Isolation and screening of lactic acid producing Lactobacilli

عزل وغربلة بكتريا Lactobacillus المنتجة لحامض اللاكتيك

أ.م.د. علي عبد الكاظم الغانمي / جامعة كربلاء – كلية العلوم- قسم علوم الحياة
* سهاد رضا متعب / جامعة كربلاء – كلية العلوم- قسم علوم الحياة
المراسلات الى : أ.م.د. علي عبد الكاظم الغانمي

* البحث مستل من رسالة الماجستير للباحث الثاني

الخلاصة

امكن الحصول على 20 عزلة بكتيرية عائدة لجنس Lactobacillus من مصادر مختلفة اشتملت على الحليب الخام والمخللات واللبن الريفي والشرش والألبان الرائبة المعملية وإن العزلات العشرين المستحصل عليها إضافة الى اربع عزلات اخرى عائدة لنفس الجنس خضعت لعملية غربلة لتحديد الأكفأ منها في إنتاج حامض اللاكتيك تحت ظروف حضن مختلفة واتضح أن العزلتين L.acidophilus و Lactobacillus sp.(25) هما الأغزر إنتاجاً للحامض .

كما تم تحديد نوع الوسط الأفضل لأنتاج الحامض من العزلتين المنتخبتين واظهرت النتائج تفوق عصير التمر على وسط MRS السائل في إنتاج الحامض اذ بلغت كمية الحامض المنتجة (44.02 و64.8) غم/لتر للعزلتين L. acidophilus وLactobacillus sp.25 على التوالي , مقارنة بقيم الأنتاج المستحصلة عند استخدام وسط MRS السائل والتي بلغت (36.12 و62.076) غم/لتر للعزلتين على التوالي ايضاً.

Abstract

Twenty bacterial isolates belonged to the genus of Lactobacillus were obtained from different sources included raw milk , pickles , rural dairy, whey and yoghurt . The above isolates in addition to four isolates belonged to the same genus were subjected to a screening program to test their abilities for lactic acid production using different incubation conditions . Results showed that L. acidophilus and Lactobacillus sp. (25) were the higher producer isolates for lactic acid .

The best medium for production of lactic acid from L. acidophilus and Lactobacillus sp. (25) was date juice in comparision with MRS liquid medium ,the lactic acid amounts were (44.02 and 64.8) gm/L by using date juice as production medium, while they were (36.12 and 62.076) gm/L by using MRS medium for both used isolates , respectively.

المقدمة (Introduction) :

يتزايد الأحتياج العالمي من حامض اللاكتيك سنوياً إذ وصل هذا الأحتياج الى (200000) طن عام 2011 [1] . ويمكن أن يعكس الطلب المتنامي هذا أهمية الحامض الكبيرة والتي تتجلى من خلال إستخداماته الواسعة خاصة في المجالات الصيدلانية والغذائية والكيميائية ومواد التجميل فضلاً عن إستخداماته الجديدة كمواد اولية لصناعة البوليمرات القابلة للتحلل(Biodegradable polymer industry).

يوجد نظيران ضوئيان من حامض اللاكتيك هما L(+)Lactic acid و D(-)Lactic acid ولكل منهما استخداماته المختلفة [2] وينتج هذا الحامض بطريقتين :الأولى التصنيع الكيميائي (Chemical synthesis) والثانية التخمر المايكروبي (Microbial fermentation) . وتتميز الأخيرة بأمكانية إستخدامها لأنتاج النظير الضوئي المطلوب من حامض اللاكتيك L(+) أو D(-) بعد إختيار الكائن المجهري المناسب , وهي الميزة التي تفتقر اليها الطريقة الكيميائية والتي تنتج مزيجاً راسيمياً(Racemic Mixture) من الحامض (DL) غير المرغوب من الناحية الصناعية .

يتوزع إنتاج حامض اللاكتيك من الأحياء المجهرية بين البكتريا والفطريات , وتشكل بكتريا Lactobacillus رافداً مهماً لأنتاج هذا الحامض على المستوى التجاري .

ويتحدد إختيار السلالة الملائمة للانتاج بنوعية المادة الأولية المتوفرة [3]. ولتحقيق إنتاج مناسب من الحامض فأن المادة الأولية المستخدمة يجب أن تفي بعدد من المتطلبات لعل في مقدمتها رخصها واحتواءها على أقل قدر ممكن من الملوثات وذات معدل إنتاج سريع بحصيلة عالية وبدون أو بنواتج عرضية قليلة فضلاً عن توفرها على مدار السنة [2] .

ونظراً لما يمتلكه حامض اللاكتيك من أهمية تطبيقية كبيرة فقد هدفت هذه الدراسة الى:
1- عزل بكتريا Lactobacillus المنتجة لحامض اللاكتيك .
2- غربلة العزلات البكتيرية لتحديد الأكفأ منها لأنتاج الحامض .

