعد ان أجريت الأختبارات السابقة وأختيرت العزلة YL4 الأكثر إنتاجاً لحامض اللاكتيك ، تم تأكيد تشخيص العزلة على اساس النوع بالتشخيص الجزيئي، إذ أوضحت تقنية ترحيل حزم DNA لعزلة البكتريا على هلام الاكاروز 1% بان عملية الاستخلاص كان جيداً وظهر الحزم بدرجة عالية من الوضوح كما يبين الشكل (4-4).

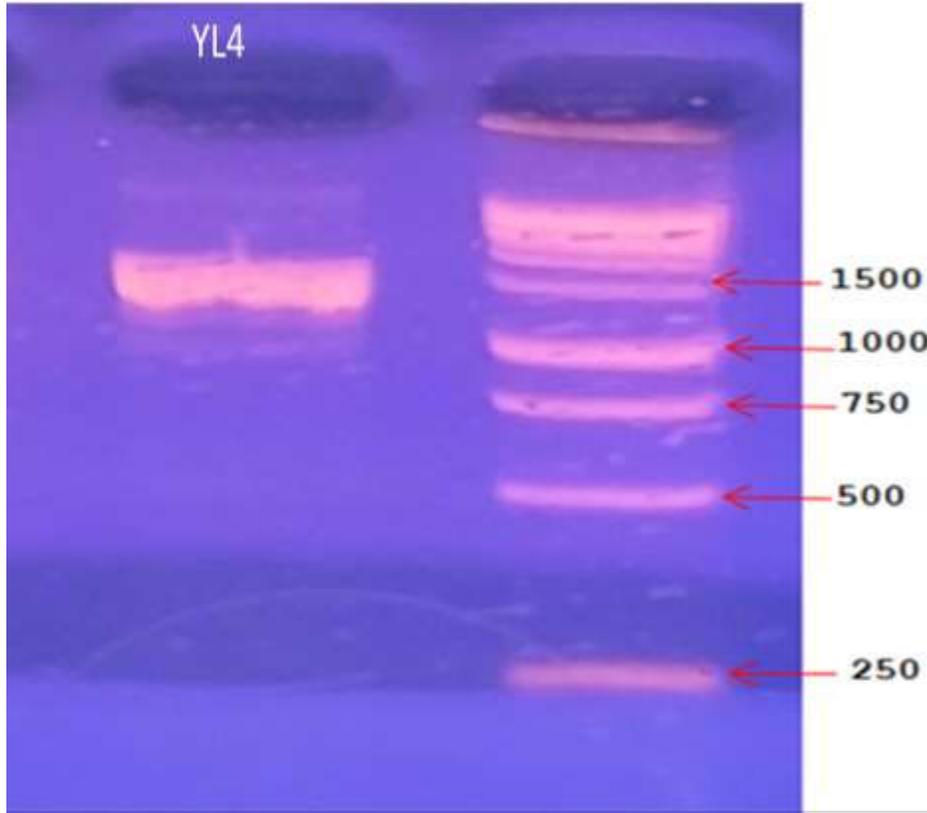


شكل (4-4): الترحيل الكهربائي لـ DNA المستخلص من العزلة البكتيرية YL4

4-4-2: تضخيم الجين 16S rDNA بتقنية (PCR)

تم ظهور حزم واضحة للجين 16S rDNA في المنطقة (bp) 1500 للعزلة (YL4) عند الترحيل

الكهربائي على هلام الأكاروز وباستخدام مضخم الجين Universal primer كما موضح في الشكل (4-5).



شكل (4-5): تضخيم الجين 16S rDNA للعزلة المحلية YL4

4-4-3 : تتابع القواعد النروجينية

شُخصت العزلة المعزولة من اللبن الرائب للجاموس YL4 على مستوى السلالة إعتياداً على قراءة تتابع القواعد

النروجينية وكما موضح في الجدول (4-4) وأظهرت العزلة *Lactobacillus paraplantarum* LP IQ

(YL4) تطابقاً 100% عند تحليلها مع السلالة المرجعية *Lactobacillus paraplantarum* وسُجلت في

البنك الياباني Gene bank تحت الرقم MT 622658 كما موضح في الملحق (5).

Results and Discussion

النتائج والمناقشة

جدول (4-4): تتابع القواعد النروجينية لعزلة بكتريا حامض اللاكتيك YL4

طول (bp)	تتابع القواعد النروجينية	العزلة
1181F	GCCAAATGGCGGCTGCTATACATGCAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTG CTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGG AAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATA ACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCCGGCTATCACTTTTG GATGGTCCC CGGCGTATTAGCTAGATGGTGAGGTAACGGCTCACCATGGCAAT GATACGTAGCCACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC CAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTG ATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGT TAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAG AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG TTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATG TGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTG CAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGA AGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTTAGGCTCGA AAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCATAACCGTAAACGAT GAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA GCATTCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCT TACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAAAGATTAGACGTTCCCTTCGGGG ACATGGATACGGGTGGGGCATGGGTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGG TTAAGTCCC GCCACGAGCGCACCCCTTATTATCATTGCCGCATTAATTGGGCCTC TGGTAGAAGGCCGGGACAACCCGAGAAGGGGGGGGTGGAGTCCATCC	<i>Lactobacillus paraplantarum strain LP IQ MT622658</i>
1181R	GGATGGACTCCACCCCCCTTCTCGGGTTGTCCCGCCTTCTACCAGAGGCC AATTAATGCGGCAATGATAATAAGGGTGCCTCGTGGCGGGACTTAACCCAACA TCTCACGACACGAGCTGACGACACCCATGCCCCACCCGTATCCATGTCCCCGAA GGGAACGTCTAATCTTTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCT TCGCGTAGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCA ATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGAATGCTTAATGC GTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACACTTAGCATTTCATCGTTT ACGGTATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCATACTTTTCGAGCC TAAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCTTTCGCCACTGGTGTCTTCCATAT ATCTACGCATTTACCCGCTACACATGGAGTTCACCTGTCTCTTCTGCACTCAA GTTTCCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGA CTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGC CACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTA AATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAACAACAG AGTTTTACGAGCCGAAACCCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTT TCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTG TCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTGGGCTACGTATCATTGCCA TGGTGAGCCGTTACCTACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGT GATAGCCGAAGCCATCTTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGG TATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCCACGT GTTACTCACAGTTTCGCCACTCACTCAAATGTAATCATGATGCAAGCACCAAT CAATACCAGAGTTCGTTTCGACTGCATGTATAGCAGCCGCCATTTG	

5-4: تقدير مكونات الشرش

يوضح الجدول (5-4) نتائج تحليل مكونات الشرش .

الجدول (4 - 5) التركيب الكيميائي الشرش

المكونات	الشرش %
اللاكتوز	3.44
الدهن	0.18
البروتين	1.29
الماء	92.2

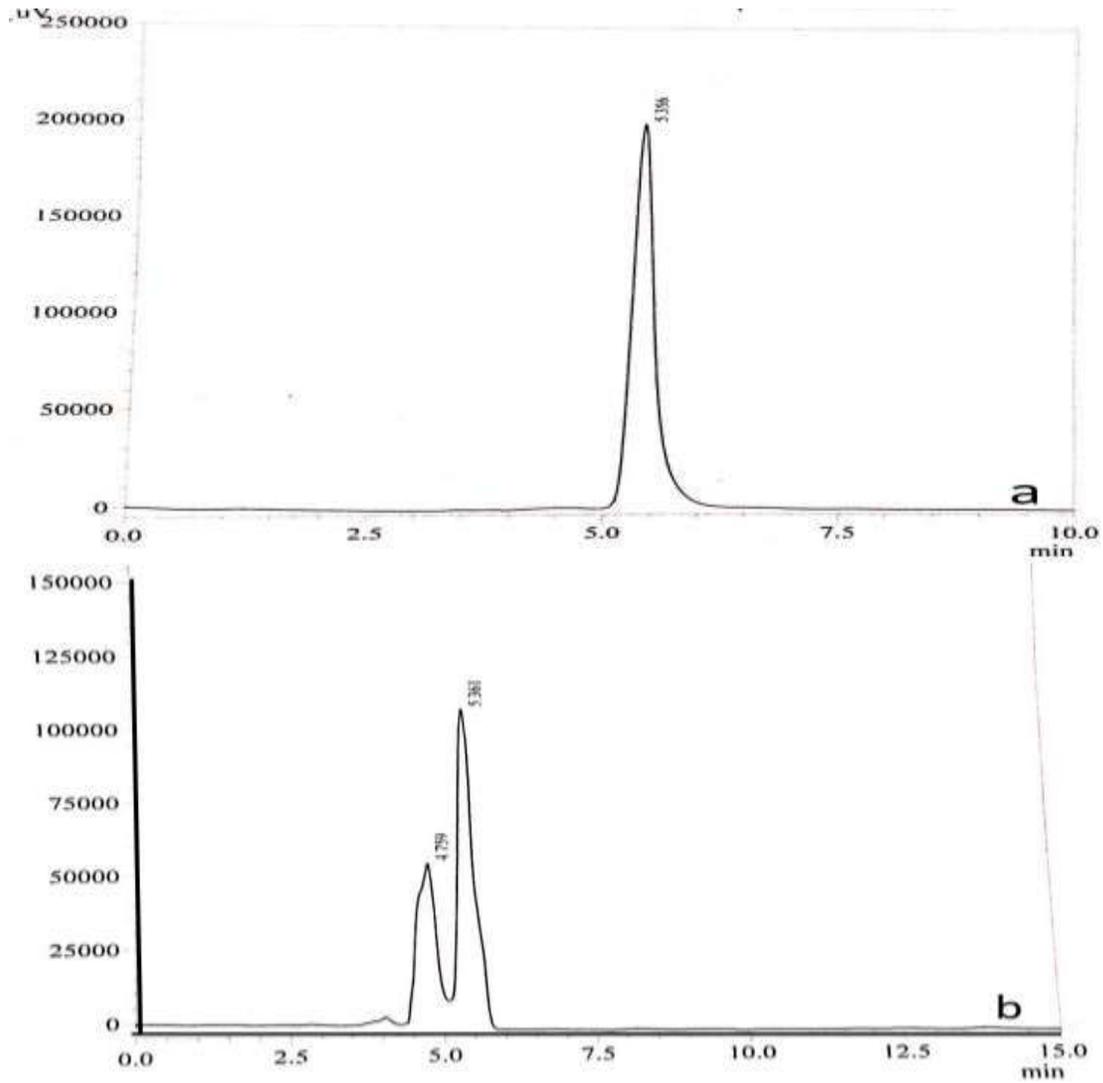
4-5-1: إنتاج حامض اللاكتيك

تميز الحامض المنتج من العزلة بكونه مادة سائلة ذات قوام زيتية خفيفة بلون ابيض مائل قليلاً الى الاصفرار ، تم تشخيصه بالطرق المطيافية المتعارف عليها (NMR,HPLC,FTIR).

4-5-2: تشخيص حامض اللاكتيك بجهاز كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة

تم تشخيص حامض اللاكتيك المنتج من العزلة البكتيرية YL4 باستخدام الجهاز HPLC والموضح في الشكل (a6-4) حيث تبين من الشكل (b6-4) عند المقارنة تشابه وقت ظهور (زمن الاحتجاز) الحامض المنتج مع وقت ظهور حامض اللاكتيك القياسي اذ أشارت نتائج التحليل بأن وقت ظهور حزمة الحامض القياسي الممثلة بالقمة عند زمن احتجاز $Ret.time = 5.356$ كما موضح في الجدول (6-4).

في حين كان وقت ظهور حزمة الحامض المنتج عند وقت احتجاز 5.361 في حين توجد حزمة اخرى عند وقت احتجاز 4.759 عُزيت الى وجود مركبات اخرى. والجدول (6-4) يبين نتائج تحليل نموذج حامض اللاكتيك المنتج من البكتريا قيد الدراسة.



شكل (6-4) كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة -a حامض اللاكتيك القياسي b - حامض اللاكتيك

المنتج من العزلة المحلية (*L.paraplantarum* (YL4)

جدول(6-4) تحليل نموذج حامض اللاكتيك القياسي وحامض اللاكتيك المنتج من العزلة المحلية *L.paraplantarum*

Peak	Ret.time	Area	Heigh	Area%
Standard LA	5.356	4499	2268	100.000
Unknown	5.361	1008451	77911	73.462

4-5-2-1: تقدير الحموضة

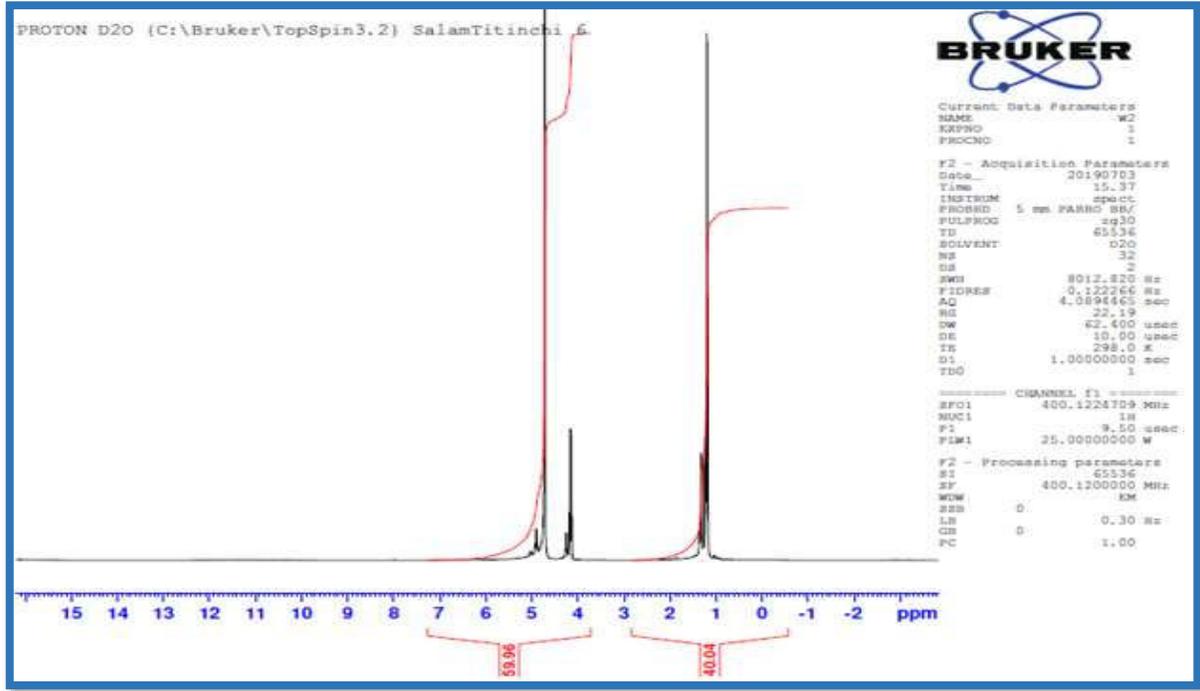
يلاحظ في الجدول (7-4) كمية حامض اللاكتيك المنتج من العزلة (YL4) المنمأة على وسط الشرش اذ انخفض الأس الهيدروجيني للشرش من 6.4 الى 4.5 وكانت النسبة المئوية للحموضة 3.15 .

جدول (7-4) كمية الحامض المنتج من العزلة *L.paraplantarum* على وسط الشرش

الحموضة الكلية%	الأس الهيدروجيني النهائي	العزلة
3.15	4.5	YL4

4-5-3: تحليل حامض اللاكتيك بجهاز ¹H-NMR

يلاحظ من شكل الطيف نتيجة تحليل حامض اللاكتيك المنتج من البكتريا بجهاز NMR الموضح في الشكل (7-4) بأن الحزمة في الموقع (1-1.5) جزء لكل مليون (ppm) عائدة الى مجموعة CH₃ في الحامض في حين ان الحزم المحصورة ما بين (4-4.5) جزء لكل مليون تعود الى بروتون ذرة الكربون الثانية ، وهذا مطابق لما نشر في (Ramanjooloo et al.2009 ; Bouteille et al. 2013) اذ بينوا ان مواقع (CH₃) في حامض اللاكتيك تظهر عند موقع 1-1.5 اما بروتونات مجموعة الهيدروكسيل (OH) ظهرت في موقع الحزم المحصورة ما بين (4-4.5) جزء لكل مليون .علماً ان حزمة المذيب (D₂O) ظهرت بشدة عالية في الموقع 4.8 (ppm).

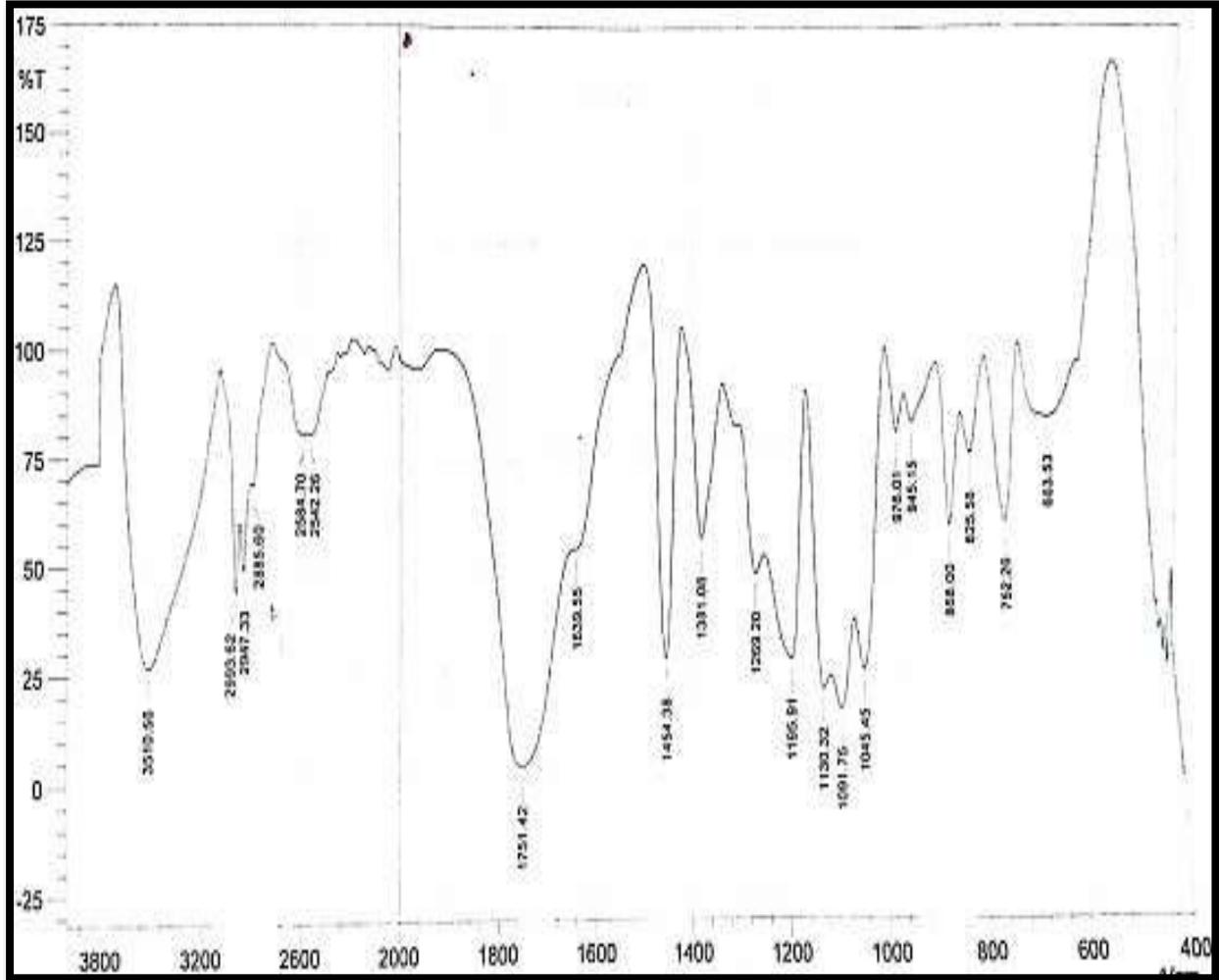


شكل (4-7): الطيف التحليلي بجهاز $^1\text{H-NMR}$ لحامض اللاكتيك المنتج من بكتريا *L. paraplantarum*

4-5-4: طيف الاشعة تحت الحمراء FTIR-analysis

تم دراسة اطيف الاشعة تحت الحمراء FTIR بمدى من 4000-400 سم⁻¹ واخذت الاطيف الى حامض اللاكتيك المعزول ومتعدد حامض اللاكتيك على قرص من كلوريد الصوديوم وكلوريد البوتاسيوم. اذ يبين الشكل (4-8) طيف FTIR للحامض المعزول اذ تشير الحزمة في الموقع 3510 سم⁻¹ الى تردد مجموعة الهيدروكسيل (OH) في المركب، في حين تشير الحزم في المواقع (2993,2947,2885) سم⁻¹ الى تردد اصرة C-H . والحزمة في الموقع 1454 تعزى الى تردد مجموعة CH₃ في المركب بينما تشيرحزم المنطقة من (1300-1000) سم⁻¹ الى تردد المط (Stretching vibration) لاصرة C-C و C-O كما تم الاشارة الى مواقع تلك الحزم من قبل الباحثين (Paucean *et al.*, 2017; Bureau *et al.*, 2009).

