استخدام المتحلل البروتيني لقرون الماشية مصدرا نايتروجينيا لنمو بكتريا حامض اللبنيك

Use of sheep horn hydrolysate as nitrogen source for lactic acid bacteria growth

ايات عدنان عباس ، زيد اكرم ثابت ، حيدر حقي اسماعيل
مركز بحوث التقنيات الاحيائية / جامعة النهرين

Ayat A. A. , Zaid A. T. , Hayder H. I.
Biotechnology Research Center/ Al-Nahrain University

المستخلص :

شملت الدراسة استخدام المتحلل البروتيني لقرون الماشية Sheep Horn Hydrolysate (SHH) مصدرا نايتروجينيا في الوسط الزرعي (SHHM) المعد لتنمية بكتريا حامض اللبنيك ، اذ كانت كثافة النمو وعلى طول موجي 540 nm لبكتريا *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus acidophilus* (1.31 و 1.38) ، على التوالي عند تنميتها في وسط SHHM بينما كانت كثافة النمو لبكتريا *Lactobacillus casei* و *Lactobacillus acidophillus* (1.27 و1.32) ، على التوالي عند تنميتها في وسط MRS الحاوي على الببتون وخلاصة الخميرة وخلاصة اللحم مصادرا للنايتروجين . وفي اختبار فحص التضاد كان معدل اقطار منطقة التثبيط لرواشح بكتريا *Lactobacillus casei* المنماة على وسط SHHM (14 , 13 , 18) ملم تجاه *Klebsiella sp.* و *Staphylococcus aureus* و *Candida sp.* ، على التوالي . في حين كان معدل اقطار منطقة التثبيط لرواشح بكتريا *Lactobacillus casei* المنماة على وسط MRS (12, 10, 12) ملم تجاه *Klebsiella sp.* و *Staphylococcus aureus* و *Candida sp.* على التوالي . اما معدل اقطار منطقة التثبيط لرواشح بكتريا *Lactobacillus acidophillus* المنماة على وسط SHHM (14 , 14 , 20) ملم تجاه *Klebsiella sp.* و *Staphylococcus aureus* و *Candida sp.*على التوالي ، فيما كانت (13 , 13 , 16) ملم تجاه *Klebsiella sp.* و *Staphylococcus aureus* و *Candida sp* ، على التوالي عند تنميتها في وسط MRS .

Abstract

This study included used the sheep horn Hydrolysate as a nitrogen source in growth medium (SHHM) for cultivation of lactic acid bacteria, The results showed the optical density of growth in 540 nm for *Lactobacillus casei* and *lactobacillus acidophillus* was 1.38 and 1.31 respectively after cultivation in (SHHM) medium. Otherwise the optical density of growth for *Lactobacillus casei* and *lactobacillus acidophillus* was 1.27 and 1.32, respectively after cultivation in (MRS) medium, Which contain peptone, yeast extract and meat extract as a nitrogen source. In the inhibition capability test the results showed that the inhibition zone average of cell free extract for *lactobacillus casei* which cultivated in SHHM was (14 , 13 and 18) mm against *Klebsiella sp, Staphylococcus aureus* and *Candida sp.* respectively, while the inhibition zone average of cell free extract for *lactobacillus casei* which cultivated in MRS was (12 , 10 and 12 mm) against *Klebsiella sp, Staphylococcus aureus* and *Candida sp.* Respectively. The

inhibition zone average of cell free extract for *lactobacillus acidophillus* which cultivated in SHHM was (14 , 14 and 20) mm against *Klebsiella sp, Staphylococcus aureus* and *Candida sp.* respectively, and (13 , 13 and 16) mm against *Klebsiella sp, Staphylococcus aureus* and *Candida sp.* respectively after cultivated in MRS medium.