المواد وطرائق العمل:

عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus*

تم جمع 30 عينة من مصادر مختلفة لعزل بكتريا *Lactobacillus* اشتملت هذه العينات على الحليب الخام والمخللات والألبان الريفية والشرش والألبان الرائبة المعملية, حيث تم جلبها الى المختبر بأنابيب بلاستيكية معقمة محكمة الغلق.كما استخدمت طريقة التخافيف المتسلسلة في عزل البكتريا بأستخدام الوسط الزرعي DeMan Rogosa and Sharpe (MRS) الصلب , والحضن بدرجة حرارة 37° مئوية لمدة 48 ساعة في ظروف لاهوائية .

كما شخصت عزلات بكتريا *Lactobacillus* على وفق ماجاء في[4] حيث تم الأعتمادعلى الصفات المظهرية التي شملت تصبيغ البكتريا واختبار الحركة فضلاً عن الفحوصات الكيموحيوية التي شملت إختبار الكاتليز و إختبار الأوكسديز و إختبار الجيلاتينيز و إستهلاك السترات وإختبار الأندول و إختبار تخمير السكريات و إختبار قابلية البكتريا على النمو بتراكيز ملحية مختلفة وجرى اختبار حساسية العزلات للمضادات الحيوية.

غربلة عزلات بكتريا *Lactobacillus* لأنتاج حامض اللاكتيك

استخدمت 24 عزلة من بكتريا *Lactobacillus* منها 20 عزلة عزلت في هذه الدراسة اضافة الى ثلاث عزلات تم الحصول عليها من كلية الطب البيطري /جامعة بغداد.أما العزلة الأخيرة فكانت بكتريا *L. acidophilus* وقد تم الحصول عليها من كلية الزراعة /جامعة بغداد, لتحديد أكفأها في إنتاج الحامض ونشطت العزلات في انابيب حاوية على 5 مل من وسط MRS السائل بدرجة حرارة 37° مئوية لمدة 18 ساعة للحصول على اللقاح.

- **تحضير وسط الأنتاج**

استخدم وسط MRS السائل كوسط انتاجي لغربلة عزلات بكتريا *Lactobacillus* إذ تم توزيعه في قناني زجاجية (Vials) محكمة الغلق سعة 20 مل وبواقع 10مل لكل عبوة وتم تعقيمها بجهاز المؤصدة وبعد ان بردت القناني الى درجة حرارة الغرفة أصبحت جاهزة لعملية التلقيح.

- **تلقيح وسط الأنتاج**

تم تلقيح وسط الأنتاج بحجم لقاح مقداره 2% من حجم الوسط لكل العزلات الاربع والعشرين التي شملتها الغربلة وتمت التنمية بدرجة حرارة 37° مئوية لمدة 48 ساعة وبأستخدام ظروف نمو مختلفة اشتملت على الحاضنة الساكنة (Static) والحاضنة الهزازة (Shaker incubator) بسرعة رج 100 دورة/دقيقة واسطوانة النمو اللاهوائي (Anaerobic jar) وبعد انتهاء مدة الحضن فصلت الخلايا عن وسط التخمر بأستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق حيث اهملت الخلايا في حين استخدم الراشح لتقدير كمية حامض اللاكتيك فضلاً عن قياس الرقم الهيدروجيني لوسط التخمر.

- **تقدير حامض اللاكتيك**

قدرت كمية حامض اللاكتيك خلال جميع مراحل الدراسة بأتباع الطريقة الموصوفة من قبل Hadzja (1974)[5] والمطورة من قبل Taylor (1996)[6] واعتماداً على المنحنى القياسي لحامض اللاكتيك.

تحديد نوع الوسط الأمثل لأنتاج الحامض من العزلتين المنتخبتين

قورن إنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين المنتخبتين بأستخدام نوعين من الأوساط :

الأول : صناعي يتمثل بوسط MRS السائل .

الثاني : طبيعي يتمثل بوسط عصير التمر الذي تم تخفيفة الى 2 %سكريات مختزلة بأتباع الطريقة الموصوفة من قبل(Miller 1959)[7] وتم تدعيمه بمستخلص الخميرة 0.5 % وكربونات الكالسيوم 1 % . وزع الوسط في دوارق مخروطية سعة 250 مل بواقع 50 مل لكل دورق . وبعد تعقيمها تمت تنمية العزلتين في حاضنة ساكنة بدرجة حرارة 37° مئوية لمدة 48 ساعة.وبعد انتهاء فترة الحضن تم تقدير حامض اللاكتيك .