اما الحزمة الرئيسية للمركب والتي تعتبر كدليل واضح لتكوين الحامض والحاوي على رابطة متعدد الاستر في الموقع 1751 سم⁻¹ والتي تعزى الى مجموعة الكربونيل في الحامض وهذا ماكدته Vodnar *et al.*, (2010) الى ظهور مجموعة الكربونيل في الموقع نفسه.



شكل (4-8): طيف FTIR لحامض اللاكتيك المنتج من العزلة المحلية *L. paraplantarum*

من ناحية اخرى اشار Yoshida *et al.* (1999) الى ان هناك حزم معينة في طيف FTIR يمكن الاستدلال عليها لوجود الحامض حيث وجد ان الحزمة في الموقع 1127 سم⁻¹ هي احدى الحزم الدالة على وجود الحامض بينما أكد Huang *et al.* (2018) الى ان الحزمة في الموقع 1132 سم⁻¹ هو دليل على وجود حامض اللاكتيك.

Results and Discussion

النتائج والمناقشة

4-5-5: دراسة الظروف المثلى لانتاج حامض اللاكتيك

4-5-5-1: الأس الهيدروجيني الابتدائي الأمثل

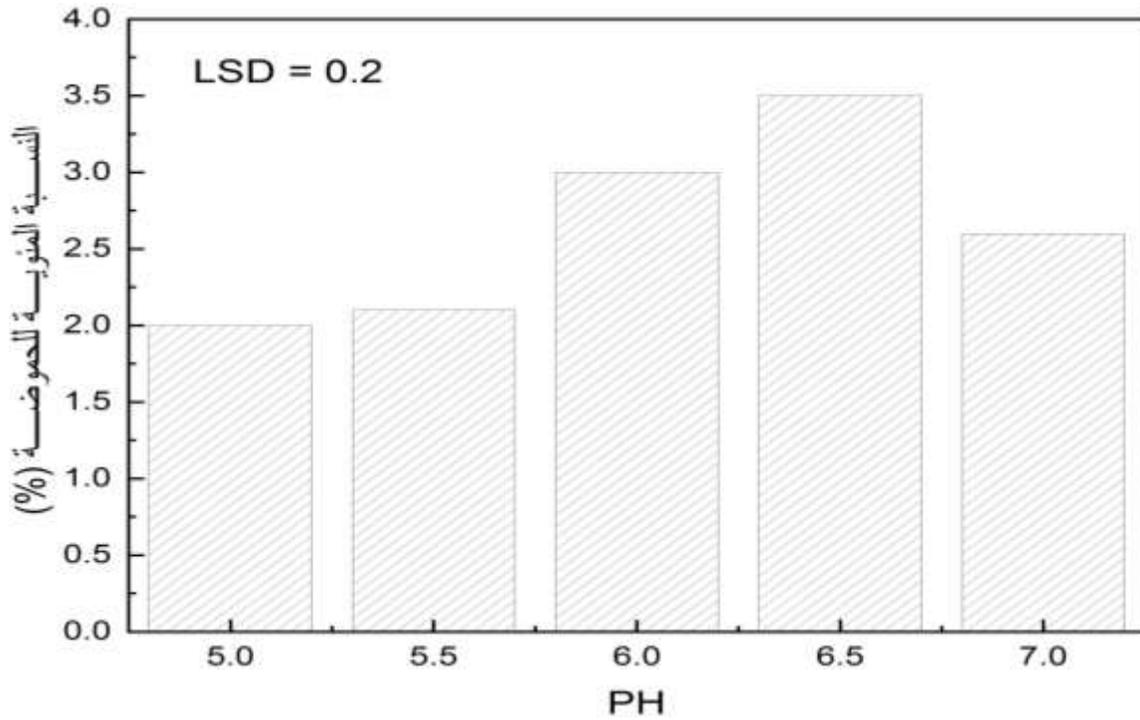
يوضح الشكل (4-9) نتائج تأثير الأس الهيدروجيني الابتدائي لوسط تخمر الشرش على إنتاج حامض

اللاكتيك. اذ يُلاحظ ان اعلى انتاج للحامض كان عند الاس الهيدروجيني 6.5 اذ بلغ 3.5% في فترة تخمر

72 ساعة وعلى درجة حرارة 37 م. بينما تفاوت الإنتاج للحامض على الأس الهيدروجيني (5, 5.5, 6, 7)

وكان (2.0, 2.1, 3.0, 2.6) % على التوالي. كما بينت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية للأس

الهيدروجيني 6.5 والأسس 5 و6 و7.



شكل (4-9) تأثير الأس الهيدروجيني الابتدائي على انتاج حامض اللاكتيك من *L.paraplantarum*

ان كمية الحامض المنتجة تعتمد على الأس الهيدروجيني الابتدائي المناسب للبكتريا المستعملة ويؤدي الأس

الهيدروجيني الابتدائي المنخفض الى خفض الأس الهيدروجيني لوسط النمو بسرعة مما يسبب توقف عمل

Results and Discussion

النتائج والمناقشة

البكتريا. بينما يحتاج الأس الهيدروجيني المتعادل الى المزيد من الوقت للوصول الى الأس الهيدروجيني الذي تتوقف به البكتريا وهذا يتيح إنتاج اعلى من الحامض (Abdel-Rahman *et al.*,2013).

يؤثر الأس الهيدروجيني في إنتاج أي منتج أيضي معين لذا يجب المحافظة على مدى ضيق من الأس الهيدروجينية لأن تحديد pH الوسط يُعد من العوامل المهمة جداً في زيادة الإنتاجية لذا تُضاف الى اوساط التخمير مركبات تعمل منظمات للحموضة لغرض المحافظة على الأس الهيدروجيني فضلاً عن كونها مصادر مغذية للأحياء المجهرية ، لذا تستخدم كربونات الكالسيوم لغرض المحافظة على أس هيدروجيني متعادل في الوسط ، فعند انخفاض pH تتحلل الكربونات وعند زيادة pH الوسط تعمل الاحماض المتحررة الى الوسط من خلال الاحياء المجهرية على خفض الأس الهيدروجيني (المصلح والحيدري،1989).

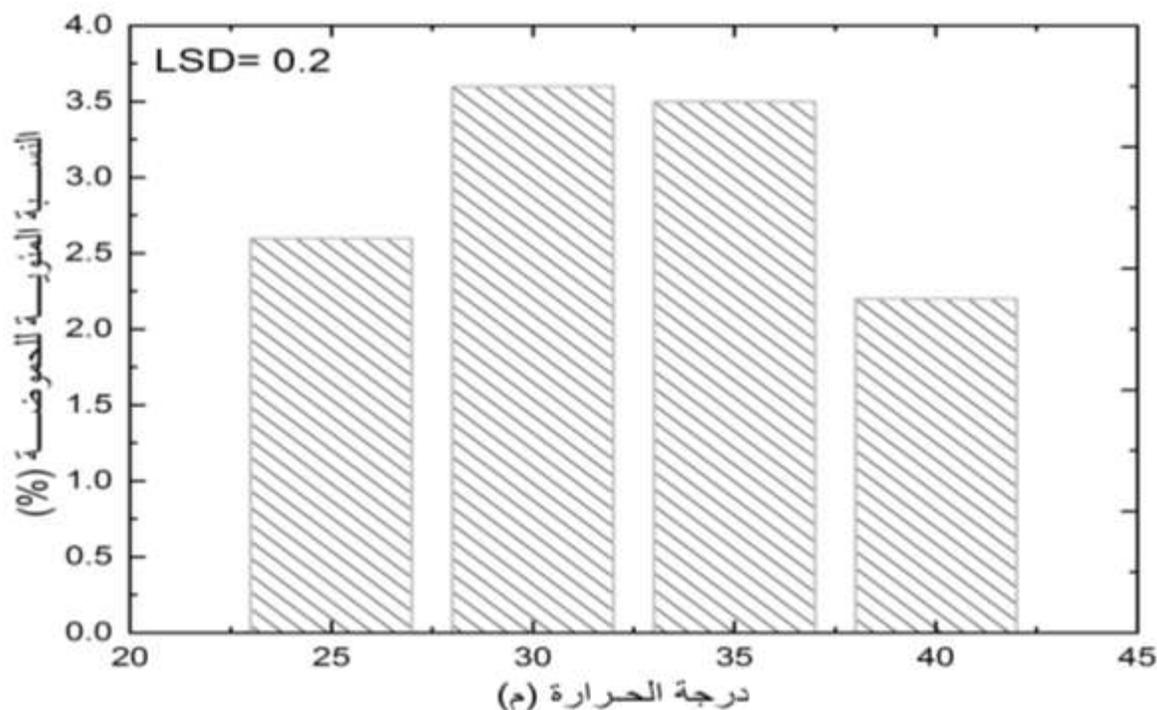
4-5-5-2: درجة الحرارة المثلى

يُلاحظ من الشكل (4-10) ان إنتاج حامض اللاكتيك يختلف باختلاف درجات الحرارة وكان اعلى إنتاج عند درجة 30 م تليها درجة 35 م وعلى اس هيدروجيني 6.5. كما بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية واختلاف مابين درجة حرارة 30 م و25 و40 °م والتي تراوحت قيمها (3.6 و2.6 و2.2)% على التوالي ولم تظهر اي فروق معنوية بين درجة حرارة 30 و35 م (3.6 و 3.5)% على التوالي.

تُعد درجة الحرارة احد اهم العوامل المؤثرة على النشاط الإنزيمي لأيض الخلايا وأكد (Ha *et al.*,2013) ان لكل انزيم درجة حرارة مثلى لنشاطه ويُظهر اقصى فعالية في تلك الدرجة ومع ارتفاع وانخفاض درجات الحرارة عن الدرجة المثالية للنمو يؤثر سلباً على الفعاليات الحيوية للخلية. كما يُعزى ان الإنتاج الأمثل للحامض في درجة حرارة 30م و35م الى ان بكتريا *L.paraplantarum* تُعد من البكتريا المحبة لدرجة حرارة متوسطة . Mesophilic

Results and Discussion

النتائج والمناقشة



شكل (4-10): تأثير درجات حرارة النمو على إنتاج حامض اللاكتيك

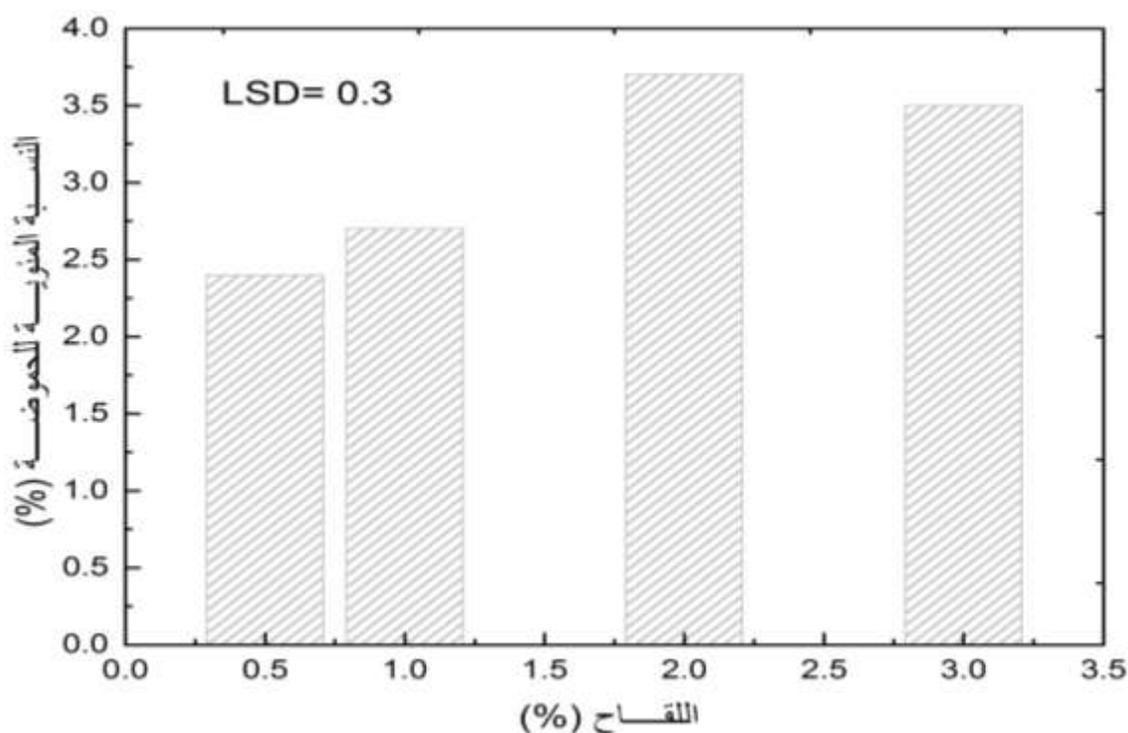
4-5-3: حجم اللقاح الامثل

أظهرت النتائج ان افضل إنتاج للحامض عند درجة حرارة 30م وأس هيدروجيني 6.5 ولفترة تخمر 72 ساعة كان عند إضافة حجم لقاح بنسبة 2% اذ بلغ 3.7% بينما تفاوت الإنتاج (2.4، 2.7، 3.5)% عند إضافة حجم لقاح (0.5، 1، 3) % على التوالي كما موضح في الشكل (4-11).

وبينت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية بين حجم لقاح 2% و(0.5 و1 و3)% اذ يُعزى انخفاض كمية الحامض المنتجة عند إضافة حجم اللقاح الى وسط التخمر بنسب (0.5 و1)% الى قلة المحتوى الميكروبي وبطأ نمو بكتريا *L.paraplantarum*. في حين ان إزدياد حجم اللقاح يؤدي الى زيادة في النمو خلال عملية التخمر واستهلاك اللاكتوز كمصدر كربون للنمو وعمليات الايض وتحويله الى حامض اللاكتيك مؤدياً الى سرعة إنتاج الحامض .

Results and Discussion

النتائج والمناقشة



الشكل (4-11): تأثير حجم اللقاح على إنتاج حامض اللاكتيك

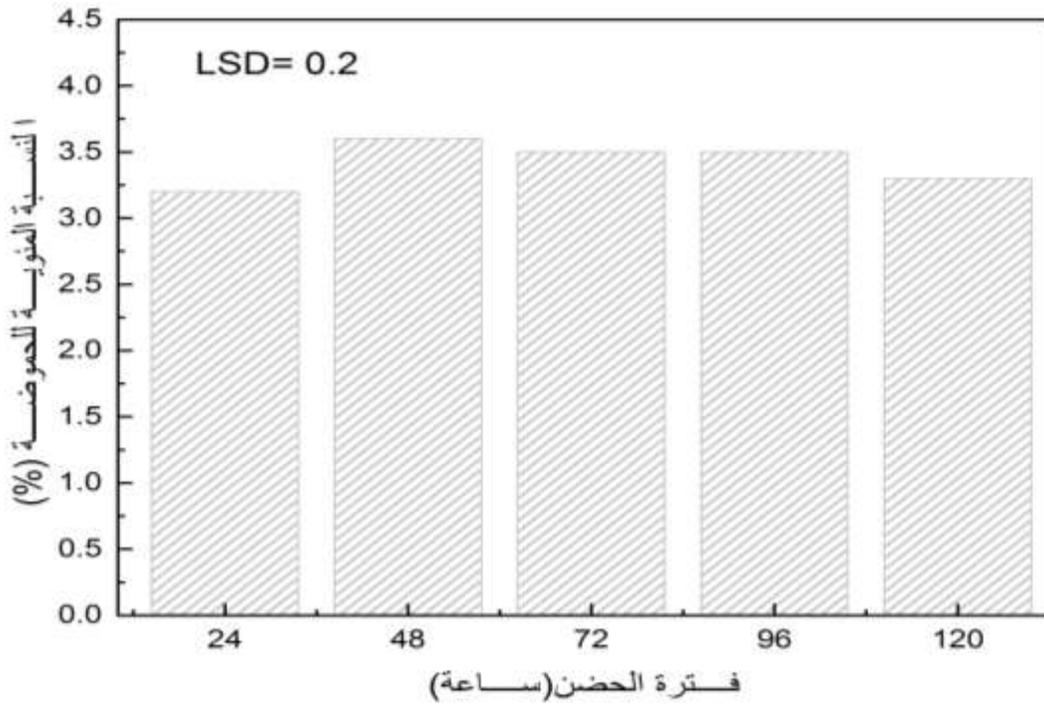
واتفقت هذه النتائج مع Wardani *et al.*(2017) عندما لاحظت ان الزيادة في حجم اللقاح يؤدي الى انخفاض في الأس الهيدروجيني وزيادة إنتاج الحامض. كما أكد Panesar *et al.*(2010) ان استهلاك اللاكتوز وانتاج الحامض يزداد بزيادة حجم اللقاح وصولاً الى 2% ولا يعقبه تطور في الانتاج عند زيادة حجم اللقاح عن 2%، في حين ان ازدياد حجم اللقاح يؤدي الى زيادة في النمو خلال عملية التخمير واستهلاك اللاكتوز كمصدر كربون للنمو وعمليات الايض وتحويله الى حامض اللاكتيك مؤدياً الى سرعة انتاج الحامض . واتفقت هذه النتائج مع Wardani *et al.*(2017) عندما لاحظت ان الزيادة في حجم اللقاح يؤدي الى انخفاض في الأس الهيدروجيني وزيادة إنتاج الحامض. كما أكد Panesar *et al.*(2010) ان استهلاك اللاكتوز وانتاج الحامض يزداد بزيادة حجم اللقاح وصولاً الى 2% ولا يعقبه تطور في الانتاج عند زيادة حجم اللقاح عن 2%.

Results and Discussion

النتائج والمناقشة

4-5-5-4: فترة التخمير المثلى

يوضح الشكل (4-12) نتائج اختبار فترات تخمر مختلفة على إنتاج الحامض. اذ بلغ معدل الانتاج (3.2, 3.6, 3.5, 3.5)% لكل من الفترات الزمنية (24, 48, 72, 96, 120) ساعة على التوالي. اذ بينت نتائج التحليل الاحصائي وجود تفاوت معنوي بين الفترات الزمنية وكان اعلى معدل لانتاج الحامض بعد مرور 48 ساعة مقارنةً مع الفترتين الزميتين 24 و 120 ساعة من المعاملة. وقد يعزى ذلك الى توفر سكر اللاكتوز في الفترة الاولى من التخمير واستهلاكه وانتاج الحامض. اما سبب انخفاض انتاج الحامض مع زيادة فترة التخمير يعزى الى استهلاك اللاكتوز وقلة العناصر المغذية في الوسط اضافة الى هلاك الخلايا .



