

## المسخلص

هدف الدراسة الحالية هو تصنيع حليب الابل المتخمّر الغني بالببتيدات المنخفضة الوزن الجزيئي باستخدام البادئ المفرد *Lactobacillus delbrueckii sp. bulgaricus* والمختلط *Lactobacillus delbrueckii sp. bulgaricus* ، *Streptococcus thermophilus* وتم تلقيح حليب الابل الفرز المبستر بنسبة 5% من البادئ ومتابعة التغيرات الحاصلة في الرقم الهيدروجيني والنسبة المئوية لحامض اللاكتيك وتركيز الببتيدات المتكونه وقدرتها على تثبيط البكتريا المرضية وحساب اعداد بكتريا البادئ في مدد مختلفة من عملية التخمير (0,2,4,6,24 ساعة) وباعتماد افضل تركيز للببتيدات واعلى قدرة على تثبيط البكتريا المرضية تم اختيار الوقت (6 ساعة ) المناسب وباستخدام بادئ مختلط في تصنيع حليب ابل متخمّر واجراء عملية التقييم الحسي له. تم الحصول على المستخلص المائي للحليب المتخمّر (WSE) لاستخدامه في فصل وتنقية الببتيدات المنخفضة الوزن الجزيئي (LMW) من خلال الترسيب بحامض الخليك ثلاثي الكلور (التركيز النهائي 12% TCA) ثم التنقية باستخدام كروماتوغرافي الترشيح الهلامي عبر عمود السيفادكس G-50 بأبعاد (1.8 X 55)سم وتم تحديد قدرة على تثبيط البكتريا المرضية للاجزاء المفصوله. وللحصول على نقاوة اعلى تم استخدام تقنية الطرد المركزي وبمرشحات فائقة الدقة (Centericon) باستخدام انابيب الترشيح الفائق ذات قدرة فصل Molecular Mass Cut-Off(MMCO) 5 و10 كيلو دالتن والتنقية النهائية باستخدام كروماتوغرافي السائل عالي الاداء معكوس الطور Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) وتم اختيار الاجزاء المفصوله التي تمتاز بالفعالية العالية في تثبيط البكتريا المرضية وتحديد تتابع الاحماض الامينية فيها باستخدام تقنية Nano-Electrospray Ionization- Quadrupoles- time-of-flight- Liquid chromatography- Mass spectrometry/Mass spectrometry (TOF-LC-MS/MS) وبعد تحليل النتائج باستخدام برنامج PEAKS Studio 6.0 ومطابقة النتائج مع قاعدة البيانات العالمية لحليب الابل باستخدام Swiss Prot . MAR. fasta. 2013 تم الحصول على النتائج التالية:

1- أظهرت نتائج تركيب حليب الابل الطازج وبعض صفاته الفيزيوكيميائية انه يحتوي على 3.57- 4.03% دهن، 2.92- 3.48% بروتين، 4.06- 5.32% اللاكتوز، 0.77-0.82% مواد صلبة كلية 11.95- 13.93% وتراوح الرقم الهيدروجيني للعينات بين 6.22-6.7 ونسبة حامض اللاكتيك 0.16-0.19% وكانت كثافة الحليب 1.030-1.032 غرام/مل .

2- وصلت اعداد بكتريا البادئ المفرد في حليب الابل المتخمر عند 42°م الى 10<sup>8</sup> وت م/مل بعد مرور 6 ساعات من الحضان مع انخفاض واضح في الرقم الهيدروجيني وارتفاع في النسبة المئوية لحامض اللاكتيك وقد وصل تركيز البيبتيدات الى 0.62 ملغرام /مل واستمر ارتفاع التركيز الى 1.127 ملغرام/مل بعد 24 ساعة من حضان. أما استخدام البادئ المختلط بنسبة 5% فقد ارتفعت اعدادها بعد 4 ساعات من الحضان واستمر بالارتفاع حتى وصلت بعد 6 ساعات الى 10<sup>7</sup> وت م/مل وتركيز البيبتيدات 0.702 ملغرام /مل وبعد 24 ساعة وصل تركيز البيبتيدات الى 1.396 ملغرام/مل.

