نمو وحيوية اللاكتوباسياس أسيدوفياس والبفيدوبكتيريا في الحليب الأسيدوفيلي المضاف له ثاني أكسيد الكربون

جمال محمد علي خالد وحمزة محمد أبوطربوش ومصطفى عبده قاسم
جامعة الملك سعود، كلية علوم الأغذية والزراعة، قسم علوم الأغذية والتغذية
ص. ب ٢٤٦٠ الرياض ١١٤٥١
tarboush@ksu.edu.sa

الملخص: تم في هذه الدراسة تقييم لنمو وحيوية *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 و *L. acidophilus DSM* 20242 و *Bifidobacterium breve* DSM 20213 و *Bifid. longum* DSM 20219 و *Bifid. bifidum* DSM 20456 في الحليب الأسيدوفيلي المتخمر المضاف له ثاني أكسيد الكربون (CO_2)، خلال فترات التخزين المبرد (٤°م) لمدة صفر و٣ و٦ و٩ أيام. كما تم تصنيع حليب أسيدوفيلي مجفف من أفضل المعاملات التي أجريت في هذه الدراسة من حيث النمو والحيوية لأنواع البكتيريا التي تم دراستها.

تفاوت تأثير CO_2 على الأس الهيدروجيني (pH) بحسب البادئ الخليط المستخدم، ولكن كان التغير في قيمته طفيفاً سواء عند إضافة ١,١ مل/ مل أو ١,٥ مل/ مل حليب من CO_2 حيث لم ينخفض عن pH ٥ وكانت الحموضة المعايرة في المدى ٠,٣٣ - ٠,٣٩٪.

كانت سلالات *L. acidophilus* أكثر استقراراً من أنواع بفيدوبكتيريا خلال التخزين المبرد (٩ أيام على ٤°م. وقد نمت *L. acidophilus* DSM 20079 خلال فترة التخزين في المعاملات المضاف لها *Bifid. breve* DSM 20213 . كما كان لوغارثم عدد سلالتي *L. acidophilus* أقل في المعاملات المضاف لها *Bifid. longum* DSM 20219 مقارنة بالنوعين الآخرين من البفيدوبكتيريا.

كانت المتبقيات الحية من *Bifid. breve* DSM 20213 و *bifidum* DSM 20456 أفضل في المعاملات المضاف لها *L. acidophilus* DSM 20079 مقارنة بالمعاملات المضاف لها *L. acidophilus* DSM 20242 وسجلت *Bifid. longum* DSM 20219 أعلى المتبقيات مقارنة بالنوعين الآخرين من البفيدوبكتيريا، حيث ظل لوغارثم عددها أكثر من ٦ حتى نهاية فترة التخزين (٩ أيام على ٤°م) في المعاملة المضاف لها ١,١ مل/مل حليب من CO_2. وقد تناقص لوغارثم *Bifid. breve* DSM 20213 ابتداء من اليوم الثالث من التخزين عند إضافة CO_2.

كان التحلل البروتيني مرتفعاً في جميع المعاملات وكان الأعلى في المعاملات المضاف لها *Bifid. longum* DSM 20219. انخفضت المتبقيات الحية من *Bifid. longum* DSM 20219 و *L. acidophilus* DSM 20079 انخفاضاً معنوياً ($P \leq 0.05$) بعد التجفيد وكانت المتبقيات الحية منها ٨١,٢ و ٨١,٠٤٪ على الترتيب.

الكلمات المفتاحية: النمو، الحيوية، لاكتوباسلس، بفيدوبكتيريا، الحليب الأسيدوفيلي، ثاني أكسيد الكربون.

المقدمة

تستهلك منتجات الحليب المتخمرة لاحتوائها على المغذيات ولفوائدها الصحية المتعددة (Wood Brian, 1992)، ويخطط منذ العام ١٩٩٣م على مستوى عالمي لإدخال اللاكتوباسيلس والبفيدوبكتيريا إلى منتجات الحليب المتخمرة (Kneifel and Pacher, 1993)، حيث يستخدم خليط من بعض أنواع بكتيريا حمض اللبن Lactic Acid Bacteria خاصة أنواع من Lactobacilli و Bifidobacteria لعمل ما يطلق عليه المعاونات الحيوية Probiotics. للمعاونات الحيوية تأثيرات مفيدة على الإنسان عقب استهلاكها تشمل تحسين هضم اللاكتوز (Kim and Gilliland, 1983) والتحكم في مستويات الكولسترول في مصل الدم (Anderson and Gilliland, 1999; de Rodas et al., 1996; Gilliland et al., 1985) والتأثير المضاد للسرطان (Goldin and Grobach, 1984; Kato et al., 1994)، ومنع العدوى المعوية من خلال تحفيز الجهاز المناعي في الجسم (Perdigon et al., 1995).

يعتبر اختيار السلالات ذات التأثير الصحي المطلوب وحيويتها ونموها، وكذلك حيويتها خلال التخزين المبرد وعددها في المنتج المصنع، من العوامل التي يجب توافرها في هذه الأحياء الدقيقة (Gilliland et al., 2002). إن المفتاح الرئيس للاستخدام الفعال للمعاونات الحيوية، خاصة البفيدوبكتيريا هو وجود أكثر من ١٠^{٦} وحدة مكونة للمستعمرة/مل (وم م/مل) في المنتج المستهلك. يعتمد توفر هذا العدد من البكتيريا خلال الإنتاج وأثناء التخزين على المدعمات الغذائية التي تؤدي في النهاية إلى زيادة التكلفة الإنتاجية، كما أن التشريعات الغذائية تحظر إضافة مكونات غير حليبية إلى منتجات الحليب مما حدا بالباحثين إلى اقتراح حلول اقتصادية لتحقيق الأهداف السابقة، مثل استخدام تقنية الهندسة الوراثية أو خليط من البفيدوبكتيريا والأنواع البكتيرية الأخرى في المنتجات المتخمرة، مثل حليب الخض والقشدة المتخمرة والزبادي والجبن وعصائر الفواكه والحليب الأسيدوفيلي (Hughes and Hoover, 1991).

يسوق الحليب الأسيدوفيلي المحتوي على *L. acidophilus* و*Bifidobacterium longum* و *Bifid. breve* الذي ينتج بإضافة أعداد كبيرة من هذه الأحياء الدقيقة في صورة نشطة إلى الحليب قليل الدسم ويخزن على ٤°م لحين الاستهلاك، ويحتوي المنتج النهائي غير المتخمر في العادة على ١٠^{٥}(و م م/مل) من الحليب (Kosikowski and Mistery,1997) .

يجب تقليل تأثير الأكسجين والحموضة على البادئ لضمان حصول المستهلك على التركيز المطلوب من الخلايا الحية النشطة، لذا فإن إضافة ثاني أكسيد الكربون إلى الحليب الأسيدوفيلي المتخمر عند أس هيدروجيني لا يقل عن ٥ قد يؤدي إلى تحفيز نموها لأنه يؤدي إلى تقليل جهد الأكسدة والاختزال oxidation reduction potential، إضافة إلى كونها عملية آمنة واقتصادية وليس لها تأثيرات سلبية على منتجات الحليب المتخمرة بل تؤدي إلى تثبيط الخمائر والعفن في منتجات الزبادي المضاف لها النكهة (Tamime and Deeth,1980).

كان الهدف من هذه الدراسة تقييم تأثير إضافة ثاني أكسيد الكربون في المحافظة على نمو وحيوية بكتيريا *L. acidophilus* وBifidobacteria في الحليب الأسيدوفيلي المتخمر خلال فترة التخزين المبرد على ٤°م ومدى المحافظة على حيوية بكتيريا *L. acidophilus* وBifidobacteria في مسحوق الحليب المحضر من حليب أسيدوفيلي مضاف له Bifidobacteria وثاني أكسيد الكربون.

المواد وطرق العمل

البكتيريا المستخدمة

أستخدم في هذه الدراسة سلالتين من بكتيريا حمض اللبن، هما *L. acidophilus* DSM 20079 و *L. acidophilus* DSM 20242 وثلاثة أنواع من البفيدوبكتيريا، هي *Bifidobacterium breve* DSM 20213 و *Bifid. longum* DSM 20219 و *Bifid. bifidum* DSM 20456 . تم الحصول على هذه البكتيريا من (Deutshe Sammlung Von Milkroorganismer und Zellk ultturen GmbH, Germany).