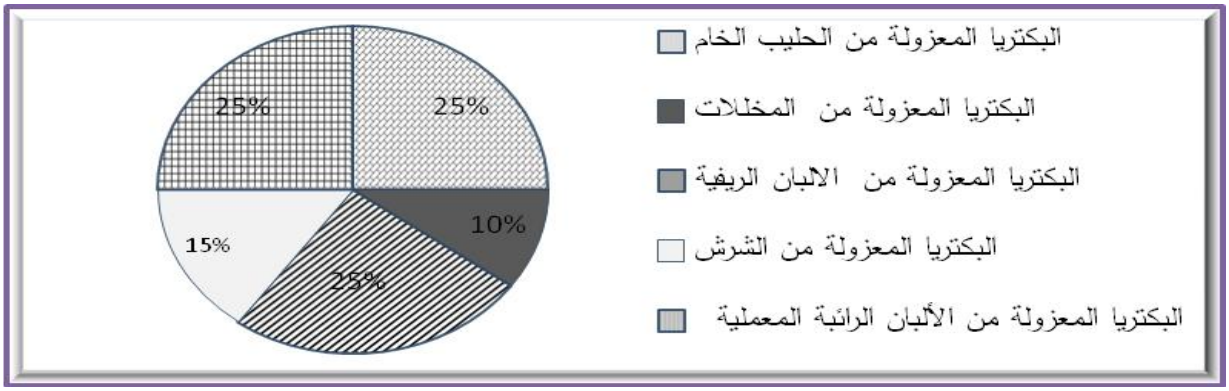
النتائج والمناقشة :

عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus*

عزل بكتريا *Lactobacillus*

أسفرت نتائج عزل بكتريا *Lactobacillus* عن الحصول على 20 عزلة عائدة لهذا الجنس. وقد تباين عدد العزلات المتحصل عليها بأختلاف مصادر العزل المستخدمة في هذه الدراسة إذ بلغت أعدادها (5 و2 و5 و3 و5) عزلات من عينات

الحليب الخام والمخللات والألبان الريفية والشرش والألبان الرائبة المعملية على التوالي بنسب (25 و10 و25 و15 و25)% من مجموع العزلات المتحصل عليها,على التوالي ايضاً (شكل 1).



شكل(1): النسب المئوية لعزلات بكتريا *Lactobacillus* موزعة حسب مصادر عزلها .

أشارت العديد من الدراسات إلى عزل بكتريا *Lactobacillus* من مصادر متعددة واستخدامها في دراسات مختلفة , فقد تم عزل21 عزلة عائدة لجنس *Lactobacillus* من منتجات البان مختلفة [8]. كذلك عزلت 13عزلة بكتيرية عائدة لنفس الجنس من السمك والروبيان [9]. إن الأوساط الغذائية المستعملة للعزل يجب إن تكون ملائمة وحاوية على العوامل التي تسلط الضغط الأنتخابي فمثلاً البكتريا ذات المتطلبات المعقدة مثل بكتريا الألبان يجب أن يضاف الى الأوساط المستعملة لعزلها مركبات معقدة لذا فأن استخدام وسط MRS في عزل هذه البكتريا مناسب جداً[3], إذ يعد هذا الوسط إنتقائياً (Selective) للبكتريا المذكورة فضلاً عن كونه وسطاً اغنائياً (Enrichment medium) لها.

تشخيص بكتريا *Lactobacillus*

يتضح من الجدول (**1**) إن بكتريا *Lactobacillus* المعزولة في هذه الدراسة موجبة لصبغة غرام غير متحركة ومخمرة للكلوكوز وسالبة لأختبارات الكاتليز والاوكسديز والاندول والسترات والجيلاتين.

جدول (1): الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *Lactobacillus*

ت	الأختبار	النتيجة
-1	صبغة غرام	+
-2	المظهر	مفردة او ازواج او بشكل سلاسل قصيرة
-3	ظروف النمو	لاهوائي اختياري
-4	إختبار الحركة	-
-5	إختبار الكاتليز	-
-6	إختبار الاوكسديز	-
-7	إختبار الاندول	-
-8	إستهلاك السترات	-
-9	تحلل الجيلاتين	-
-10	تخمر الكلوكوز	+

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة.

و تم اختبار قابلية بكتريا *Lactobacillus* على تخمير بعض أنواع السكريات (الكلوكوز واللاكتوز والمانيتول والسوربيتول والرامينوز و السكروز والميليبايوز والأميكدالين والأرابينوز والأينوسيتول). أظهرت النتائج في الجدول (2) أن لعزلات بكتريا *Lactobacillus* قابلية مختلفة على تخمير السكريات, إذ كانت لجميعها القابلية على تخمير سكري الكلوكوز واللاكتوز , في حين تباينت قابلية العزلات على تخمير سكريات المانيتول والسوربيتول والرامينوز والسكروز والمليبايوز والأميكدالين والأرابينوز والأينوسيتول وكما موضح في الجدول(2) .

