نمو بكتيريا بروبيوتيك *Lactobacillus acidophilus LA-5 , Lactobacillus casei 431*

,Bifidobacterium animalis subsp lactis(Bb12)

وانتاج حمض اللبن في بيئة الحليب المجفف خالي الدسم المعاد تشكيله وMRS

د.أنطون طيفور

الملخص :

استخدمت في هذه الدراسه بكتيريا *Lactobacillus acidophilus LA-5 , Lactobacillus casei 431,* *Bifidobacterium.animalis subsp lactis(Bb12)* وتم تنميتها في بيئة الحليب المجفف المعاد تشكيله بنسبة 12% وبيئة الMRS السائله وقدرالعدد البكتيري للسلالات بعد 2,4, 6, 18 ساعة من الحضن في البيئات المستخدمه, وتشيرنتائج التحليل الاحصائي الى وجود فروقات معنويه بين البيئتين حيث كانت بيئة ال MRS الافضل في تنمية هذه السلالات مع العلم أن عدد الأنواع الثلاثة من البكتيريا في بيئة الحليب المجفف كانت عاليه ، كذلك بينت نتائج التحليل الى وجود فروقات معنويه بين اعداد البكتيريا باختلاف مدة الحضن حيث زاد عدد البكتيريا بزيادة مدة الحضن فقد بلغ المتوسط الحسابي لعدد الانواع الثلاثه بعد 18 ساعة من الحضن في بيئة الحليب المجفف $1X10^9$ و$1.7X10^9$ و$1.1X10^9$ خليه /غ على التوالي، أما في بيئة الMRS فقد بلغ المتوسط الحسابي لأعداد البكتريا $1.3X10^9$ و$3.2X10^9$ و$2.8X10^9$ خليه /غ على التوالي , كذلك تشير نتائج التحليل الى أن سلالة بكتيريا الـــ *Lactobacillus acidophilus LA-5* قادرة على إنتاج حموضة أعلى خلال 6 ساعات مقارنة مع السلالات الاخرى وكانت *Lactobacillus casei 431* أقل الانواع مقدرة على إنتاج الحموضة خلال 6 ساعات عند تنميتهما في بيئة الحليب المجفف, كما بينت النتائج ان (Bb12) (*Bifidobacteriu animalis subsp lactis*) كانت الاقدر على خفض الpH خلال 6 ساعات من الحضن في بيئة ال MRS حيث بلغت درجة الـــ pH 4.3 وان السلالة 5- *Lactobacillus acidophilus LA* الاقل مقدرة على خفضه حيث بلغت درجة الـــ pH 4.6وذلك عند التحضين لمدة 6 ساعات بحرارة 37 مْ.

الكلمات المفتاحية: بروبيوتيك *Lactobacillus acidophilus LA-5 , Lactobacillus casei 431*

,Bifidobacterium animalis subsp lactis(Bb12

أستاذ مساعد,قسم علوم الأغذية,كلية الزراعة,ص ب 30621,جامعة دمشق,سورية

I. المقدمة والدراسات المرجعية:

نشأ مفهوم البروبيوتيك مع بداية القرن العشرين بفرضيه قدمها العالم الروسي ميتشنيكوف (Metchnikoff) والذي اقترح بأن صحة وطول عمر الفلاحين البلغار ناتج عن إستهلاكهم منتجات الحليب المحتويه على عصويات الحليب والتي تؤثر إيجابيا على مستعمرات الفلورا المعوية وتقلل من التأثيرات السامه للميكروبات (بمعنى انها تحافظ على توازن الفلورا المعويه وتقلل الى اقصى حد من التخمرات التعفنيه الغير مرغوبة (Sanders,1999) .

اشتق مصطلح البروبيوتيك من اللغة اليونانية وتعني لاجل الحياة for life (Fuller,1989) وهي عباره عن كائنات حية والتي تعطي عند تناولها بكميات مناسبة فوائد صحية للمستهلك (FAO/WHO,2001,) ولتعطي فوائدها الصحيه لابد ان تتواجد بصورة حية وباعداد كبيرة بحيث لا يقل عددها في الغذاء عند استهلاكه عن 10^6 خلية/غ وأن يستهلك الغذاء المحتوي عليها بشكل يومي وبمعدل 100غ (Gomes and Malcata,1995) .

وتصنف الاغذية التي تحتوي على بكتيريا بروبيوتيك على انها اغذية وظيفية Functional food وهي اغذية تعطي اثراً ايجابياً على صحة المستهلك بالاضافة الى قيمتها الغذائية

(Ross *et al,* 2002) و تشمل التأثيرات الصحية لميكروبات البروبيوتيك تثبيط نمو الجراثيم الممرضه وذلك بإنتاج حمض اللبن وحمض الخل وحمض البربيونيك فتنخفض درجة الـ pH في الامعاء كابحه بذلك نمو الجراثيم الممرضه , كما انها تنتج بعض المواد المثبطة لنمو بكتيريا الفساد (antimicrobial) حيث تنتج *L . acidophilus* الباكتريوسين و Acidophilin ,Lactoidin,Lactacium-B, وبشكل مشابة تنتج ال *Bifidobacterium* Bifidolin ,Bifilong (Shah, 1999) . كذلك تمنع بكتيريا الفساد من الالتصاق بمخاطية الامعاء ,من جهة أخرى تلعب بكتيريا البروبيوتيك دوراً هاماً في إستعادة التوازن الجرثومي الطبيعي للجسم خاصه بعد حدوث خللاً في

توازن الميكروفلورا المعويه نتيجة إستخدام المضادات الحيويه والأدوية المثبطة للمناعة والمعالجة الشعاعية والعمل الجراحي , وكذلك لها القدرة في تحسين هضم اللاكتوز , وتخفض من امتصاص الكلولسترول وانتقاله للدم وبالتالي تقلل نسبة الكلولسترول بالدم ، تمنع وتقلل من الاسهال , تنشط نظام المناعة الطبيعية للجسم , تحسن من الخصائص المضادة للطفرات الوراثية للخلايا , وتخفض من آلام البطن الهضمية والنفخة والتطبل الناتج عن زيادة نمو الجراثيم فى الامعاء والتي تسبب زيادة فى تخمر الغذاء وإنتاج الغاز (Salminen,2001 ,Sander 1999) .

