

تحضير أوساط زرعية لتنمية وعزل بكتريا حامض اللاكتيك باستخدام مخلفات صناعة النشا

زهرة محمود الخفاجي*
 مها طارق القاضي**
 ريم فالح عبد الحميد**
 ثريا صادق الحكاك**

تاريخ قبول النشر 2006/ 5/ 23

الخلاصة:

تم استعمال مخلفات صناعة النشا من الذرة لتنمية بكتريا حامض اللاكتيك التي تمثل أحياء ذات متطلبات غذائية كثيرة والمخلفات تتمثل بماء نقع البذور كناتج عرضي اولي والكلوتين كناتج عرضي نهائي بعد إجراء المعاملات اللازمة لتحضيرها للاستعمال في الأوساط الغذائية. أشارت النتائج الى امكانية استبدال البيبتون وخالصة اللحم بخالصة الكلوتين الذائبة للتعويض في وسط MRS الذي أعطى نتائج مماثلة للوسط القياسي MRS. واستعمل وسط ماء النقع S بعد المعاملات الخاصة لجعله وسطا " ملأما " للنمو وكذلك حضر وسط من ماء النقع أضيف اليه التوين 80 بنسبة 0.1% اطلق عليه MZ والذي كان وسطا جيدا لتنمية عصيات ومسبقيات لبنية قياسية ومتفوقا لتنمية العزلات المحلية وبواديء اللين القياسية والمحلية. طور الوسط MZ بإضافة الخلات كعامل انتخابي لتنمية العصيات اللببية بشكل مماثل لوسط Rogosa وكانت قابليته واضحة في إظهار الانتخابية والسماح للعصيات بالنمو فقط. لم تكن هناك فروق واضحة في فعالية البواديء لتخثر الحليب عند تنميتها في وسط MRS او وسط MZ وربما تفوقت البواديء النامية على الوسط الأخير سواء في المدة اللازمة للتخثر او الحموضة الناتجة.

كلمات مفتاحية : بكتريا حامض اللاكتيك ، الكلوتين ، أوساط زرعية ، Probiotics،

المقدمة

اتصفت الأوساط الخاصة لتنميتها بالتعقيد واحتوائها على العديد من المواد الغذائية مثل وسط MRS وغيرها كما انها تعيش في الحليب بعد وسطاً غذائياً غنياً جداً [4,15]. ومن جهة ثانية تنتج العديد من الصناعات مواداً عرضية غنية بالمواد الغذائية التي يمكن ان تستعمل من قبل الأحياء مثل النواتج العرضية لصناعة النشا من الذرة والتي لا تستغل بالشكل الأمثل. واستهدفت الدراسة الحالية إمكانية استعمال المخلفات لتنمية بكتريا حامض اللاكتيك وكذلك تحضير أوساط انتخابية منها.

المواد وطرائق العمل: السلالات البكتيرية:

1. السلالات القياسية استوردت من شركة CHR Hansen الدانماركية.
2. سلالة *Streptococcus thermophilus* عزلت من اللبن الرائب القياسي (لبن المصانع).
3. نماذج اللبن الرائب: استعملت ألبان محلية (غير قياسية) والبان قياسية (ألبان مصانع) من

بكتريا حامض اللاكتيك Lactic Acid Bacteria من الأحياء ذات الأهمية الكبيرة للإنسان وغيره من الأحياء [1] فهي تدخل ضمن صناعات غذائية أساسية [2,3,4,5] بالإضافة الى انها دخلت ضمن السياقات العلاجية التي بدأت تتخذ اطرأ واضحة وكثر استعمالها في الأونة الأخيرة [6] فقد اتجهت لها الانظار لما لها من قابليات متعددة من النواحي العلاجية مثل خفضها للكوليسترول ومعالجة الامراض الفسلجية الأخرى [7,8] بالإضافة الى امكانياتها في تحسين الجهاز المناعي [7,9,10] وغيرها من القابليات التي أدت الى ظهور الأغذية العلاجية التي تستعمل في تحضيرها [11] ولذلك أطلق عليها الأحياء العلاجية او المعززات (Probiotics) ووضعت التشريعات الخاصة باستعمالها [8] بالإضافة الى انها تستعمل في حفظ الأغذية الحيوي Biopreservation نظرا لقابليتها المتعددة للتضاد مع الأحياء المتلفة للأغذية [12,13].