جدول (2): قابلية عزلات بكتريا *Lactobacillus* على تخمير السكريات المختلفة

ت	العـــزلـــــة	الكلوكوز	اللاكتـــوز	المـانيتول	السوربيتول	الرامينوز	السكـروز	الميليبايوز	الأميكدالين	الأرابينـوز	الأينوسيتول
-1	***Lactobacillus* sp.(3)**	+	+	_	_	_	_	_	+	_	+
-2	***Lactobacillus* sp.(4)**	+	+	_	_	_	_	_	_	+	_
-3	***Lactobacillus* sp.(6)**	+	+	+	_	_	+	_	+	_	_
-4	***Lactobacillus* sp.(9)**	+	+	_	_	_	_	_	_	+	_
-5	***Lactobacillus* sp.(10)**	+	+	_	_	_	_	_	+	_	_
-6	***Lactobacillus* sp.(11)**	+	+	+	_	_	+	+	_	+	_
-7	***Lactobacillus* sp.(12)**	+	+	_	_	_	+	+	+	_	_
-8	***Lactobacillus* sp.(13)**	+	+	_	_	_	+	_	+	_	_
-9	***Lactobacillus* sp.(16)**	+	+	+	_	_	+	_	+	+	_
-10	***Lactobacillus* sp.(17)**	+	+	_	_	_	+	_	+	_	_
-11	***Lactobacillus* sp.(18)**	+	+	+	_	+	+	+	+	+	_
-12	***Lactobacillus* sp.(20)**	+	+	+	_	_	+	_	+	+	_
-13	***Lactobacillus* sp.(22)**	+	+	_	_	_	_	_	_	_	_
-14	***Lactobacillus* sp.(23)**	+	+	+	_	_	+	+	+	+	_
-15	***Lactobacillus* sp.(24)**	+	+	_	_	_	_	_	+	_	_
-16	***Lactobacillus* sp.(25)**	+	+	+	+	+	+	_	+	+	_
-17	***Lactobacillus* sp.(26)**	+	+	+	_	_	+	+	+	+	_
-18	***Lactobacillus* sp.(27)**	+	+	+	_	+	+	+	+	+	+
-19	***Lactobacillus* sp.(30)**	+	+	+	_	_	+	_	+	_	_
-20	***Lactobacillus* sp.(31)**	+	+	+	_	_	+	+	+	+	_
-21	***Lactobacillus* sp.(32)**	+	+	+	_	_	+	+	+	+	_
-22	***Lactobacillus* sp.(35)**	+	+	_	_	_	+	+	_	_	_
-23	***Lactobacillus* sp.(36)**	+	+	+	_	_	+	+	+	+	_

(+):نتيجة موجبة , (−): نتيجة سالبة .

قابلية عزلات بكتريا *Lactobacillus* على النمو في ملح كلوريد الصوديوم

تم اختبار قابلية بكتريا *Lactobacillus* على النمو في التراكيز الملحية المختلفة باستخدام تراكيز متدرجة من ملح كلوريد الصوديوم (1.5 و4.5 و7.5 و10) % , واظهرت النتائج الموضحة في الجدول (3) أن جميع العزلات قيد الدراسة لها القابلية على النمو في تراكيز ملحية (1.5 و4.5) % . وإن 21.7 % من العزلات لها القابلية على النمو بشكل ضعيف عند التركيز 7.5 % , بينما كان التركيز الملحي 10% مثبطاً لنمو جميع العزلات المشار اليها في الدراسة .

جدول (3): قابلية عزلات بكتريا *Lactobacillus* على النمو في التراكيز المختلفة من ملح كلوريد الصوديوم

ت	العـــزلـــة	تركيز ملح كلوريد الصوديوم(%)			
		1.5	4.5	7.5	10
-1	*Lactobacillus* sp.(3)	+	+	-	-
-2	*Lactobacillus* sp .(4)	+	+	W	-
-3	*Lactobacillus* sp .(6)	+	+	-	-
-4	*Lactobacillus* sp .(9)	+	+	-	-
-5	*Lactobacillus* sp .(10)	+	+	-	-
-6	*Lactobacillus* sp .(11)	+	+	-	-
-7	*Lactobacillus* sp .(12)	+	+	-	-
-8	*Lactobacillus* sp .(13)	+	+	-	-
-9	*Lactobacillus* sp .(16)	+	+	-	-
-10	*Lactobacillus* sp .(17)	+	+	-	-
-11	*Lactobacillus* sp .(18)	+	+	-	-
-12	*Lactobacillus* sp .(20)	+	+	-	-
-13	*Lactobacillus* sp .(22)	+	+	W	-
-14	*Lactobacillus* sp .(23)	+	+	-	-
-15	*Lactobacillus* Sp. (24)	+	+	-	-
-16	*Lactobacillus* sp .(25)	+	+	W	-
-17	*Lactobacillus* sp.(26)	+	+	-	-
-18	*Lactobacillus* sp .(27)	+	+	W	-
-19	*Lactobacillus* sp.(30)	+	+	-	-
-20	*Lactobacillus* sp .(31)	+	+	-	-
-21	*Lactobacillus* sp .(32)	+	+	-	-
-22	*Lactobacillus* sp .(35)	+	+	W	-
-23	*Lactobacillus* sp .(36)	+	+	-	-