إن أهم المعايير الواجب توفرها بالبكتيريا المستخدمة كبروبيوتيك يجب ان تكون لمنه وخاليه من اية خصائص ممرضه ومقاومه لحموضة المعده والاملاح الصفراوية وبالتالي قادرة على الوصول للامعاء , كذلك يجب ان تكون قادره على الالتصاق بالخلايا الطلائيه للقناه الهضميه والتكاثر لتشكل مستعمرات على حساب الجراثيم الضاره (Kaizu, *et al* 1993, Salminen,2001) .

تنتمي بكتيريا بروبيوتيك الى مجموعة بكتيريا حمض اللبن lactic acid bacteria وهناك انواع عديدة من الميكروبات تستخدم كبروبيوتيك وتشمل *Lactococcus , Lactobacillus , bifidobacterium , Leuconostoc , Streptococcus , Pediococcus , Enterococcus, Saccharomyces bouladil* .(Holzapfel, *et al* ,1998)

تعتبر بكتيريا SPP *Lactobacillus casei , Lactobacillus acidphilus , Bifidobacterium* من *اكثر الانوع لإستخداماً* في الأغذية بسبب تاريخها الطويل والأمن وهي ايضا وجدت كجزء من الميكروفلورا المعوية .(Jarvenpaa, *et al, 2007,* Sarrela *et al* 2007)

عزلت بكتيريا *Bifidobacterium* لاول مره عام1899 بواسطة العالم هنري تيزر من براز الاطفال الرضع المتغذين على حليب الامهات واسماها فى حينه *Bacillus bifidus* وبعد ذلك سميت *Lactobacillus bifidus* وهي تستخدم فى صناعة الألبان المتخمرة الصحية لما لها من فوائد فى عملية

الهضم (Ballongu, *et al* ,1993) ؛ وتتواجد فى كامل القناة الهضمية والمهبل لدى الإنسان والحيوان ولكنها تتمركز اكثر فى المعي الغليظ وتسود بكثرة فى امعاء الرضع المتغذين على حليب الأمهات حيث تصل نسبة أعدادها فى امعاء الرضع 95% من التعداد الكلي وتقل نسبتها مع تقدم العمر لتشكل 3% فقط من التعداد الكلي لفلورا الامعاء لدى البالغين (Lievin, *et* al 2000 ,Requera,*et al* 2002) , تحلل هذه البكتيريا السكريات لتنتج حمض اللبن وحمض الاستيك بنسبة (3−2) بدون إنتاج غاز CO_2 , إضافة لأنتاج كميات قليلة من حمض الفورميك والايثانول (Bouhnik, *et al* ,2006) . كما و تفرز هذه البكتيريا انزيم Fructose -6 phosphate phophoketolas (F6PPK) والذي يعتبر من الوسائل الهامة للتعرف عليها (Berthoud *et al*,2005) . وهي بكتيريا موجبة الغرام وشديدة التأثر بالاكسجين (تحملها للاكسجين يعتمد على السلالة نفسها) (Boylston *et al*, 2004) وغير متحركة وغير مفرزة لانزيم الكتاليز وغير مكونه للابواغ (Tamime *et al*, 2002 ,Charteris *et al*, 1997)وتقع درجة الـــ pH المثلى لنموهـــــــــــا 6.5 − 7.0 ويثبط نموها فـــــي درجة الـــ pH اقل من 5.0 واعلى من 8.0 وتبلغ الحرارة المثلى لنموها 37°م −41م (Lourenes and Violjoen, 2001) وتظهر السلالات المعزولة حديثا باشكال منتظمة او متفرعة على هيئة حرف Y,X ,V وغالبا ماتكون عصوية مستقيمة او منحنية(Holt *et al*,1994) ويتبع لهذا الجنس 30 نوعاً مختلفاً تم عزلها من الانسان والحيوان ومن اشهر سلالاتها المستعملة فى منتجات الالبان *lactis , B. adolescentis , B . breve , B . bifidum* *Bifidobacterium . , B . longum , B.infantis*

.(Tamime et al,2002,Boylston etal,2004)

تستعمل السلالة البكتيرية *Bifidobacterium.animalis subsp lactis(Bb12)*, والتابعة لجنس *Bifidobacterium* في منتجات الالبان واغذية الاطفال بشكل واسع حول العالم كبروبيوتيك حيث تمتلك مقدرة جيدة على تحمل الاكسجين (Aguilar *et al*, 2008) وتنمو هذه البكتيريا بشكل جيد في الحليب والاغذية المعتمدة على الحليب لقدرتها على إستخدام اللاكتوز كمصدر للطاقة (Roy ,2001) . كذلك تحلل

البروتينات وهذه الصفات تسهل نموها في المنتجات التجارية في ظروف ليست لاهوائية (Aguilar *et al*, 2008) . الا ان النمو الجيد والمثالي لكل انواع *Bifidobacterium* لا يكون الا فى الظروف اللاهوائية (Cheng and Sandin ,1989) .