شكل (4-12) تأثير فترات تخمر مختلفة على إنتاج حامض اللاكتيك

4-6: بلمرة حامض اللاكتيك

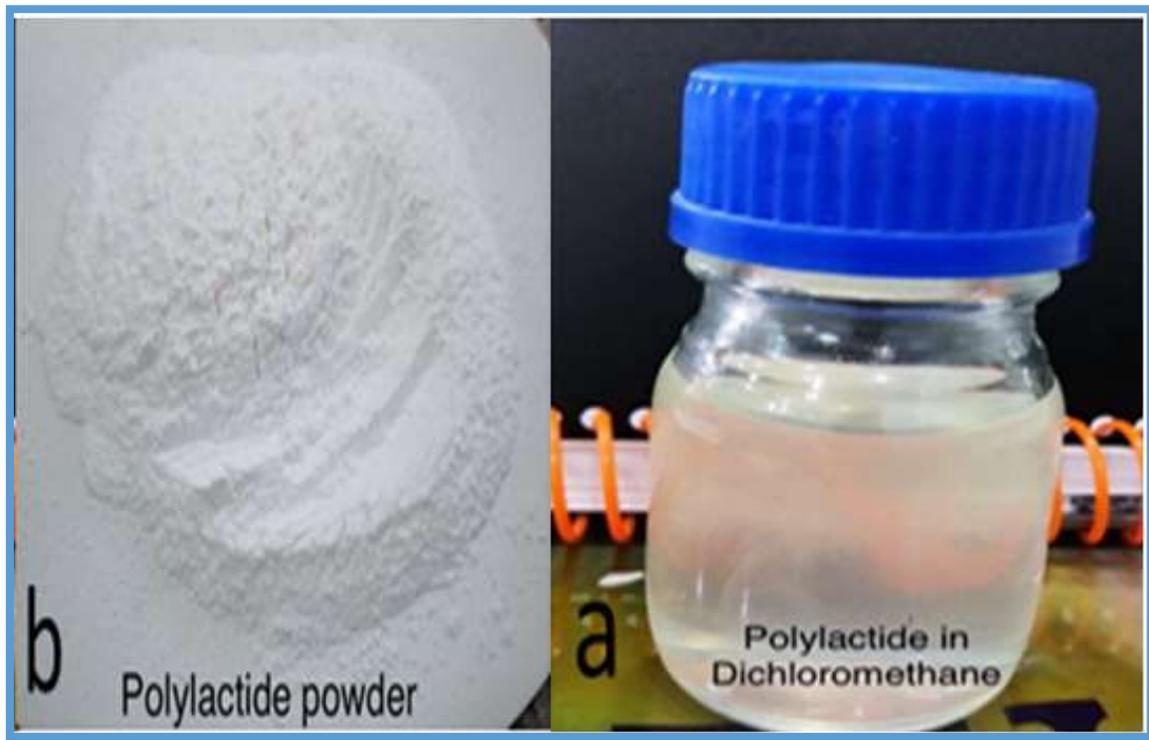
تمت عملية بلمرة حامض اللاكتيك باستخدام البلمرة التكتيفية المباشرة لحامض اللاكتيك المنتج من البكتريا إذ

Results and Discussion

النتائج والمناقشة

يحدث تفاعل التكتيف عن طريق اتحاد مجاميع الكربوكسيل مع مجاميع الهيدروكسيل بمساعدة المحفز ويلاحظ زيادة اللزوجة وهذا دليل على حدوث عملية البلمرة .

ويشير الشكل (a13-4) الى البوليمر المذاب في مذيب ثنائي كلوروميثان ، وللحصول على المتعدد بشكل مسحوق اثناء عملية البلمرة تم اضافة مذيب الميثانول الى المتعدد المذاب في ثنائي كلوروميثان وحدثت عملية الترسيب للبوليمر اذ ترسب متعدد حامض اللاكتيك بشكل مسحوق وذات لون ابيض مائل للاصفرار الموضح في الشكل (b13-4) علماً ان الوزن الذي أستحصل عليه هو 20.6غم.



شكل (13-4) a- متعدد اللاكتيك في المذيب ثنائي كلوروميثان b- مسحوق متعدد اللاكتيك

1-6-4: تحليل طيف متعدد اللاكتيك بجهاز FTIR

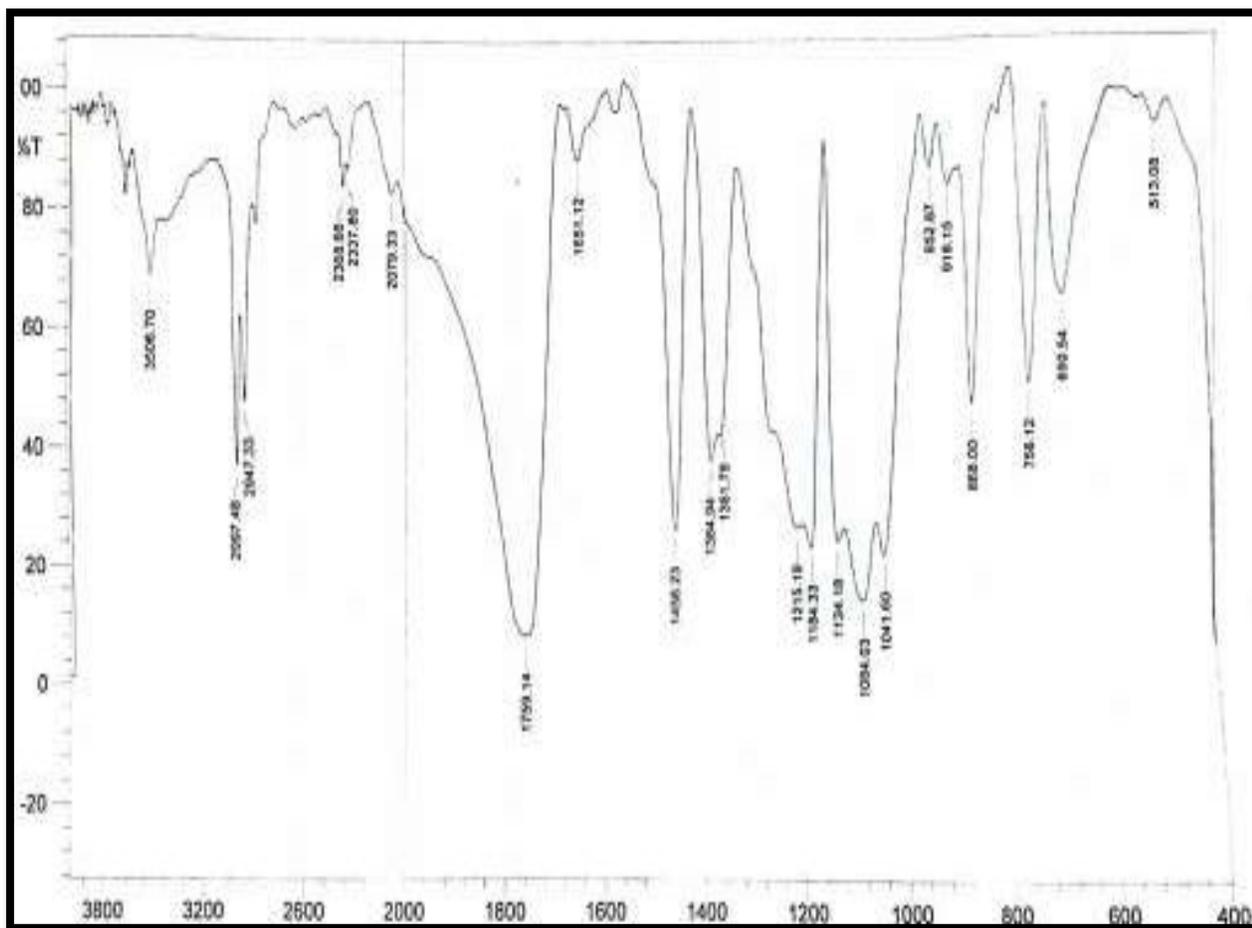
يبين طيف FTIR لمتعدد حامض اللاكتيك والموضح في الشكل (14-4) نقصان في شدة الحزمة العائدة الى

مجموعة الهيدروكسيل 3506 سم⁻¹ وهذا دليل على حصول عملية البلمرة، اضافة الى وجود حزم في الموقع

Results and Discussion

النتائج والمناقشة

(2997،2947) سم⁻¹ عائدة الى تردد المط لاصرة C-H ومن ناحية اخرى لوحظ ان حزمة مجموعة الكربونيل في الحامض والتي ظهرت 1751 سم⁻¹ قد اصبح فيها إزاحة الى الموقع 1759 سم⁻¹ وبشدة اقوى في البوليمر والتي تعود الى مجموعة الاستر تعطي دليل على بلمرة الحامض، إضافة الى وجود حزمة في الموقع 1458 سم⁻¹ تعود الى تردد المجموعة CH₃ .



شكل (4-14): طيف FTIR لمتعدد اللاكتيك المنتج من *L. paraplantarum*

أشار (2014) Cheing *et al.* الى ان الحزم الرئيسية في متعدد حامض اللاكتيك هي عائدة الى مجاميع OH مجموعة الكربونيل C=O في الاستر المتكون ومجموعة CH₃. وحدد المواقع تلك المجاميع والتي هي بنفس

Results and Discussion

النتائج والمناقشة

حدود مواقع الحزم في البوليمر المحضر قيد البحث .

اضافة الى تأكيد طيف الـ FTIR لمتعدد حامض اللاكتيك اللاكتيك المحضر قيد البحث مع ماكدو Yaniaro

(2015) *et al.* بدراسة طيف FTIR متعدد اللاكتيك كما حدد مواقع الحزم فيه والتي هي مطابقة لمواقع الحزم

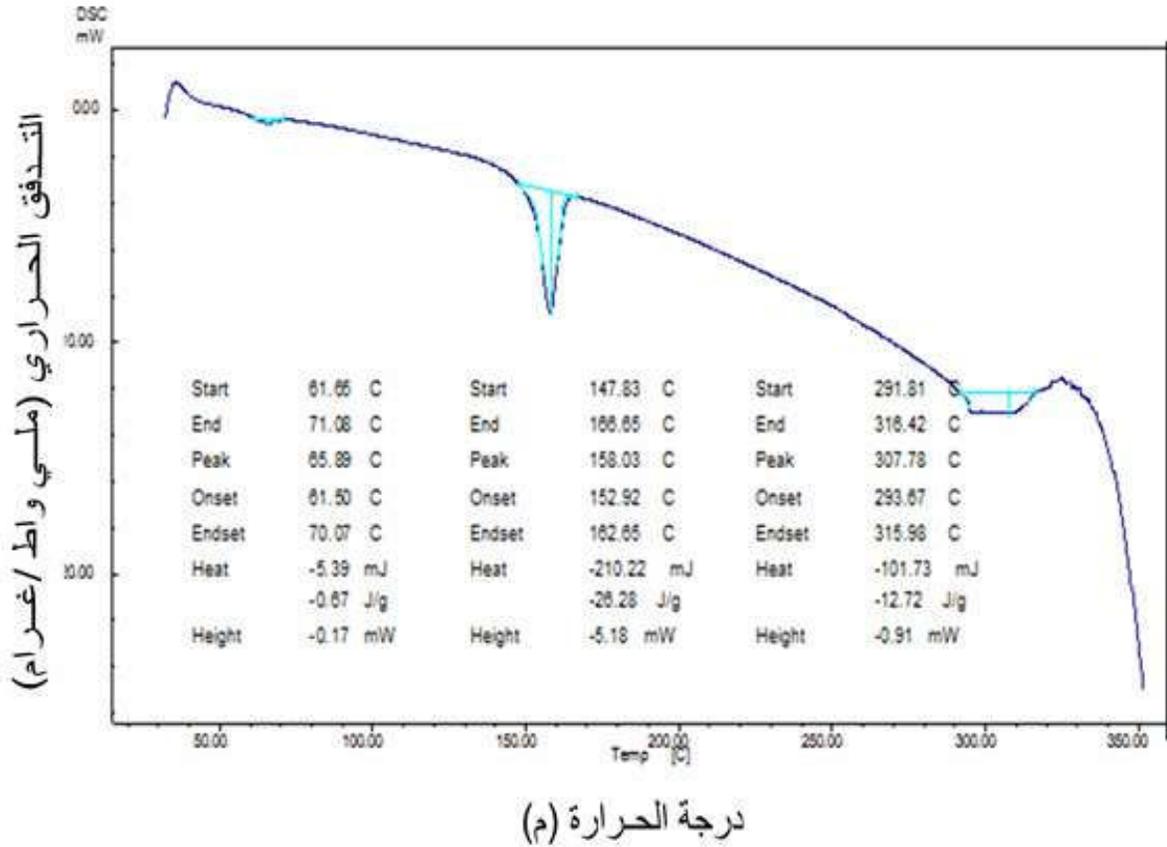
التي اظهرها طيف متعدد حامض اللاكتيك في البحث.

4-6-2: المسح التفاضلي المسعري (DSC)

يوضح الشكل (4-15) منحنى DSC لمتعدد حامض اللاكتيك حيث يلاحظ وجود حزمة على هيئة كتف

Shoulder عند درجة حرارة 65.89 °م عزيت الى درجة الانتقال الزجاجي للمتعدد والحرارة النوعية كانت 0.67

جول/غم اما الحزمة الماصة في الموقع 158 °م عزيت الى درجة انصهار متعدد اللاكتيك .



شكل (4-15) منحنى DSC لمتعدد اللاكتيك الناتج من *L. paraplantarum*

Results and Discussion

وهذه النتائج مقارنة لما أشار له Liu *et al.* (2017) ان درجة الانتقال الزجاجي لمتعدد اللاكتيك هي 61.2 م وان درجة الانصهار للمتعدد كانت 170.2 م.

كما وجد (Lai and Hesieh (2016) ان قيم درجة الانتقال الزجاجي للمتعدد باستعمال بعض المائات لم تتغير كثيرا باضافة نسب قليلة من جزيئات السليكا النانوية، في حين ان اضافتها بنسبة 7% ادت الى زيادة في درجة حرارة تفكك متعدد الحامض اذ ارتفعت من 377.4 م الى 391.4 م. اضافة الى زيادة نسبة المتبقي من عملية التحلل الحراري .

من ناحية اخرى تم الاستعانة بهذا التحليل لحساب درجة التبلور بالاعتماد على حرارة انصهار البوليمر (ΔH_m) وكانت تساوي 26.28 J/g في حين ان حرارة انصهار البوليمر المتبلور كليا ΔH_f يمكن الحصول عليها من الجداول الخاصة بالبوليمرات والتي تساوي 93.60J/g.

$$X_c \% = \frac{26.28}{93.6} \times 100 = 28.07$$

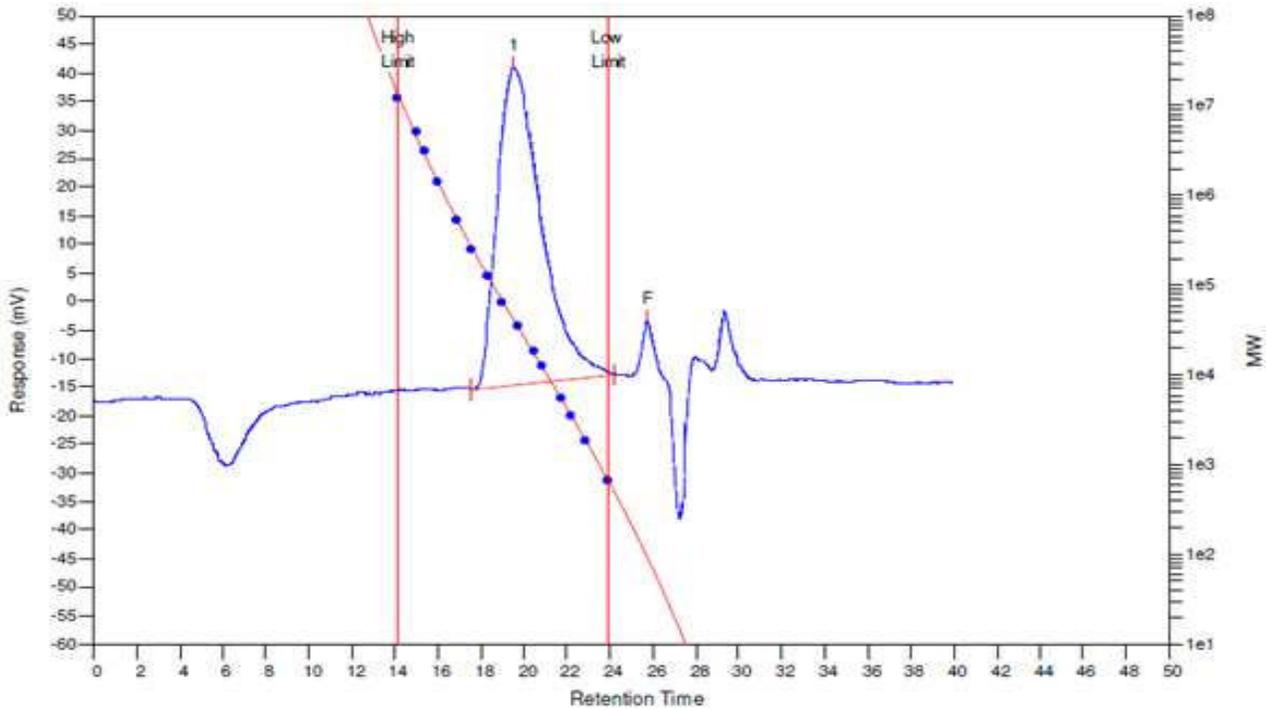
واختلفت النتيجة مع (Choubisa and Dholakiya (2013) اذ وجد ان قيمة درجة الانتقال الزجاجي هي 58.2 وان هذا الاختلاف بسبب الفرق في درجة التبلور 53.76 بينما في المتعدد المحضر قيد الدراسة كانت 28.07. تعتمد بعض الخصائص الفيزيائية مثل الكثافة، السعة الحرارية والخصائص الريولوجية على درجة حرارة الانتقال الزجاجي (T_g).

4-6-3: قياس الوزن الجزيئي لمتعدد حامض اللاكتيك

يبين الشكل رقم (4-16) منحنى توزيع الوزن الجزيئي للبوليمر بجهاز GPC في حين الجدول (4-9) يوضح

Results and Discussion

نتائج الازان الجزيئية المستحصل عليها من القياس. اذ بلغ الوزن الجزيئي لمتعدد اللاكتيك 39.139 كيلو دالتون . وجد (Choubisa and Dholakiya (2012) الى ان قيمة الوزن الجزيئي 14.875 كيلودالتون. وان الاختلاف في الازان الجزيئية يعتمد على طريقة البلمرة.



شكل (4-16) منحنى توزيع الوزن الجزيئي لمتعدد حامض اللاكتيك بجهاز GPC

الجدول (4-9) نتائج الازان الجزيئية المستحصل عليها من القياس

Mn	Mw	Mz	Mz+1	Mv	PDI
15563	39193	63449	84490	35766	2.5183

ومن النتائج المستحصلة نلاحظ ان ترتيب الازان الجزيئية المختلفة حسب قيمها هو كالآتي :

$$M_n < M_w < M_z < M_{z+1}$$

Results and Discussion

وهذا مطابق للترتيب العام لاغلب قياسات الوزن الجزيئي للبوليمرات. اما قيمة معامل التشتت المتعدد Polydispersity index(PDI) فقد بلغت 2.518 وهذا يعني ان حزمة الوزن الجزيئي العالي هي عريضة ، حيث هذه القيم تعتمد على نوع عملية البلمرة وظروفها، حيث تشير البحوث بأن قيم PDI بالنسبة الى بوليمرات الإضافة هي بحدود 1-1.5 بينما قيمها بالنسبة الى بوليمرات التكثيفية هي >2، وكلما اقترب الرقم الى حدود 2 تعني ضيق حزمة الوزن الجزيئي العالي وبالتالي يكون نسبة التبلور فيه عالية ، وأشار Choubisa *et al.* (2012) الى ان قيمة معامل التشتت المتعدد بلغت 2.84.