تنشيط البكتيريا

نشطت البادئات البكتيرية قبل الاستخدام ثلاث مرات باستخدام بيئة MRS (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) لتنشيط بكتيريا *L. acidophilus*، وباستخدام ١٪ من اللقاح البكتيري في البيئة المعقمة والتحضين على ٣٧°م لمدة ١٨ ساعة. ونشطت أنواع البفيدوبكتيريا في بيئة (MRS-THIO) وهي عبارة عن MRS مدعمة بـ ٠,٢٪ Sodium thioglycolate (Gilliland et al., 2002) وحضنت على ٣٧°م لمدة ١٨ ساعة في برطمان لا هوائي BBL, Cookeysville, anaerobic system, BB38 (Oxoid, Hampshire, England) أستخدم فيها

أشرطة لتوفير الظروف اللاهوائية Qanaero Gen TM, atmosphere generation system (Oxoid .Lts., Wed Road, Basingstoke, Hampshire, England)

تقدير النمو الميكروبي

قدر النمو الميكروبي ورسم منحنى النمو الميكروبي القياسي لكل بكتيريا على حدة في بيئة التنشيط طبقاً لـ طريقة لين وآخرون (Lin et al., 1989).

تحضير الحليب الفرز

تم تجهيز الحليب البقري الخام في معمل البسترة بكلية علوم الأغذية والزراعة – قسم علوم الأغذية والتغذية - الرياض، حيث تم فرزه مباشرة باستخدام جهاز الفرز (Milchzentrifuge, LABSCO, Germany) ثم سخن حليب الفرز الخام عند ٩٥° م لمدة ساعة ثم برد إلى ٣٨°م ثم حفظ على هذه الدرجة لمدة ٤ ساعات، ثم سخن مره أخرى بحدود ٩٠-٩٥°م لمدة نصف ساعة وبرد إلى ٣٨°م طبقا لـ طريقة روبينسن (Robinsen, 1981) .

المعاملات

صنعت مجموعتان من الحليب الاسيدوفيلى (Robinsen, 1981)، الأولى باستخدام *L. acidophlius* DSM 20079 والثانية باستخدام *L. acidophlius* DSM 20242، وقسمت كل مجموعة في ١٠٨ قنينة سعة ١٠٠ مل معقمة وذات سداد محكم القفل، وأضيف لكل ٣٦ قنينة من كل مجموعة نفس النوع من البفيدوبكتيريا المختارة للدراسة بعد أن نشطت أنواع البفيدوبكتيريا في بيئة (MRS-THIO) وكانت نسبة الإضافة ١٪، ثم حضنت على ٣٧°م في برطمان لاهوائي والتي أستخدم فيها أشرطة لتوفير الظروف اللاهوائية وتعديل جو البرطمان. تم إيقاف التحضين عند الوصول إلى رقم الأس الهيدروجيني ٥,٢٠-٥,٢٥ الذي قدر باستخدام pH meter 240 (Corning) طبقا لـ (APHA, 1992) وكان وقت التخمير من ١٠إلى ١٢ ساعة، ثم تم تقسيم كل ٣٦ قنينة محتوية على نفس نوع البفيدوبكتيريا إلى ثلاثة أقسام يحوى كل قسم ١٢ قنينة، القسم الأول لم يضاف له ثاني أكسيد الكربون والثاني أضيف له ١,١ من CO_2 كعدد حجوم مضافة إلى حجم من الحليب والثالث أضيف له ١,٥ من CO_2 كعدد حجوم مضافة إلى حجم من الحليب طبقا لـ (Karagül-Yüceer et al., 1999). حيث أستخدم ثاني أكسيد الكربون درجة غذائية تم الحصول عليه من شركة عبد الله هاشم للمعدات والغازات الصناعية المحدودة – الرياض، وباستخدام فلوميتر (CO_2 مخصص لقياس تدفق CO_2 في الثانية الواحدة من منظم أسطوانة الغاز REG. Uniweld U.S.A)

وعبر أنبوب محكم الربط منتهي بمرشح (Membranfilter 0.45µm Scheicher and Schüll.Germany) لضمان تعقيم CO_2 الداخل إلى الحليب، واستخدمت ماصة معقمه إلى داخل الحليب. بحساب حجم CO_2 المتدفق خلال الثانية الواحدة حقنت الحجوم المطلوبة من CO_2 إلى الحليب الذي كان مبردا عند ٤°م لضمان ذوبان CO_2 في الحليب عند هذه الدرجة وذلك طبقا للجداول الملحقة بجهاز(Model D.T. Number 6001; Zahm and Nagel Co., A piercing device Buffalo, NY)، حيث لم يستخدم لإذابة CO_2 ضغط وأكتفي بالحقن إلى داخل الحليب المبرد عند ٤°م. أضيف ١١٠ مل من CO_2 إلى ١٠٠ مل من الحليب المبرد عند ٤°م للحصول على تركيز يقدر بـ ١,١ عدد حجوم من CO_2 مضاف إلى حجم من الحليب. خزنت جميع العينات على ٤°م للفترات الزمنية صفر و ٣ و ٦ و ٩ أيـام وأستخرج في كل فترة من كل قسم ثلاث قنينات وأجري عليها الفحوصات الكيمائية و الميكروبيولوجية.

الاختبارات الكيميائية

قدر رقم الأس الهيدروجيني وقدرت النسبة المئوية للحموضة المعايرة Titratable Acidity (TA) كحامض لبن طبقا لطريقة (AOAC,1995) وتم تقدير التحلل البروتيني Protein hydrolysis طبقا لطريقة شارش وآخرون (Church et al., 1983).

الاختبارات الميكروبيولوجية

قدر المحتوى الميكروبي للعينات باستخدام طريقة العد القياسي للأطباق (Dave and Shah, 1996)، أما بالنسبة لبكتـيريا *L. acidophilus* فقد استخدمت بيئة Rogosa agar المضاف لها حامض الخل الثلجي (The Oxoide Manual, 1998) وحضنت عند ٣٧° لمدة ٤٨ ساعة في حاويات بلاستيكية محتوية على غاز ثاني أكسيد الكربون (Gilliland et al., 2002). وقدر عدد البفيدوبكتيريا باستخدام بيئة MRS-NNLP agar التي هي عبارة عن (De Man Rogosa Sharpe, MRS agar Oxoide) المدعمة بـ Nalidixic acid (15 mg) و Lithium chloride (3gm) و Neomycine sulphate (100mg) و Paromomycin (200 mg) طبقا لطريقة Dave and Shah (1996)، وحضنت في برطمان لاهوائي على ٣٧°م ولمدة ٤٨ ساعة.

تصنيع الحليب الأسيدوفيلي المجفف

تم تصنيع الحليب الأسيدوفيلي المجفف من أفضل المعاملات السابقة التي كانت أعداد الخلايا الحية فيها أكثر من مليون خلية حية لكل مل طوال فترة التخزين المبرد (٩ أيام) وهى المعاملة التي أستخدم فيها *Bifid. longum* في الحليب الأسيدوفيلي المصنع بـ *L. acidophilus* DSM 20079 والمضاف له ثاني أكسيد الكربون (١,١ مل لكل مل من الحليب)، واستخدمت طريقة التجفيد باستخدام جهاز Virtis freezemobile 12SL (The virtis company, Gardiner, N.Y. 12525) وقدرت أعداد البكتيريا الحية من *L. acidophilus* والبفيدوبكتيريا.

التحليل الإحصائي

أستخدم في هذه الدراسة التجارب العاملية ٢×٣×٣ في تصميم القطاعات تامة التعشية حيث أن الزمن هو القطاعات. وتم تحليل البيانات من الاختبارات المختلفة بطريقة تحليل التباين الإحصائي (Analysis of Variance "ANOVA") باستخدام نظام ساس (SAS, 1997).