تعتبر البكتيريا التابعة لجنس *Lactobacillus* عصوية ، موجبة الغرام ، غير متبوغة ، غير متحركة ، غير مفرزة لانزيم الكتاليز ، لاهوائية اختيارية أو لاهوائية إجبارية (Tamime *et al*, 2002,)

ومن اشهرالانواع التابعه لجنس *Lactobacillus* و التي تستعمل كبروبيوتيك *Lactobacillus .acidophilus* ، *Lactobacilus casei* ، *Lactobacilus gasser* ، *lactobacillus paracasei* ، *Lactobacillus reuteri* ،

Lactobacillus plantarum , Lactobacillus rhamnosus (GG (Tieking ,*et al* 2005) . لقد تم عزل بكتيريا *Lactobacillus acidophilus* من الجهاز الهضمي للإنسان والحيوان والفم ومهبل الانسان وتوجد فى منتجات الالبان وهي متجانسة التخمر حيث تنتج حمض اللبن كناتج اساسي من عملية التخمر ولها فوائد صحية(Jamuma and Jeevaratnam ,2004) . وتستخدم بكتيريا *Lactobacillus acidophilus LA-5* كبروبيوتيك بشكل واسع فى صناعة منتجات الالبان المتخمرة(Tabasco,et al, 2007) ، اما بكتيريا *Lactobacillus casei* *فقد عزلت* من الحليب الخام ومنتجات الالبان المتخمرة والقناة الهظمية للانسان وهي غير متجانسة التخمر ولاهوائية اختيارية (Kandler and Weiss ,1986) تتوفر بكتيريا بروبيوتيك على شكل كبسولات او حبوب او مسحوق او مضافه الى بعض انواع الاغذيه ومن اكثر الاغذيه التي إضيفت لها بكتيريا البروبيوتيك هى منتجات الالبان المتخمره والحليب (Vinderola, *et al* ,2000) كذلك تم اضافتها الى انواع مختلفة من الاجبان .

2- أهدف البحث:

يهدف البحث إلى تقدير اعـداد البروبيوتيـك *Lactobacillus acidophilus LA5 , Lactobacillus Bifidobacterium animalis subsp lactis(Bb12 casei 431,* فى الحليب المجفف خالي الدسم المعاد تشكيله بنسبة 12% و بيئة De Man Rogosa and Sharp (MRS) السائله خـلال الحضـن لاوقـات مختلفة وكذلك تقدير كمية حمض اللبن الناتج عن نشاط السلالات المختبرة من البروبيوتيك وذلك خـلال 2-4-6-18 ساعة من التحضين على درجة حرارة 37 م.

3- المواد المستخدمة وطرق العمل:

1.3- **البيئات المستخدمة** : استخدمت فى هذه الدراسة بيئة الحليب المجفف خالي الدسم (منشأ فرنسي) تم إعادة تشكيله بنسبة 12% ومعاملته بحرارة 90م° لمدة نصف ساعة وبرد الى حرارة37°م و بيئة MRS السائلة وتم التعقيم على حرارة 121°م لمدة 15 والتبريد الى حرارة37°م

2.3- **بادئ البروبيوتيك المستخدم** : استخدم فى هذه الدراسه بادئ البروبيوتيك البكتيري المجفد والمكون من

Lactobacillus acidophilus LA -5 Lactobacillus casei 431, Bifidobacterium animalis subsp lactis(Bb12 (من إنتاج شركة هانسن - الدنمارك) وتم تنمية هذه السلالات على بيئة الحليب المجفف خالي الدسم المعاد تشكيله بنسبة 12% و بيئة MRS السائله حيث اضيف الى كلتا البيئتين (L-cysteine – HCL) بنسبة 0.05% كملتقط للاكسجين وكمصدر للنيتروجين (انتاج شركة Sigma) بعد ذلك اضيف 1غ من كل سلاله بكتيريه وحضنت البيئتان في ظروف لاهوائية بحرارة 37°م لمدة 2 ساعة و 4 ساعات و 6 ساعات و 18 ساعة تلا ذلك تقدير أعداد هذه البكتيريا بعد كل مده حضن وتقدير نسبة الحموضة مقدرة كحمض لبن وقياس الرقم الهيدروجيني pH .

3.3- التحليل الميكروبي:

أ. تحضير العينة للتحليل الميكروبي:

حضر التخفيف الابتدائي 10^{-1} بخلط 2 غ من العينة مع 18 مل من buffer peptone water المعقم أما التخفيفات الاخرى فتم تحضيرها حسب الحاجة وقد اضيف الى وسط التخفيف المستخدم (L-cysteine – HCL) بنسبة 0.05% (Vinderola, *et al*,2000). واستعملت طريقة الاطباق المصبوبة وباستخدام طبقين لكل تخفيف (Yousef and Carlstrom ,2003)

ب. الفحوصات الميكروبية:

تم تقدير أعداد بكتيريا *Lactobacillus casei 431* *Lactobacillus acidophilus LA-5,* *Bifidobacterium animalis subsp lactis (Bb12)* , حيث قدرت أعداد بكتيريا *Lactobacillus acidophilus LA -5* بإستخدام بيئة Rogosa Sl agar (إنتاج شركة Sigma) واضيف لها حمض الخل الثلجي 1.32 مل/ لتر (pH 5.4) ، اما بالنسبة لسلالة بكتيريا *Lactobacillus casei 431* فقد قدر عددها باستخدام بيئة De Man Rogosa and Sharp (MRS) (pH 6.5) ومن إنتاج شركة Sigma أمريكا). أضيف لها 1 ملغ/ لتر من المضاد الحيوي vancomycine (Thamaraj and Shah,2003) أما بالنسبة لسلالة بكتيريا *Bifidobacterium.animalis subsp lactis(Bb12)* ، فقد قدر عددها باستخدام بيئة Bifidus Selective Medium Agar (pH 6.8) (Aguilar, *et al*, 2008) واضيف لها 116 ملغرام /لتر من BSM supplement وهو (عبارة عن خليط من المضادات الحيوية لمنع نمو الميكروبات الاخرى) ويكون لون المستعمرة على هذه البيئة بنفسجي ولكن عندما تقل مركبات النيتروجين في الوسط يكون لون المستعمرة وردي (حسب تعليمات الشركة الصانعة Sigma) وتحضن الاطباق بحرارة 37°م بظروف لا هوائية لمدة 3 ايام بإستخدام حاضنة لاهوائية صنع J.P Selecta

(منشأ اسباني) ولتوفير الظروف اللاهوائية تم تزويد الحاضنة بمضخة تسحب الاكسجين ثم يضخ غاز CO2 و N2 من اسطوانات خاصة بكل غاز.