وبكتريا حامض اللاكتيك مجبرة على التخمر [14] وتحتاج الى العديد من المواد الجاهزة لنموها ولذا فهي من أحياء العوز الغذائي الطبيعي ولذلك

*معهد الهندسة الوراثية والتقانة الاحيائية للدراسات العليا/جامعة بغداد

**مركز الربيع للبحوث الزراعية والغذائية/ الهيئة العامة للبحث والتطوير الصناعي/وزارة الصناعة

(Agar) وعقمت بالمؤصدة لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 121° م تحت ضغط 1.5 جو.

حضنت المزارع بدرجات حرارة ملائمة للسلاسل المستعملة ولمدة 24 ساعة بالنسبة للمزارع السائلة و 48 ساعة للأحياء النامية على الأوساط الصلبة.

تقدير الحموضة: تم وفق الطرق القياسية [6]

تقدير العدد الحي: تم وفق الطرق المتبعة في هذا المجال [4]

تم إجراء التجارب لمرتين او اكثر وبمكررين لكل نموذج.

النتائج والمناقشة:

تنتج شركة الفرات العامة للصناعات الكيماوية ما يقرب من 10-11 طن نشأ يومياً وتدخل البذور بمعدل يقرب من 7000 طن ويكون ناتج الكلوتين العرضي لها بحدود 13 % الذي يستعمل بشكل رئيسي علف حيواني بأسعار تتراوح بين 4000-9000 دينار للطن الواحد ، اما ماء النقع الذي يبلغ 4200 متر³ فلا يستعمل بالمرة. أسفرت نتائج التحليل الى الإشارة الى احتواء خلاصة الكلوتين (الذائبة) على نسب واطئة نوعا ما من البروتين والنتروجين الكلي والنتروجين الأميني (Amino nitrogen) في حين كانت النسب عالية في ماء النقع ، بالإضافة الى احتواء كل من خلاصة الكلوتين وماء النقع على نسبة جيدة من العناصر الضرورية لنمو الأحياء المجهرية.

بدأت دراسة إمكانية استعمال هذه المخلفات لتنمية بكتريا حامض اللاكتيك المعروفة بمتطلباتها العالية من المواد الغذائية وكونها Natural auxotroph [11,6,4] فاستبدلت مادة البيبتون وخلاصة اللحم بخلاصة الكلوتين لتحضير وسط MRS المحور، ولقح بأعداد 10×10^3 خلية/ ملتر لسلاسل مختلفة من بكتريا حامض اللاكتيك القياسية وقورن نموها مع وسط MRS القياسي كما موضح في الشكل (1) وشملت السلاسل المستعملة ، *Lb.fermenti* ، *Lb.plantarum* ، *Lb.bulgaricus* ، *Lactobacillus acidophilus* والمسبقيات ، *Lc.diacetilactis* ، *Lc.cremoris* ، *Lactococcus lactis*.

شركات كانون، ألبان تازة، البان الخليج المتوفرة في الأسواق المحلية.

الأوساط الغذائية:

1. وسط (de Man , Rogosa and MRS (Sharpe) القياسي حضر من مكوناته وفق الطرق المتبعة [15,4].

2. وسط MRS المحور حضر باستبدال البيبتون وخلاصة اللحم بخلاصة الكلوتين.

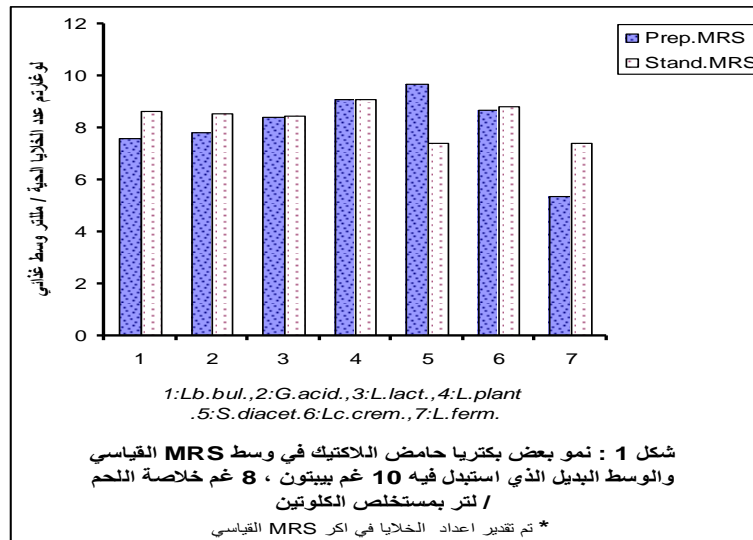
3. وسط خلاصة الكلوتين: حضر بنقع 6 غم من الكلوتين الخام (شركة الفرات العامة للصناعات الكيماوية) في 100 ملتر ماء مقطر لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة مع التحريك، ثم رشح باستعمال ورق ترشيع Whatman #42 وعدل الرقم الهيدروجيني الى الحد المطلوب (التعادل) باستعمال محلول هيدروكسيد الكالسيوم ثم رشح المحلول ثانية وأضيف اليه 0.1 % توين -80 و 2 % كلوكوز (GS).