النتائج والمناقشة

أولاً: العدد الكلي لأنواع البفيدوبكتيريا عند نموها مع سلالتي اللاكتوباساس أسيوفياس

يوضح الجدول (١) عدم انخفاض الأس الهيدروجيني في المعاملات المختلفة (صفر و١,١ و١,٥ مل/ مل CO_2) حيث أن التركيزات المضافة من CO_2 في هذه الدراسة لم تكن عالية بالدرجة التي تؤثر على الأس الهيدروجيني وظلت قيمته حتى نهاية التجربة في المدى الذي تستطيع أن تنمو فيه البفيدوبكتيريا إذ أن الأس الهيدروجيني الأمثل لنموها ٦,٥-٧ وتتحمل الانخفاض في هذا الأس حتى ٥ ولكنها لا تستطيع النمو إذا انخفض الأس الهيدروجيني عن ٥ (Scardovi, 1986)، كما أن الحموضة المعايرة ظلت في المدى ٠,٣٣ -٠,٣٩٪ حتى انتهاء فترة التخزين (٩ أيام).

عند مقارنة المتبقيات الحية لبكتيريا *Bifidobacterium breve* DSM 20213 (B1) عند نموها مع كل من L3 و L10 لكل معاملة على حدا أتضح تناقص لوغارثم عددها بصورة معنوية إحصائياً ($p\leq0.05$) خلال فترات التخزين سواء عند إضافة أو عدم إضافة CO_2 ووصل لوغارثم عدد المتبقيات الحية منها بعد تسعة أيام من التخزين على ٤°م إلى أقل من لوغارثم العدد ٦ عند نموها

جدول(١) الأس الهيدروجيني والحموضة المعايرة في الحليب الأسيدوفيلي المصنع بـ *L. acidophilus* DSM 20079(L3) (السطر الأول) والمصنع بـ *L. acidophilus* DSM 20242 (L10) (السطر الثاني) والمضاف له أنواع مختلفة من البفيدوبكتيريا وتراكيز مختلفة من CO_2 (صفر و ١,١ و ١,٥ مل/ مل حليب) خلال التخزين المبرد (٩ أيام على ٤°م).

أ. إضافة *Bifid. breve*

المعاملة	الأس الهيدروجيني (pH)	الحموضة المعايرة ٪
L3B1/ 0	^{A*}5.26±0.019	^{A}0.37±0.006
L10B1/ 0	^{A}5.27±0.011	^{A}0.38±0.010
L3B1/1.1	^{A}5.29±0.018	^{A}0.37±0.063
L10B1/ 1.1	^{A}5.29±0.009	^{A}0.38±0.006
L3B1/1.5	^{A}5.28±0.015	^{A}0.38±0.007
L10B1/ 1.5	^{A}5.29±0.005	^{A}0.39±0.003

ب. إضافة *Bifid. longum*

المعاملة	الأس الهيدروجيني (pH)	الحموضة المعايرة ٪
L3B2/0	^{*A}5.28±0.006	^{B}0.33±0.002
L10B2/ 0	^{B}5.25±0.002	^{A}0.36±0.004
L3B2/1.1	^{A}5.26±0.003	^{B}0.35±0.004
L10B2/ 1.1	^{B}5.23±0.003	^{A}0.36±0.004
L3B2/1.5	^{A}5.25±0.005	^{B}0.34±0.004
L10B2/ 1.5	^{B}5.21±0.003	^{A}0.37±0.055

ج. إضافة *Bifid. bifidum*

المعاملة	الأس الهيدروجيني (pH)	الحموضة المعايرة ٪
L3B3/ 0	^{*A}5.20±0.005	^{A}0.37±0.008
L10B3/ 0	^{A}5.21±0.009	^{A}0.36±0.011
L3B3/1.1	^{A}5.19±0.003	^{A}0.38±0.008
L10B3/ 1.1	^{A}5.19±0.005	^{A}0.35±0.012
L3B3/1.5	^{A}5.20±0.003	^{A}0.38±0.007
L10B3/ 1.5	^{A}5.19±0.006	^{A}0.36±.011

* المتوسطات ± الانحراف المعياري (n = 12)، الحروف الإنجليزية الكبيرة المختلفة تدل على الفروق المعنوية عند اختلاف سلالة اللاكتوباسياس أسيدوفيلس لكل سطرين راسيا معا ($P \leq 0.05$).

* صفر و ١,١ و ١,٥ تعني عدم إضافة وإضافة ١,١ و ١,٥ مل من CO_2 / مل من الحليب.

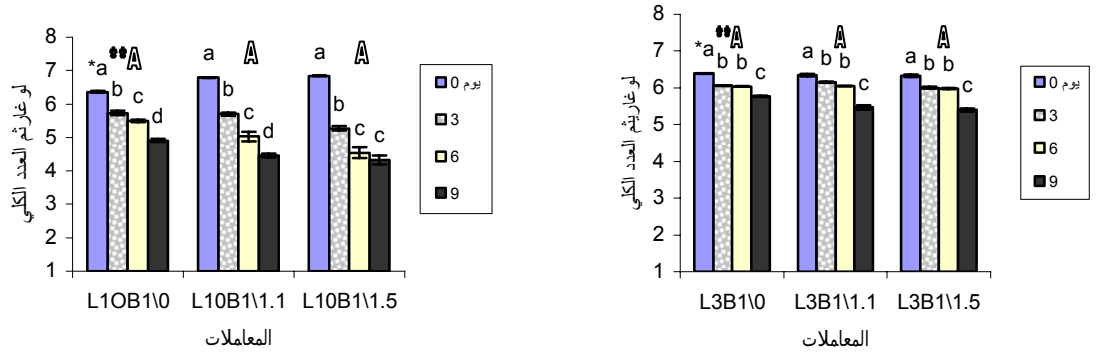
مع L3 في حين وصل إلى أقل من لوغارثم العدد ٥ عند نموها مع L10 (شكل ١). وبالرغم من أن B2 و B3 سلكت نفس المنحى إلا أن لوغارثم عدد B3 لم ينخفض عن لوغارثم العدد ٦ سواء عند نموها مع L3 أو L10 وبغض النظر عند إضافة أو عدم إضافة CO_2 (شكل ١). وبالرغم من تناقص لوغارثم أنواع البفيدوبكتيريا خلال فترات التخزين لكل معاملة على حدا إلا أنه لم تكن هنالك فروق معنوية إحصائية في لوغارثم الأعداد بين المعاملات الثلاثة (شكل ١).

ثانياً: العدد الكلي لسلالتي اللأكتوباساس أسيدوفيلاس عند نموها مع أنواع البفيدوبكتيريا

يوضح الشكل (٢) لوغارثم أعداد L3 و L10 عند نموهما مع أنواع البفيدوبكتيريا (B1 و B2 و B3) عند إضافة أو عدم إضافة CO_2 حيث يتضح أن لوغارثم عدد L3 قد انخفض في المعاملات المضافة لها CO_2 بتركيز ١,٥ مل/ مل عند نموها مع B1 و B2 في حين أزداد لوغارثم عددها في المعاملتين التي أضيف لها CO_2 عند نموها مع B3. لم يتأثر نمو L3 عموماً داخل كل فترة مع إضافة CO_2 في حين قل عددها في معاملة الضبط (بدون CO_2) عند نموها مع B3.