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة , (w): نمو ضعيف

ان هذه النتائج مقاربة لما ذكر في دراسات سابقة إذ تم إختبار قابلية ستة انواع بكتيرية عائدة لجنس *Lactobacillus* على النمو في التراكيز الملحية(1.5 و 2.5 و5 و7.5 و10) % واظهرت النتائج قابلية نمو جميع العزلات لغاية التركيز 5 % بينما تمكنت عزلة واحدة من النمو عند التركيز 7.5 % , في حين كان التركيز 10 % مثبطاً لنمو جميع العزلات المشار اليها[10] .

إن اختبار قابلية بكتريا حامض اللاكتيك على التحمل للتراكيز الملحية يعطي مؤشراً على تحمل المستوى الأوزموزي لهذه البكتريا, فعند تنمية الخلية البكتيرية في تراكيز ملحية عالية يؤدي إلى فقدان الضغط الأنتفاخي للخلية والذي بدوره يؤثر فسلجياً على الخلية والفعالية الأنزيمية والنشاط المائي (water activity) والعمليات الأيضية للخلية البكتيرية[11] .

إختبار حساسية عزلات بكتريا *Lactobacillus* للمضادات الحيوية

تـم إختبار حساسية عزلات بكتريا *Lactobacillus* تجاه عدد من المضادات الحيـوية اشتملت على (Clindamycin و Oxacillin وCefotaxime و Sulphanethoxazole وNeomycin وChloramphenicol و Nalidixic acidو Tetracycline و Ciprofloxacin). وأظهرت النتائج الموضحة في الجدول (4) أن جميع العزلات قيد الدراسة كانت مقاومة للمضـادات الـحـيوية (Clindamycin و Oxacillin و Cefotaxime و Sulphanethoxazote) . و 47.8% منها كانت مقاومة للمضاد (Nalidixic acid). و 8.7% مقاومة للمضاد الحيوي Chloramphenicol . و اظهرت النتائج في الجدول نفسه ان جميع عزلات *Lactobacillus* كانت حساسة للمضادات الحيوية Tetracycline و Ciprofloxacin . و 43.5% حساسة للمضاد الحيوي Neomycin و47.8 % حساسة للمضاد Chloramphenicol. و34.8% حساسة للمضاد Nalidixic acid .

ورد تأثير المضادات الحيوية على بكتريا *Lactobacillus* في العديد من الدراسات حيث اختبرت حساسية العزلتين *L. rhamnosus* و *L. paracasei* تجاه المضادين Neomycin و Tetracycline ولوحظ التاثير المثبط للمضاد الحيـوي Tetracycline للعزلتين المشار اليهما, بينما كان تاثير المضاد Neomycin مثبطاً للعزلة *L. paracasei* وغير مثبط لنمو *L. rhmnosus* [12] . واشارت العديد من الدراسات الى حساسية بعض انواع بكتريا *Lactobacillus* تجاه المضادات الحيوية Clindamycin و Chloramphenicol التي تعمل على تثبيط بناء البروتين في الخليـة البكتيرية [13,14]