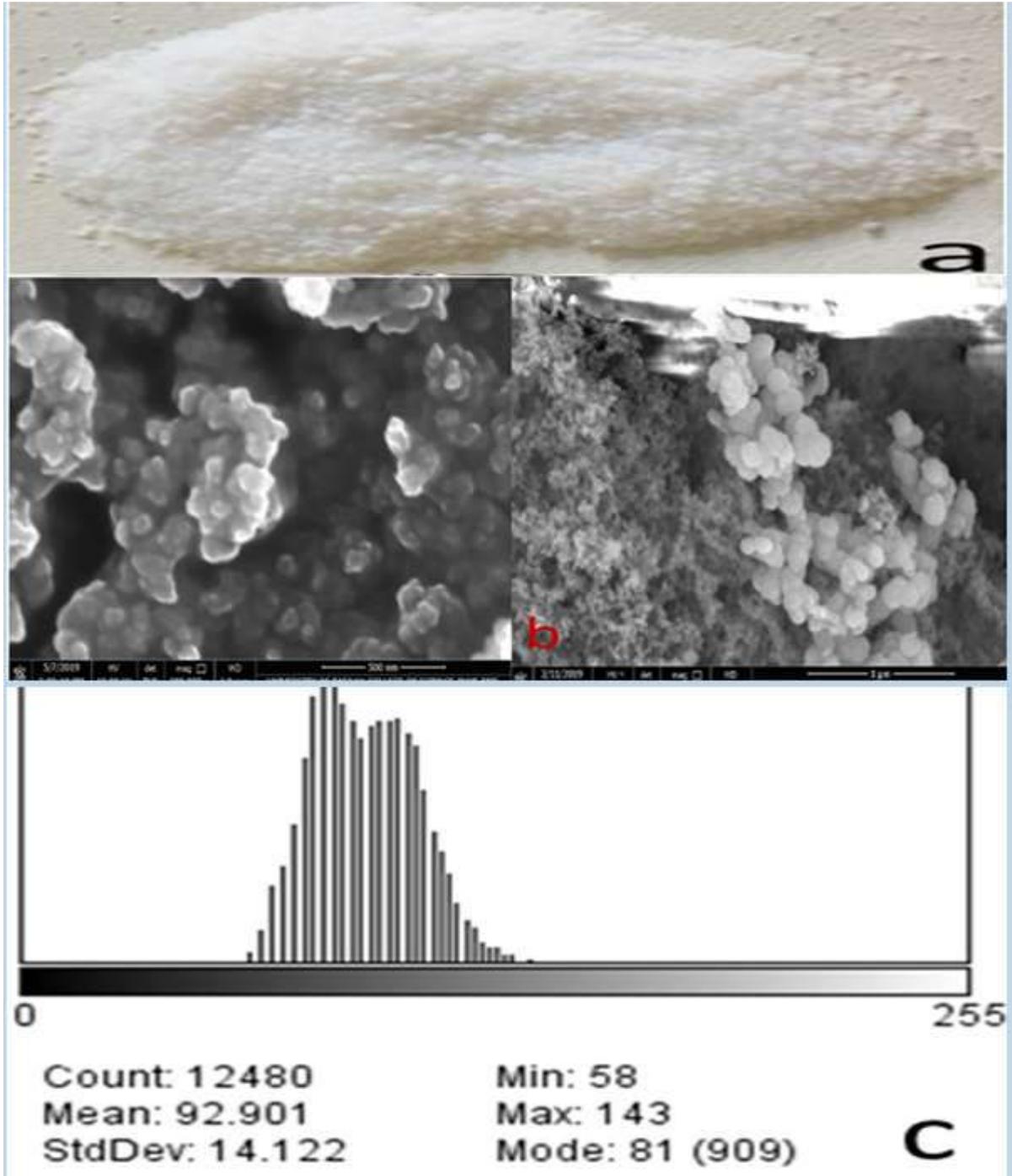
لذلك فان القيمة المستحصلة للبوليمر المحضر اعطت نسبة قليلة من التبلور والتي هي بحدود 28.07% والتي تم حسابها من قياسات المسح التفاضلي المسعري (DSC). وهي مطابقة لنتيجة PDI المحسوبة بطريقة GPC. وجد Henton *et al.*, (2005); Auras *et al.*, (2010) ان درجة الانصهار البلورية (T_m) ونسبة التبلور لمتعدد اللاكتيك المتبلور من العوامل الرئيسية التي تؤثر على كثير من الخصائص مثل الصلادة ومعامل المرونة وقوة الشد.

4-7: تحليل جسيمات السليكا النانوية

4-7-1: التحليل بجهاز المجهر الالكتروني الماسح SEM

تم الاستعانة بجهاز SEM لتحديد الحجم الحبيبي لجسيمات السليكا النانوية المحضرة قيد الدراسة من خلال عملية التحلل المائي لمادة رابع ايثوكسي سليكون والتي اعطت مسحوق ابيض ناصع خفيف الوزن والموضح في الشكل (a-17-4) ، وتبين من نتيجة التحليل والموضحة في الشكل (b-17-4) شكل جزيئات السليكا النانوية المحضرة ، كما يبين الشكل (c-17-4) توزيع الحجم الحبيبي إذ تراوحت قيمة حجم الجزيئات ما بين 58-143 نانومتر اي بمعدل 92.2 نانومتر. وقد ذكر Lai and Hsieh(2016) بأن حجم الحبيبات الناتجة من عملية

التحضير ومن خلال القياسات تراوحت ما بين 25-250 نانومتر .

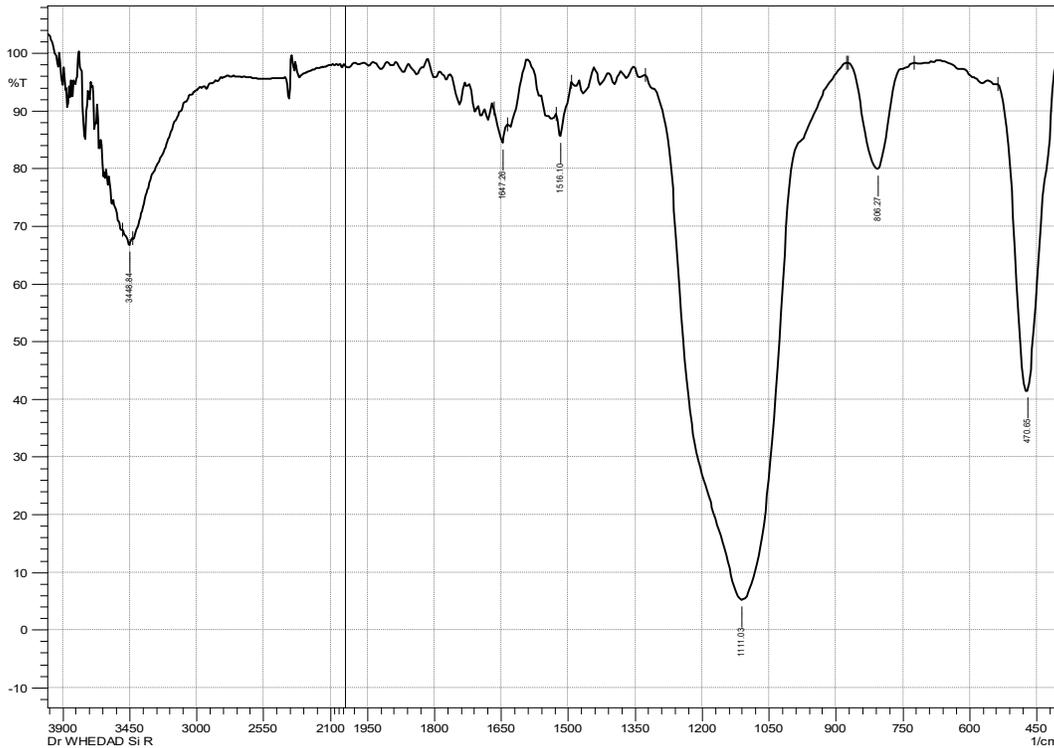


شكل (4-17): جزيئات السليكا النانوية المحضرة a - شكل جزيئات السليكا النانوية b - حجم جزيئات السليكا

النانوية المحضرة بجهاز SEM c - التوزيع الحبيبي لجزيئات السليكا النانوية

4-7-2: تحليل جسيمات السليكا النانوية بجهاز FTIR

تم اخذ قياس FTIR لجسيمات السليكا النانوية المحضرة في الدراسة والموضح في الشكل (4-18) اذ تشير الحزمة عند الموقع 3448 سم⁻¹ إلى وجود مجموعة الهيدروكسيل الموجودة على سطح السليكا ، بينما تشير الحزمة المميزة عند 1111 سم⁻¹ بسبب الأصرة Si-O-Si الموجودة ضمن التركيب الكيميائي للمركب. وان هذه القراءة تتفق مع ما ذكره (Lai et al. (2017) الذي اشار الى ان حزمة Si-O-Si كانت محصورة ما بين 1010-1090.



شكل (4-18): طيف جزيئات السليكا النانوية بجهاز FTIR.

4-8: تصنيع الاغشية

تميزت الاغشية التي تم تحضيرها لمتعدد حامض اللاكتيك والأغشية المدعمة بجزيئات السليكا النانوية بانها اغشية رقيقة شفافة وذات لمعان وسهلة الرفع من القالب ومن ناحية اخرى لوحظ تجانس الاغشية والمحافظة على

قوامها مع تقادم زمن التحضير، واستعملت نسب من جزيئات السليكا النانوية (1 و3 و5) % وأن زيادة النسبة عن 5% أدى الى تحويل المادة المركبة الى مادة اكثر هشاشة بحيث يصعب الحصول على غشاء متجانس. يبين الشكل (4-19) صور للاغشية المحضرة حسب المواد الداخلة في تركيبها.



شكل (4-19): الاغشية الناتجة من متعدد اللاكتيك وخليط السليكا مع متعدد اللاكتيك a-غشاء PLA

b-غشاء Si NPs + PLA

4-8-1: تقدير سمك الغشاء

يوضح الجدول رقم (4-10) وجود اختلافات معنوية في سمك الاغشية ، اذ يتضح من النتائج تفوق الغشاء المتكون من PLA ونسبة جزيئات السليكا النانوية 5% معنوياً على بقية الاغشية وحصل على اعلى قيمة بلغت 0.1567 مايكرومتر بينما حصل الغشاء المكون من PLA على اقل سمك للغشاء وبلغ 0.1133.

جدول (4-10) تقدير سمك الاغشية (مايكرومتر)

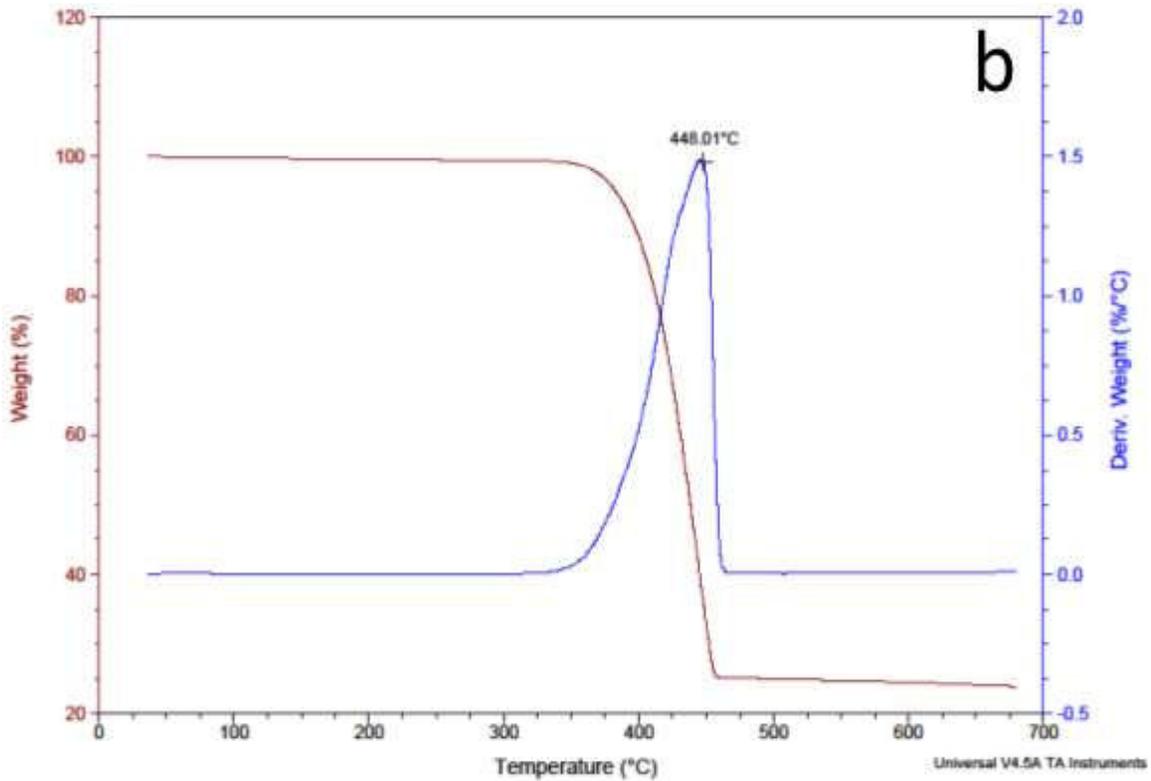
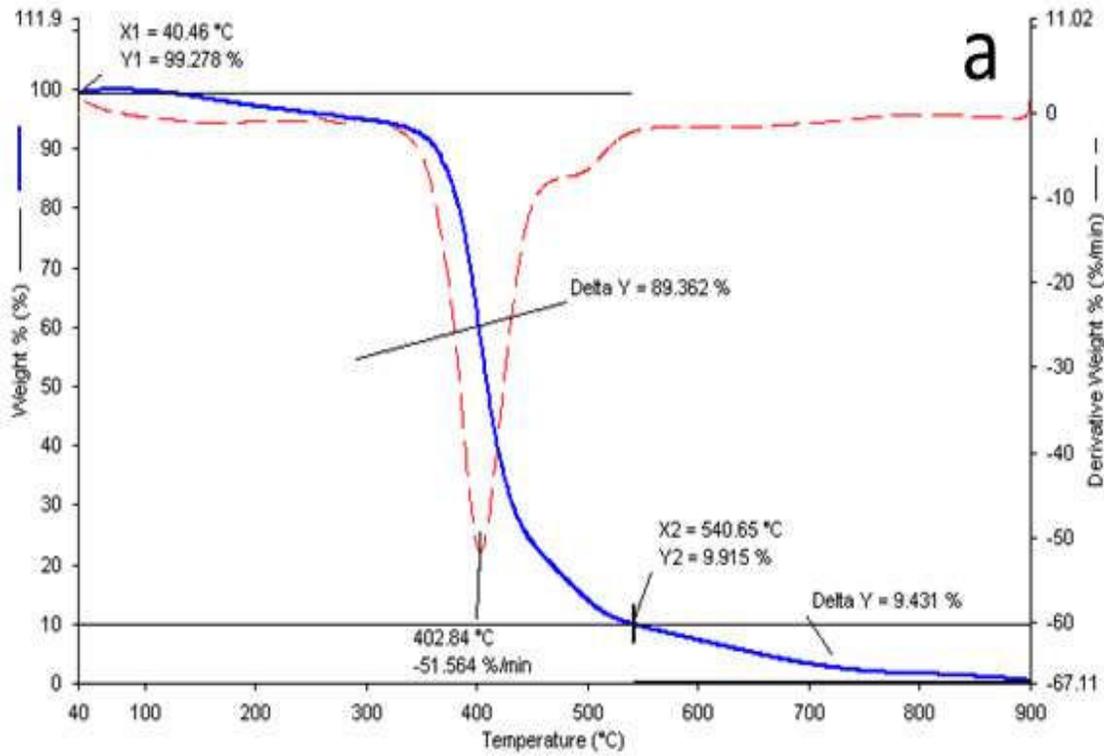
PLA+5%Si NPs	PLA +3%Si NPs	PLA +1%Si NPs	PLA	نوع الغشاء
0.1567	0.1367	0.1233	0.1133	سمك الغشاء
0.00471 = LSD 0.05				

4-8-2: التحلل الحراري الوزني للغشاء TGA

يبين الشكل (4-20) منحنيات التحلل الحراري الوزني لنماذج متعدد اللاكتيك ومتعدد اللاكتيك المدعم بجزيئات السليكا النانوية إذ تحدد هذه التقنية درجة استقرار البوليمرات والاعشية بشكل خاص. بينما الجدول (4-11) بعض الدوال الحرارية المستتبهة من تلك التحاليل.

لوحظ من خلال نتائج منحنى تحليل PLA (4-20 a) وجود حزمة تفكك واحدة عند درجة حرارة 402 م . اما عند اضافة السليكا بنسبة 3% لوحظ ارتفاع درجة التفكك الحراري وبلغت 448م وهذا يعني ان البوليمر مستقر حرارياً عند الدرجات الحرارية التي هي اقل من 410 م كما مبين في الشكل (4-20 b). وتأتي هذه النتائج متفقة مع ما وجدته Liu et al. (2017) إذ وجد عدم وجود حزمة تفكك لمتعدد اللاكتيك لغاية 220 وان التفكك بدأ بدرجة حرارة اعلى من 300م.

اشار Lai et al. (2016) الى ان درجة تفكك متعدد اللاكتيك عند درجة 377.4 وعند استعمال 3.8% نانو سليكا كانت درجة حرارة تفكك الخليط 380م. لوحظ ايضاً ان معدل تفكك البوليمر بوجود السليكا كعامل مقوي اقل من البقية وهذا يدل ان وجود السليكا يقلل من تفكك البوليمر. وجد Jeziorska et al. (2018) ان اضافة جسيمات السليكا النانوية الى متعدد اللاكتيك قد عززت من تبلور المزيج واستقرار حراري اكثر. وتوقع الغشاء المدعم بجسيمات السليكا النانوية معنوياً على غشاء متعدد حامض اللاكتيك من حيث الاستقرار والتفكك بدرجة حرارة اعلى



الشكل (4-20) التحلل الحراري الوزني TGA لمركب PLA-a - المركب Si NPs + PLA -b

Results and Discussion

اضافة الى فقدان نصف الوزن بدرجة 435 م ولم يكن هناك فرق معنوي في المتبقي من الغشاءين عند درجة 600 م. كما مبين في الجدول (4-11).

جدول (4-11) بعض الدوال الحرارية المستنبطة من تحاليل TGA.

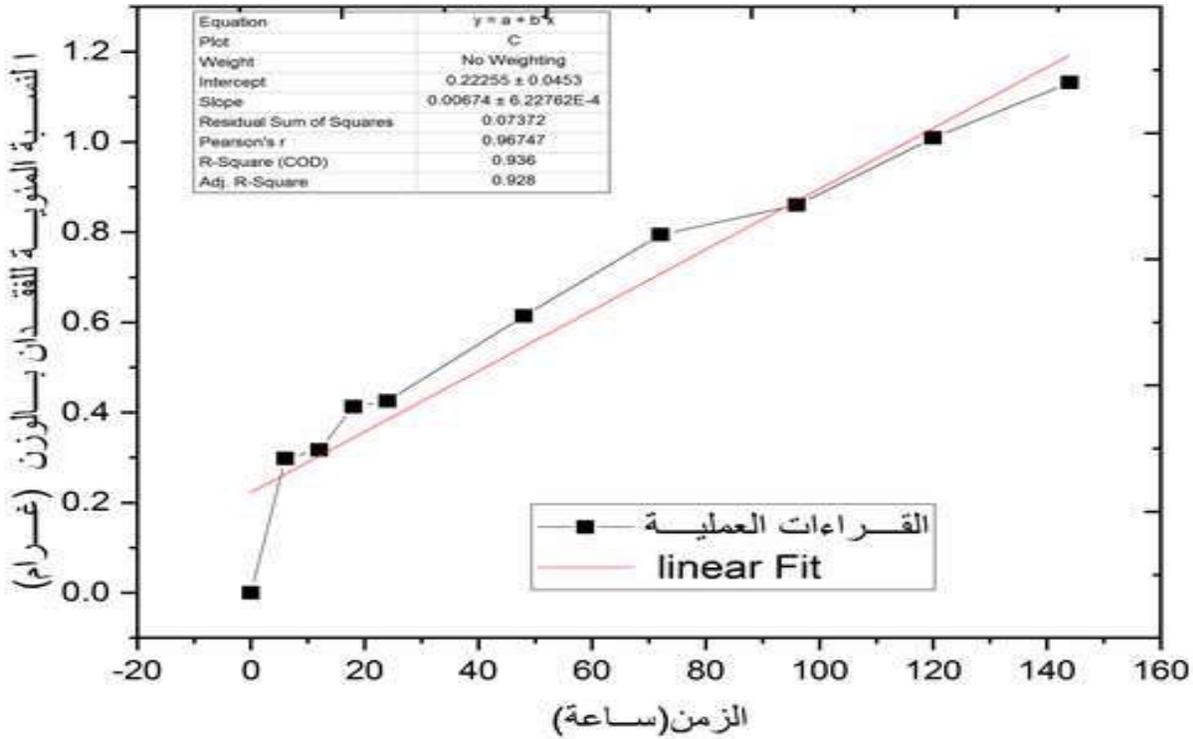
النموذج	درجة التفكك القصوى	درجة الحرارة الذي يفقد البوليمر نصف وزنه	المتبقي عند 600°C	معدل التفكك %/min
PLA	448.00	435.00	8.00	1.03200
PLA+3% Si NPs	402.00	418.00	8.00	0.83200
LSD 0.05	2.267	2.267	2.267	0.002267

4-8-3: تقدير نفاذية الغشاء لبخار الماء

تم قياس نفاذية الغشاء لبخار الماء باستعمال الطريقة الموضحة في الفقرة (3-7-4) والتي تعتمد على الطريقة القياسية في المصدر المذكور . رسمت العلاقة بين فقدان الوزن للطبق والماء خلال 6 ايام وتم حساب الميل للقراءات المسجلة باستعمال Linear regression كما موضح في الشكل (4-21) وكانت قيمة WVTR = 1.348 غم/م².ساعة.