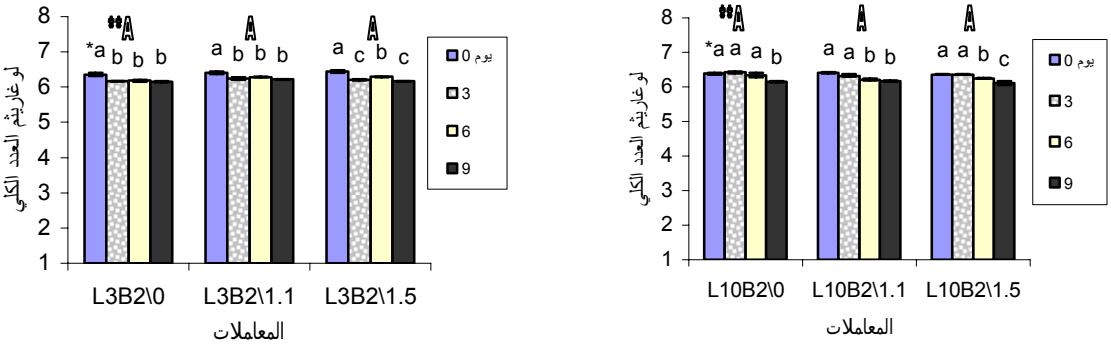
كما يتضح من الشكل (١) أن لوغارثم عدد L10 قد انخفض معنوياً في المعاملات المضاف لها CO_2 بتركيز ١,٥ مل/ مل عند نموها مع B1 و B2 في حين سلكت منحاً مغايراً عند نموها مع B3. أما المعاملة المضاف لها ١,١ مل/ مل CO_2 فقدت أدت إلى انخفاض معنوي في لوغارثم L10 عند نموها مع B2 بينما لم يتأثر لوغارثم عددها عند نموها مع B1 و B3. أما من حيث تأثير فترات التخزين لكل معاملة على حدى فقد كان هناك تفاوت مع انخفاض في العدد في اليوم التاسع عند نموها مع B1 و B2 في المعاملة المضاف لها ١,٥ CO_2 في حين ازداد العدد في اليوم التاسع عند نموها مع B3.

شكل (١) لوغارثم عدد البفيدوبكتيريا (وحدة مكونة للمستعمرة/مل) في الحليب المتخمر باستعمال سلالتين من اللاكتوباسياس أسيدوفياس المضاف له أنواع مختلفة من البفيدوبكتيريا وتراكيز مختلفة من ثاني أكسيد الكربون خلال فترات التخزين المبرد (٤° م) .



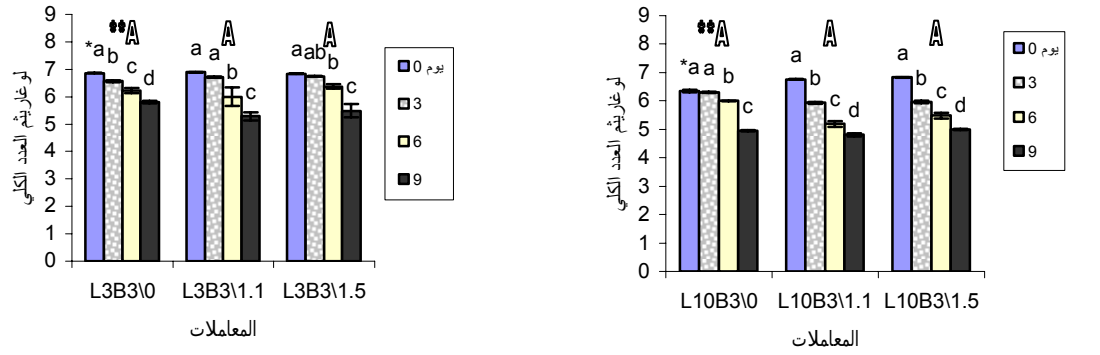
L. acidophilus DSM 20079(L3)+ *Bifid. breve* DSM 20213(B1)

L. acidophilus DSM 20242(L10)+ *Bifid. breve* DSM 20213(B1)



L. acidophilus DSM20079(L3)+*Bifid. longum* DSM20219(B2)

L. acidophilus DSM20242(L10)+*Bifid. longum* DSM20219 (B2)



L. acidophilus DSM20079(L3)+ *Bifid. bifidum* DSM20456(B3)

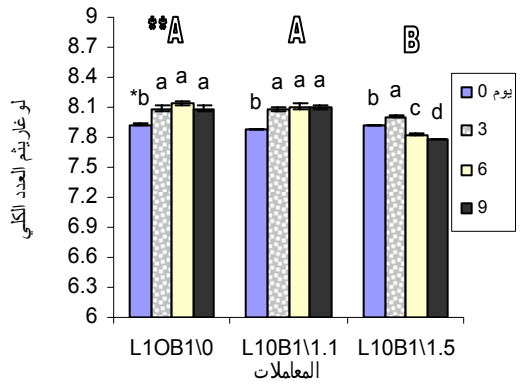
L. acidophilus DSM20242(L10)+ *Bifid. bifidum* DSM20456(B3)

صفر = عدم إضافة co2 و 1.1= 1.1 مل من co2 لكل مل من الحليب و 1.5= 1.5 مل من co2 لكل مل من الحليب .

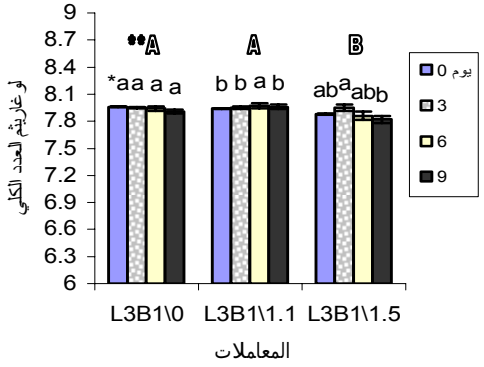
* المتوسط ± الانحراف المعياري (n=3) .المتوسطات ذات الأحرف الإنجليزية الصغيرة المختلفة بينها فروق معنوية ($P \leq 0.05$) للمعاملة الواحدة خلال فترات التخزين.

** المتوسط ± الانحراف المعياري (n=12) .المتوسطات ذات الأحرف الإنجليزية الكبيرة المختلفة بينها فروق معنوية ($P \leq 0.05$) للمعاملات عند التراكيز المختلفة من CO2.

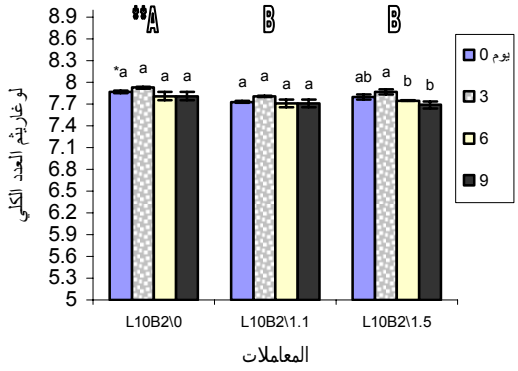
شكل (٢) لوغاريثم عدد اللاكتوباسلس أسيدوفيلس (وحدة مكونة للمستعمرة/مل) في الحليب المتخمر باستعمال سلالتين من اللاكتوباسلس أسيدوفيلس المضاف له أنواع مختلفة من البفيدوبكتيريا وتراكيز مختلفة من ثاني أكسيد الكربون خلال فترات التخزين المبرد (٤° م).



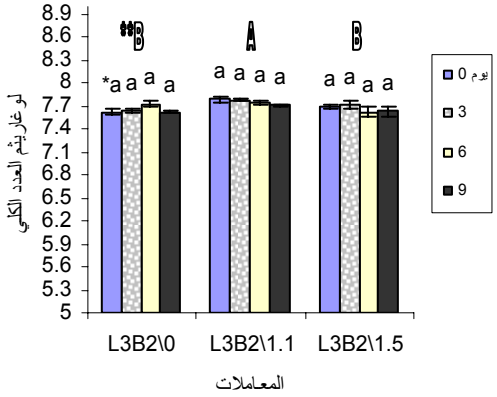
L. acidophilus DSM 20242(L10)+ ***Bifid. breve*** DSM 20213(B1)



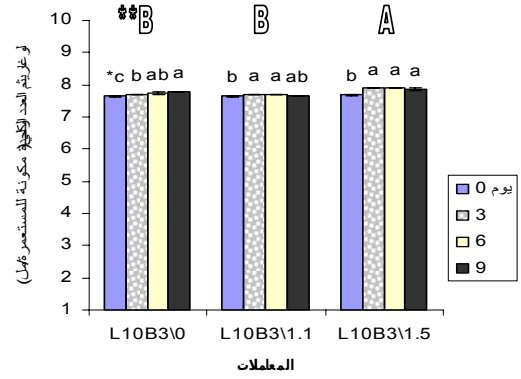
L. acidophilus DSM 20079(L3)+ ***Bifid. breve*** DSM 20213(B1)