جدول (4): اختبار حساسية عزلات بكتريا *Lactobacillus* تجاه المضادات الحيوية

ت	العــزلـة	DA	OX	CTX	SMZ	N	C	NA	TE	CIP
-1	***Lactobacillus* sp.(3)**	R	R	R	R	M	M	M	S	S
-2	***Lactobacillus* sp.(4)**	R	R	R	R	M	M	R	S	S
-3	***Lactobacillus* sp.(6)**	R	R	R	R	M	M	R	S	S
-4	***Lactobacillus* sp.(9)**	R	R	R	R	S	M	R	S	S
-5	***Lactobacillus* sp.(10)**	R	R	R	R	M	S	S	S	S
-6	***Lactobacillus* sp.(11)**	R	R	R	R	M	S	S	S	S
-7	***Lactobacillus* sp.(12)**	R	R	R	R	M	S	R	S	S
-8	***Lactobacillus* sp.(13)**	R	R	R	R	S	M	M	S	S
-9	***Lactobacillus* sp.(16)**	R	R	R	R	S	R	R	S	S
-10	***Lactobacillus* sp.(17)**	R	R	R	R	S	M	M	S	S
-11	***Lactobacillus* sp.(18)**	R	R	R	R	M	M	S	S	S
-12	***Lactobacillus* sp.(20)**	R	R	R	R	M	M	R	S	S
-13	***Lactobacillus* sp.(22)**	R	R	R	R	S	S	R	S	S
-14	***Lactobacillus* sp.(23)**	R	R	R	R	S	S	S	S	S
-15	***Lactobacillus* sp.(24)**	R	R	R	R	M	S	R	S	S
-16	***Lactobacillus* sp.(25)**	R	R	R	R	M	S	S	S	S
-17	***Lactobacillus* sp.(26)**	R	R	R	R	S	S	S	S	S
-18	***Lactobacillus* sp.(27)**	R	R	R	R	S	M	S	S	S
-19	***Lactobacillus* sp.(30)**	R	R	R	R	S	M	R	S	S
-20	***Lactobacillus* sp.(31)**	R	R	R	R	M	R	M	S	S
-21	***Lactobacillus* sp.(32)**	R	R	R	R	M	S	S	S	S
-22	***Lactobacillus* sp.(35)**	R	R	R	R	S	S	R	S	S
-23	***Lactobacillus* sp.(36)**	R	R	R	R	M	S	R	S	S

(R) : مقاومة , (S) : حساسة , (M) : متوسطة .

(DA): Clindamycin
(CTX):Cefotaxime
(N) : Neomycin
(NA): Nalidixic-acid
(CIP): Ciprofloxacin
(OX): Oxacillin
(SMZ):Sulphanethoxazole
(C): Chloramphenicol
(TE): Tetracycline

غربلة عزلات بكتريا *Lactobacillus* لأنتاج حامض اللاكتيك

تم استخدام 24 عزلة بكتيرية عائدة لجنس *Lactobacillus* لأختبار قابليتها في انتاج حامض اللاكتيك , وتمت تنمية هذه العزلات على وسط MRS السائل وتحت ظروف مختلفة شملت ظروفاًهوائية ساكنة وأخرى هزازة بسرعة رج (100 دورة / دقيقة) وظروفاً لاهوائية بأستخدام اسطوانة النمو اللاهوائي (Anaerobic jar) . وقد أظهرت النتائج المبينة في الجدول (5) أن لجميع العزلات البكتيرية القابلية على انتاج الحامض ولكن بدرجات متفاوتة , وبمقارنة قيم الانتاج في الجدول نفسه يلاحظ أن أعلى إنتاج من الحامض تحقق من العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp. (25) إذ بلغ (57.86 و59.76) غم / لتر على التوالي . وذلك بتنميتهما تحت ظروف ساكنة . و تبين ايضاً انعدام انتاج الحامض من العزلة *Lactobacillus* sp. (4) تحت ظروف النمو الساكنة واللاهوائية , بينما بلغ 5.12 غم / لتر تحت الظروف الهوائية الهزازة. وإعتماداً على هذه النتائج فقد أختيرت العزلتان أعلاه للدراسات اللاحقة وتم إنتاج الحامض منهما تحت الظروف الساكنة في جميع مراحل الدراسة .

إن الحصول على أعلى إنتاج من حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus* .sp (25) تحت ظروف ساكنة ربما يعزى الى الطبيعة المحبة لكميات قليلة من الهواء (Micoaerophilic nature) لهاتين العزلتين . وفضلاً عن ذلك فأن دورق المزرعة الساكنة يوفر عدداً غير محدد تقريباً من ظروف التخمر المتغيرة تتفاوت بين غزارة المواد المغذية الى النقص في المواد المغذية وبين تجهيز وفير للأوكسجين الى تعايش لاهوائي (Anaerobiosis) جزئي [15].