4.3- انتاج الحموضة :

نميت سلالات البكتيريا المستخدمة فى بيئة الحليب المجفف خالي الدسم المعاد تشكيله بنسبة 12% وبيئة MRS السائله حيث اضيف الى كلتا البيئتين (L-cysteine – HCL) بنسبة 0.05% وحضنت البيئتان في ظروف لاهوائية بحرارة 37°م لمدة 2 ساعة و 4 ساعات و 6 ساعات و 18 ساعة تلا ذلك تقدير نسبة الحموضة مقدره كحمض لاكتيك باستخدام المعايرة في ماءآت الصوديوم العيارية (0.1 N) وقياس الرقم الهيدروجيني pH بإستعمال مقياس pH نوع Oakton موديل pH 5/6 and Lon 5/6 منشأ أمريكي (AOAC,2002).

5.3- التحليل الاحصائي: أجري التحليل الاحصائي للبيانات بإستخراج المتوسطات الحسابية والانحرافات المعيارية واختبار(F) لفحص وجود فرق معنوي بين المتوسطات بإستخدام البرنامج الاحصائي spss.

4-النتائج والمناقشه:

1.4- نتائج التحليل الميكروبي:

يبين الجدول رقم (1) أعداد بكتيريا *Lactobacillus acidophilus LA* -5 عند تنميتها في بيئة الحليب المجفف المعاد تشكيله و بيئة MRS السائله , حيث يتضح أن المتوسط الحسابي لاعداد هذه البكتيريا بعد 2, 4 ,6, 18 ساعه من الحضن بحراره 37°م بظروف لاهوائيه بلغ $1x10^9$, $9x10^8$, $6.4x10^8$, $1x10^6$ خلية/غم على التوالي، اما عند تنميتها في بيئة MRS فقد بلغ المتوسط الحسابي لاعداد هذه البكتيريا $1.3x10^9$ $1.1x10^9$, $8x10^8$, $4x10^6$ خلية/غ.

الجدول(1): أعداد السلالات البكتيرية المختبرة (خلية/غ) أثناء التحضين على درجة حرارة 37 م باستعمال بيئة الحليب المجفف المعاد تشكيله (1) وبيئة MRS (2) .

سلالة الاختبار						مدة التحضين بالساعة
Lactobacillus acidophilus LA -5		*Lactobacillus Casei 431*		*B .animails subsp lactis (Bb12)*		
بيئة 2	بيئة 1	بيئة 2	بيئة 1	بيئة 2	بيئة 1	
$4x10^6$	$1x10^6$	$8x10^7$	$3.8x10^6$	$6x10^7$	$4x10^6$	2
$8x10^8$	$6.4 x10^8$	$1.8x10^9$	$8.6x10^8$	$1.6x10^9$	$6.7x10^8$	4
$1.1x10^9$	$9x10^8$	$2.6x10^9$	$1.5x10^9$	$2.4x10^9$	$8x10^8$	6
$1.3x10^9$	$1x10^9$	$3.2x10^9$	$1.7x10^9$	$2.8x10^9$	$1.1x10^9$	18

وتشير نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنويه في اعداد هذه البكتيريا عند تنميتها في البيئتين و يلاحظ من النتائج ان بيئة MRS أفضل لتنمية هذه البكتيريا من بيئة الحليب المجفف المعاد تشكيله مع ان عددها في بيئة الحليب المجفف المعاد تشكيله عالية, كذلك تشير نتائج التحليل بوجود فروقات معنويه فى اعداد البكتيريا في اختلاف مدة الحضن حيث يزداد عددها بزيدة مدة الحضن بشكل كبير لغاية 6 ساعة بعد ذلك يتباطئ النمو وقد يعود ذلك لانخفاض pH وسط النمو وتراكم الحوامض العضوية الناتجة عن نشاط ونمو بكتيريا البروبيوتك (Donkr, *et al*, 2006)

كما يبين الجدول رقم (1) أعداد بكتيريا *Lactobacillus casei 431* عند تنميتها في البيئتين المستخدمتين حيث يلاحظ من الشكل ان المتوسط الحسابي لاعداد هذه البكتيريا في بيئة الحليب المجفف خالي الدسم المعاد تشكيله بعد 2,4,6,18 ساعه من الحضن بلغ $1.7x10^9$ و $1.5x10^9$ و $8.6x10^8$ و $3.8x10^6$ خليه /غ على التوالي أما عند تنميتها في بيئة MRS فقط بلغ المتوسط $3.2X10^9$ و $2.6X10^9$ و $1.8X10^9$ و $8X10^7$ خليه /غ

وتشير نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنويه في اعداد هذه البكتيريا عند تنميتها في البيئتين و يلاحظ من النتائج ان بيئه MRS افضل لتنمية هذه البكتيريا من بيئة الحليب المجفف المعاد تشكيله مع ان أعدادها في بيئة الحليب المجفف المعاد تشكيله عاليه, كذلك تشير نتائج التحليل بوجود فروقات معنويـــه فـــى اعـــداد البكتيريا في اختلاف مدة الحضن حيث يزداد عددها بزيادة مدة الحضن.