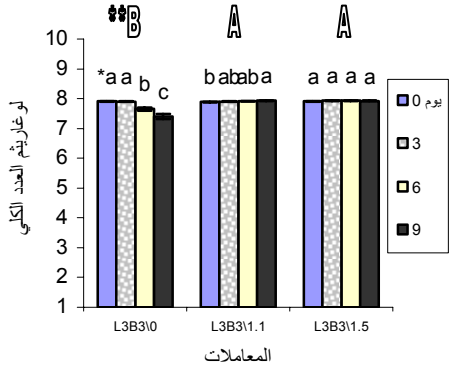
L. acidophilus DSM20242(L10)+***Bifid. longum*** DSM20219 (B2)



L. acidophilus DSM20079(L3)+***Bifid. longum*** DSM20219(B2)



L. acidophilus DSM20242(L10)+ *Bifid. bifidum* DSM20456(B3)



L. acidophilus DSM20079(L3)+ *Bifid. bifidum* DSM20456(B3)

صفر = عدم إضافة co2 و 1.1= 1.1 مل من co2 لكل مل من الحليب و 1.5= 1.5 مل من co2 لكل مل من الحليب .

* المتوسط ± الانحراف المعياري (n=3) .المتوسطات ذات الأحرف الإنجليزية الصغيرة المختلفة بينها فروق معنوية ($P \leq 0.05$) للمعاملة الواحدة خلال فترات التخزين.

** المتوسط ± الانحراف المعياري (n=12) .المتوسطات ذات الأحرف الإنجليزية الكبيرة المختلفة بينها فروق معنوية ($P \leq 0.05$) للمعاملات عند التراكيز المختلفة من CO2.

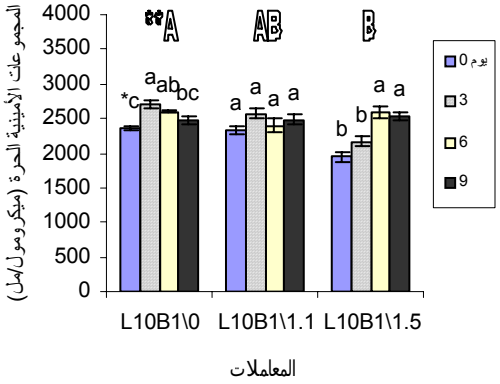
يعد ثاني أكسيد الكربون إما مثبط أو محفز للبكتيريا ويعتمد ذلك على تركيز ثاني أكسيد الكربون ودرجة الحرارة (Blickstad et al., 1981) ونوعية المنتج (Ogden, 1997) ونوعية الأحياء الدقيقة (Dainty, 1971; Davidson and Juneja, 1990). وقد وجد أن ثاني أكسيد الكربون يعمل على إطالة طور التأقلم وزمن الجيل للميكروبات المسببة للفساد، وذكرت العديد من الآليات المقترحة مثل نفاذية CO_2 بسهولة إلي داخل الخلايا الميكروبية مسببا انخفاض في الأس الهيدروجيني داخل الخلايا واختلال للأنزيمات الداخلية، إضافة لقدرة CO_2 على إزاحة الأكسجين في البيئة وخفض جهد الاختزال داخلها (Wolfe, 1980). تبدى بكتيريا حامض اللبن تحمل نسبى لثاني أكسيد الكربون (Ruas-Madiedo et al., 1998). أما بالنسبة لعدم نمو البفيدوبكتيريا في جميع المعاملات فقد يرجع السبب إلى درجة حرارة التخزين المبرد وظروف التخزين الهوائية، و ذلك برغم إضافة CO_2 الذي قد يزيح جزء من الأكسجين، إلا أن النمو المثالي لكل أنواع البفيدوبكتيريا لا يكون إلا في الظروف اللاهوائية، وتتفق هذه الدراسة مع الدراسة التي قام بها ميلي وآخرون (Meile et al., 1997) في اختلاف أنواع البفيدوبكتيريا لتحمل الظروف الهوائية حيث كانت *Bifid. longum* DSM 20129 أفضل الأنواع بالنسبة للمتبقيات الحية خلال فترة التخزين المبرد (٩ أيام). تعتبر سمية الأكسجين من أهم مسببات تناقص وموت المعاونات الحيوية في المنتجات الحليبية التي تضاف إليها، ولاشـك أن سلـوك البفيدوبكتيـريا أو اللاكتوباسياس أسيدوفياس يختلف عند اختلاف تركيز الأكسجين وأن بعضها يملك آلية للتغلب على سمية الأكسجين (Talwalkor and Kailasapathy, 2004a). وقد تختلف هذه الدراسة مع ما وجده فيندير ولا وآخرون (Vinderola et al., 2000) بان عدد المتبقيات الحية في الحليب المبستر المضاف له CO_2 أستمر أكثر من $١٠^{٦}$ (و م م/مل) لمدة ٤٩ يوم على ٤°م وفي هذه الدراسة لم يستمر العدد في كثير من المعاملات إلى أكثر من ٩ أيام، وقد يرجع السبب لاختلاف نوع المنتج المستخدم حيث أضيف في دراسة فيندير ولا وآخرون (Vinderola et al., 2000) مسحوق حليب فرز (٢٪) كما أضيفت *Bifid. bifidum* BBI بتركيز عالي للحصول على عدد ابتدائي في المنتج يصل إلى $١٠^{٧}$ خلية حية/مل، وتتفق الدراستان على تناقص العدد مع فترة التخزين المبرد. ورغم المحافظة على نمو وحيوية *L. acidophilus* خلال التخزين المبرد إلا أن عدم الزيادة المعنوية في نموها قد يرجع لعدم نموها المثالي في أقل من ١٥°م (Kandler and Weiss, 1984) ، أو بسبب إنتاج أنواع البفيدوبكتيريا لحامض الخل. من ناحية أخرى تتفق هذه الدراسة مع الدراسة التي قام بها جيليلاند وآخرون (Gilliland et al., 2002) في أن *L. acidophilus* أكثر

استقرارا من أنواع البفيدوبكتيريا وأن عدد المتبقيات الحية منها خلال التخزين المبرد يعتمد على النوع والسلالة المستخدمة. كما وجد ونق وآخرون (Wang et al., 2002) أن درجة حرارة التخزين المبرد تلعب دوراً مهماً في عدد المتبقيات الحية من المعاونات الحيوية حيث تقل المتبقيات الحية بزيادة درجة الحرارة. تختلف أنواع البفيدوبكتيريا في مقدرتها علي تخمير السكريات و تنمو في الحليب لقدرتها على أستخدم اللاكتوز كمصدر للطاقة (Roy, 2001)، ويلعب العدد الابتدائي للمعاونات الحيوية دور هام في عدد المتبقيات الحية منها أثناء التخزين المبرد. من الملاحظ عـدم نمو أنـواع البفيدوبكتيريا أثناء التخزين المبرد فهي لا تنمو في أقل من ٢٠°م (Scardove, 1986; Ballongue, 1993) فضلا عن ٤°م ومن الصعب التحدث عن نمو لأنواع البفيدوبكتيريا في ظروف التخزين المبرد إلا في أنواع معدلة وراثيا وهذه ستكون بحاجة لإثبات محافظتها على خصائصها المفيدة للمستهلك. أن توفير ظروف مثالية لنمو المعاونات الحيوية أثناء التحضين سيكون مناسب للحصول على أعداد أولية مرتفعة قبل التخزين المبرد، ومن ثم توفير ظروف مناسبة جزئيا أثناء التخزين المبرد مثل ما حدث في هذه الدراسة، حيث لعب الأس الهيدروجيني دور هام في المحافظة على المتبقيات الحية من *Bifid. longum* طوال فترة التخزين المبرد (٩ أيام) بأعداد تتجاوز $١٠^{٦}$ (و م م /مل).