3- لم يظهر الحليب الطازج اي فعالية تثبيطية تجاه البكتريا المرضية المعزولة محليا باستخدام تقنية agar well diffusion و بعد مرور ست ساعات من التخمر باستخدام بادئ مفرد اظهر تثبيطاً بقطر هالة 9 ملم تجاه بكتريا *E. coli* وبعد 24 ساعة حضان وصل قطر الهالة الى 13 ملم و7 ملم تجاه بكتريا *Pseud. aeruginosa* ، أما حليب الابل المتخمر بالبادئ المختلط فقد كان قطر الهالة التثبيطية بعد ست ساعات 14 ملم تجاه بكتريا *E.coli* و7ملم تجاه بكتريا *Pseud. aeruginosa* و6 ملم تجاه بكتريا *Morg. morganii* وبعد 24 ساعة حضان لحليب الابل المتخمر بفعل البادئ المختلط وصل قطر الهالة التثبيطية الى 20 ملم و 9 ملم تجاه هذه الانواع من البكتيرية على التوالي ، أما بكتريا *Staph. aureus* فقد كان قطر الهالة التثبيطية لها 6 ملم.

4- اظهرت نتائج التقييم الحسي ان متوسط الدرجات الممنوحة من المقيمين للنكهة كانت 8.9 وحصلت الحموضة والمظهر واللون وصفة المرارة على اعلى قيم في خلو المنتج من الطعم المر إذ كانت قيمة متوسط الدرجات الممنوحة 9.5 أما القوام فقد حصل على 7.6 وحصلت

النسجة على 6.8 وبشكل عام فإن المقيمين قد اعطوا اقل درجات للقوام والنسجة إذ ان حليب الابل لايشبه تماما في صفاته اللبن الرائب.

5- انخفض تركيز الببتيدات من 0.703 ملغرام/مل في أثناء تحضير المستخلص المائي WSE لحليب الابل المتخمر بالبادئ المختلط الى 0.635 ملغرام/مل واستمر الانخفاض الى 0.403 ملغرام/مل عند الترسيب بحامض الخليك الثلاثي الكلور TCA وعند تقدير الفعالية التثبيطية في نهاية عملية الاستخلاص باعتماد بكتريا *E.coli* كبكتريا اختبار وجد ان قطر الهالة التثبيطية قد ارتفع الى 20 ملم.

6- فصلت عدة قمم في أثناء عملية التنقية للببتيدات من المستخلص المائي WSE باستخدام كرموتوغرافي الترشيح الهلامي والتي تمثل أوزاناً جزيئية مختلفة ، ولم تظهر القمة الاولى اي فعالية تثبيطية تجاه البكتريا المرضية وكانت خالية من الببتيدات، في حين احتوت القمة الثانية على الببتيدات بتركيز 0.228 ملغرام/مل واعطت قطر هالة تثبيطية 22ملم تجاه بكتريا *E.coli*. اما القمة الثالثة فقد اعطت قطر هالة تثبيطية 24 ملم تجاه بكتريا *E.coli* وقطر 10ملم تجاه بكتريا *Staph.aureus* وقطر 14 ملم تجاه بكتريا *Morg. morganii* وقطر 16ملم تجاه بكتريا *Pseud. aeruginosa* وكان تركيز الببتيدات فيها 0.143 ملغرام/مل ،أما القمة الرابعة والتي احتوت على تركيز ببتيديات 0.129 ملغرام/مل فقد اعطت فعالية تثبيطية فقط تجاه بكتريا *E.coli* بقطر 12 ملم.

7- احتوى الجزء الناضح Permeate للمستخلص المائي لحليب الابل الطازج من انايبب الطرد المركزي وبمرشحات فائقة الدقة 5 كيلودالتن على ببتيديات بتركيز 0.081 ملغرام /مل وبروتينات بتركيز 0.0084 ملغرام / مل واطهر نسبة تثبيط 22.4% لبكتريا *Staph. aureus* ATCC 25923 ونسبة 27.0% تجاه *Strep. faecalis* ATCC 13048 وثبط بكتريا *Shigella dysenteriae* ATCC 11311 بنسبة 18% وبكتريا *E.coli* (DE3)origami بنسبة تثبيط 6.6% ، أما للجزء الناضح Permeate للحليب المتخمر فقد احتوى على ببتيديات بتركيز 0.214 ملغرام /مل ، وبروتينات بتركيز 0.0097 ملغرام / مل ، وأظهر نسبة تثبيط 30% لبكتريا *Staph. aureus* ATCC 25923 ونسبة

32% تجاه *Strep. faecalis* ATCC 13048 وثبتت بكتريا *Shigella dysenteriae* ATCC 11311 بنسبة 42% وبكتريا *E. coli* (DE3)origami بنسبة تثبيط 45.5%.