ويبين الجدول رقم (1) أعداد البكتيريا *Bifidobacterium animalis subsp lactis* (Bb12) عند تنميتها في البيئتين المستخدمتين, حيث يلاحظ من الشكل ان المتوسط الحسابي لأعداد هذه البكتيريا عند حضنها في بيئة الحليب المجفف خالي الدسم المعاد تشكيله بنسبة 12% لمدة 18 .6 .4 .2 ساعه بلغ و$1.1X10^9$ و $8X10^8$ و $6.7X10^8$ و $4X10^6$ خليه /غ على التوالي . أما عند تنميتها في بيئة MRS فقد بلغ المتوسط الحسابي لاعداد البكتيريا $2.8X10^9$ و $2.4X10^9$ و $1.6X10^9$, $6X10^7$ خليه /غ وتشير نتائج التحليل الاحصائي إلى وجود فروقات معنوية في اعداد هذه البكتيريا عند تنميتها فـــي البيئتـــين و يلاحظ من النتائج ان بيئه MRS افضل لتنمية هذه البكتيريا من بيئة الحليب المجفف المعاد تشكيله مـــع ان أعدادها في بيئة الحليب المجفف المعاد تشكيله كانت مرتفعة, كذلك تشير نتائج التحليل بوجود فروقات معنويـــه فى أعداد البكتيريا في اختلاف مدة الحضن حيث يزداد عددها بزيدة مدة الحضن وصولاً إلـــى مرحلـــة ثبـــات النمو.

للبيئة المستخدمة في تنمية البكتيريا تأثيراً كبيراً في أعداد وحيوية البكتيريا ، وتستخدم معظم الدراسات بيئـــة MRS السائله لتنشيط بكتيريا الProbiotic لاحتوائها على المتطلبات الغذائية المعقده التـــي تحتاجهـــا تلـــك الميكروبات (Matto, *et al*, 2006) فهي تحتوي على سكر الجلوكوز كمصدر للطاقه والكربون ومستخلص اللحم والخميره كمصدر للمواد الغذائية الظرورية لنمو هذه الميكروبات (نيتـــروجين ، فيتامينـــات ، معـــادن أحماض أمينيه) والتوين 80 كمصدر للأحماض الدهنية الضرورية , وكبريتات المغنسيوم وكبريتات المنغنيز كمصدر للحديد والكبريت (Sharp, *et al* ,1966) .

ومن معوقات استخدام هذه البيئه انها غالية الثمن (Matto, *et al*, 2006) ولفصل البكتيريا منهـا نحتـاج اجراءعملية طرد مركزي لتجميع الكتله الحيويه للبكتيريا ومن بعد ذلك يتم غسل هذه الكتلـه بالمـاء المعقـم لتخليصها من بقايا البيئه قبل اضافتها للمواد الغذائية وهذه قد يؤدي لحـدوث عمليـات تلـوث (Hilde, *et al* 2003)

ويعود ذلك إلى بطئ نمو سـلالتي بكتيريـا Lactobacillus acidophilus LA -5 و *Bifidobacterium animalis subsp lactis* (Bb12) في الحليب مع انة يحتوي على اغلب العناصـر الغذائية المهمـة لنمـو وتطوراعداد البكتيريا ان هذه العناصر ليست موجوده دائما بالتراكيز المثالية لنمو هذه البكتيريـا وبالتـالي لا تعتبر البيئة المثالية (Magarinos *etal* ,2007) ولأفتقـار تلـك البكتيريـا لفاعليـة تحليـل البروتينـات (proteolitic activity) وبالتالي نقص في توفير الاحماض الامينيه والنيتروجين والببتيـدات الضـرورية لنمو البكتيريا (Shah, 2001).

2.4-انتاج الحموضة:

يبن الجدول(2) النشاط التحميضي لسلالات بكتيريا البروبيوتيك عند نموها بالحليب المجفـف خـالي الدسـم ،حيث تختلف السلالات فى مقدرتها على انتاج حمض اللبن وبالتالي خفض ال pH (Hebert,*et at*,2000) حيث تشير النتائج في الجدول (2) إلى أن سلالة بكتيريا *Lactobacillus acidophilus LA -5* قادرة على انتاج حموضة اعلى خلال 6 ساعات من الحضن مقارنة بالسلالات الاخرى حيث بلغ المتوسط لحسابي لنسبة الحموضة المنتجة 1.95% وبالتالي خفـض ال pH مـن 6.7 - 4.30 , بينمـا كانـت سـلالة بكتيريـا *Lactobacillus casei 431* اقل الانواع مقدرة على انتاج الحموضة بعد 6 ساعات من الحضن حيث بلـغ المتوسط الحسابي لنسبة الحموضة المنتجة 1.5 % وخفضت ال pH من 6.7 - 4.7 , اما فيما يخص نسبة الحموضة المنتجة من قبل سلالة بكتيريا *Bifidobacterium animalis subsp lactis* (Bb12) فقـد بلـغ المتوسط الحسابي للحموضة 1.6%

وخفض ال pH من 6.7- 4.53 . ,اما عند زيادة مدة الحضن الى 18 ساعة فقد بلغ المتوسط الحسابي لنسبة الحموضة المنتجة من قبل السلالة *Lactobacillus acidophilus LA -5* 2.25% وخفض pH الى 4.02 . ولسلالة بكتيريا *Lactobacillus casei 431* بلغت 2.0% وخفضت ال pH الى 4.21 . وكانت بكتيريا *Bifidobacterium.animalis subsp lactis* (Bb12)

جدول (2) يبين الرقم الهيدروجيني ونسبة الحموضه المنتجه من قبل البكتيريا(*B.animails subsp lactis* *(Bb12)* و *Lactobacillus Casei 431* و *Lactobacillus acidophillus LA-5*) في بيئة الحليب المجفف خالي الدسم المعاد تشكيله