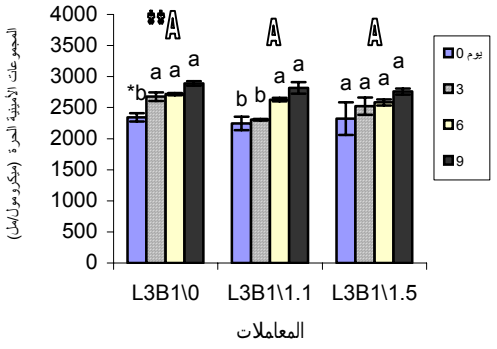
ثالثاً: التحلل البروتيني

يوضح الشكل (٣) التحلل البروتيني لسلالتي *L.acidophilus* (L3 و L10) عند نموها مـع أنواع البفيدوبكتيريا (B1 و B2 و B3) عند إضافة أو عدم إضافة CO_2 حيث لم يكن هنالـك فـرق معنوي إحصائي في التحلل البروتيني لبكتيريا L3 عند إضافة CO_2 بتركيز ١,٥ أو ١,١مل/ مـل مقارنة بالمعاملة الضابطة وذلك عند نموها مع B1 و B3 في حين انخفض التحلل البروتيني لهـا بشكل معنوي عند إضافة CO_2 بتركيز ١,٥ مل/ مل عند نموها مع B2 بالمقارنة مع نموهـا عنـد إضافة ١,١ مل/ مل CO_2 ، في حين انخفض التحلل البروتيني لبكتيريا L10 في المعاملة المضاف لها ١,٥ مل/ مل CO_2 عند نموها مع B1 وB3 ولم تكن هنالك فروق معنوية إحصائية في التحلـل البروتيني لهذه البكتيريا مع جميع أنواع البفيدوبكتيريا عند إضـافة ١,١ مـل/ مـل CO_2 مقارنـة بالمعاملة الضابطة.

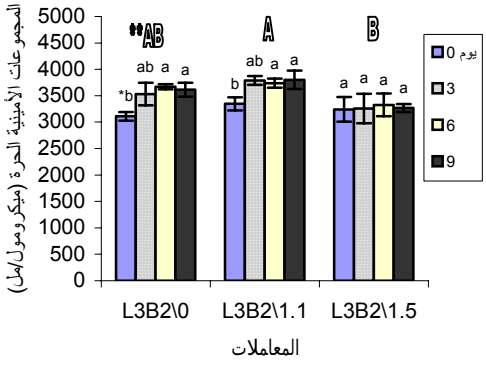
شكل (٣) التحلل البروتيني في الحليب المتخمر باستعمال سلالتين من اللاكتوباساس أسيدوفياس المضاف له أنواع مختلفة من البفيدوبكتيريا وتراكيز مختلفة من ثاني أكسيد الكربون خلال فترات التخزين المبرد (٤° م).



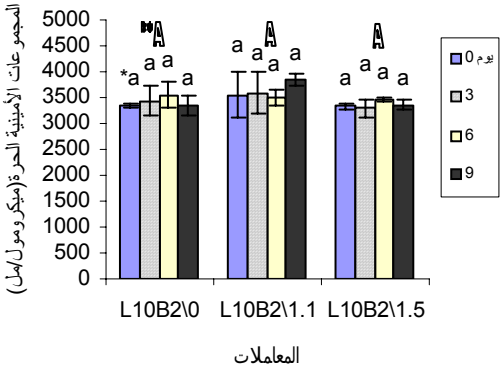
L. acidophilus DSM 20242(L10)+ ***Bifid. breve*** DSM 20213(B1)



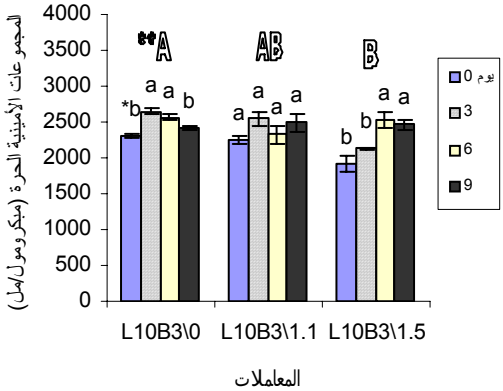
L. acidophilus DSM 20079(L3)+ ***Bifid. breve*** DSM 20213(B1)



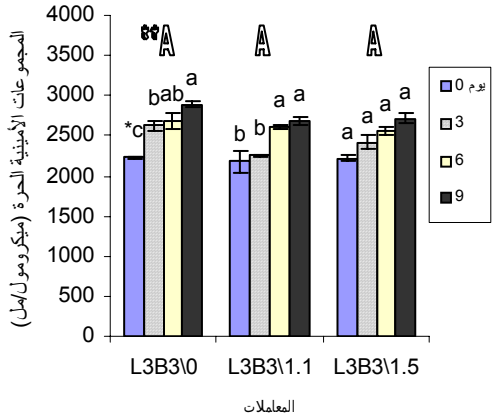
L. acidophilus DSM20242(L10)+***Bifid. longum*** DSM20219 (B2)



L. acidophilus DSM20079(L3)+***Bifid. longum*** DSM20219(B2)



L. acidophilus DSM20242(L10)+ *Bifid. bifidum* DSM20456(B3)



L. acidophilus DSM20079(L3)+ *Bifid. bifidum* DSM20456(B3)

صفر = عدم إضافة co2 و 1.1= 1.1 مل من co2 لكل مل من الحليب و 1.5= 1.5 مل من co2 لكل مل من الحليب.

* المتوسط ± الانحراف المعياري (n=3) .المتوسطات ذات الأحرف الإنجليزية الصغيرة المختلفة بينها فروق معنوية ($P\leq 0.05$) للمعاملة الواحدة خلال فترات التخزين.

** المتوسط ± الانحراف المعياري (n=12) .المتوسطات ذات الأحرف الإنجليزية الكبيرة المختلفة بينها فروق معنوية ($P\leq 0.05$) للمعاملات عند التراكيز المختلفة من CO2.

أما من حيث تأثير فترات التخزين على التحلل البروتيني فقد ازداد لبكتيريا L3 معنوياً في اليوم التاسع لكل معاملة على حدا مقارنة باليوم صفر في المعاملات المضاف لها ١,١ م ل/ م ل CO_2 وفي العينة الضابطة وعند نموها مع جميع أنواع بفيدوبكتيريا في حين لم يتأثر تحلل البروتين بين الفترات الزمنية لها عند تركيز ١,٥ مل/ مل CO_2. وبالمقابل ازداد التحلل البروتيني معنوياً لبكتيريا L10 عند نموها مع B1 و B3 خلال فترات التخزين المختلفة في المعاملة المضاف لها ١,٥ مل/ مل CO_2، في حين لم تؤثر إضافة ١,١ مل/ مل CO_2 في فترات التخزين على تحلل البروتين في بكتيريا L10. وكذلك لم يتأثر التحلل البروتيني لبكتيريا L10 عند نموها مع B2 لكافة المعاملات.

وبالرجوع إلى الشكل (٣) يتضح أيضاً أن التحلل البروتيني لسلالتي اللاكتوباسلس أسيدوفيلس (L3 و L10) كان أعلى عند نموها مع B2 وفي جميع المعاملات مقارنة بتحليلهما للبروتين عند نموهما مع B1 و B3.