8- أظهرت نتائج التتقية باستخدام RP-HPLC احتواء الجزء الناضح Permeate للمستخلص المائي لحليب الابل الطازج على اجزاء ذات فعالية متفاوتة في تثبيط البكتريا المرضية وان اعلى فعالية كانت تعود الى الجزء F23 اذ اظهر فعالية تثبيطية بنسبة 22.2% ضد بكتريا *Strep. faecalis* 13048 ATCC ونسبة تثبيط 23% ضد بكتريا *Staph. aureus* ATCC 25923 مع ملاحظة ان تركيز الببتيدات في هذا الجزء قد وصل الى 0.013 ملغرام/مل وان تركيز البروتينات كان منخفضاً جداً إذ وصل الى 0.0054 ملغرام/مل. واطهرت نتائج المستخلص المائي لحليب الابل المتخمر على نسبة من الببتيدات القطبية والمحبة للماء وتم استرداد عدد من الببتيدات اذ احتوى الجزء F17 على ببتيدات بتركيز 0.56685 ملغرام/مل وعدم وجود اي تركيز للبروتينات في هذا الجزء. اما الفعالية التثبيطية فقد وصلت الى 45%، 42% تجاه كل من بكتريا *E. coli* (DE3) origami وبكتريا *Shigella dysenteriae* ATCC 11311 على التوالي وفعالية ضعيفة تجاه بكتريا *Staph. aureus* ATCC 25923 وعدم وجودها تجاه بكتريا *Strep. faecalis* ATCC 13048.

9- أظهرت نتائج تحليل تتابع الاحماض الامينية في الببتيدات الموجودة في الاجزاء الفعالة F23 للحليب الطازج و F17 للحليب المتخمر انها تحتوي على تنوع كبير من الببتيدات إذ تم تشخيص 11 ببتيداً تعود الى مواقع مختلفة من جزيئة البيتا كازئين واربعة ببتيدات تعود الى مواقع مختلفة من جزيئة الـ lactophorin للجزء الفعال F23. وتم تشخيص 30 ببتيداً تعود الى بروتين الفا اس 1 كازئين و 17 ببتيداً تعود الى البيتا كازئين و 9 ببتيدات من الكابا كازئين و 16 ببتيداً تعود الى بروتين Lactophorin في الجزء F17.

10- ظهر ان صفات الببتيدات التي تم الحصول عليها في الاجزاء الفعالة كانت متفاوتة بشكل كبير وان بعض الببتيدات احتوت على صفتين من صفات الببتيدات المضادة فمثلا ببتيدات البيتا الكازئين للحليب الطازج والتي اجتمعت فيها صفة الشحنة الموجبة مع صفة الكره للماء كما في الببتيدات رقم 1,2,4 اما صفة التركيب الثانوي من نوع  $\alpha$ -helix فانها

ايضا اجتمعت مع صفة الكره للماء في بعض الببتيدات كما في الببتيدات رقم 9,7,6,5,3 من البيتا كازئين، واحتوى Lactophorin على ببتيد واحد يحمل صفة الكره للماء وتركيب ثانوي من نوع  $\alpha$ -helix بنسبة 45%. اما ببتيدات الحليب المتخمر فكان اكثرها حاملاً للشحنة الموجبة والتي لها نسبة كره للماء بين 30-50 % تعود الى الكابا كازئين والبيتا كازئين وبنسبة اقل الى الفا اس 1 كازئين وامتازت ببتيدات الكابا كازئين جميعها بانها كارهة للماء بنسبة تراوحت بين 33-50%. وان 7 ببتيدات منها تحمل شحنة موجبة وفي الوقت نفسه كارهة للماء بنسبة اكثر من 30%.

11- لم تظهر الاجزاء (F17, F23) ذات الفعالية في تثبيط البكتريا المرضية والمفصولة باستخدام كرموتوغرافي عالي الاداء معكوس الطور RP-HPLC حزماً واضحة في الترحيل الكهربائي (SDS-PAGE) وانما ظهرت بشكل منتشر smear وتراوحت أوزنها الجزيئية بين 1060 دالتن الى 3496 دالتن.