4. وسط ماء نقع الذرة Corn steep water حضر بمعاملة ماء نقع الذرة (شركة الفرات العامة للصناعات الكيماوية) بهيدروكسيد الكالسيوم لتعديل الأرقام الهيدروجينية التي تبلغ 3-3.5 وإزالة الفائض من الكبريت ومركباته (اذ يتفاعل الكالسيوم مع الكبريتات لتكوين كبريتات الكالسيوم غير الذائبة)، رشح المحلول باستعمال ورق الترشيح Whatman #42 ثم غلي المحلول (الراشح) الناتج لمدة 3-5 دقائق ثم رشح ثانية.

5. استعمال وسط ماء النقع الحاوي على توين -80 حضر باستعمال الوسط رقم (4) واطبق عليه MZ. التوين -80 بنسبة 0.1 % واطلق عليه MZ.

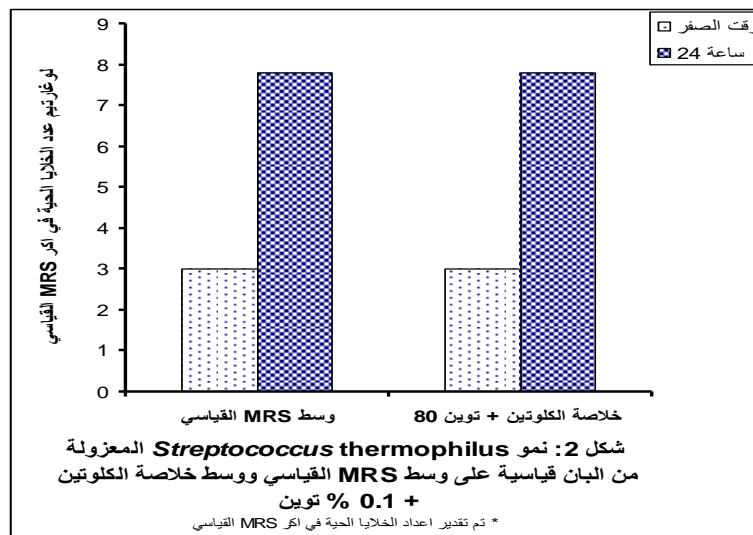
6. حضر وسط Rogosa الانتخابي للعصيات اللبنية Lactobacilli وفق ما جاء لتعليمات شركة Oxoid [15] اما الوسط الانتخابي فحضر باستعمال وسط MZ (رقم 5) واطبق عليه 25 غم/لتر خلاص الصوديوم و 1.32 ملتر/لتر من حامض الخل الثلجي. وبرقم هيدروجيني $5.4 \pm$.

تراوحت الأرقام الهيدروجينية للأوساط المستعملة للتنمية (1-5) بين 6.2-6.8 وصلبت الأوساط الغذائية عند الحاجة بإضافة 1.5 % اكر