مدة الحضن بالساعه	سلالة الاختبار					
	B .animails subsp lactis BB12		*Lactobacillus Casei 431*		*Lactobacillus acidophillus LA-5*	
	pH	نسبة الحموضه	pH	نسبة الحموضه	pH	نسبة الحموضه
0	6.7	0.16	6.7	0.16	6.7	0.16
2	5.37	1.1	5.43	1. 0	5.15	1.40
4	4.9	1.30	5.06	1.2	4.40	1.85
6	4.53	1.60	4.70	1.5	4.30	1.95
18	4.35	1.82	4.21	2.0	4.02	2.25

اقل السلالات مقدرة على خفض درجة الـpH وانتاج الحموضة بعد 18 ساعة فقد بلغ المتوسط الحسابي لنسبة الحموضة المنتجة 1.82% خفض درجة الـ pH الى 4.35.

امالجدول (3) فيبين النشاط التحميضي لسلالات بكتيريا البروبيوتيك عند نموها فى بيئة MRS السائلة حيث تشير النتائج إلى أن السلالة البكتيرية *Bifidobacterium animalis subsp lactis* (Bb12) كانت قادرة على خفض ال pH من 6.7 الى 4.3 خلال 6 ساعات من الحضن وبلغت نسبة الحموضة 1.7% و بينما كانت السلالة البكتيرية *Lactobacillus acidophilus LA* -5 الاقل مقدرة على خفض ال pHفقد خفض الى4.6

جدول (3) يبين الرقم الهيدروجيني ونسبة الحموضه المنتجه من قبل السلالات البكتيرية المختبرة (B animails subsp lactis (Bb12) و*Lactobacillus Casei 431* و *Lactobacillus acidophillus LA-* 5) في بيئة(MRS)

مدة الحضن بالساعه	سلالة الاختبار					
	B .animails subsp lactis (Bb12)		*Lactobacillus Casei 431*		*Lactobacillus acidophillus LA-5*	
	pH	نسبة الحموضه	pH	نسبة الحموضه	pH	نسبة الحموضه
0	6.5	0.18	6.5	0.18	6.5	0.18
2	4.82	1.45	4.95	1.40	5.05	1.44
4	4.50	1.64	4.65	1.5	4.7	1.70
6	4.30	1.70	4.40	1.65	4.6	1.8
18	4.08	1.88	3.95	1.9	4.15	2.1

في حين بلغ المتوسط الحسابي لنسبة الحموضة 1.8% , اما فيما يخص السلالة البكتيريـــة *Lactobacillus casei 431* فقد خفضت ال pH الى 4.4 خلال 6 ساعات وبلغ المتوسط الحسابي لنسبة الحموضة 1.65% , وعند زيادة مدة الحضن الى 18 ساعة كانت بكتيريا Lactobacillus casei 431 قـــادرة علـــى خفـــض ال pHالى 3.95 وبلغ المتوسط الحسابي لنسبة الحموضة 1.9% , اما السلالة البكتيريـــة *Bifidobacterium animalis subsp lactis* (*Bb12* فقد *استطاعت خفض ال pH إلى 4.08 وبلغ المتوسط الحســـابي لنســـبة الحموضة 1.88% , اما السلالة البكتيرية Lactobacillus acidophilus LA -5* فقد خفضت ال pH الى 4.15 وبلغ المتوسط الحسابي لنسبة الحموضة 2.1% .

يمكن لبعض انواع الحليب ان يكون لها نفس ال pH لكنه يظهر درجات حموضة مختلفة وهذا قد يعود لنواتج تخمر البكتيريا الملقح بها المنتج فبعض سلالات بكتيريا البروبيونيك متجانسة التخمر حيث تحول اللاكتوز إلى حمض اللبن بشكل اساسي (*Lactobacillus acidophilus LA -5*) , وبعض سلالاتها غير متجانسة التخمـــر حيث تحول سكر اللاكتوز إلى حمض اللـــبن وحمـــض الخـــل والايثـــانول وCo2(Hild, *etal*, 2003) ويعتبر الانخفاض في pH وسط النمو وتراكم الحوامض العضوية الناتجة عن نشاط ونمو بكتيريا البروبيونيك من العوامل الرئيسية التي تقلل من حيوية البروبيونيك (Donkor, *et al*, 2006) .

الاستنتاجات والتوصيات

1-تعتبر بيئة الحليب المجفف خالي الدسم المعاد تشكيله بنسبة 12% بيئة مناسبة لنمو وتطور أعداد ســـلالات البروبيونيك المستخدمة فهو يحتوي على اغلب العناصر الغذائية المهمة لنمو البكتيريا.

2-تشكل بيئة MRS بيئة مثالية لنمو بكتيريالبروبيوتيك لاحتوائها على المتطلبات الغذائية المختلفة التي تحتاجها تلك الميكروبات .

3- يؤخذ على استخدام بيئة MRS في تنمية بكتيريا البروبيوتيك الحاجة إلى إجراء عملية طرد مركزي لفصل البكتيريا عن البيئة ثم غسل الكتلة الحيوية للبكتيريا بالماء المعقم قبل اضافتها للمواد الغذائية وهذا قد يسبب التلوث بالميكروبات الأخرى .

4 -تزداد أعداد خلايا السلالات البكتيرية المختبرة في البيئتين المستخدمتين بزيادة مدة التحضين على الدرجة 37 م ولا يفضل زيادة مدة التحضين عن 6 ساعات لأنها تترافق مع زيادة بطيئة نسبياً مع أعداد البكتيريا .