وحسبت نفاذية الغشاء لبخار الماء 1.793×10^{-12} غم/م. باسكال.ساعة. أكد Teo and Chow. (2014) الى ان قيمة النفاذية لمتعدد اللاكتيك بلغت 0.47×10^{-10} غم/م. باسكال. ساعة وان هذا الاختلاف في حساب النفاذية يعود الى سمك الغشاء المستعمل .

ان قيمة نفاذية الاغشية لبخار الماء تعطي دلالة على انتقال الماء من المواد الغذائية المحفوظة الى المحيط الخارجي وكلما قلت النفاذية للاغشية بقيت المواد طازجة لفترة خزنية اطول (Gontard et al., 1992).



شكل (4-21): نفاذية الاغشية لبخار الماء

4-8-4: تقدير قوة الاستطالة والشد للغشاء

يلاحظ من الجدول (4-12) تفوق غشاء متعدد اللاكتيك المدعم 5% جزيئات السليكا النانوية معنوياً في صفة قوة الشد وسجل اعلى قيمة بلغت 31.800 Map بينما سجل غشاء متعدد اللاكتيك اقل قيمة بلغت 19.800 . اضافة الى تفوقه معنوياً في صفة معامل يونك اذ سجل اعلى قيمة بلغت 1098.00 بينما سجل متعدد اللاكتيك اقل قيمة بلغت 986.00.

ان زيادة قوة الشد والاستطالة مع زيادة محتوى المادة المدعمة ربما يعزى بسبب الالتصاق السطحي الأفضل بين المادة المدعمة والمادة الاصلية بواسطة قوى van der Waals أو التفاعلات الحثية (Jeziorska et al., 2018).

جدول (4-12) قوة الشد والاستطالة ومعامل يونك لاغشية PLA والاعشية المدعمة بالجزيئات السليكا النانوية

نوع الغشاء	قوة الشد (Map)	معامل يونك (Map)	الاستطالة حتى القطع %
PLA	19.800	986.00	2.833
PLA+ 1% Si NPs	21.600	1011.00	2.700
PLA+ 3%Si NPs	24.200	1045.00	2.600
PLA+5% Si NPs	31.800	1098.00	2.100
LSD 0.01	0.1883	1.883	0.1719

واختلفت الاغشية معنوياً فيما بينها في معامل الاستطالة حتى القطع اذ سجل متعدد اللاكتيك اعلى قيمة للاستطالة بلغت 2.883 وبفارق معنوي عن بقية الاغشية. بينما كانت اقل قيمة مسجلة لغشاء متعدد اللاكتيك المدعم 5% جسيمات السليكا النانوية وبلغت 2.100 .

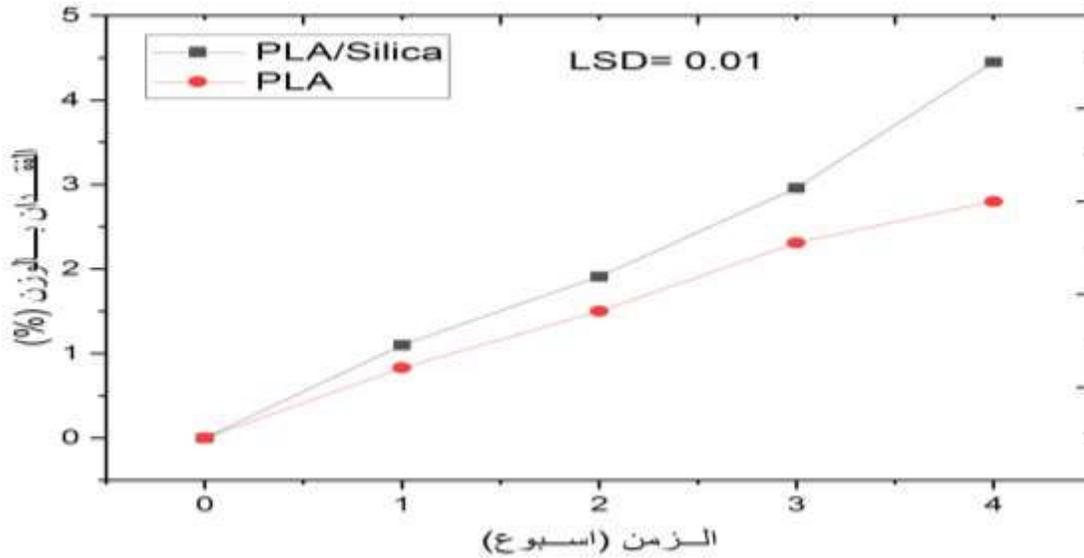
وتتفق هذه النتائج مع ماوجده (Lai and Hsieh (2016) ومن خلال نتائج الخواص الميكانيكية الى ان معامل يونك وقوة الشد ازدادت بزيادة نسبة جسيمات السليكا النانوية ولكن مقابل هذه الزيادة لوحظ بعدها نقصان بمعامل يونك وقوة الشد عندما تكون النسبة السليكا اكثر من 4% وذلك بسبب زيادة هشاشية المادة المركبة للنتائج.

4-8-5: تقدير قابلية الأغشية على الاذابة بالماء

بينت النتائج عدم قابلية الاغشية المحضرة على الاذابة بالماء وذلك لاحتفاظها بالوزن الابتدائي عند بداية التجربة اذ احتفظ غشاء متعدد اللاكتيك بالوزن نفسه 0.9157 بعد الاذابة بالماء لفترة 24 ساعة كما احتفظت الاغشية المدعمة بجزيئات السليكا النانوية (1و2 و3%) بالوزن نفسه عند بداية والى نهاية التجربة (0.4389, 0.8813, 0.4336) على التوالي.

4-8-6: تحليل الأغشية في التربة

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (4-22a) ان هناك زيادة في فقدان وزن الأغشية مع مرور الوقت وان التحلل البيولوجي لغشاء متعدد حامض اللاكتيك المدعم بجزيئات السليكا النانوية يكون اسرع مقارنة بالغشاء غير المدعم ، اذ بلغت النسبة المئوية للفقد 4.46% للغشاء المدعم و2.8% لمتعدد اللاكتيك خلال 28 يوم يعزى ذلك الى سهولة تفكك مجاميع الاستر في سلاسل PLA (Yi et al., 2012). وتفوق الغشاء المدعم 3% سليكا معنوياً وحصل على اعلى معدل لفقدان الوزن خلال فترة الطمر 28 يوم مقارنةً مع غشاء متعدد اللاكتيك.



شكل (4-22a) النسبة المئوية لفقدان وزن الأغشية عند الطمر تحت التربة

تعتمد قابلية التحلل البيولوجي على عوامل تخص البوليمر مثل وزنه الجزيئي ، النسبة المئوية للتبلور ، سمك الغشاء ، تركيبه الكيميائي وطريقة تصنيعه . إضافة الى الظروف البيئية اذ تؤدي الرطوبة ودرجة الحرارة الى تفكك متعدد اللاكتيك عن طريق فصل سلاسل البوليمر الى جزيئات ذات وزن جزيئي منخفض، ومن ثم تحلله من قبل الاحياء المجهرية الموجودة في التربة الى CO₂ وماء تحت ظروف هوائية ولاهوائية او التحلل بواسطة الانزيمات (Luzi et al., 2015; Vasile et al., 2018 ; Luo et al., 2019). ويبين الشكل (4-22b) تحليل

تحلل الغشاء خلال فترة الطمر .



شكل(4-22b): التحلل الحيوي 1- لغشاء PLA 2- غشاء Si NPs 3% + PLA في التربة

4-9: حفظ الثمار

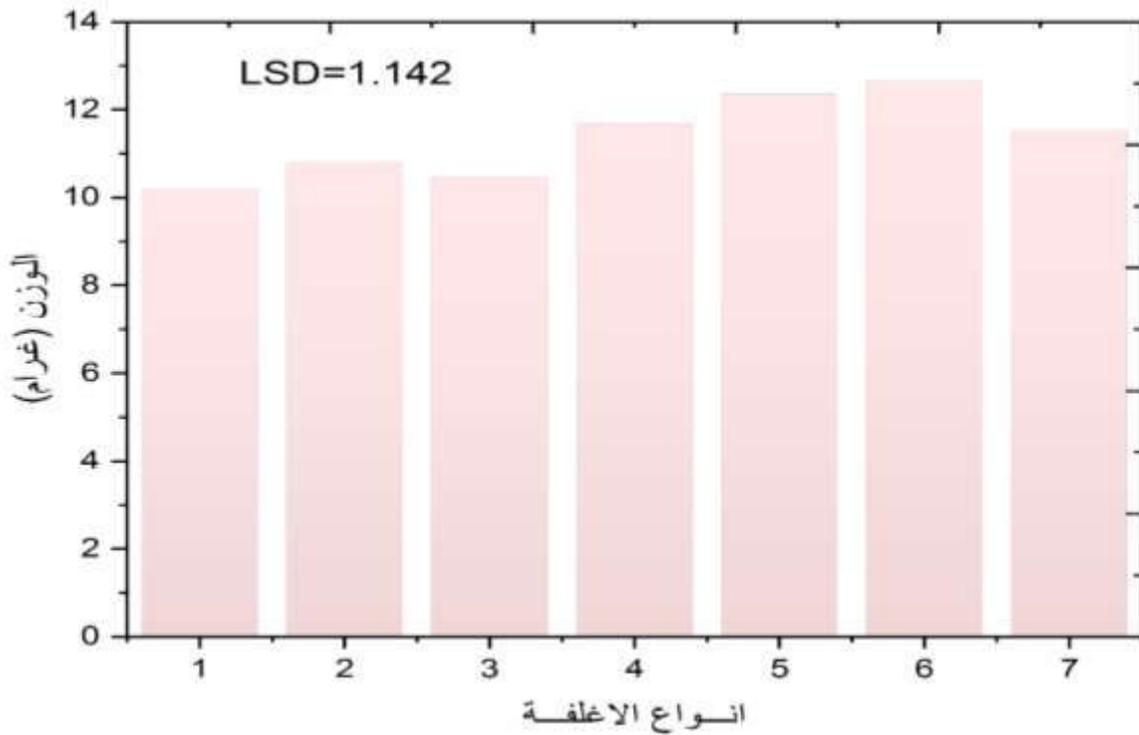
4-9-1: التغير في وزن الثمار

تشير نتائج الشكل (4-23) الى تغير الوزن لثمار خلال البرحي باختلاف تاثير انواع الاغلفة المختلفة خلال

فترة الخزن اذ سجلت المعاملات 1,2,3,4,5,6,7 المذكورة في الفقرة 3-8-1 في بداية فترة الخزن الاوزان

Results and Discussion

(12.5, 11.9, 12.1, 12.8, 12.9, 12.1) غم وبلغت في نهاية فترة الخزن (10.17, 10.80, 10.45, 11.67, 12.36, 12.68, 11.53) غم على التوالي اذ يتضح من النتائج الاختلافات المعنوية بين الثمار في صفة الوزن اذ سجل غلاف متعدد اللاكتيك المدعم 3% سليكا افضل وزن للثمرة اذ بلغ 12.68غم بينما سجلت معاملة المقارنة اقل وزن للثمرة وبلغ 10.17غم .وقد يعود سبب فقد الوزن للثمار غير المغلفة الى عدم الاحتفاظ بالماء والدخول في مرحلة النضج (شبانة واخرون ،2006).



شكل(4-23):التغير في وزن الثمار المغلفة بانواع مختلفة من الاغلفة خلال فترة الخزن

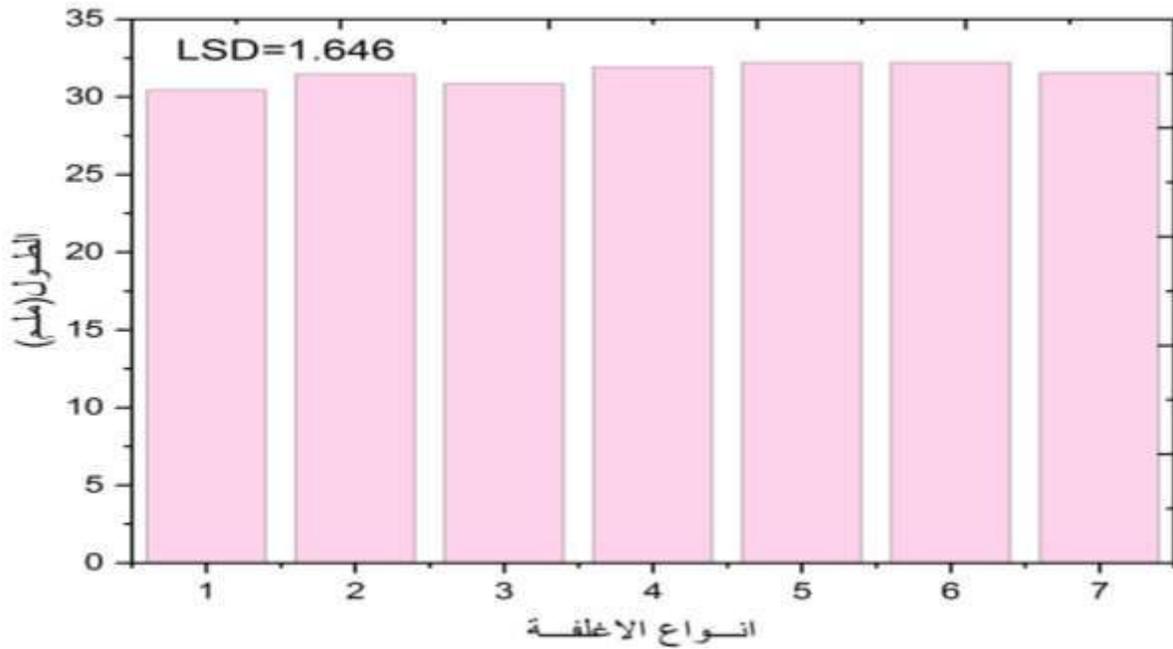
اما الثمار المغلفة فقدت نسبة اقل من الوزن بسبب الحفاظ على الرطوبة وعدم فقدانها اثناء التنفس وتبخر الرطوبة خلال الخزن اضافة الى قلة نفاذية الاغلفة النانوية لبخار الماء. وذكر (Zhang et al.(2019) ان نسبة 0.3% من جزيئات السليكا النانوية كانت مناسبة اكثر 0.5% وذلك لانتشارها بشكل افضل في الغشاء وان زيادة مقاومة الغشاء للماء ملائم لحفظ الاغذية في ظروف عالية الرطوبة. وجد (Kamil et al.(2019) ان اضافة جسيمات

Results and Discussion

نانوية مثل السليكون والكايتوسان الى ثمار الخوخ قد قللت من فقدان الوزن خلال فترة الخزن بالتبريد.

4-9-2: التغيير في ابعاد الثمار

اختلفت اطوال الثمار اثناء فترة الخزن كما مبين في الشكل (4-24) وكانت قيم الاطوال (31.47, 30.44), 31.57, 32.21, 32.21, 31.91, 30.85 ملم للمعاملات 1,2,3,4,5,6,7 على التوالي. وسجلت الثمار المغلفة بغلافي متعدد اللاكتيك المدعم 1% و3% سليكا على زيادة معنوية في طول الثمرة وبلغ 32.21 ملم لكلا الغلافين بينما سجلت معاملة المقارنة اقل قيمة وبلغت 30.44 ملم. ان اطوال الثمار تتحدد بالتغير الحاصل في الوزن وعدم فقدان الماء والذي ينعكس ايجاباً على طول الثمرة.

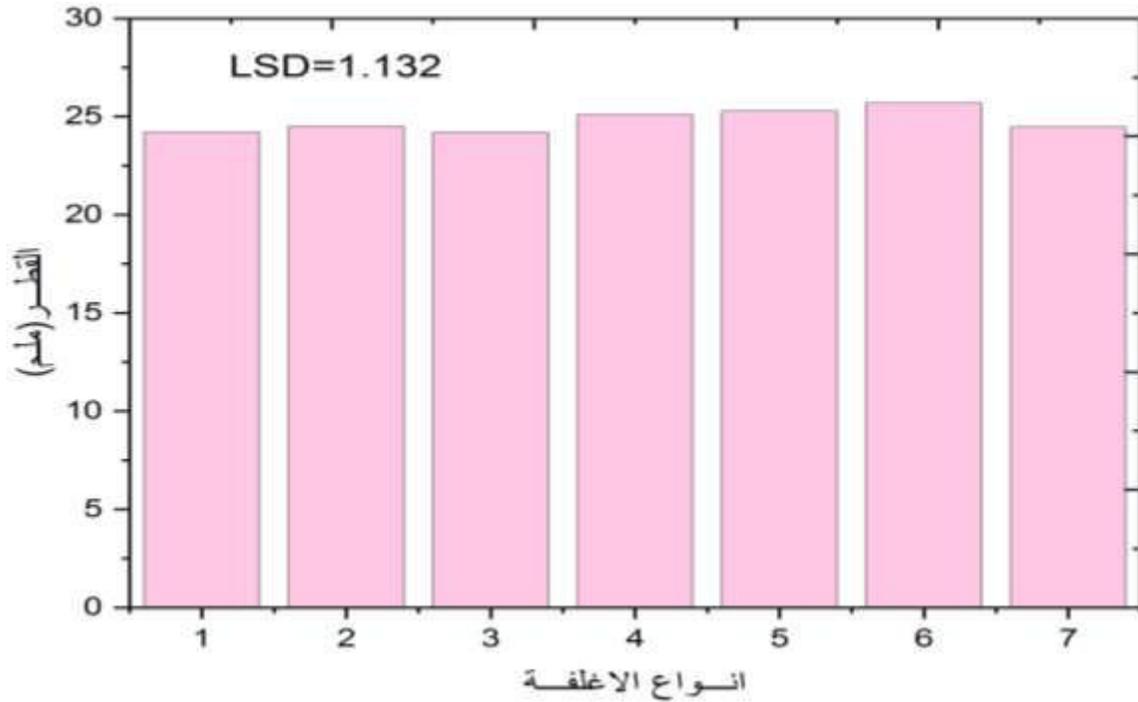


شكل(4-24): التغيير في اطوال الثمار المغلفة بانواع مختلفة من الاغلفة خلال فترة الخزن 4 اسابيع

ويتضح من نتائج قياس اقطار الثمار المغلفة بانواع الاغلفة المختلفة وعينة المقارنة كما يوضح الشكل(4-25) احتفاظ الثمار المغلفة باغلفة المتعدد والمدعمة بجسيمات السليكا النانوية بأقطار الثمار وذلك لعدم فقدان الوزن والمحتوى المائي وبالتالي الحفاظ على جودتها. وكانت قيم اقطار الثمار (24.2, 24.5, 24.2, 25.1, 25.2,