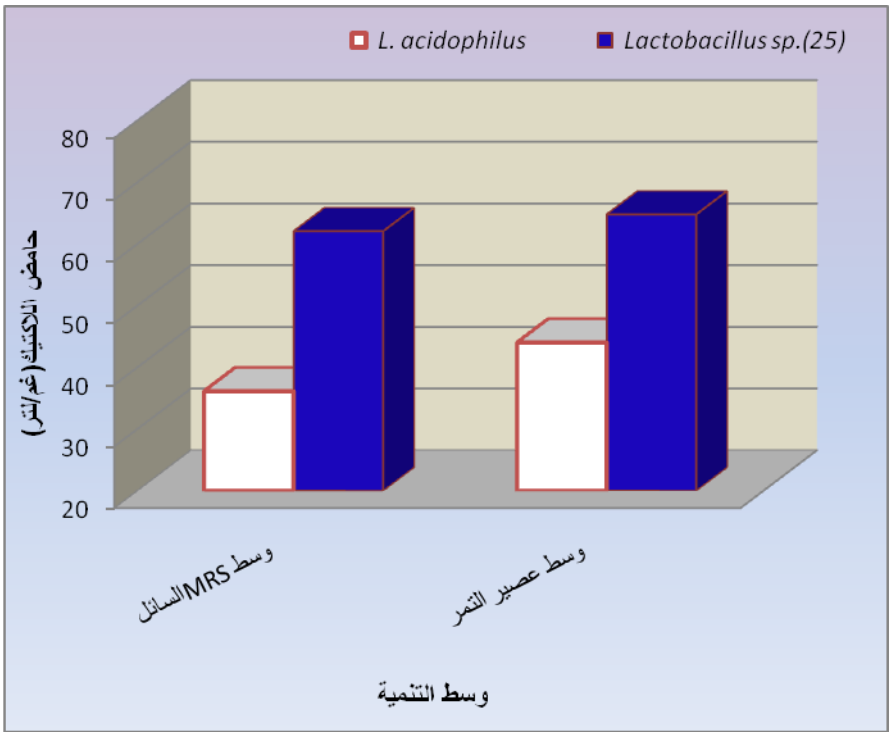
تعد عملية الغربلة مهمة جداً نظراً لكونها تسمح بفرز إضافي لتلك الأحياء المجهرية التي لها قيمة حقيقية في العمليات الصناعية ونبذ تلك التي تنقصها هذه الأمكانية[15].

جدول (5):غربلة عزلات بكتريا *Lactobacillus* لأنتاج حامض اللاكتيك تحت ظروف هوائية مختلفة.

ت	العـــزلــة	ظروف هوائية هزازة		ظروف هوائية ساكنة		ظروف لاهوائية	
		L A (g/l)	pH	L A (g/l)	pH	L A (g/l)	pH
-1	*Lactobacillus* sp.(3)	0.00	4.16	06.43	4.16	01.67	4.16
-2	*Lactobacillus* sp.(4)	05.12	4.20	0.00	4.19	0.00	4.18
-3	*Lactobacillus* sp.(6)	06.31	5.06	32.98	4.72	44.40	4.71
-4	*Lactobacillus* sp.(9)	26.19	4.39	04.52	5.30	10.71	5.15
-5	*Lactobacillus* sp.(10)	29.76	4.54	21.67	4.53	19.29	4.52
-6	*Lactobacillus* sp.(11)	0.00	6.78	01.43	6.76	03.45	6.67
-7	*Lactobacillus* sp.(12)	22.62	4.18	33.10	4.18	43.33	4.19
-8	*Lactobacillus* sp.(13)	10.18	5.14	08.04	5.35	06.19	5.47
-9	*Lactobacillus* sp.(16)	07.62	5.35	0.24	5.40	04.17	5.42
-10	*Lactobacillus* sp.(17)	43.45	4.24	45.60	4.26	38.81	4.22
-11	*Lactobacillus* sp.(18)	30.48	4.14	47.38	4.14	35.36	4.14
-12	*Lactobacillus* sp.(20)	36.31	4.18	34.64	4.18	40.83	4.19
-13	*Lactobacillus* sp.(22)	13.93	4.17	55	4.16	46.19	4.16
-14	*Lactobacillus* sp.(23)	17.86	4.60	33.81	4.59	35.71	4.74
-15	*Lactobacillus* sp.(24)	44.76	4.19	50.95	4.20	40.95	4.20
-16	*Lactobacillus* sp.(25)	57.62	4.12	59.76	4.11	54.76	4.10
-17	*Lactobacillus* sp.(26)	39.76	4.21	48.57	4.20	41.43	4.20
-18	*Lactobacillus* sp.(27)	32.74	4.25	33.93	4.18	52.86	4.23
-19	*Lactobacillus* sp.(30)	35.95	4.26	49.17	4.22	46.19	4.19
-20	*Lactobacillus* sp.(31)	30.48	4.15	34.76	4.17	44.05	4.16
-21	*Lactobacillus* sp.(32)	25.00	4.15	27.14	4.15	30.48	4.14
-22	*Lactobacillus* sp.(35)	0.00	7.08	12.32	6.99	05.12	6.83
-23	*Lactobacillus* sp.(36)	33.33	4.15	40.00	4.14	32.02	4.14
-24	*L. acidophilus*	44.17	4.34	57.86	4.23	39.88	4.22

تحديد نوع الوسط الأمثل لأنتاج الحامض من العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25)

قورن انتاج حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) بأستخدام نوعين من الاوساط ,الاول وسط MRS الصناعي السائل والآخر عصير التمر المدعم بمستخلص الخميرة وكاربونات الكالسيوم .وأظهرت النتائج المبينة في الشكل (2) أن اعلى انتاج للحامض كان بأستخدام وسط عصير التمر المدعم بالمغذيات المشار اليها اذ بلغ (44.02 و 64.8) غم/لتر للعزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp.(25) على التوالي , مقارنة بقيم الأنتاج المستحصلة عند استخدام وسط MRS السائل والتي بلغت (36.12 و62.076) غم/لتر للعزلتين على التوالي ايضاً. واعتماداًعلى هذه النتائج تم إختيار وسط عصير التمر بوصفه مصدراً كاربونياً وتم إستخدامه في جميع مراحل الدراسة اللاحقة .