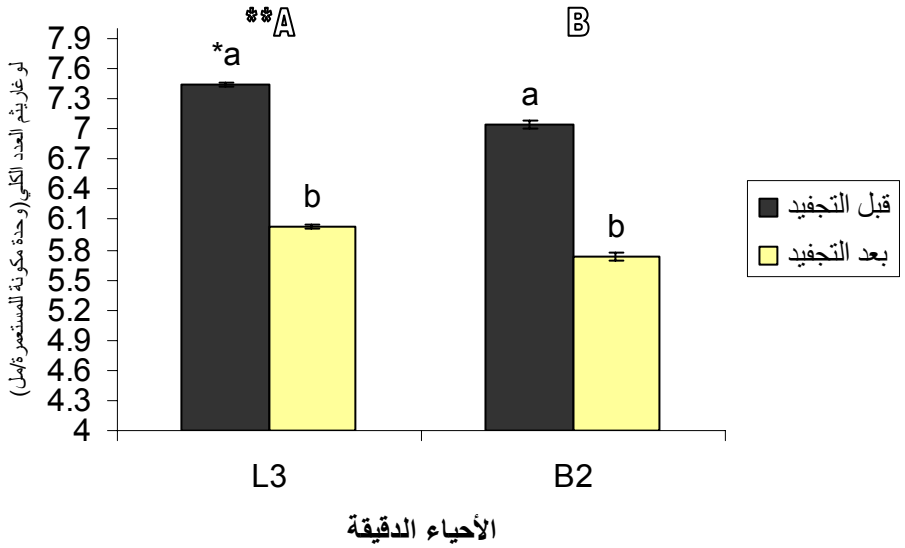
دلت النتائج المتعلقة بالتحلل البروتيني على ارتفاع هذا التحلل عموماً وقد يرجع السبب في ذلك إلى استخدام حليب فرز تم معاملته بالحرارة العالية وإلى النشاط التحليلي للبروتينات بواسطة اللاكتوباسلس. أما التحلل البروتيني المرتفع في المعاملات المضاف لها *Bifid. Longum* فقد يرجع إلى امتلاك *Bifid. longum* نشاط في التحلل البروتيني أعلى من أنواع البفيدوبكتيريا الأخرى في هذه الدراسة ولكن الدور الرئيسي في التحلل البروتيني يرجع لـ اللاكتوباسيلس أسيدوفيلس حيث أن أنواع البفيدوبكتيريا لا تمتلك نشاط إنزيمي كافي لإنتاج المجموعات الأمينية الحرة في الحليب (Tamime et al., 1995) وهذا قد يكون من الأسباب الهامة في عدم نموها في الحليب بشكل كافي إضافة لظروف أخرى. في حين تمتلك *L. acidophilus* نشاط إنزيمي كافي لتحليل البروتينات في الحليب. يمكن من خلال المنفعة التبادلية بين اللاكتوباسيلي والبفيدوبكتيريا أن تنمو البفيدوبكتيريا بشكل أفضل في الحليب مستفيدة من نواتج التحليل البروتيني بواسطة الأنزيمات المحللة للبروتين Proteinase والببتيدات Aminopeptidase (Cheng and Nagaswa, 1983).

رابعاً: تجفيد الحليب الأسيدوفيلي

تم اختيار المعاملة المضاف لها *Bifid. longum* و*L. acidophilus* DSM 20079 و١,١ مل ثاني أكسيد الكربون/م ل حليب لإنتاج مسحوق حليب مجفف بطريقة التجفيد لأن

المعاملات التي أضيف لها *Bifid. longum* كانت أعداد المتبقيات الحية فيها مـن البفيـدوبكتيريا أكثر من ١٠^{٦} (و م م /مل) طوال التخزين المبرد، مما يدل على أن حيويتها أفـضل مـن أنـواع البفيدوبكتيريا وهذا الاختيار يتفق مع ما وجده ليان وآخرون(Lian et al., 2002)، حيث وجـدوا أن *Bifid. longum* أكثر أنواع البفيدوبكتيريا من حيث المتبقيات الحية بعد عملية التجفيف بـالرذاذ. والسبب الأخر لاختيار المعاملة السابقة هو أن أعداد المتبقيات الحية من *Bifid. longum* كان أكثر من المعاملات الأخرى في اليوم التاسع من التخزين المبرد. دلت النتائج الموضحة في الشكل (٤) على انخفاض معنوي للمتبقيات الحيـة مـن *Bifid. longum* و *L. acidophilus* DSM 20079 بعد عملية التجفيد، واختلفت المتبقيات الحية مـن *L. acidophilus* DSM 20079 معنويـا عـن *Bifid. longum* بعد عملية التجفيد حيث كانت المتبقيات الحية لـ *L. acidophilus* أكثـر مـن *Bifid. longum* وهذا لا يدل على أن البفيدوبكتيريا أكثر حساسية للتجفيد مـن *L. acidophilus* حيث كانت نسبة المتبقيات الحية بـعد التجفيـد ٨١,٢ و ٨١,٠٤٪ لـ *Bifid. longum* و *L. acidophilus* على التوالي. وقد وجد ليان وآخرون (Lian et al., 2002) أن نسبة المتبقيات الحيـة من *Bifid. longum* B6 بلغت ٨٢,٦٪ في حليب الفرز بعد عملية التجفيف بالرذاذ (٥٠°م للهـواء الخارج) ويعود السبب لارتفاع النسبة رغم استخدام التجفيف بالرذاذ لاستخدام الباحثين مواد ناقلـة (صمغ عربي أو جيلاتين أو نشا ذائب) والتي تعمل على حماية الخلايا البكتيرية مـن الأضـرار الميكانيكية (الفيزيائية) التي تحدث أثناء التجفيف بالرذاذ.

شـكل(٤) المتبقيـات الحيـه (وحدة مكونـة للمستعمرة/مل) لـ *L. acidophilus* DSM 20079 و *Bifid. Longum* DSM 20219 بعد التجفيد للحليب الأسيدوفيلي المـصنع بـ *L. acidophilus* DSM 20079 والمضاف لـه *Bifid. Longum* DSM 20219 و ١,١ مل ثاني أكسيد الكربون/ مل.



الاستنتاجات

تفاوت تأثير ثاني أكسيد الكربون على الأس الهيدروجيني (pH) بحـسب البـادئ الخلـيط المستخدم إلا أن التغير كان طفيفاً عند إضافة ١,١ أو ١,٥ مل ثاني أكسيد الكربون/مل حليب.

كان هنالك تفاوت في نمو وحيوية الأنواع البكتيرية المستخدمة في الدراسة إلا أن المتبقيات الحية من *Bifid. longum* DSM 20219 كان الأفضل مقارنة بالنوعين الآخرين من بفيدوبكتيريا.وقد كان للتجفيد تأثيراً معنوياً على البفيدوبكتيريا واللاكتوباسلس إلا أن المتبقيات الحيـة فـي الحليـب الأسيدوفيلي بلغت أكثر من ٨٠٪.

توصي الدراسة بإجراء بحوث أخرى لمعرفة تركيزات الأكـسجين التـي تنمـو عنـدها البفيدوبكتيريا والمعاونات الحيوية الأخرى مع دراسة إمكانية إضافة غازات خاملة مثل النيتروجين للمنتجات الحليبية المحتوية على المعاونات الحيوية لمعرفة تأثيره على حيوية المعاونات الحيوية.

شكر وتقدير

يتقدم الباحثون بالشكر والتقدير لمدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية لدعمها السخي لهذا المشروع البحثي تحت الرقم (أط – ١٢ – ٢٢) والشكر موصول لمركز بحوث كلية علوم الأغذية والزراعة وعمادة الدراسات العليا في جامعة الملك سعود لدعمها المادي الجزئي لهـذا المـشروع البحثي. والشكر موصول للأستاذ أمين أبو الخير لمساعدته في التحليل ورسم الأشكال.

المراجع

American Public Health Association (APHA). (1992). Standard Methods for the Examination of Dairy Products. American Public Health Association. 16 th ed. New York

Anderson, J. W. and Gilliland, S. E. (1999). Effects of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. J. Am. Clin. Nutr. 18:43-50.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1995).Official methods of analysis. 16thed., Arlington, Virginia, USA. Cha.33.p.7.

Ballongue, J. (1993). Bifidobacteria and probiotic action. pp 357-428 in Lactic Acid Bacteria.Salminen S. and VonWright A., eds. Marcel Dekker, New York, NY.

Blickstad, E; Enfors, S. O., and Molin, G. (1981). Effect of hyberbaric carbon dioxide pressure on the microbial flora of pork stored at 4 or 14° C. J. Appl. Bacteriol. 50:493-504.

Cheng, C. C. and Nagasawa, T. (1983). Associative relationships between bifidobacteria and lactobacilli in milk. Jap. J. Zootechnical Sci. 54:740-747.

Church, F. C.; Swaisgood, H. E.; Porter, D. H. and Catignani, G. L.(1983). Spectrophotometric assay using O-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. J. Dairy Sci. 66:1219-1229.