5- لوحظ *في بيئة الحليب* المجفف خالي الدسم المعاد تشكيله بأن السلالة البكتيرية *Lactobacillus acidophilus LA* -5 كانت قادرة على إنتاج حموضة أعلى مقارنة بالسلالات الاخرى بينما كانت السلالة البكتيرية *Lactobacillus casei 431* اقل السلالات مقدرة على انتاج الحموضة بعد 6 ساعات من الحضن .

6- في بيئة MRS كانت السلالة البكتيرية *Bifidobacterium animalis subsp lactis* (Bb12) الأكثر قدرة على خفض ال pH من 6.7 الى 4.3 خلال 6 ساعات من الحضن على الدرجة 37 م وبلغت نسبة الحموضة المتكونة 1.7% بينما كانت السلالة البكتيرية5- *Lactobacillus acidophilus LA* الاقل قدرة على خفض ال pH فقد خفضته الى 4.6.

7- ينصح باستخدام الحليب المجفف خالي الدسم المعاد تركيبه بنسبة 12% كبيئة غذائية لتنمية سلالات بكتيريا البروبيوتيك المختبرة وإنتاج هذه السلالات بشكل صناعي وكبير على الرغم من أنها أعطت أعداداً منخفضة نسبياً في أعداد خلايا السلالات المختبرة وذلك لتوفر هذه البيئة ولخفض تكاليف إنتاج البروبيوتيك مقارنة مع بيئة الـ MRS.

8- يجب أن يراعى الحذر الكامل أثناء استخدام البيئات السائلة لإنتاج المزارع البكتيرية المكثفة وتجنب حدوث تلوث ميكروبي للمزارع الناتجة عن عملية الطرد المركزي وعمليات الغسيل.

References

1-Aguilar, G.S., Dawson, H., Restrepo, M., Andrews, K., Vinyard,B.,and Joseph,F. 2008. Detection of Bifidobacterium animalis subsp Lactis(Bb12 in the Intestine after Feeding of Sow and Their piglets.Applied and Environment Microbiology 74(20)6338-6347.

2-AOAC., Association of Official Analytical Chemists,2000. Official Methods of Analysis 18th Ed.Margland:AOAC international .

3- Ballongu,J., Salminen, S., Wrign, V.A ,1993, Bifidobacteria and probiotic in Lactic acid bacteria ,ets. Marcel Dekker, NewYork NY, PP357-428.

4-Berthoud,H., Chavagnat .F.,Haueter M. and Casey ,M .G.,2005 ,Comparison of partial gene sequences encoding aphophoketolase for the identification bifidobcteria Lebensmittel Wissenschafiund –Technologe ,38:

5-Bouhnik, Y., Raskine,L., Simoneau,G.Paineau, D., Bornet ,F. 2006 .The capacity of short chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria adose response relationship study in healthy humans .Nutr ,J, 5:8

6-Boylston,T.D., Vinderola,C.G., Reinheimer,D.A.,2004.Incorporation of bifidobacterium into cheese challenges and rewards.International Dairy Journal 14,375-387.

7-Charteris,W.P.,Kelly, P.M., Morelli, and Collins, K. 1997. Selective detection, enumeration and identifaction of potentially probiotics Lactobacillus and Bifidobacterium species in mixed bacterial population. IntJ.Food Micro.35. 1-27

8-Cheng , R . and Sandine ,W.E.,1989. Growth characteristics of Bifidobacteria species in whey base medium ,J.Dairy Sci ,72:148 (Abstr)

9- Donkor,O.N., Henriksson, A., Vasiljevic ,T., Sharh,N.P., 2006. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage,International Dairy Journal 16,1181-1189.

10-FAO/WHO. 2001.Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria,Report of ajoint FAO/WHO expert consultation,cordoba.Argentina-available.

11-Fuller,R.1989. probiotics in man and animals.J. of Applied Bacteriology ,66,365-378

12-Gomes, A . M . and Malcata, F.X.. 1995. Develpoment of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. J. Dairy Sci.81:1492-1507

13- Hebert, E.M., Raga, R.R., Tailliez,P. and De Giori , G.S. 2000. Characterization of natural isolates of Lactobacillus strains to be used as starter cultures in dairy fermentation, J. Food Microbiol.59:19-27

14- Hilde , M.O., Merete.H.,H,Judith, A.N,2003. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk, International Journal of Food Microbiology 87,17-27.

15-Holt,J.G., Krieg,N.R., Sneath,P.H.A.and Staly,J.T.,1994. Bergegs Manual Of Systematic Bacteriology 9th Williams and Wilkins,Baltimore 418 – 543

16-Holzapfel, W. H., Haberer, P ., Snel,.J. Schillinger, U.Huisint Veld,J.H.J,1998. overview of gut Flora and probiotics. -J.of FoodMicrob-41,85-101

17-Jamuma,M.and Jeevaratnam,K. 2004. Isolation and characterization of Lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins .J of General and Applied Microbiology.50(2)79-90

18- Jarven paa,S. T.,ahvonen.R.L.,ouweh, A.C., Sandell-M-jarven paa-E- Salminet .S. 2007. Aprobiotic Lactobacillus Fermentum ME3 , Has Antioxidative Capacity in Soft cheese Spread with Different Fats, journal Dairy Science 90, 3171-3177

19-Kaizu,M.M, Sasaki, H. ,Nakajama,R. and Suzuki ,1993. Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rat fed adiet deficient in vitamin E J Dairy Sci ,76, 2493-2499

20-Kandler ,O and Weiss ,N.,1986. The genus Lactobacillus in Bergeys Manual of Systematic Bacteriology(Eds ,P.H .A Sneath ,N .S. Mair,M.E.Sharpeand Hoit ,J .G pp .1219-1234

21-Lievin,V.,Peiffer,I.,Hudaulat,S.Rochat,F.,Brassart,D.,Neeser,J.R.,Servin ,A.L. 2000. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal will microflora exert antimicrobiota activity Gut, 47,5,646 -652 .