Results and Discussion

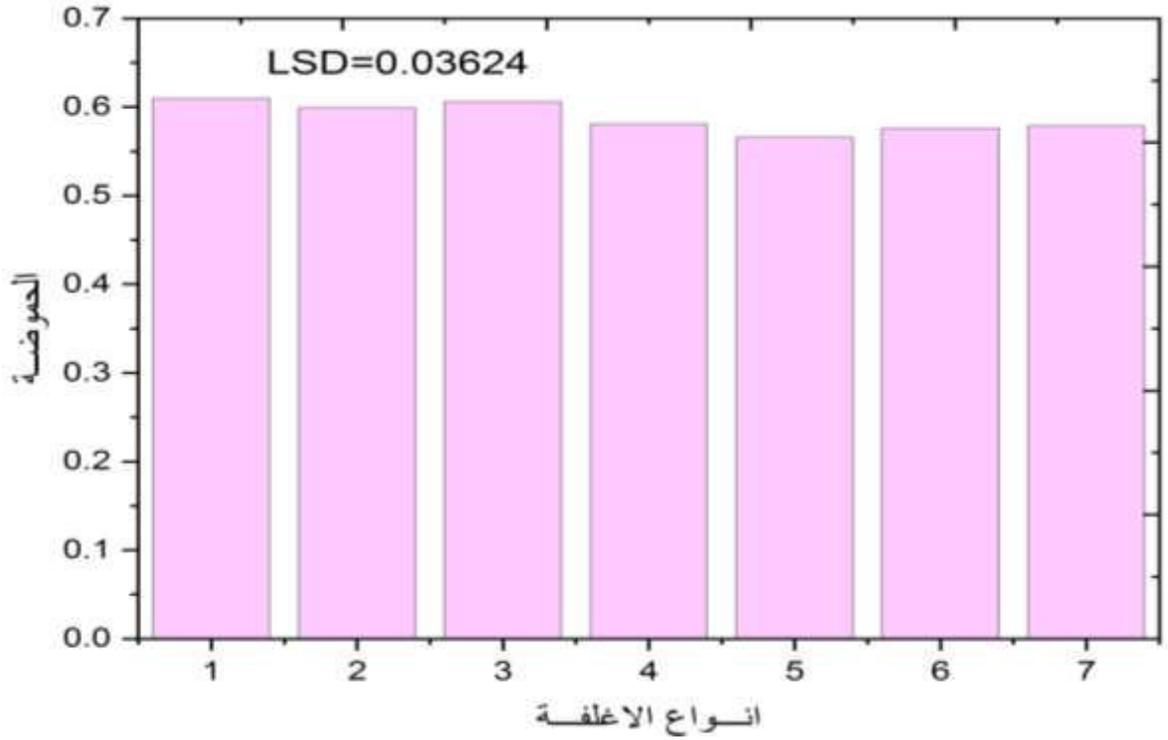
25.7, 24.4) ملم للمعاملات 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 على التوالي. وتبين ان هناك اختلافات معنوية في صفة قطر الثمرة اذ تفوقت معاملة الغلاف المدعم 3 % جسيمات السليكا النانوية بتسجيلها اعلى قطر للثمرة وبلغ 25.70 ملم بينما حصلت معاملة المقارنة على اقل قطر مسجل وبلغ 24.21 ملم .



شكل(4-25):التغير في قطر الثمار المغلفة بانواع مختلفة من الاغلفة خلال فترة الخزن

4-9-3: الحموضة

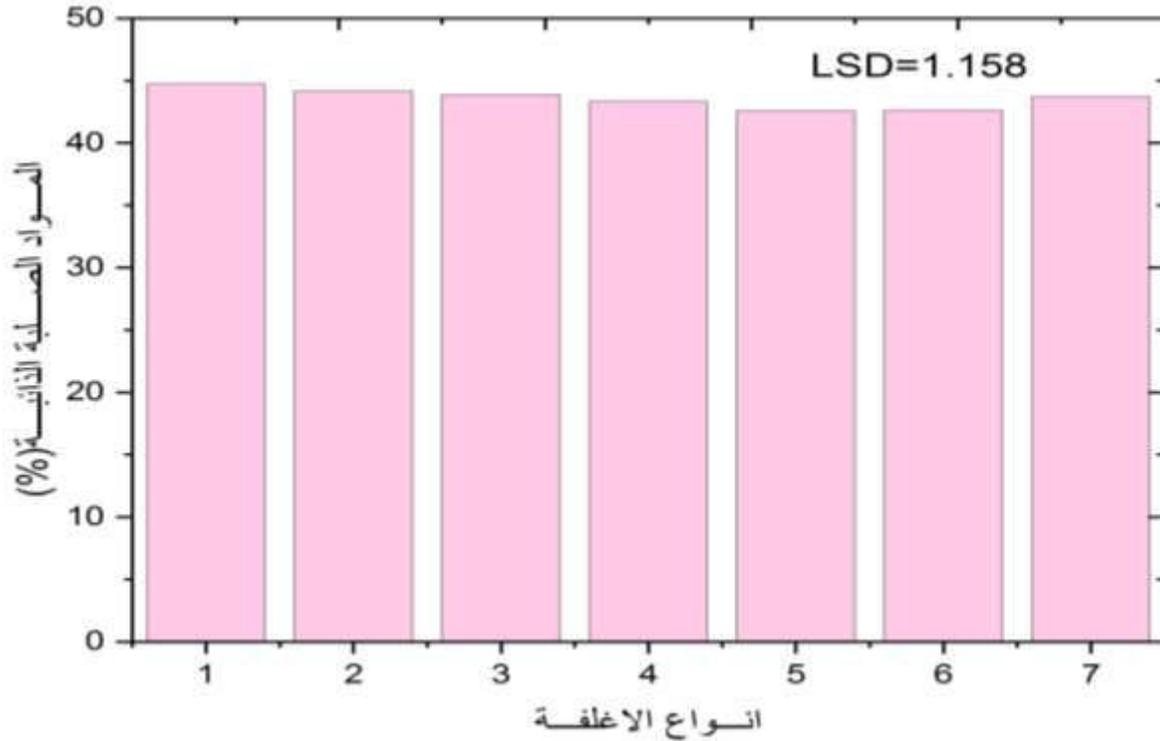
يبين الشكل (4-26) ان النسبة المئوية للحموضة الكلية قد تأثرت بالتغليف باختلاف انواع الاغلفة اذ بلغت قيم الحموضة (0.610, 0.599, 0.606, 0.581, 0.566, 0.576, 0.579) % للمعاملات 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 على التوالي . اذ حافظ الغلاف متعدد اللاكتيك المدعم 3% سليكا على اقل حموضة مسجلة 0.567% بينما ارتفعت الحموضة في معاملة المقارنة وسجلت اعلى قيمه وبلغت 0.610. يعزى سبب ارتفاع الحموضة في الثمار غير المغلفة الى انتاج وتفكك الحوامض العضوية (Pesis et al.,1999).



شكل (4-26): النسبة المئوية للحموضة للثمار المغلفة بأنواع مختلفة من الاغلفة خلال فترة الخزن 4 أسابيع

4-9-4: المواد الصلبة الذائبة الكلية

يتبين من النتائج الموضحة في الشكل (4-27) ان قيم المواد الصلبة الذائبة للمعاملات 1,2,3,4,5,6,7 كانت (44.76, 44.15, 43.88, 43.34, 42.58, 42.62, 43.73)% على التوالي ولوحظ الاختلافات المعنوية بين الاغلفة في تأثيرها على المواد الصلبة الذائبة الكلية اذ حصل غلاف متعدد اللاكتيك المدعم 1% جسيمات السليكا النانوية على اقل قيمة 42.58 وبفارق غير معنوي عن الغلاف المدعم متعدد اللاكتيك 3% سليكا اذ سجل 42.62 بينما سجلت معاملة مقارنة اعلى قيمة وبلغت 44.76% وتاتي هذه الزيادة بسبب فقدان الرطوبة وانخفاض المحتوى المائي مع زيادة وتراكم نسبة المواد الصلبة الكلية مع تقدم فترة الخزن (Burton,1982).

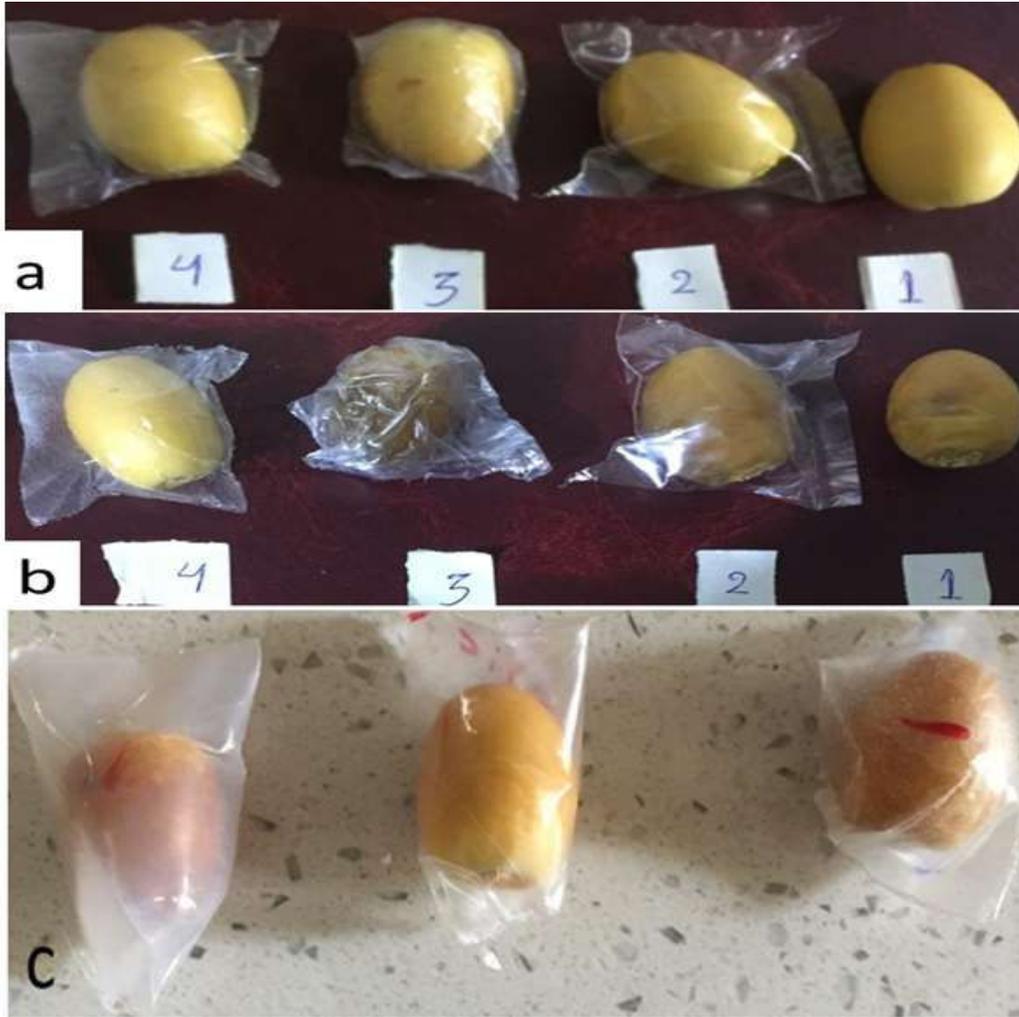


شكل (4-27): التغير في قيم المواد الصلبة الذائبة للثمار المغلفة بانواع مختلفة من الاغلفة

خلال فترة الخزن

4-9-5: المظهر الخارجي Outer appearance

يلاحظ من الشكل (4-28) ان عينات ثمار المغلفة بغشاء متعدد اللاكتيك وغشاء متعدد اللاكتيك المدعم بالجزيئات السليكا النانوية قد كانت ذا مظهر خارجي جيد جداً مقارنة مع بقية العينات ويعزى السبب الى احتفاظ الثمار بالرطوبة وعدم فقدان الماء مع بقاء غلاف الثمار الوسطي Mesocarp صلب الى نهاية فترة الخزن. كما يلاحظ ان لون الثمار قد احتفظت باللون الاصفر الزاهي وربما يعود السبب الى انخفاض التنفس وانخفاض الاثيلين والاحتفاظ بجو معتدل (Ali et al., 2011).



شكل (4-28) a- ثمار خلال البرحي المغلفة بانواع مختلفة من الاغلفة في بداية الخزن

b,c- الثمار بعد 28 يوم فترة خزن

كما يعمل الغلاف كحاجز شبه نافذ ومن ثم يمنع تغيير لون الثمار وتأخير النضج والشيخوخة (Han *et al.*, 2014). اما عينة السيطرة وبقية العينات فقد تغير اللون اثناء الخزن تدريجيا وصولاً الى البني الداكن في نهاية فترة الخزن وربما يعود السبب الى نشاط إنزيم متعدد فينول Polyphenol Oxidase الذي يعمل على اكسدة المواد متعددة الفينول Polyphenols الى كوينونات Quinone ثم تمر بسلسلة تفاعلات مؤدية الى ظهور اللون البني بسبب صبغة الميلانين Melanin.

Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات والتوصيات

5: الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

1-5: الاستنتاجات Conclusions

- الحصول على بكتريا محلية جديدة عزلت لأول مرة في العراق *L.paraplantarum* من عينة اللبن الرائب للجاموس بنسبة تطابق 100% مع سلالة مرجعية لبكتريا *L.paraplantarum* .
- استعمال العزلة الجديدة في انتاج حامض اللاكتيك بطريقة التخمر المايكروبي على وسط للإنتاج الشرش الذي يمتاز بتوفره ورخص ثمنه.
- إمكانية تحضير أغشية من متعدد حامض اللاكتيك مدعمة بجسيمات السليكا النانوية تمتاز بالشفافية والتجانس والقوام وعدم التكسر مع تقادم زمن التحضير .
- امكانية تحسين الصفات الميكانيكية والحرارية للأغشية باستعمال تراكيز معينة من المادة المدعمة.
- محافظة ثمار البرحي المغلفة بأغشية متعدد اللاكتيك المدعمة على جودتها ونظارتها وعدم ظهور اي روائح او طعوم غير مقبولة مما ادى اطالة العمر الخرنى.
- تمتاز الاغشية المدعمة بأنها صديقة للبيئة ذات تحلل بايولوجي خلال فترة قصيرة.

2-5: التوصيات Recommendations

- استعمال اوساط تخمير اقتصادية اخرى لاننتاج الحامض.
- دراسة واجراء بحوث على استعمال الاغلفة في حفظ فواكه وخضروات اخرى.
- توعية المستهلك بفوائد الاغلفة الحيوية ودورها في حماية البيئة من التلوث.
- اجراء بحوث ودراسات لامكانية استعمال اغلفة متعدد اللاكتيك كاغلفة قابلة للاكل.

- امكانية دراسة اضافة نسب معينة من بعض المائئات التي تتجانس مع متعدد اللاكتيك مثل متعدد كابرولاكتوم Polycaprolactum.
- دراسة تأثير الاغشية على المحتوى الميكروبي للمواد الغذائية المغلفة.
- امكانية استخدام مائئات نانوية اخرى مثل الكايتوسان والفضة واوكسيد الفضة واوكسيد التيتانيوم والسليولوز مع متعدد حامض اللاكتيك ودراسة تأثيراتها المختلفة.
- تحضير غشاء متعدد اللاكتيك بأوزان جزيئية مختلفة وبطرائق مختلفة ودراسة خواصه واستعمالاته.
- دراسة الجدوى الاقتصادية من متعدد حامض اللاكتيك.

References المصادر 6:

1-6: المصادر العربية

- العطار، سحر؛ ابو غرة، صياح وهدال، احمد(2015). عزل وتوصيف انواع بكتريا حمض اللبن من بعض منتجات الألبان السورية. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية 31(1): 193-205.
- شبانه، حسن عبد الرحمن وزايد، عبد الوهاب وسنبلي، عبد القادر اسماعيل.(2006). ثمار النخيل، فسلجتها، جنيها، تداولها والعناية بها بعد الجني. منظمة الاغذية والزراعة للأمم المتحدة (FAO). روما. ايطاليا.
- عماش عطية سعيد،(2019). عزل وتشخيص بعض انواع بكتريا حامض اللاكتيك من اللبن الرائب المحلي واختبار قابليتها كمعززات حيوية. مجلة ابحاث كلية التربية الاساسية ،15(3):1927-1950 .

2-6: المصادر الاجنبية

- Adesulu-Dahunsi, A. T., Jeyaram, K., and Sanni, A. I. (2018). Probiotic and technological properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from cereal-based nigerian fermented food products. Food Control, 92, 225-231.
- Ahirwar, S.S., Gupta, M.K., Gupta, G. and Singh, V.(2017). Screening, isolation and identification of lactobacillus species from dental caries of children. Int J. Curr Microbiol App Sci, 6(1), pp.497-503.
- Alhaag, H., Yuan, X., Mala, A., Bai, J., and Shao, T. (2019). Fermentation characteristics of lactobacillus Plantarum and Pediococcus species isolated from

References

المصادر

- sweet sorghum silage and their application as silage inoculants. *Applied Sciences*, 9(6), 1247.
- Al-hilfi, W.A. (2014). Preparation of biodegradable polymer of poly lactic acid using lactic acid bacteria. Ph.D. Thesis. Basrah University.
 - Ali, A., Muhammad, M. T. M., Sijam, K., and Siddiqui, Y. (2011). Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. *Food chemistry*, 124(2), 620-626.
 - AlKalbani, N. S., Turner, M. S., and Ayyash, M. M. (2019). Isolation, identification, and potential probiotic characterization of isolated lactic acid bacteria and in vitro investigation of the cytotoxicity, antioxidant, and antidiabetic activities in fermented sausage. *Microbial cell factories*, 18(1), 188.
 - Al-Mariri, A. and Sharabi, N.D., (2008). Typing some of lactic acid bacteria in Syria using PCR and FT-IR techniques (No. AECS-B/FRSR--416). Atomic Energy Commission.
 - Altin, B. (2009). Synthesis and characterization of monodisperse silica based functional nanoparticles for multi-purpose applications, Master of Science. Izmir Institute of Technology, 1-97.
 - A.O.A.C. (1970). Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
 - ASTM E96. (1995) . Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. American Society for Testing and Materials, P:785-792.
 - Auras, R. A., Lim, L. T., Selke, S. E., and Tsuji, H. (Eds.). (2011). Poly (lactic acid): synthesis, structures, properties, processing, and applications (Vol. 10). John Wiley & Sons.

References

المصادر

- Avella, M., Errico, M. E., Gentile, G., and Volpe, M. G. (2011). Nanocomposite sensors for food packaging. In *Nanotechnological Basis for Advanced Sensors* (pp. 501-510). Springer, Dordrecht.
- Awan, J. A., and Rahman, S. U. (2005). Microbiology manual. Unitech Communications, Faisalabad, Pakistan, 49-51.
- Azadnia, P. K. N. A., and Khan Nazer, A. H. (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional drinking yoghurt in tribes of Fars province. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 10(3), 235-240.
- Baig, N., Shetty, S., Al-Mousawi, S., and Alameddine, B. (2020). Synthesis of conjugated polymers via cyclopentannulation reaction: promising materials for iodine adsorption. *Polymer Chemistry*, 11(17), 3066-3074.
- Barrios, V. A. E., Méndez, J. R. R., Aguilar, N. V. P., Espinosa, G. A., and Rodríguez, J. L. D. (2012). FTIR—An Essential Characterization Technique for Polymeric Materials. *Infrared Spectroscopy-Materials Science, Engineering and Technology*, 195-214.
- Battezzatore, D., Bocchini, S., and Frache, A. (2011). Crystallization kinetics of poly (lactic acid)-talc composites. *Express Polym Lett*, 5(10), 849-858.
- Borovic, B., Velebit, B., Veskovic, S., Baltic, T., Milijasevic, M., Jankovic, V., and Vranic, D. (2019). Lactic acid bacteria isolated from sremska sausage using molecular methods. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 333, No. 1, p. 012047). IOP Publishing.
- Božanić, R., Barukčić, I., and Lisak, K. (2014). Possibilities of whey utilisation. *Austin Journal of Nutrition and Food Sciences*, 2(7), 7.
- Bulut, C. (2003). Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from Cheese. MSc. Thesis, İzmir Institute of Technology Izmir, Turkey, pp102.