Dainty, R. H. (1971). The control and evaluation of spoilage. J. Food Technol. 6:209-224.

Dave, R. I. and Shah, N. P. (1996). Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and bifidobacteria. J. Dairy Sci. 79:1529-2864.

Davidson, P. M. and Juneja, V. K. (1990). Antimicrobial Agents. pp 83-137 in "Food Additives".(Eds A.L. Branen, P.M. Davidson and S. Salminen) Marcel Dekker, New York, NY.

de Rodas, B. Z.; Gilliland, S. E. and Maxwell, C. V. (1996). Hypocholesterolemic action of *Lactobacillus acidophilus* ATTC 43121 and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by diet . J. Dairy Sci. 79:2121-2128.

Gilliland, S. E.; Nelson, C. R. and Maxwell, C. V. (1985). Assimilation off cholesterol by *Lactobacillus acidohpilus.* Appl. Environ. Microbiol. 49:377-381.

Gilliland, S. E.; Reilly, S. S.; Kim, G. B. and Kim, H. S. (2002). Viability during storage of selected probiotic *Lactobacilli* and bifidobacteria in a yogurt-like product. J. Food Sci. 67:3091-3095.

Goldin, B. R. and Gorbach, S. L. (1984).Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics and *Lactobacillus*, decreased production of free amines from aromatic nitro compound, azo dyes, and glucuronides. J. Nat. Cancer Inst. 73:689-695.

Hughes, D. B. and Hoover, D. G. (1991). Bifidobacteria: Their potential for use in American dairy products. Food Technol. 45:74-83 .

Kandler, O. and Weiss, N. (1984). The genus *Lactobacillus*. pp.1219-1234. in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2, (Eds P. H. A. Sneath, N. S. Mair. M. E. Sharpe and J. G. Holt). Baltimore. MD: Williams & Wilkins.

Karagül-Yüceer, Y.; Conggins, P. C.; Wilson, J. C. and White, C. H. (1999). Carbonated yogurt-sensory properties and consumer acceptance. J. Dairy Sci. 82:1394-1398.

Kato, I.; Endo, E. and Yokokura, T. (1994). Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on anti-tumor responses induced by tumor resection in mice. Int. J. Immunopharmacol. 16:29-36

Kim, H. S. and Gilliland, S. E. (1983). *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. J. Dairy Sci. 66:959-699.

Kneifel, W. and Pacher, B. (1993). An X-glu based agar medium for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yougurt-related milk products. Int. Dairy J. 3: 277-291.

Kosikowski, F. V. and Mistery, V. V. (1997). Fermented milk pp.59-64 in:" Cheese and fermented milk foods"Vol.1.3rd.F.V. Kosikowski,L.L.C. 1 Peters lane. Westport, Connecticut 06880.

Lian, W.; Hsiao, H. and Chou, C. (2002). Survival of bifidobacteria after spray-drying. Int. J. Food Microbiol. 74:79-86.

Lin, S.; Savaianu, D. and Harlander, S. K. (1989). A method for determining α-galactosidase activity of yogurt cultures in skim milk. J. Dairy Sci. 72:351-366.

Meile, L.; Ludwig, W. l.; Rueger, U.; Gut, C.; Kaufmann, P.; Dasen, G.; Kaufmann, S.; Wenge, S. and Teuber, M. (1997). *Bifidobacterium lactis* sp. Nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. Syst. Appl. Microbiol. 20: 57-64 .

Ogden, L. V. (1997). Process to produce carbonated semi-solid or solid food and the thereof .Brigham Young Univ. Provo, UT, assignee.US Pat. No. 5:624-700.

Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Aguero, G. and Gobbato, N. (1995). Immune system stimulation by probiotics. J. Dairy Sci.78:1597-1606.

Robinsen, R. K. (1981). Microboilogy of fermented milks. Pp 242-278 in "Dairy Microbiology" Vol.2. Elsevier Appl. Sci. pulb.Ltd. London and N.Y.

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

Ruas-Madiedo, P.; Alonso, L.; Gonzalez de, D. G. and de los Reyes-Gavilan, C. (1998). Growth and metabolic activity of a cheese starter in CO_2-acidified and non-acidified refrigerated milk. Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung. 206: 179-183.

SAS.(1997). SAS User's Guide: Statistics Version (6.12)edition. SAS Inst. Inc., Cary, NC.

Scardovi, V. (1986). The genus Bifidobacterium pp.1418-1434 in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2, (Eds P. H. A. Sneath, N. S. Mair. M. E. Sharpe and J. G. Holt). Baltimore. MD: Williams & Wilkins .

Talwalkar, A. and kailasapathy, K. (2004). Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strain of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex form commercial yoghurts. Int. Dairy J. 14:143-149.

Tamime, A. Y.; Marshal, V. M. E. and Robinson, R. K. (1995). Microbiolgical and technological aspects for milks fermented by bifidobacteria. J. Dairy Res. 62: 151-187.

Tamime, A. Y. and Deeth, H. C. (1980). Yogurt: technology and biochemistry. J. Food Prot. 43:939-977.

The Oxoid munnal, 8^{Th} edition .(1998). compiled by Bridson E.Y. Former Technical Director of Oxoid.

Vinderola, C. G.; Gueimonde, M.; Delgado, T. and Reinheimer, J. A. (2000). Characteristic of carbonated fermented milk and survival of probiotic bacteria. Int. Dairy J. 10: 213-220.

Wang, Y.; Roch-chuii, Y. and Chou, C. (2002). Growth and Survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drink. Food Microbiol. 19:501-508.

Wolfe, S. K. (1980). Use of CO- and CO2-inriched atmospheres for meats, fish, and produce. Food Technol. 29(3):55-58

Wood Brian, J. B. (1992). The Lactic acid bacteria in health and disease. pp 151-339. London, England: Elsevier Applied Science.

Growth and Viability of *Lactobacillus acidophilus* and Bifidobacteria in Carbonated Acidophilus Milk

Khlid, G. M.; Abu-Tarboush, H. M. and Gassem, M. A.

King Saud University – College of Food and Agric. Sci. – Dept. Food Sci. Nutrition,PO Box 2460, Riyadh 11451 Saudia Arabia

tarboush@ksu.edu.sa

ABSTRACT: Growth and viability of *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079, *L acidophilus* DSM 20242, *Bifidobacterium breve* DSM 20213, *Bifid. longum* DSM 20219 and *Bifid. bifidum* DSM 20456 were evaluated in this study in the carbonated fermented acidophilus milk during cold storage (4ºC) for zero, 3, 6 and 9 days. Dried acidophilus milk was also made from the best cultures used in this study in term of growth and viability.

The effect of CO_2 on pH varied according to the used mixed culture. However, change in pH was slight either with the addition of 1.1 or 1.5 ml CO_2/ml milk. pH never reached below 5 and titratable acidity was in the range 0.33 – 0.39 %.

Strains of *L. acidophilus* were more stable than bifidobacteria during the cold storage (9 days at 4ºC) and *L acidophilus* DSM 20079 grew during storage periods in the treatment which had *Bifid. breve* DSM 20213. Logarithm of the two strains of *L acidophilus* was lower in treatment which had *Bifid. longum* DSM 20219 compared to the other two species of bifidobacteria.

Survival of *Bifid. breve* DSM 20213 and *Bifid. bifidum* DSM 20456 was better with *L acidophilus* DSM 20079 compared to the other strain. The highest survival was for *Bifid. longum* DSM 20219 and its logarithm remained higher than 6 until the end of storage period (9 days at 4ºC) in 1.1 ml/ml CO_2 treatment. However, the logarithm of *Bifid. breve* DSM 20213 decreased from day 3 with the addition of CO_2.

Proteolytic hydrolysis was high for the all treatments, and it was higher in the treatment with *Bifid. longum* DSM 20219 compared to the treatments with the other bifidobacteria.

Survival of *Bifid. longum* DSM 20219 and *L acidophilus* DSM 20079 decreased significantly ($p \leq 0.05$) after freeze drying and were 81.2 and 81.04 % for these two bacteria, respectively.

Key Words: growth, viability, *Lactobacillus*, bifidobacteria, acidophilus milk, CO_2.