المقدمة

تحتاج بكتريا *Lactobacillus* الى متطلبات غذائية معقدة (Fastidious) ، اذ يحتاج نموها الى مدى واسع من المركبات العضوية واللاعضوية ، والاحماض الامينية والدهنية والفيتامينات والكاربوهدرات والببتيدات والاملاح [1 ، 2] . [3] الى حاجة بكتريا *Lactobacillus* الى الاحماض الامينية ففي غياب الاحماض الامينية (Glutamine, Arginine ,Leucine ,Isoleucine, Valine, Phenyl alanine , Tryptophane) من الوسط الزرعي أدى إلى تثبيط نمو انواع منها مثل *Lactobacillus helveticus* و*Lactobacillus casei* و *Lactobacillus acidophillus* و*Lactobacillus plantarum* . [4] حاجة بكتريا Lactobacillus الى العديد من عوامل النمو كالنيوكليوتيدات والاحماض الامينية وفيتامين B12 والبايوتين . ان ارتفاع كلف الاوساط الغذائية وعوامل النمو يؤثر على كلف انتاج الخلايا المايكروبية والايض الحيوي ونواتج التخمر [5] . ويعد مصدر النايتروجين احد عوامل النمو المكلفة للبكتريا والتي يتم الحصول عليها من مصادر عدة مثل النبات ، بروتين الحليب ، الشرش ، وخلاصة الخميرة وغيرها من المصادر ، لذا بدأت تتوجه الدراسات للتحري عن بدائل رخيصة للحصول على مصدر للنايتروجين [6] وتعد الياف البروتين التي مصدرها القرون والريش والشعر التي يمكننا الحصول عليها من مخلفات المجازر وبكلف رخيصة من اهم هذه البدائل[7] ، ومن هنا جاء الهدف من هذه الدراسة :

1. اختبار المتحلل البروتيني لقرون الماشية مصدرا نايتروجينيا بديلا عن خلاصة الخميرة وخلاصة اللحم والببتون الموجود في وسط MRS المستخدم لنمو بكتريا حامض اللبنيك .
2. اختبار قابلية المتحلل البروتيني لقرون الماشية على تحفيز نمو بكتريا حامض اللبن (Prebiotic)
3. تصميم اوساط غذائية لنمو بكتريا حامض اللبنيك وبكلف ارخص من وسط النمو MRS .

طرائق العمل :

عزلات بكتريا الاختبار : تضمنت الدراسة استخدام عزلتين من بكتريا حامض اللبنيك وهي *Lactobacillus acidophillus* و*Lactobacillus casei* المعزولة محليا (مركز بحوث التقنيات الاحيائية – جامعة النهرين) ، وكذلك استخدام احياء مجهرية مرضية مصدرها (مختبر الصحة المركزي – وزارة الصحة) وهي *Klebsiella sp.* و *Staphylococcus aureus* و *Candida sp.* .

طريقة تحضير المتحلل البروتيني لقرون الماشية : اخذت القرون وغسلت بالماء المزال منه الايونات وبعدها جففت بالفرن على 100 م° لمدة ثلاثة ايام . قطعت القرون الجافة الى قطع صغيرة وطحنت ونخلت للحصول على ناتج يسمى Horn Flour (HF) . اخذ 35 غم من طحين القرون وشبع بـ50 مل من عياري 6HCL ثم بعدها حضن المزيج على درجة حرارة 80 م لمدة 24 ساعة ، في نهاية المدة اضيف 100 مل من الماء المزال منه الايونات وحضن على درجة حرارة 30 م لمدة ساعة ، اخذ المحلول الناتج وبرد ثم رشح مرتين بورق الترشيح No.1 ، وكمل الحجم النهائي الى 400 مل بالماء المزال منه الايونات وبذلك تم الحصول على الراشح الرائق النهائي والذي يسمى Sheep Horn Hydrolysate (SHH) وقد استخدم بنسبة 4% (حجم / حجم) وخزن على درجة حرارة 4 م [8] وتم تقدير انتروجين الكلي للمتحلل البروتيني بطريقة كلدال .

الاوساط الزرعية :

1. وسط MRS السائل :استخدم هذا الوسط في تنشيط ونمو عزلات بكتريا حامض اللبنيك المجهز من شركة (Himedea) وحضر طبقا لتعليمات الشركة المجهزة .
2. وسط Mueller – Hinton : استخدم هذا الوسط في تنشيط عزلات الاحياء المجهرية المرضية واجراء فحص التضاد المجهز من شركة (Difico) وحضر طبقا لتعليمات الشركة المجهزة واضيف % 1.5 من مادة Agar للحصول على وسط صلب .