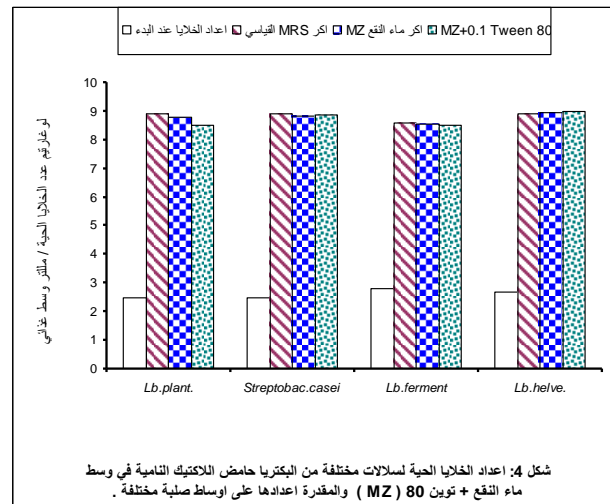
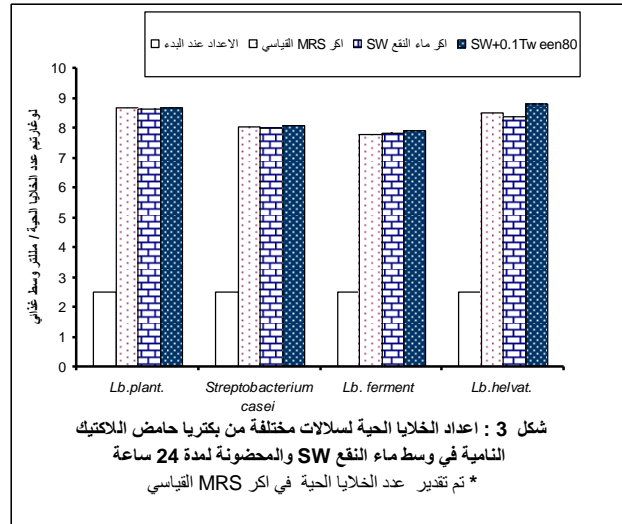
المصادر البروتينية الموجودة في الوسط واجراء التحويرات عليها (18,19,20). لذلك تم تجربة وسط خلاصة الكلوتين لوحدها بعد إضافة كلوكوز بنسبة 2 % وتوين 80- بنسبة 0.1 % (وسط رقم 3/ مواد وطرق العمل) لتنمية بكتريا *Streptococcus thermophilus* ومقارنة ذلك بوسط MRS والنتائج موضحة في الشكل (2). فكان النمو متقارب حيث ازدادت الأعداد حوالي اربع دورات لوغاريتمية.

ويلاحظ من النتائج عدم وجود فروق واضحة بين الوسطين ما عدا بعض الاختلافات كما في *Lb. fermenti* ، *Lc. diacetylactis* والحقيقة ان النمو في هذه الأوساط لا يعطي صورة واضحة عن قابلية خلاصة الكلوتين لتدعيم نمو السلالات المستعملة نظراً لأن الوسط المحور لا يزال يحوي على مصادر للحوامض الامينية مثل خلاصة الخميرة [15] ، كما ان للبكتريا القابلة على تخليق بعض الحوامض الامينية من مكونات الوسط الأخرى بالإضافة الى قابليتها العالية في تحليل



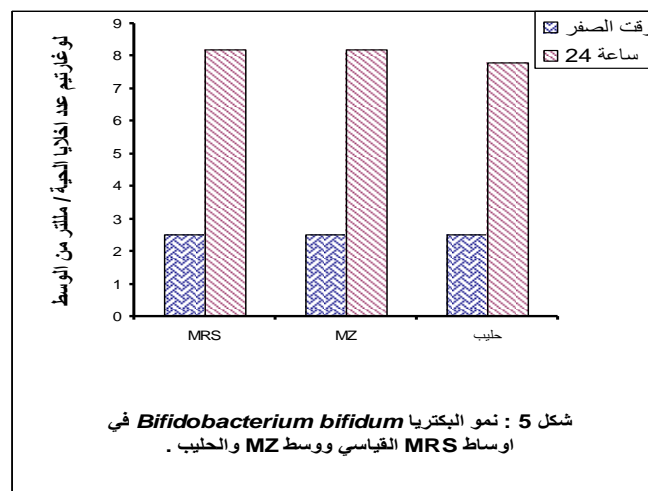
الأوساط. ولكن يبدو ان وسط MZ الحاوي على توين 80- له قابلية مشجعة اكثر لذلك استعمل الوسط للتنمية مرة اخرى وقدرت الاعداد على اوساط غذائية صلبة مختلفة (انظر هامش شكل 3) والنتائج موضحة في الشكل (4) ويبدو ان الأوساط السائلة والصلبة تدعم النمو بدرجات متقاربة.