الشكل (2) : تأثير نوع الوسط في إنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp. (25) بأستخدام وسط (MRS) السائل ووسط عصير التمر بتركيز (2)%.

يتضح من النتائج اعلاه ملائمة وسط عصير التمر لأنتاج حامض اللاكتيك ويمكن أن يعزى ذلك الى إحتوائه على مكونات تدعم نمو البكتريا وإنتاج الحامض حيث يحتوي التمر على سكر مختزل بنسبة 55.8 % وبروتين 1.2 % فضلاًعن الكثير من الاملاح المعدنية وبعض الفيتامينات[16]. كما اتضح من احدى الدراسات أن تمور الزهدي تحوي على سكريات كلية بنسبة 86.8 % وسكريات مختزلة بنسبة 73.4 % منها 32.77 %سكر كلوكوز و 39.15 % سكر فركتوز على أساس الوزن وتحوي أيضاً على فيتامين B1 و B2 والبايوتين وحامض الفوليك بنسب (80 و167 و 5.74 و 6.3) مايكروغرام/100غم من الوزن الجاف على التوالي [17].

المصادر

1- Altaf, M.; Naveena, B. J. and Reddy, G. (2005). Screening of Inexpensive Nitrogen Sources For Production of L (+) Lactic acid From Starch by Amylolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in Single Step Fermentation. Food Technol. Biotechnol. 43(3) : 235-239.

2- Wee, J. Y. ; Kim, H. O.; Yun, J. S. and Ryu, W. (2006). Pilot- Scale Lactic Acid Production Via Batch Culturing of *Lactobacillus* sp. RKY2 Using Corn Steep Liquor as a Nitrogen Source . Food Technol. Biotechnol. 44(2): 293-298.

3- الخفاجي , زهرة محمود (1990) . التقنية الحيوية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي / جامعة بغداد . مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر .

4- Krieg , N. R. and Holt, J.G. (1984) . Bergey's Manual of Systematic Bacteriology . Volume 1. Williams and Wilkins . Baltimore / London .

5- Hadzja , O. (1974) . A simple method for the quantitative determination of muramic acid . Anal.
Biochem . 60: 512-517

6- Taylor , K. A. (1996) . Asimple Colorimetric Assay For Muramic Acid And Lactic Acid . Appl. Biochem. Biotechnol. 56. 49-58 .

7- Miller ,G .I. (1959) . Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar . Anal. Chem. , 3r . 426-428 .

8- Erdogrul ,O. and Erbilir, F. (2006). Isolation and characterization of *Lactbacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from Various foods. Turk J. Biol. 30. 39-44 .

9- Nair, P. S. and Surendran, P. K. (2005). Biochemical Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From Fish and Prawn. Journal of Culture Collections. Volume 4: 48-52.

10- Adnan, A. F. M. and Tan,I. K. P. (2003). Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential.

11- Liu, S.Q.; Asmundson, R.V.; Gopal, P.K.; Holland, R. and Crow, V. L. (1998). Influence of reduced water activity on lactose metabolism by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* at different pH values. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2111-2116 .

12- Verdenelli, M. C.; Ghelfi, F.; Silvi, S.; Orpianesi, C.; Cecchini, C. and Cresci, A. (2009). Probiotic Properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* Isolated From Human Faeces . Eur. J. Nutr.

13- Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G. and Sorrentino, E. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese Lait. 85: 193-204.

14- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., H ildebrandt, B., Muller-Bertling, S., Witte, W. and Goossens, H. (2007) Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. J. Antimicrob Chemother 59: 900-912.

15- ساجدي , عادل جورج وعلي , علاء يحيى محمد .(1987) . أساسيات التخمرات الصناعية الجزء الأول . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي / جامعة البصرة . مطبعة جامعة البصرة .

16- البكر , عبد الجبار (1972) . نخلة التمر , ماضيها وحاضرها والجديد في زراعتها وصناعتها وتجارتها . شركة مطبعة الوطن .

17- Yousif, A. K. ; Benyamin , N.D. ; Kado, A. ; Mehi- Alddin and Ali, S. M. (1982) .Chemical composition of four Iraqi date cultivars . Date Palm Journal . 1 (2) : 285-294 .

1