References

المصادر

- Bureau, S., Ruiz, D., Reich, M., Gouble, B., Bertrand, D., Audergon, J. M., and Renard, C. M. (2009). Application of ATR-FTIR for a rapid and simultaneous determination of sugars and organic acids in apricot fruit. *Food Chemistry*, 115(3), 1133-1140.
- Chieng, B. W., Ibrahim, N. A., Yunus, W. M. Z. W., and Hussein, M. Z. (2014). Poly (lactic acid)/poly (ethylene glycol) polymer nanocomposites: effects of graphene nanoplatelets. *Polymers*, 6(1), 93-104.
- Choi, W. S. and Han, J. H. (2001). Physical and Mechanical Properties of Pea-Protein-based Edible Films. *Journal of Food Science*, 66(2)319-322.
- Chonhenchob, V., Saha, K., Singh, S. P., and Siddiq, M. (2013). Packaging Technologies for Dates and Date Products. *Dates– Postharvest Science, Processing Technology and Health Benefits*, 137-156.
- Choonut, A., Paichid, N., Yunu, T., and Sangkharak, K. (2016). The statistic optimization for lactic acid production by *Lactobacillus Plantarum* using ethanol stillage as sole carbon source. In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1775, No. 1, p. 030019). AIP Publishing LLC.
- Collazo-Bigliardi, S., Ortega-Toro, R. and Chiralt, A., (2019). Using grafted poly (ϵ -caprolactone) for the compatibilization of thermoplastic starch-poly(lactic acid) blends. *Reactive and Functional Polymers*, 142, pp.25-35.
- Collee, J.G.; Miles, R.S. and Batt, B. (1996). Test for the identification of bacteria. In: *Practical medical of microbiology*. 4th ed. Collee, J.G.; Marmion, B.P. Francer, A.G. and Simmons, A. (editor). Mackie and McCartney, New York, PP.: 131.
- Courgneau, C., Domenek, S., Guinault, A., Avérous, L., and Ducruet, V. (2011). Analysis of the structure-properties relationships of different multiphase systems

References

المصادر

- based on plasticized poly (lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 19(2), 362-371.
- Curk, M.C.; Hubert, J. C.; Bringel, F. (1996). *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a New Species Related to *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46 (2): 595–598.
 - Da Costa, R. J., Voloski, F. L., Mondadori, R. G., Duval, E. H., and Fiorentini, Â. M. (2019). Preservation of meat products with bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. *Journal of Food Quality*, 2019.
 - De Oliveira, R. A., Komesu, A., Rossell, C. E. V., and Maciel Filho, R. (2018). Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—from economic to production aspects. *Biochemical Engineering Journal*, 133, 219-239.
 - Durán, N., and Marcato, P. D. (2013). Nanobiotechnology perspectives. Role of nanotechnology in the food industry: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(6), 1127-1134.
 - Endo, A., Tanizawa, Y., and Arita, M. (2019). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Environmental Samples. In *Lactic Acid Bacteria* (pp. 3-13). Humana Press, New York, NY.
 - Fukushima, K., and Kimura, Y. (2006). Stereocomplexed polylactides (Neo-PLA) as high-performance bio-based polymers: their formation, properties, and application. *Polymer International*, 55(6), 626-642.
 - Garvey, J. S.; Cremer, N. E. and Sussdorf, D.H. (1977). *Methods immunology*, 3rd ed. INC. Massachusetts, U.S.A.
 - Gedde U.W. (1999). *Thermal Analysis of Polymers*. In: *Polymer Physics*. Springer, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-0543-9-10>.
 - Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., and Mehmood, S. (2014). Recent trends in lactic acid biotechnology: a brief review

References

المصادر

- on production to purification. *Journal of radiation research and applied Sciences*, 7(2), 222-229.
- Glasner, B., Botes, A., Zaid, A., and Emmens, J. (1999). *Date harvesting, packinghouse management and marketing aspects. Date palm cultivation*. FAO, Roma (Italia).
- Gontard, N., Guilbert, S., and CUQ, J. L. (1992). Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of food science*, 57(1), 190-195.
- Greenwood, D. J., and Levin, M. (2006). *Introduction to action research: Social research for social change*. SAGE publications.
- Gregorczyk, K. and M. Knez, (2016). Hybrid nanomaterials through molecular and atomic layer deposition: Top down, bottom up, and in-between approaches to new materials. *Progress in Materials Science*, 75:1–37.
- Guimarães, A., Venancio, A., and Abrunhosa, L. (2018). Antifungal effect of organic acids from lactic acid bacteria on *Penicillium nordicum*. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 35(9), 1803-1818.
- Gupta, A. P. and Kumar, V. (2007). New emerging trends in synthetic biodegradable polymers–Polylactide: A critique. *European polymer journal*, 43(10), 4053-4074.
- Han, C., Zuo, J., Wang, Q., Xu, L., Zhai, B., Wang, Z., and Gao, L. (2014). Effects of chitosan coating on postharvest quality and shelf life of sponge gourd (*Luffa cylindrica*) during storage. *Scientia horticulturae*, 166, 1-8.
- Harley, J.P. and Prescott, L. M. (2002). *Laboratory exercises in microbiology*. 5th ed. The McGraw – Hill companies, U. S. A. 449.
- Harrigan, W. F. (1998). *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. 3rd Ed. Academic Press, California . USA. 532p.

References

المصادر

- Harrigan, W. F. and McCance, M. E. (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, London.
- Hatakeyama, T., Quinn, F.X. (1994). Thermal Analysis; Fundamentals and Applications to Polymer Science. New York, NY: John Wiley and Sons: ISBN 0-471-95103-X.
- Hatti-Kaul, R., Chen, L., Dishisha, T. and Enshasy, H.E., (2018). Lactic acid bacteria: From starter cultures to producers of chemicals. *FEMS microbiology letters*, 365(20), p.fny213.
- Henton, D. E., Gruber, P., Lunt, J., and Randall, J. (2005). Polylactic acid technology. Natural fibers, biopolymers, and biocomposites, 16, 527-577.
- Holt, J. C., Krieg, N. R. ; Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th Ed., Williams and Wilkins. Baltimore Maryland, USA .
- Horwitz, W. (1980). Association of official analytical chemist (AOAC) . 13th ed. *George Banta Co. Press, INC.* Menasha , Wisconsin , USA .
- Hu, Y., Daoud, W. A., Cheuk, K. K. L., and Lin, C. S. K. (2016). Newly developed techniques on polycondensation, ring-opening polymerization and polymer modification: Focus on poly (lactic acid). *Materials*, 9(3), 133.
- Huang, L., Zeng, X., Sun, Z., Wu, A., He, J., Dang, Y. and Pan, D., (2020). Production of a safe cured meat with low residual nitrite using nitrite substitutes. *Meat Science*, 162, p.108027.
- Huang, H., Grün, I. U., and Ellersieck, M. (2018). Use of HPLC and FTIR as a tool for analysis of lactic acid in restructured fish products. *J Nutr Food Technol*, 1(2), 42-48.
- Hutkins, R.W., (Ed). (2019). Microbiology and Technology of Fermented Foods, 2nd Ed., Wiley Blackwell USA. pp 70-72.

References

المصادر

- Ibrahim, G. A., Mawgoud, Y. A., Dabiza, N. M., Sharaf, O. M., and El-Sayad, M. F. (2017). Optimization of lactic acid production from supplemented whey permeate using immobilized *Lactobacillus plantarum*. *Sciences*, 7(04), 794-804.
- Ilmén, M., Koivuranta, K., Ruohonen, L., Suominen, P., and Penttilä, M. (2007). Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(1), 117-123.
- Ingrao, C., Tricase, C., Cholewa-Wójcik, A., Kawecka, A., Rana, R. and Siracusa, V., (2015). Polylactic acid trays for fresh-food packaging: A Carbon Footprint assessment. *Science of the Total Environment*, 537, pp.385-398.
- Jafari, M., Rezaei, M., Gheisari, H. R., Abhari, K., Khaniki, G. J., Noori, N., and Khaneghah, A. M. (2019). Application of cultivable lactic acid bacteria isolated from Iranian traditional dairy products for the production of liquid and dried kashks. *LWT*, 116, 108519.
- Jeziorska, R., Szadkowska, A., Spasowka, E., Lukomska, A., and Chmielarek, M. (2018). Characteristics of Biodegradable Polylactide/Thermoplastic Starch/Nanosilica Composites: Effects of Plasticizer and Nanosilica Functionality. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2018.
- Kalavrouzioti, I., M. Hatzikamari, E. Litopoulou-Tzanetaki and N. Tzanetakis, (2005). Production of hard cheese from caprine milk by the use of two types of probiotic cultures as adjuncts. *Int. J. Dairy Technol.*, 58: 30-38.
- Kamil, O. T., El-Hefnawy, S. M., Alashkar, R. A., and Gad, M. M. (2019). the impact of nano chitosan and nano silicon coatings on the quality of canino apricot fruits during cold storage. *Zagazig Journal of Agricultural Research*, 46(6), 2215-2227.

References

المصادر

- Kandler, O. and Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus* In: Bergey's manual of systematic Bacteriology. Vol. 2. Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (editors). Williams and Wilkins, Boltimore, PP. 1209-1234.
- Kargozari, M., Emam-Djomeh, Z., Gandomi, H., Partovi, R., Ghasemlou, M., and Martin, I. R. (2015). Identification of selected *Lactobacillus* strains isolated from Siahmazgi cheese and study on their behavior after inoculation in fermented-sausage model medium. *LWT-Food Science and Technology*, 62(2), 1177-1183.
- Kasra-Kermanshahi, R., and Mobarak-Qamsari, E. (2015). Inhibition effect of lactic acid bacteria against food born pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Applied Food Biotechnology*, 2(4), 11-19.
- Kester, J. J., and Fennema, O. R. (1986). Edible films and coatings: a review. *Food technology (USA)*.
- Kirk, S., and Sawyer, R. (1991). *Pearson's composition and analysis of foods* (No. Ed. 9). Longman Group Ltd.
- Komesu, A., Wolf Maciel, M. R., Rocha de Oliveira, J. A., da Silva Martins, L. H., and Maciel Filho, R. (2017a). Purification of lactic acid produced by fermentation: focus on non-traditional distillation processes. *Separation and Purification Reviews*, 46(3), 241-254.
- Komesu, A., Maciel, M. R. W., and Maciel Filho, R. (2017b). Separation and purification technologies for lactic acid—a brief review. *Bio Resources*, 12(3), 6885-6901.
- Kumar, V., Kumari, A., Angmo, K., and Bhalla, T. C. (2017). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India. *Journal of food science and technology*, 54(7), 1945-1952.

References

المصادر

- Lai, S. M., Chen, J. R., Han, J. L., Yu, Y. F., and Lai, H. Y. (2013). Preparation and properties of melt-blended polylactic acid/polyethylene glycol-modified silica nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 130(1), 496-503.
- Lai, S. M., and Hsieh, Y. T. (2016). Preparation and properties of polylactic acid (PLA)/silica nanocomposites. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 55(3), 211-228.
- Laslo, É. , György, É., and Czikó, A. (2019). Meat starter cultures: Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional sausages. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, 12(1), 54-69.
- Lasprilla, A. J., Martinez, G. A., Lunelli, B. H., Jardini, A. L., and Maciel Filho, R. (2012). Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices—A review. *Biotechnology advances*, 30(1), 321-328.
- Li, Yi, Changyu Han, Junjia Bian, Lijing Han, Lisong Dong, and Ge Gao. (2012). Rheology and biodegradation of polylactide/silica nanocomposites. *Polymer composites* 33, 10: 1719-1727.
- Luo, Y., Lin, Z. and Guo, G. (2019). Biodegradation assessment of poly (lactic acid) filled with functionalized Titania nanoparticles (PLA/TiO₂) under compost conditions. *Nanoscale research letters*, 14(1), p.56.
- Mahulette, F., Mubarik, N. R., Suwanto, A., and Widanarni, W. (2016). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Inasua. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 1(2), 71-76.
- Majid, I., Thakur, M., and Nanda, V. (2018). Biodegradable packaging materials. 688-697.
- Makete, G., Aiyegoro, O. A., and Thantsha, M. S. (2017). Isolation, identification and screening of potential probiotic bacteria in milk from South african saanen goats. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 9(3), 246-254.

References

المصادر

- Manandhar, A., and Shah, A. (2020). Techno-Economic Analysis of Bio-Based Lactic Acid Production Utilizing Corn Grain as Feedstock. *Processes*, 8(2), 199.
- Mannepula, S., Bathal, V. K., and Obulam, V. S. R. (2015). A comparative study on utilisation of citrus and mango peels for lactic acid production and optimisation by *Rhizopus oryzae* in submerged fermentation. *Eur. J. Biotechnol. Biosci*, 3, 18-26.
- Martucci, J. F., and Ruseckaite, R. A. (2009). Biodegradation of three-layer laminate films based on gelatin under indoor soil conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 94(8), 1307-1313.
- Mithun, S., Dipak, V., and Sheela, S. (2015). Isolation and Identification of lactobacilli from raw milk samples obtained from Aarey Milk Colony. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 5(4), 1-5.
- Miyoshi, T., Iwatsuki, T., and Naganuma, T. (2005). Phylogenetic characterization of 16S rRNA gene clones from deep-groundwater microorganisms that pass through 0.2-micrometer-pore-size filters. *Applied and environmental microbiology*, 71(2), 1084-1088.
- Mokoena, M.P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255.
- Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Landry, M.L. and Tenover, M.A. (2007). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington, DC. American Society for Microbiology, USA.
- Nazir, Y., Hussain, S. A., Abdul Hamid, A., and Song, Y. (2018). Probiotics and their potential preventive and therapeutic role for cancer, high serum cholesterol, and allergic and HIV diseases. *BioMed research international*, 2018.

References

المصادر

- Nampoothiri, K. M., Nair, N. R., and John, R. P. (2010). An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource technology*, 101(22), 8493-8501.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P. K., and Srivastava, A. (2004). L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic journal of Biotechnology*, 7(2), 167-178.
- O'Bryan, C.A., Crandall, P.G., Ricke, S.C. and Ndahetuye, J.B. (2015). Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: types and mechanisms of action. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, 6, pp.117-29.
- Oliveira, R. A. D., Maciel Filho, R., and Rossel, C. V. (2016). High lactic acid production from molasses and hydrolysed sugarcane bagasse. *Chemical Engineering Transactions*, 50, 307-312.
- Öz AT, Süfer Ö., and Çelebi Sezer Y., (2017). Poly (Lactic Acid) Films in Food Packaging Systems. *Food Science and Nutrition Technology* .Volume 2 Issue4.
- Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Knill, C. J., and Kosseva, M. (2010). Production of L (+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 53, 219-226.
- Panseri, S., Martino, P.A., Cagnardi, P., Celano, G., Tedesco, D., Castrica, M., Balzaretto, C. and Chiesa, L.M., (2018). Feasibility of biodegradable based packaging used for red meat storage during shelf-life: A pilot study. *Food chemistry*, 249, pp.22-29.
- Păucean, A., Vodnar, D. C., Mureșan, V., Fetea, F., Ranga, F., Man, S. M., and Socaciu, C. (2017). Monitoring lactic acid concentrations by infrared

- spectroscopy: A new developed method for Lactobacillus fermenting media with potential food applications. *Acta Alimentaria*, 46(4), 420-427.
- Poudel, P., Tashiro, Y., and Sakai, K. (2016). New application of Bacillus strains for optically pure L-lactic acid production: general overview and future prospects. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(4), 642-654.
 - Ramanjooloo, A., Bhaw-Luximon, A., Jhurry, D., and Cadet, F. (2009). ¹H NMR quantitative assessment of lactic acid produced by biofermentation of cane sugar juice. *Spectroscopy Letters*, 42(6-7), 296-304.
 - Ren, D., Zhu, J., Gong, S., Liu, H., and Yu, H. (2018). Antimicrobial characteristics of lactic acid bacteria isolated from homemade fermented foods. *BioMed research international*, 2018.
 - Reuben, R.C., Roy, P.C., Sarkar, S.L., Alam, R.U. and Jahid, I.K., (2019). Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *BMC microbiology*, 19(1), p.253.
 - Ripari, V., Gänzle, M. G., and Berardi, E. (2016). Evolution of sourdough microbiota in spontaneous sourdoughs started with different plant materials. *International journal of food microbiology*, 232, 35-42.
 - Rose, A.H. (1976). *Chemical microbiology: An introduction to microbial physiology*, 3rd. ed. Butter worths. London. PP.: 469.
 - Ruiz Rodriguez, L. G., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E. M., and Mozzi, F. (2019). Diversity and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated From Wild Fruits and Flowers Present in Northern Argentina. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1091.
 - Ryu, H.W., Yun, J.S., Wee, Y.J., (2003). Lactic acid. In: Pandey, A. (Ed.), *Concise Encyclopedia of Bioresource Technology*. The Haworth Press, New York, p. 635.

References

المصادر

- Sahoki, M. and K. M. Wahib. 1990. Applications in the design and analysis of experiments. Dar Al - Hikma Press Printing and Publishing. Mosul University: 488pp.
- Sahu, S., Behera, B., Maiti, T. K., and Mohapatra, S. (2012). Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: application as excellent bio-imaging agents. *Chemical communications*, 48(70), 8835-8837.
- Salehizadeh, M., Modarressi, M. H., Mousavi, S. N., and Ebrahimi, M. T. (2020). Evaluation of lactic acid bacteria isolated from poultry feces as potential probiotic and it's in vitro competitive activity against Salmonella typhimurium. In *Veterinary Research Forum* (Vol. 11, No. 1, p. 67). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
- Sambrook, J. and D. Russell (2001). Molecular cloning: A laboratory manual, the third edition, Cold spring harbor laboratory press, cold spring harbor, New York.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning and laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor, New York. pp: 46-49.
- Samelis, J., Maurogenakis, F., and Metaxopoulos, J. (1994). Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *International Journal of Food Microbiology*, 23(2), 179-196.
- Sand, C.K., (2018). Packaging That Keeps Produce Fresh. *Food Technology*, 72(1):69-71.
- Sarkar, S., and Kuna, A.(2020). Food Packaging and Storage.
- Sarkar, D., and Paul, G. (2019). A study on optimization of lactic acid production from whey by Lactobacillus sp isolated from curd sample.

References

المصادر

- Sarkar, P., Choudhary, R., Panigrahi, S., Syed, I., Sivapratha, S. and Dhumal, C.V., 2017. Nano-inspired systems in food technology and packaging. *Environmental Chemistry Letters*, 15(4), pp.607-622.
- Schleifer, K. H. (2009). Family I. Lactobacillaceae Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1917, familia. De Vos PG, GM; Jones, D.; Krieg, NR, 465-532.
- Schillinger, U. and Lücke, F.K. (1987). Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food microbiology*, 4(3), pp.199-208.
- Singh, A. A., Sharma, S., Srivastava, M., and Majumdar, A. (2020). Modulating the properties of polylactic acid for packaging applications using biobased plasticizers and naturally obtained fillers. *International journal of biological macromolecules*, 153, 1165-1175.
- SISO, M. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review *Bioresource Technol.*, v. 57.
- Sharpe, R.M., Fraser, H.M., Cooper, I. and Rommerts, F.F.G., (1981). Sertoli–Leydig cell communication via an LHRH-like factor. *Nature*, 290(5809), pp.785-787.
- Shehata, M. G., Badr, A. N., El Sohaimy, S. A., Asker, D., and Awad, T. S. (2019). Characterization of antifungal metabolites produced by novel lactic acid bacterium and their potential application as food biopreservatives. *Annals of Agricultural Sciences*, 64(1), 71-78.
- Shirokov, E.P. (1968). *Partial Course in Storage and Processing of Fruit and Vegetable* USDA/NSF. Washington. D.C, USA. PP: 161.
- Shojaeiarani, J., Bajwa, D. S., Stark, N. M., and Bajwa, S. G. (2019). Rheological properties of cellulose nanocrystals engineered polylactic acid nanocomposites. *Composites Part B: Engineering*, 161, 483-489.