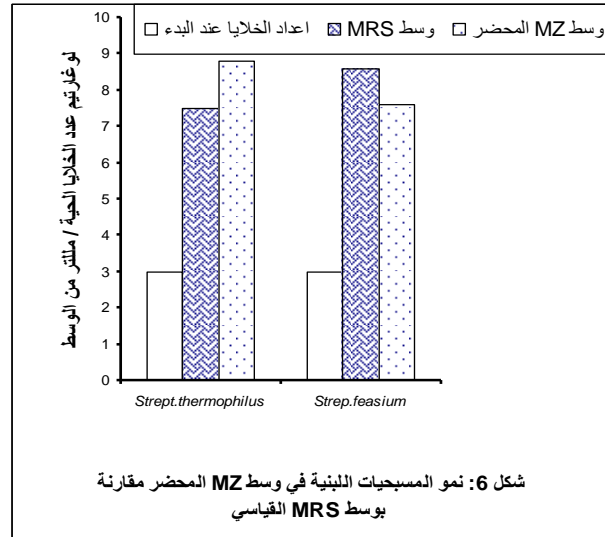
ولدراسة امكانية استعمال ماء نقع الذرة كوسط غذائي لتنمية بكتريا حامض اللاكتيك فقد حضر الوسط S ، والأخر الذي اضيف اليه التوين 80- بنسبة 0.1 % (MZ) وقورنت قابليتهما على تدعيم نمو عدد من السلالات (العصيات) مقارنة بوسط MRS القياسي كما موضح في شكل (3) فيلاحظ مرة اخرى عدم وجود فروق واضحة بين



وقد تم ايضا استعمال الوسط لتنمية المسبقيات اللبنة مثل *S. feacium* , *Lc.lactis* , *S.thermophilus* كما موضح في الشكل رقم (6).

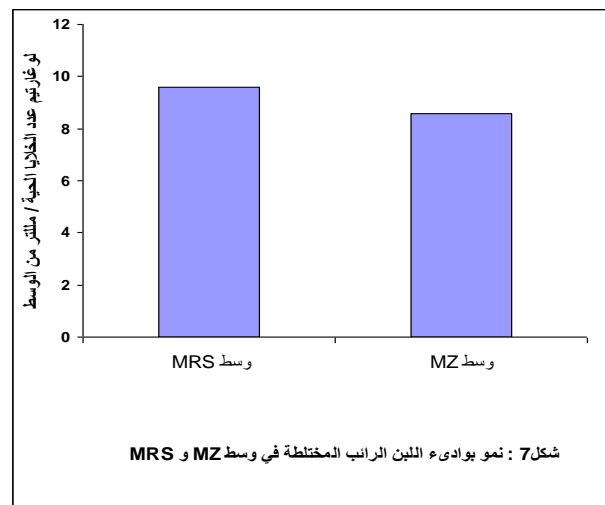
ونظراً للنتائج المشجعة التي تم الحصول عليها من استعمال وسط MZ لذلك تم تجربته في تنمية بكتريا *Bifidobacterium bifidum* لأهميتها العلاجية [9] بالإضافة الى وسط MRS ووسط الحليب الفرز للمقارنة حيث بدأ باعداد اقل من 1×10^3 خلية/ ملتر كما موضح في الشكل رقم (5).





وخفف 10^{-2} ثم استعمل 0.05 ملتر منه لتلقيح 10 ملتر من الوسط MZ ووسط MRS والنتائج موضحة في الشكل (7).

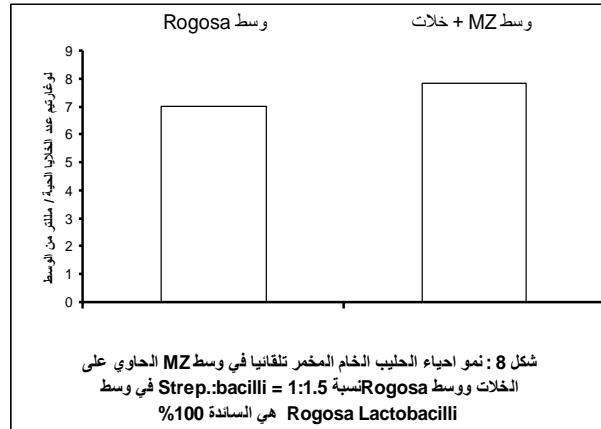
ومن النتائج المذكورة آنفاً يلاحظ صلاحية MZ لتنمية اغلب انواع بكتريا حامض اللاكتيك سواء العصيات او المسبقيات او *Bifidobacteria*. ومن المحاولات التطبيقية لاختبار صلاحية الأوساط لتنمية المزارع المختلطة أخذ لبن قياسي



Stresses ومعالجتها والتي تتمثل في هذه الحالة بالمجموعة المسلطة على الخلايا من انخفاض الحموضة واختلاف مكونات المواد الغذائية [11,6,3].