22-Lourens,H,A. and Viljoen,B.C.,2001.Yogurt as probiotic carrier food International Dairy Journal 11,1-17.

23–Magarinos ,H.Selaive,S. Costa,M.Flores,M. and Pizarro ,O.2007 .Viability of probiotic micro-organisms *(Lactobacillus acidophilus LA-5 and Bifidobacterium animails subsp lactis Bb12*) in ice cream International Journal of Dairy Technology 60-2-128-134

24—Matto,J.,Alakomi, H. L , Varri,A., Virkajarvi,I.,Saarela, M.,2006. Influence of processing conditions on Bifidobacterium animalis subsp. Lactis functionality with a special focuson acid tolerance and factors affecting it, International Dairy Journal, 1029-1037.

25-Requena,T.Burton,J.Matsuki,T.Munro,K.Simon,M.Tanaka,R.Watanabe,k. Tannock,W.G .2002.Identification, detection and enumeration of human Bifidobacterium species by PCR targeting the translodase gene .APPI Eviron .Microbiol .2420-2427

26-Ross, R.P,Filzgerald ,G.,Collins ,K., Stanton,C ,2002. Cheese delivering biocultures brobiotic cheese The Australia Journal of Dairy Technology ,57 ,71-78

27-Roy ,D.2001. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products , J .Food Microbiol ,69:167-182

28-Salminen,S.,2001. Humanstudies on probiotics : Aspects of scientific documentation . Scand. J. Nutr. 45:8-12.

29-Sanders, M. E . ,1999. Probiotic . Food Technology 53(11 67-77)

30-Sarrela ,M .G., Morgensen ,R , Fonden J .M and Mattile .T.S., 2007. probiotic bacteria safety functional and technology properties .J Biotechology ,84, 197-215

31-Shah,N.P., 1999.Probiotic Bacteria:Antimicrobial and antimutagenic properties, probiotic 6,268-271.

32– Shah , N.P. 2001. Function food from probiotics and prebiotics , Food Technology 55,46-53

33-Sharp,M. E. , Fryer ,T.R.and Smith,D.G.1966. Identification of the Lactic Acid Bacteria in Identification Methed for Microbiologist part A ,London and New York , Academic press .

34-Tabasco,R.,Paarup,T.Janer,C.,Pelaez,C.,Reouena,T.,2007.Selective enumeration identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus ,Lactobacillus bulgaricus ,L. acidophilus ,L.paracasei and Bifidobacterium lactis* in fermented milk International Dairy Journal 17,1107-1114

35-Tamime,A.Y.2002.Microbiology starter culture .In R.K.Robinson(Ed),Dairy microbiology handbook(3rd ed.)NewYourk,NY.wiley.pp,361-366.

36-Tharmaraj ,R. and shah,R.P., 2003. Selective enumeration of *L-deibrueckii ssp bulgaricus, Streptococcus thermophilus, L- acidophilus, Bifidobacterium , L-casei. L-rhamnosus and propionibacteria* ,Journal of Dairy science,86,2288-2296

37- Tieking ,M., Kaditzky,S. ,Valcheva ,R .Korakli, M. Vogel ,R.F. Ganzle,M.G.2005.Extracellular homopolysaccharides and oligosaccharides from intestinal

Lactobacilli .J Appl Microbiol :99 (3) 692 -702

38- Vinderola,C.G., Prosello,W., Ghinerto,D., and Reinheimer,J.A., 2000. Viability of probiotic (bifidobacterium, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei)andNonprobiotic Microflora in Argentinian Fresco cheese J.Dairy Sci ,83,1905-1911.

39– Yousef,A.E., and Carlstrom, C.2003. Food Microbiology. by Jhon Wiley& Sons, Inc. All rights reserved.

The growth of probiotic bacteria, *Lactobacillus acidophilus LA-5* *Lactobacillus casei 431, Bifidobacterium animalis subspp lactis (Bb12)* and production of lactic acid in a skim milk powder reconstituted and MRS broth

Dr. Antoine Tayfour

Abstract:

This study investigated the growth of three strains probiotic bacteria, *Lactobacillus acidophilus LA-5, Lactobacillus casei 431, Bifidobacterium.animalis subspp lactis (Bb12)* .They were incubated in media of milk powder reconstituted by 12% and MRS broth .The enumeration of three strains were estimated after 2,4,6 and 18 hours of incubation in previous media. Statistical analysis results showed existence of significant differences between two media. Although the number of three strains of bacteria in the media of milk powder was high, the MRS media was the best .Also there were significant differences between the incubation times, as the incubation time increased, the number of bacteria increased, The mean numbers of the three strains mentioned above were $1x10^9$,$1.7x10^9$ and$1.1x10^9$ cfu/g respectively after 18 hours of incubation in media of milk powder, while in MRS media were $1.3x10^9$,$3.2x10^9$and $2.8x10^9$cfu/g respectively. As well as the results showed that *Lactobacillus acidophilus LA -5* had the higher capacity to produce acidity within 6 hours of incubation compared with other strains,while the strain *Lactobacillus casei-431* had the lowest capacity to produce acidity in 6 hours by using milk powder media. The results showed that *Bifidobacterium.animalis subspp lactis (Bb12)* had the most capacity to reduce the pH within 6 hours of incubation in MRS media, which reached to 4.3 while *Lactobacillus acidophilus* LA-5 had the least capacity to reduce the pH which reached to 4.6 within 6 hours of incubation at 37 ˚ C.

key words: Probiotic , *Lactobacillus acidophilus-LA5 , Lactobacillus casei 431, Bifidobacterium animalis subspp lactis (Bb12).*

Associate Prof.,Dept.,Food Sciences,Faculty of Agri, Damascu university P.O box 30621