References

المصادر

- Sorrentino, A., Gorrasi, G., and Vittoria, V. (2007). Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications. *Trends in food science & technology*, 18(2), 84-95.
- Sothornvit, R., and Krochta, J. M. (2000). Oxygen permeability and mechanical properties of films from hydrolyzed whey protein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(9), 3913-3916.
- Sprenger, S. (2020). Nanosilica-toughened epoxy resins. *Polymers*, 12(8), 1777.
- Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36:1-29.
- Teo, P. S., and Chow, W. S. (2014). Water vapour permeability of poly (lactic acid)/chitosan binary and ternary blends. *Applied Science and Engineering Progress*, 7(1), 23-27.
- Teusink, Bas and Molenaar, Douwe. (2017). systems biology of lactic acid bacteria: for food and thought. *Current opinion in systems biology*, 6:7-13.
- Turner, T. L., Zhang, G. C., Kim, S. R., Subramaniam, V., Steffen, D., Skory, C. D., and Jin, Y. S. (2015). Lactic acid production from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae* without PDC or ADH deletion. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(19), 8023-8033.
- Vaidya, A. N., Pandey, R. A., Mudliar, S., Kumar, M. S., Chakrabarti, T., and Devotta, S. (2013). Production and recovery of lactic acid for polylactide—an overview. *Critical reviews in environmental science and technology*, 35(5), 429-467.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*, 60(2), 407-438.

References

المصادر

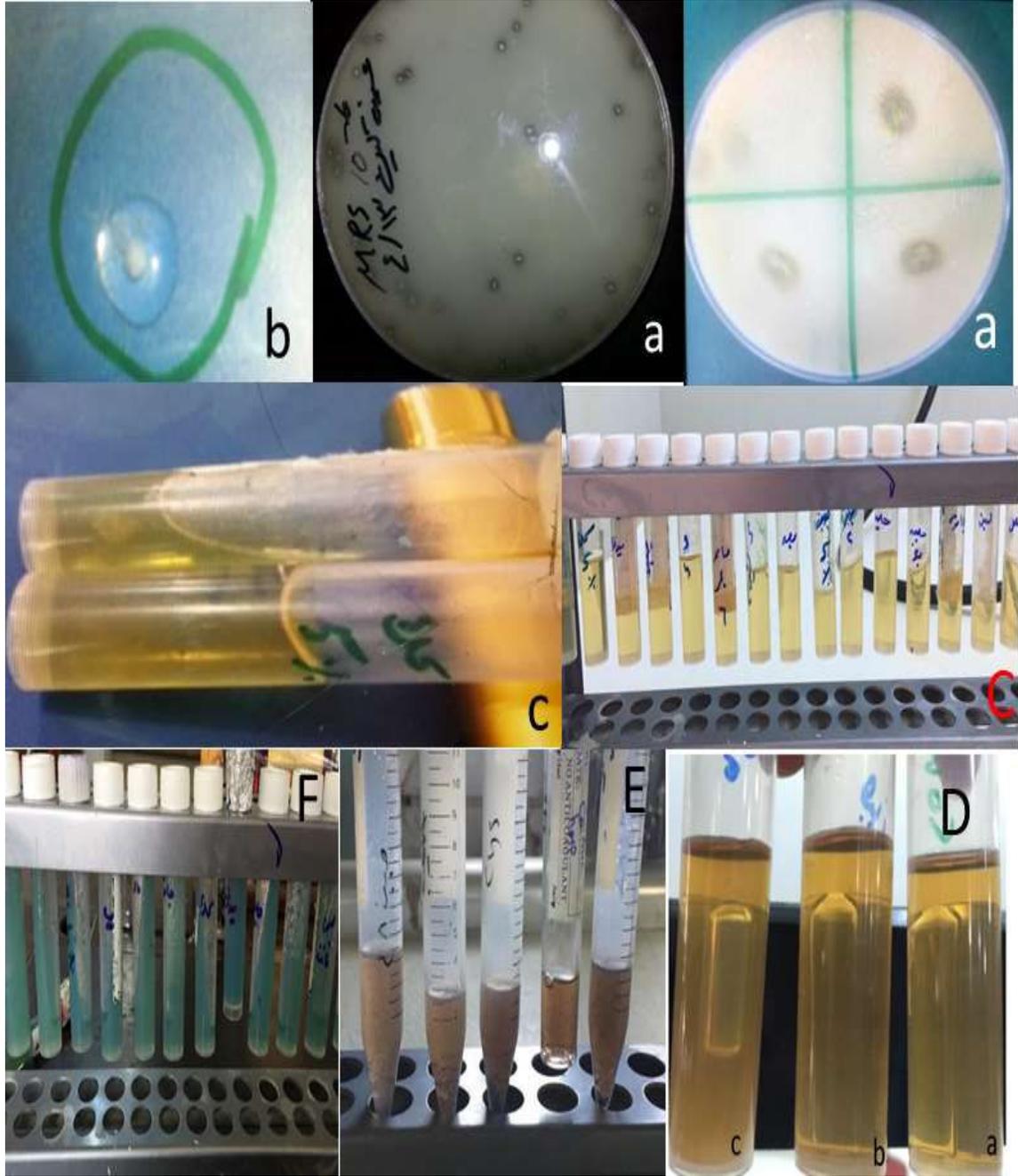
- Vasile, C., Pamfil, D., Râpă, M., Darie-Niță, R. N., Mitelut, A. C., Popa, E. E., and Popa, M. E. (2018). Study of the soil burial degradation of some PLA/CS biocomposites. *Composites Part B: Engineering*, 142, 251-262.
- VickRoy, T.B., 1985. Lactic acid. In: Moo-Young, M. (Ed.), *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon Press, New York, p. 761.
- Vidra, A., Tóth, A. J., and Németh, Á. (2017). Lactic acid production from cane molasses. *Waste Treatment and Recovery*, 2(1), 13-16.
- Vodnar, D. C., Paucean, A., DULF, F. V., and Socaciu, C. (2010). HPLC characterization of lactic acid formation and FTIR fingerprint of probiotic bacteria during fermentation processes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(2), 109-113.
- Wardani, S. K., Cahyanto, M. N., Rahayu, E. S., and Utami, T. (2017). The effect of inoculum size and incubation temperature on cell growth, acid production and curd formation during milk fermentation by *Lactobacillus plantarum* Dad 13. *International Food Research Journal*, 24(3).
- Wasewar, K. L. (2005). Separation of Lactic Acid: Recent Advances. *Chem. Biochem. Eng. Q*, 19, 159-172.
- Wassie, M., and Wassie, T. (2016). Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk. *Int J Adv Res Biol Sci*, 3(8), 44-49.
- Willey, J. M., Sherwood, L., and Woolverton, C. J. (2008). Prescott, Harley, and Klein's microbiology. 7th ed., The McGraw–Hill Companies.
- Yalçınkaya, S., and Kılıç, G. B. (2019). Isolation, identification and determination of technological properties of the halophilic lactic acid bacteria isolated from table olives. *Journal of food science and technology*, 56(4), 2027-2037.

- Yee, Y. Y., Ching, Y. C., Rozali, S., Hashim, N. A., and Singh, R. (2016). Preparation and characterization of poly (lactic acid)-based composite reinforced with oil palm empty fruit bunch fiber and nanosilica. *BioResources*, 11(1), 2269-2286.
- Yoo, H., Rheem, I., Rheem, S., and Oh, S. (2018). Optimizing Medium Components for the Maximum Growth of *Lactobacillus plantarum* JNU 2116 Using Response Surface Methodology. *Korean journal for food science of animal resources*, 38(2), 240.
- Yoshida, H., Terashima, M., and Takahashi, Y. (1999). Production of organic acids and amino acids from fish meat by sub-critical water hydrolysis. *Biotechnology progress*, 15(6), 1090-1094.
- Yuwa-Amornpitak, T., and Chookietwatana, K. (2018). Bioconversion of waste cooking oil glycerol from cabbage extract to lactic acid by *Rhizopus microsporus*. *brazilian journal of microbiology*, 49, 178-184.
- Zamanova, M. K., Glotova, V. N., Izhenbina, T. N., Krutas, D. S., and Novikov, V. T. (2014). Simultaneous HPLC-UV determination of lactic acid, glycolic acid, glycolide, lactide and ethyl acetate in monomers for producing biodegradable polymers. *Procedia Chemistry*, 10, 244-251.
- Zhang, H. and Mittal, G. (2010). Biodegradable protein based films from plant resources: A review. *Env. Progress Sustainable Energy*, 29: 203-220.
- Zhang, R., Wang, X., Wang, J., and Cheng, M. (2019). Synthesis and characterization of konjac glucomannan/carrageenan/nano-silica films for the preservation of postharvest white mushrooms. *Polymers*, 11(1), 6.

References

المصادر

- Zhang, Y., and Vadlani, P. V. (2015). Lactic acid production from biomass-derived sugars via co-fermentation of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 119(6), 694-699.
- Zhou, L., Zhao, G. and Jiang, W., 2016. Mechanical properties of biodegradable polylactide/poly (ether-block-amide)/thermoplastic starch blends: Effect of the crosslinking of starch. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(2).
- Zhu, H., Wang, X., Li, Y., Wang, Z., Yang, F., and Yang, X. (2009). Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties. *Chemical Communications*, (34), 5118-5120.



ملحق (1) الفحوصات البايوكيميائية للعضلات المعزولة من مصادر مختلفة

a-انتاج الحامض b-اختبار الكاتاليز c-اختبار تسييل الجيلاتين D- اختبار انتاج CO₂ من

الكلوكوز E- اختزال النترات F-استهلاك السترات

File: Z1_ZF.ab1 Run Ended: 2019/2/13 7:32:53 Signal G:913 A:2116 C:2394 T:1477

Sample: Z1_ZF Lane: 71 Base spacing: 16.309147 1175 bases in 14021 scans Page 2 of 2

630 TCGGAAACTGGGAAACTTTGAGTGCAGAAAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCCGTAGATATATGGAAGAAACCAAGTGGCGAAAGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTTA
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750

760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000

1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130

1140
1150
1160
1170



10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
 C C C A T C T G C C A C T T A G G C G G C T G G T T C T A A A G G T T A C C C A C C G A C T T T G G G T T A C A A C T C T C A T G G T G T G A C G G G C G G T G T A C A A G G C C C G G G A A C G T A T T C A C C G C G G C A T G C T G

130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
 A T C C G C G A T T A C T A G C G A T T C A T G A T T T A G G C T T A A G A G A T T A G C T T A C T C T C G C G A G T T C G C A A C T C G T T G T A C C A T C C A T T G T A G C

250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370
 A C G T G T A G C C C A G G T C A T A A G G G C A T G A T T T G A C G T C A T C C C C A C C T T C C T C C G G T T T G T C A C C G G C A G T C T C A C C A G A G T G C C C A C T T A A T G C T G G C A A C T G A T A A T A A G G G T T G C G

380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490
 C T C G T T G C G G A C T T A A C C C A A C A T C T C A C G A C A C G A G C T G A C G A C A A C C A T G C A C C A C C T G T A T C C A T G T C C C C G A A G G G A A C G T C T A A T C T C T T A G A T T T G C A T A G T A T G T C A A G A C C C T G G T A

500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620
 A G G T T C T T C G C G T A G C T T C G A A T T A A C C A C A T G C T C C A C C G C T T G T G C G G G C C C C C G T C A A T T C C T T T G A G T T T C A G C C T T C A G C C T T G C G G C C G T A C T C C C C A G G C G G A A T G C T T A A T G C G T T A G C T T G C A G

930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 A G G T T C T T C G C G T A G C T T C G A A T T A A C C A C A T G C T C C A C C G C T T G T G C G G G C C C C C G T C A A T T C C T T T G A G T T T C A G C C T T C A G C C T T G C G G C C G T A C T C C C C A G G C G G A A T G C T T A A T G C G T T A G C T T G C A G

630 CACTGAAGGGCGGAAACCCCTCCAAACACTTAGCATTCATCGTTTACGGTATGGACTACCAAGGATATCTAATCCTGTTTTGCTACCCATACTTTCGAGCCTCAGCGTCAGGTTCAGTTACAGACCA GACAGC
730 740

750 CGCCCTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTCAACCAGTTTCAACGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCCTCTCTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCACCTCTTTCGGTTGAGCCGAA GGCT
800 810 820 830 840 850 860 870

880 TTTACATCAGACTTAAAAA CCGCCTGGCTCGCTTACGCCAATAAATCCGGACAAAGCCTTGCACCTACGTAATACCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTAAAATACCGTCA
930 940 950 960 970 980 990 1000

1010 TACCTGAACA GTHACTCTCA GATATGTTCTTCTTTAAACAAGTTTACGAGCTTTACGAGCCGAAAACC TTCTTA TTCA GCGGGGTGTTCATCA GAAATTTCCGCC TTGTGGAGA TTCCC ACTGCTGCC TCCGC
1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120

1130 A GAAA TTTGGG C GGGG TCCATCCCCATGGGGCCATA CCCCCTCCGGGGGGACAAAAA TTTCCCTGAG
1140 1150 1160 1170 1180 1190

1200

LOCUS MT622658 1175 bp DNA linear BCT 16-JUN-2020 DEFINITION *Lactobacillus paraplantarum* strain LP IQ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION MT622658

VERSION MT622658

KEYWORDS .

SOURCE *Lactobacillus paraplantarum*

ORGANISM *Lactobacillus paraplantarum*

Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae;

Lactobacillus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1175)

AUTHORS Hassan,Z.A., Niamah,A.K. and Hanoosh,W.S.

TITLE Poly lactic acid production from *Lactobacillus paraplantarum* isolate

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1175)

AUTHORS Hassan,Z.A., Niamah,A.K. and Hanoosh,W.S.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (16-JUN-2020) Food Science, University of Basrah, Hostile university/ No. 53, Basrah, Basra 61004, Iraq

COMMENT ##Assembly-Data-START## Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing ##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1175

/organism="*Lactobacillus paraplantarum*" /mol_type="genomic DNA"

/strain="LP IQ"

/isolation_source="Dairy product"

/host="Dairy"

/db_xref="taxon:60520"

rRNA <1..>1175

/product="16S ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 gggggcaatt ggggggtgct atacatgcag tcgaacgaac tctggtattg attggtgctt 61
gcacatgat ttacatttga gtgagtggcg aactggtgag taacacgtgg gaaacctgcc 121
cagaagcggg ggataacacc tggaaacaga tgctaatacc gcataacaac ttggaccgca 181
tggtccgagt ttgaaagatg gcttcggcta tcacttttgg atgggccgc ggcgtattag 241
ctagatggtg aggtaacggc tcaccatggc aatgatacgt agccgacctg agagggtaat 301
cggccacatt gggactgaga cacggcccaa actcctacgg gaggcagcag tagggaatct 361
tccacaatgg acgaaagtct gatggagcaa cgccgcgtga gtgaagaagg gtttcggctc 421
gtaaaactct gttgttaaag aagaacatat ctgagagtaa ctgttcaggt attgacggta 481
ttaaaccaga aagccacggc taactacgtg ccagcagccg cggtataacg taggtggcaa 541
gcgttgccg gatttattgg gcgtaaagcg agcgcaggcg gttttttaaag tctgatgtga 601
aagccttcgg ctcaaccgaa gaagtgcac ggaaactggg aaacttgagt gcagaagagg 661
acagtggaac tccatgtgta gcggtgaaat gcgtagatat atggaagaac accagtggcg 721
aaagcggctg tctggtctgt aactgacgct taggctcgaa agtatgggta gcaaacagga 781
ttagataccc tggtagtcca taccgtaaac gatgaatgct aagtgttga gggtttccgc 841
ccttcagtg tgcagctaac gcattaagca ttccgcctgg ggagtacggc cgcaaggctg 901
aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga gcatgtggtt taattcgaag 961
ctacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca tactatgcaa atctaagaga ttagacgttc 1021
ccttcgggga catggataca ggtggtgcat ggttgctcgc acctccggtc gggagatggt 1081
ggggtaagtc ccgcacggag ggcaccctta ttatcagttg ccgccattaa attggggcct 1141
cttgtggaaa atgccggggc ccaaccgggg ggagg
```

//

Summary

Various local sources (Cow's milk, buffalo milk, cheese, cream, Cow's and buffalo's yoghurt, olives pickle, vegetable pickle) were collected for isolating lactic acid bacteria. 81 local isolates diagnosed by MRS-agar growth medium, Microscopy, motion testing. Furthermore, biochemical tests such as catalase test, Coagulation test, gelatinization, Carbon dioxide production from glucose, Nitrate reduction to Nitrite, growth examination at different temperatures, salt concentrations, and growth at different pH, production of ammonia from arginine, and carbohydrate fermentation have been used also.

The most isolate productivity of lactic acid was chosen and genetically diagnosed by polymerize chain reaction technique. The results shown that a new local isolate was obtained from buffalo's yoghurt *Lactobacillus paraplantarum* LP IQ (YL4) with 100% a reference strain of *Lactobacillus paraplantarum* and recorded in the Japanese gene bank and encoded under the number Accession MT622658.

Lactic acid produced from whey was diagnosed with (HPLC) and appearance time of peak for present work and standard acid equal to 5.361 and 5.356 respectively.. The NMR spectrum indicates that, the band (1-1.5) ppm attributed to the CH₃ group while the band within (4-4.5) ppm belonged to the proton of the second carbon atom.

Temperature, pH ,inoculum size and fermentation period are employed to find the best conditions for the production of acid and the results were 30°C, 6.5, 2% and 48 hours, respectively. Polylactic acid polymer has been prepared by using condensation polymerization method. The produced Polylactic was a white to yellow powder. The formation of the polymer confirmed by FTIR technique. The main peaks that characterized the polymer are: The peak at (3506 cm⁻¹) attributed hydroxyl group while the peaks at (2947, 2997) cm⁻¹ for C-H bond. Carbonyl band appeared at 1751

Summary

cm^{-1} in the acid, it displaces to the 1759 cm^{-1} and stronger in Polylactic. Molecular weight of the Polylactic was measured with a GPC device, and it was 39,139 kD.

The Polylactic glass temperature transition was $65.89 \text{ }^\circ\text{C}$. The specific heat is $0.67 \text{ j/g. }^\circ\text{C}$, the melting point is $158 \text{ }^\circ\text{C}$.

The crystallinity was equal to 28.07% , and the poly dispersity index (PDI) was 2.518 from a calorimetric differential scanning measurements. .

The Silica nanoparticles used in the preparation of composite with the prepared Polylactic. A scanning electron microscope was used to know the shape and surface properties of the composite. The Silica nanoparticles size is 29.2 nm . Thin films of composite prepared by casting method with a different ratio of Silica nanoparticles (1, 3, 5) %.

The thickness of the films was estimated and the reinforced film exceeded with 1% Silica nanoparticles and obtained the highest value of $0.1567 \text{ }\mu\text{m}$, while the membrane consisting of PLA obtained the lowest thickness of the film and 0.1133 .

The tensile strength of Polylactic acid membrane increased when adding Silica nanoparticles (1, 3, and 5)% from 19.8 to 21.6, 24, 8 and 31.8, respectively. The biodegradation testing of the membranes showed that the superiority of the Nano silica-supported membrane over the Polylactic acid membrane alone.

Supported Membranes with concentrations of Silica nanoparticles (1, 3, and 5)% were used during the period of storage of the Barhi fruits in the Al-Khalil stage for 30 days. Significant differences were recorded between the Polylactic membrane and the bags of ethylene. The membranes significantly outperformed the membranes in reducing the weight, length and diameter of fruits and dissolved materials and the acidity. It was also characterized by preserving the external appearance, color of the fruits.

Production of polylactic acid from produced lactic acid by local isolate of lactic acid bacteria and using it to prepare Nano film and applied in Barhi khalal packaging

**A thesis Submitted to the council of Agriculture Collage
University of Basra As Partial Fulfilment for the Requirements of
Philosophy Doctorate Degree in Agriculture Sciences/Food Science
Biotechnology**

By

Zainab Abd Ali Hasan

M.SC. Agriculture Sciences- Food Science

2001

Supervised by

Prof.Dr. Alaa Kareem Niamah

Prof.Dr. Widad Salih Hanoosh

2021 A.D.

1443 A.H