وفي محاولات لتطوير وسط MZ وإيجاد امكانية تحضير وسط انتخابي منه أضيفت اليه الخلات وحامض الخل على غرار وسط Rogosa [15]. لفتحت الأوساط من حليب خام ترك للتخمر التلقائي لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 ° م ثم خفف الى 10^{-2} واستعمل 0.05 ملتر لتلقيح 10 ملتر من الوسط وحضنت بدرجة حرارة 37 ° م لمدة 48 ساعة والنتائج موضحة في الشكل (8) ويلاحظ نمو الأحياء في الوسطين.

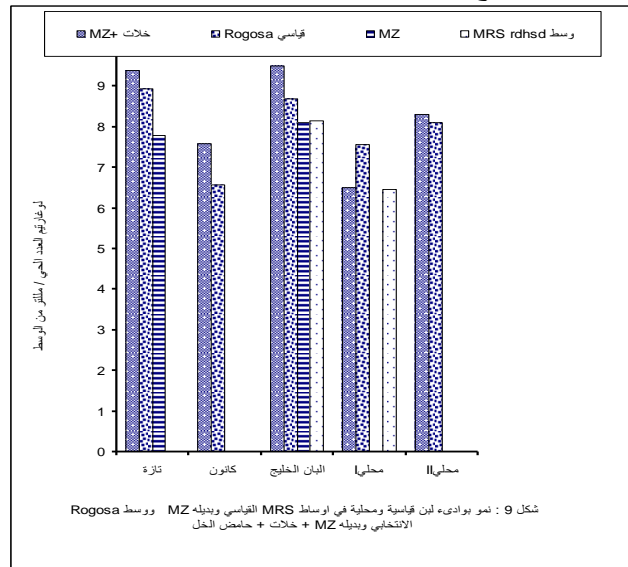
اما نسب المسبقيات الى العصيات في وسط MRS السائل فكانت 1:4 أي تغلب المسبقيات في الفحص المجهرى. اما وسط MZ السائل فقد حافظ على نسب متساوية تقريباً. وبعد تنمية البكتريا النامية في الأوساط السائلة المذكورة تم تنميتها على الأوساط الصلبة المقابلة، ثم أخذت 100 مستعمرة بشكل عشوائي فكانت 5% من المستعمرات عصوية و 95% مسبجية كروية في وسط MRS ، اما في وسط MZ فكانت 70% من المستعمرات عصوية و 30% مسبجية كروية. ان الاختلاف في نسب البكتريا العصوية الى المسبجية فيعود الى أسباب كثيرة والملاحظ من النتائج ان النسبة تكون مختلفة وتساعد مكونات البيئة المحيطة للخلايا في استجابتها للمجموعة المختلفة من



الوسط متفقا مع المراجع الخاصة بهذه الخاصية [15,4].

وامتدت الدراسة التطبيقية لاجاد صلاحية الأوساط الغذائية اعلاه في تنمية بواديء اللبن الرائب ، فقد استعملت ألبان قياسية من شركة كانون وتازه والخليج بالإضافة الى نموذجين من الألبان المحلية وزرعت النماذج بعد تخفيفها للحصول على عدد من الخلايا بحدود $10^3 \times 1$ خلية/ملتر او أقل وزرعت على وسط MZ ووسط MRS المقارنة MZ الحاوي على الخلايا وحمض الخل ووسط المقارنة Rogosa. والنتائج موضحة في الشكل (9).