3. الاوساط الزرعية المقترحة : حضرت اوساط زرعية مقترحة لتنمية بكتريا حامض اللبنيك في هذه الدراسة واعتمد في تصميم الاوساط احتياجات بكتريا حامض اللبنيك من عوامل نمو وسمي الوسط الاول (SHHM1) والذي احتوى على 4 % (حجم / حجم) من المتحلل البروتيني لقرون الماشية و 5 غم Sodium acetate trihydrate و20 غم D.glucose و1سم^3 Tween80 و2 غم Triammonum citrate و0.2 غم MgSO4.7H2O و0.05غم MnSO4.7H2O في لتر واحد من الماء المقطر ، اما الوسط الثاني (SHHM2) فقد احتوى على 4 % (حجم / حجم) من المتحلل البروتيني لقرون الماشية و20 غم D.glucose في لتر واحد من الماء المقطر ، واحتوى الوسط الثالث (SHHM3) على 4 % (حجم / حجم) من المتحلل البروتيني لقرون الماشية و 5 غم Sodium acetate trihydrate و1مل Tween80 و2 غم Triammonum citrate و0.2 غم MgSO4.7H2O و0.05غم MnSO4.7H2O في لتر واحد من الماء المقطر ، وعقمت جميع هذه الاوساط في درجة حرارة 121م (15 باون / انج^2) لمدة 15 دقيقة .

فحص التضاد :

1.تحضير Cell Free Extract (CFE) : حضر كما ورد في الطريقة الموصوفة من قبل [9] وعلى النحو الاتي :

أ. حضن 100 مل من الوسط الزرعي المعقم بعد تلقيحه بحجم لقاح 2.5 % من بكتريا الاختبار في درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة .

ب. اجريت عملية النبذ المركزي بسرعة 5000 دورة / دقيقة لمدة 25 دقيقة في درجة حرارة 4 م .

ج. فصل الراشح عن الراسب ، وعقم الراشح باستخدام المرشح البكتيري 0.45 μm وهيأ للاختبار.

2.اجري فحص التضاد بطريقة اختبار الحفرة Well Assay [9] وعلى النحو الاتي :

أ. وزع الوسط الزرعي في اطباق بتري وبواقع 23 – 25 مل .

ب. بعد تصلب الوسط نقل 0.1 مل من الاوساط الزرعية السائلة المنماة فيها الانواع المختلفة من الاحياء المجهرية المرضية ونشرت بقضيب زجاجي معقم L-Shape .

ج. حضنت الاطباق في درجة حرارة 37 م لمدة ساعتان .

د. اخرجت الاطباق من الحاضنة وثقبت باستخدام الة تثقيب الفلين المعقمة وكان قطر الحفرة 5ملم .

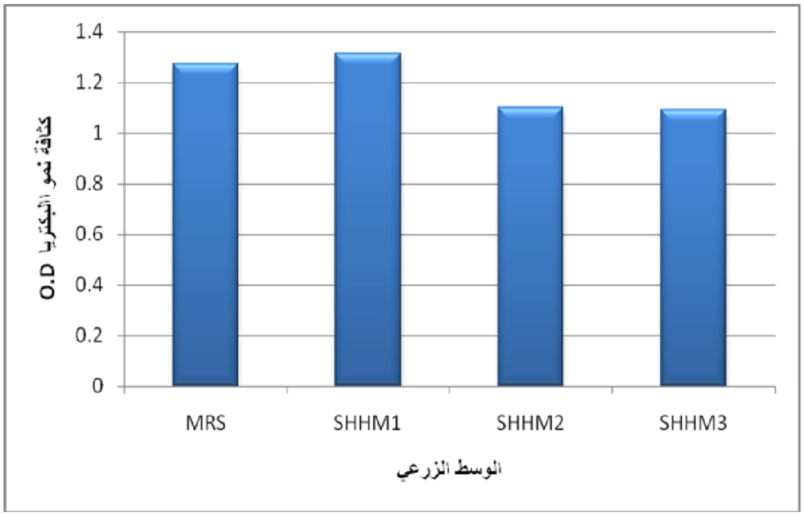
هـ. وضع 0.05 مل من CFE في الحفرة والمحضر حسب الفقرة (1).

و. نقلت الاطباق الى الثلاجة وتركت لمدة ساعتين بعدها نقلت الى الحاضنة على درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة ، ثم قيست اقطار هالة التثبيط المتكونة باستخدام مسطرة مدرجة وبضمنها قطر الحفرة .