اما عند حساب نسب نوعي البكتريا في الأوساط السائلة فكانت العصيات متغلبة على المسبقيات في وسط Rogosa (النسبة 1:1.53). اما الأحياء النامية في وسط MZ السائل المحور فكانت 100% من العصيات ولم يلاحظ وجود للمسبقيات المكورة وعند زراعة الأحياء على أوساط غذائية صلبة مقابلة وتركت للنمو، أخذت 100 مستعمرة من كل نوع من الأوساط فوجد ان 100% من الأحياء النامية على أكر MZ المحور وتشير هذه النتائج انه قد يكون وسط MZ اكثر فاعلية في انتخاب الأحياء وربما كان ذلك للتأثير الحامضي الذي توفره مكونات الوسط السائل (Rogosa) من البروتينات او المكونات الأخرى التي سمحت لبعض المسبقيات بالاستمرار ونتائج انتخابية



جدول (1) اعداد المسبقيات والعصيات من نماذج الألبان المختلفة في وسط MZ

النموذج	المسبقيات	العصيات	مسبقيات/عصيات
لبن تازه	*35	*90	2.6:1
لبن كانون	50	62	1.24:1
لبن الخليج	30	107	3.6:1
لبن محلي (1)	24	84	3.5:1
لبن محلي (2)	20	115	5.8:1

*تمثل مجموع قراءات 6-10 حقول مجهرية (لمسحة محضرة من 0.01 ملتر من الألبان)

اما لدراسة تأثير وسط التمنية وانتخابيته في تغيير نسب العصيات والمسبقيات فقد حددت نسب المسبقيات والعصيات في نماذج الألبان عند استعمال وسط MZ كما موضح في الجدول (1).

اللحم. أطروحة ماجستير. كلية الطب البيطري/قسم علوم أمراض الدواجن والأسماك/جامعة بغداد/العراق.

2-Tamime,A.Y.& Robinson, R.K. 1985.Yoghurt: Science and Technology. 1st Edition. Pergamon Press: Oxford, New York.

3-Lucke,F.K. 1996. Lactic Acid Bacteria Involved in Food Fermentation and Their Present and Future Uses in Food Industry. In "Current Advances in Metabolism, Genetics and Application." Eds.F.Bozoglu & B.Ray. 1st Edition Springer. Verlag: Germany.

4-Harrigan, W.F.& McCance, M.E. 1966. Laboratory Methods in Microbiology. 1st Edition Academic Press: London , New York.

5-Fox,P.F., Wallace,J.M., Morgan,S., Lynch,C.M.Nil and ,E.J.&Tohin,J. 1996. Acceleration of cheese ripening. Antonie Van Leeuwenhoek. 70:271-297.

6-Gillilan,S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS. Microbiol. Rev . 87:175-188.

7-Wells,J.M. Robinson,K., Chamberlain, L.M., Schofiel, K.M.&Lepage.R.W.F. 1996. Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles. Antonie Van Leeuwenhoek. 70:317-330.

8-Salminen,S.,Isolauri,E.&Salminen, E.1996.Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. Antonie van Leeuwenhoek. 70:347-358.

9-Locasio,M.,Medici,M.,Medina,M., Vintini,E.,Giori,G.S.,Ruizhologado,A.P. & Perdigon,G.1999. Bifidobacteria effect on the immune system. 6th symposium on Lactic Acid Bacteria.J2.

10- الكعبي، سهام جاسم محسن.2000. دراسة توصيف البكتريوسين المنتج من البكتريا *Lactobacillus acidophilus* وتأثيره على

وعند تنمية النماذج في وسط MZ الحاوي على الخلات او Rogosa لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة 37 ° م لوحظ اختفاء المسبقيات وكانت العصيات هي المتغلبة وقد يعود ذلك الى ان النماذج التي بدأ بها كان محتواها من المسبقيات منخفضاً "توعاً" ما لان العصيات تكون اكثر مقاومة للحموضة من المسبقيات [11,2].

ولدراسة تأثير الأوساط الغذائية في فعالية بواديء اللبن فقد استعملت الألبان المذكورة في الجدول (1) وزرعت في وسط MRS كوسط تنمية للمقارنة مع وسط MZ وأضيف منها لقاح بنسبة 2% الى حليب كامل الدسم معقم وحضنت بدرجة حرارة 42 ° م ثم قيس الوقت اللازم لظهور التخثر فكان بحدود 6 ساعات في وسط MRS وحوالي 5 ساعات للبواديء النامية في وسط MZ اما نسب الحموضة فموضحة في الجدول (2).

جدول(2) الحموضة* المتطورة في الحليب المعقم باستعمال بواديء نماء في وسط MRS او وسط MZ

الحموضة لبواديء نمى في		النموذج
MZ وسط	MRS وسط	
1.0	0.87	لين تازة
0.85	0.74	لين كانون
0.9	0.78	لين الخليج
1.69	0.62	لين محلي(1)
0.78	0.74	لين محلي(2)

• الحموضة الكلية المقدرة كحامض لاكتيك [6]

وتعود أسباب طول فترة التخثر للبواديء النامية في الأوساط الغذائية الى 5-6 ساعات مقارنة بالفترة التقليدية لبواديء اللبن العادية المتوازنة النسبة بين المسبقيات الى العصيات والبالغة بين 3-4 ساعات (في حالة الإنتاج التجاري) يعود الى غياب المسبقيات وعلاقتها التعايشية مع العصيات والتي تؤثر على نسبة إنتاج الحوامض [11,2]. وكذلك استعمال الحليب المعقم في حالة الدراسة مقارنة باستعمال الحليب المبستر في حالة الإنتاج التجاري وبذلك يمكن اعتبار وسط MZ صالحاً لتنمية بكتريا حامض اللاكتيك وذلك لمحتواه العالي من السكريات والحوامض الامينية وكذلك زيادة نسب المنغنيز والمغنيسيوم التي تحتاجها بكتريا حامض اللاكتيك خاصة العصيات منها [11,2] ، كما يمكن جعله وسط انتخابي بإضافة الخلات وكذلك يمكن استعمال خلاصة الكلوتين ولكن بعد إضافة المصادر الكربوهيدراتية اليها.

المصادر:

1-السامرائي، علي كريم.1993. تأثير العصيات اللبنية في إصابات الأكياس الهوائية في دجاج

اللاكتيك. رسالة دكتوراه/قسم علوم الحياة/كلية العلوم/الجامعة المستنصرية.

14-Singleton,P.1998. Bacteria: In Biology, Biotechnology and Medicine. 4th Edition. John Wiley & Sons: Chichester, New York.

15-Bridson,E.Y. (Ed).The Oxoid Manual. 1995.7th Edition . Unipath Ltd. U.K.

16-APHA.1978.Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 14th Edition.Ed.E.H.Marsh.American Health Association Washington. DC.USA .

بعض الخلايا المناعية . اطروحة ماجستير / قسم علوم الحياة / الجامعة المستنصرية / العراق .

11-Oberman,H.&Libudzisz,Z.1998. Fermented Milks In”Microbiology of Fermented Foods” Ed.J.B.Wood. 2nd Edition .Vol.I.Ch.11 “pp 308-350.

11-Oberman, H.& Libudzisz,Z.1998. Fermented Milks In”Microbiology of Fermented Foods” Ed.J.B.Wood. 2nd Edition .Vol.I.Ch.11 pp 308-350.

12-Stiles,M.E.1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhaek. 70:331-345.

13-الشيخلي، ضمياء محمود.1999. دراسة البكتريوسينات المنتجة من قبل بكتريا حامض

Preparation of Media for Growth and Isolation of Lactic Acid Bacteria by Using the Starch-Industry by- Products

*Zahra M.Al-Khafaji **

*Maha T.Al-Qadi***

*Reem F.Abdul-Hameed***

*Thuria S.Al-Hakak***

*Genetic Engineering and Biotechnology Institute for Postgraduate Studies /Univ. of Baghdad, IRAQ.

**Al – Rabee Center for Agricultural Research Ministry of Industry.

Abstract

By- products of corn starch industry were used to prepare media for propagation the lactic acid bacteria as a natural auxotroph. The by- products used were the corn steep water (S) and gluten extract (G) after a proper treatment to get them ready for media preparation. The results showed that it was possible to replace the peptone and meat extract by gluten extract in MRS medium. The growth was approximately similar to that obtained in standard MRS media. Corn steep water (S) was used as well and the growth enhanced by including Tween – 80 at 1% level. The later media named MZ, which was superior for growing standard and local strains and starters. The MZ medium modified by adding acetate and glacial acetic acid similarly to Rogosa media and was very efficient selection property for selecting and growing of lactobacilli only. There was no difference in the starter activities grown in MRS or MZ liquid media used to coagulate sterile whole milk and the developed acidity was at similar extent.