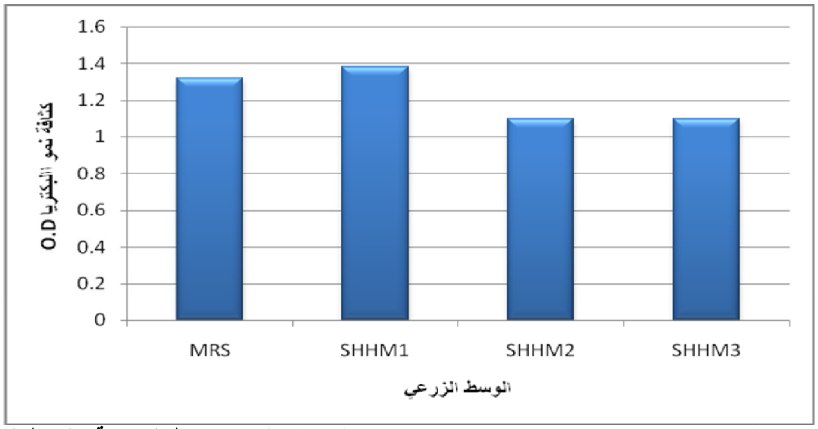
قياس كثافة النمو للخلايا : قيست كثافة النمو لخلايا البكتريا على طول موجي 540nm [10] .

النتائج والمناقشة :

وسط النمو : تبين النتائج في الشكل (1 ، 2) كثافة نمو بكتريا حامض اللبنيك في وسط MRS والاساط الزرعية المقترحة ، اذ كانت كثافة النمو لبكتريا *Lactobacillus casei* في وسط MRS هي 1.27 اما في وسط SHHM1 هي (1.31 ، 1.1 ، 1.09) في وسط SHHM2 وSHHM3 على التوالي . فيما كانت كثافة النمو لبكتريا *Lactobacillus acidophillus* في وسط MRS هي (1.32) بينما كانت (1.38 ، 1.1 ، 1.1) لوسط (SHHM1 وSHHM2 وSHHM3) على التوالي , كانت قيمة النتروجين الكلي 1.4% الضرورية لنمو الاحياء المجهرية لاستهلاك النتروجين بشكله البسيط . وبذلك تبين النتائج ان الوسط الزرعي الحاوي على المتحلل البروتيني لقرون الماشية قد اعطى كثافة نمو اعلى مقارنة بالوسط الزرعي MRS ، وهذا يتفق مع [8] . ان المتحلل البروتيني لقرون الماشية يعد من افضل المصادر النتروجينية لنمو بكتريا حامض اللبنيك مقارنة بالمصادر الاخرى ، اذ انه يحتوي على α-Keratin ذو المحتوى العالي من الحامض الاميني Cysteine بنسبة تصل الى اعلى من 22 % بالاضافة الى الاحماض الامينية الاخرى ، وكذلك كونه من المصادر النايتروجينية الرخيصة [11] . كذلك لوحظ ان كثافة النمو في وسط SHHM2 و SHHM3 كانت اقل وهذا يعود الى ان بكتريا حامض اللبنيك تحتاج الى العديد من عوامل النمو في الوسط الزرعي كالاحماض الامينية والنيوكليوتيدات والفيتامينات والسكريات والاملاح [1 ، 2] .



شكل (1) كثافة نمو خلايا بكتريا *Lactobacillus casei* المنماة على الاوساط الزرعية على طول موجي 540nm وبدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة .



شكل (2) كثافة نمو خلايا بكتريا *Lactobacillus acidophillus* المنماة على الاوساط الزرعية على طول موجي 540nm وبدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة .

فحص التضاد : يلاحظ من الجدول (1) ان معدل اقطار منطقة التثبيط لرواشح بكتريا *Lactobacillus casei* المنماة على وسط SHHM1 كانت اعلى مقارنة بالوسط MRS ، اذ كانت (14 ، 13 ، 18) ملم لـ *Klebsiella sp.* و *Staphylococcus aureus* و *Candida sp.* على التوالي . فيما كانت معدل اقطار منطقة التثبيط عند تنميتها على وسط MRS (12 ، 10 ، 12) ملم لـ *Klebsiella sp.* و *Staphylococcus aureus* و *Candida sp* على التوالي . ويبين الجدول (2) معدل اقطار منطقة التثبيط لرواشح بكتريا *Lactobacillus acidophillus* المنماة على وسط SHHM1 كانت اعلى مقارنة بالوسط MRS ، اذ كانت (14 ، 14، 20) ملم لـ *Klebsiella sp.* و *Staphylococcus aureus* و *Candida sp.* على التوالي . فيما كانت معدل اقطار منطقة التثبيط عند تنميتها على وسط MRS (13 ، 13 ، 16) ملم لـ *Klebsiella sp.* و *Staphylococcus aureus* و *Candida sp* على التوالي . ان وجود مدى واسع من الاحماض الامينية والمصادر النيتروجينية في وسط نمو بكتريا حامض اللبنيك يؤدي الى الزيادة في النواتج الايضية ونواتج التخمر لهذه البكتريا ، ويعتبر المتحلل البروتيني لقرون الماشية مصدرا جيدا لعدد من الحوامض الامينية الاساسية وبذلك يمكن ان يطلق عليه تعريف Prebiotic عناصر الغذاء غير القابلة للهضم والتي تزيد من نمو الاحياء المجهرية العلاجية وفعالياتها الايضية لذلك اختيرت لحث النمو او زيادة الفعالية للمعزز الحيوي Probiotic (12 – 13) .

جدول (1) الفعالية التضادية لبكتريا *Lactobacillus casei* تجاه ثلاثة انواع من الاحياء المجهرية

قطر منطقة التثبيط ملم			نوع الوسط الزرعي
Candida sp	*Staphylococcus aureus*	*Klebsiella sp*	
10	10	12	**MRS**
18	13	14	**SHHM1**

جدول (2) الفعالية التضادية لبكتريا *Lactobacillus acidophillus* تجاه ثلاثة انواع من الاحياء المجهرية

قطر منطقة التثبيط ملم			نوع الوسط الزرعي
Candida sp	*Staphylococcus aureus*	*Klebsiella sp*	
16	13	13	**MRS**
20	14	14	**SHHM1**

المصادر :

1. Holt, j.c.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.; Staley, J.T. and Williams, T.S. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th. Ed. Williams and Wilkins Company. Baltimore Maryland, U.S.A.
2. Teuber, M. (1995). The Genus Lactococuc.In: The Genera of Lactic Acid Bacteria. Edited by Wood, B.J. and Holzapfel, W.H.
3. Morishita, T.; Kegushi, Y.; Yajima, M.; Sakurai, T. and Yura, T. (1981). Multiple nutritional requirements of Lactobacilli: genetic lesion affecting amino acid biosynthetic pathways. J. Bact., 148:64 – 71. (cited from Neto and Yokoya, 1997).
4. Narendranath, N.V.; Hynes, S.H.; Thomas, K.C. and Ingledew, W.M. (1997). Effect of Lactobacilli and yeast .Catalyzed ethanol fermentations. J. Appl. Environ. Microbiol., 63(11): 4158 – 4163 .
5. De la Broise, D., Dauer, G., Gildberg, A., Guerard, F.(1998) Evidence of positive effect of peptone hydrolysis rate on Escherichia coli culture kinetics. J Mar Biotechnol 6: 111-115.
6. Dufosse,L.,DeLaBroisse,D.,Guerard,F.(1997)Fiproteinhydrolysates as nitrogen sources for microbial growthandmetabolite production. Recent Res. Devel. In Microbiol 1: 365-381.
7. KurbanoUlu, EB.(2001) Production of single-cell protein from ram horn hydrolysate. Turk J Biol 25: 371-377.
8. Esabi, BK. And Omer, FA.(2002). Use of Ram Horn Hydrolysate as Peptone for Bacterial Growth. Turk J Biol 26 : 115-123.
9. Gupta, P.K. ; Mital, B.K. and Garg, S.K. (1996). Characterization of *Lactobacillus acidophillus* strain for use as dietary adjunct . Int. J. of Food Microbiology . 29 : 7 – 9 .
10. Harrigan, W. F. and McCance, M. E. (1976). Laboratory methods in microbiology. Academic Press. London. U.K.

11. Dalev, P.(1990) An enzyme-alkaline hydrolysis of feather keratin for obtaining a protein concentrate for fodder. Biotechnol Lett 12: 71-72.
12. Vanderola, C. G.; Bailo, N. and Reinheimer, J. A. (2000). Survival of Probiotic microflora in yoghurts during refrigerated storage. J. Food Research International, Vol.33: 97 – 102.
13. Casas, I.A. and Dobrogosz, W.J. (2000). Validation of the Probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. Microbial. Ecol. Health Dis. 12: 247 – 285.