

## Uzgoj čiste kulture *Bifidobacterium bifidum* u različitim hranjivim podlogama\*

Prof. dr. Ljerka KRŠEV, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; Mira MALLJA, dipl. inž., »Dukat« Zagreb

Izvorni znanstveni rad — Original Scientific Paper UDK: 637.146:576.8(042) = 861 + 862  
Prispjelo: 5. 7. 1990.

### Sažetak

*Interes potrošača za mliječno-kisele proizvode koji sadrže bifidobakterije je tumačimo prvenstveno njihovim povoljnim djelovanjem na zdravlje. Za proizvodnju fermentiranog mliječnog napitka, koji sadrži *Bifidobacterium bifidum* potrebno je kulturu uzgajati u povoljnoj hranljivoj podlozi kako bi se pripravila proizvodna kultura poželjnih tehnoloških svojstava. U ovom radu istražen je rast *B. bifidum* u različitim hranjivim podlogama, te je odabrana najpovoljnija podloga za uzgoj čiste kulture bakterija. Za uzgoj čiste kulture *B. bifidum* proučene su četiri tekuće hranjive podloge: tri polusintetske i jedna prirodna hranljiva podloga. Uspoređivanjem broja izraslih stanica/ml u svakoj od podloga tijekom prvog nacjepljivanja (lifilizirana kultura) i pet uzastopnih precjepljivanja uočeno je da je najveći broj stanica/ml bio u prirodnoj podlozi, koja je i ocijenjena kao najpovoljnija. Tijekom uzgoja u različitim podlogama praćene su i morfološke promjene *B. bifidum*, te su potvrđeni podaci iz literature (Rašić i Kurman, 1978) da je ova bakterija sklona morfološkim promjenama tijekom uzgoja.*

*Riječi natuknice: Čista kultura *Bifidobacterium bifidum*, hranjive podloge, broj kolonija*

Zbog korisnog djelovanja na ljudski organizam sve više se u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda koriste neke vrste odabranih intestinalnih bakterija. Posebno mjesto i važnost u ljudskoj prehrani pripada proizvodima u kojima se nalaze *Lactobacillus acidophilus* i bifidobakterije, kojima se pripisuje važna uloga u očuvanju zdravlja čovjeka. Obje bakterije zbog sposobnosti opstanka u crijevnom traktu, te zbog antibakterijske i antivirusne aktivnosti pomažu sprečavanju različitih crijevnih oboljenja (Kršev, 1989). Bifidobakterije su slabi proizvođači kiseline u mlijeku, te se stoga uglavnom koriste u mješovitim kulturama (Kurmann, 1988), ali su ove bakterije veoma osjetljive na prisutnost drugih bakterija iz sastava mješovite kulture. Stoga se uzgoj startne biomase mora provesti pod aseptičnim uvjetima (Tamime, 1981; Tamime i Robinson, 1985), u kojima bakterije rastu kao monokulture (Schuler-Malyath i sur., 1988).

Bifidobakterije mogu rasti u poluumjetnoj podlozi sa samo tri aminokiseline, ali uz dodatak brojnih vitamina, nukleotida, uz laktozu i neke minerale. Mnogi sojevi rastu u podlozi s amonijevim solima uz dodatak cistina (ili

\* Rad je referiran na 9. jugoslavenskom simpoziju »Suvremena proizvodnja i prerada mlijeka«, u Portorožu, 1990.

cisteina), biotina, pantotenata, ugljikohidrata i minerala. Sojevi bakterije *B. bifidum* za svoj rast trebaju peptide, a najvažniji su saharidi koji sadrže N-glukozamin. Neki sojevi koriste amonijak kao izvor dušika, dok drugi trebaju organski dušik (Schuler-Malyath i sur., 1988). Sve bitne tvari za rast bifidobakterija sadrži mlijeko, no ipak uzrok slabog razvoja u mlijeku, najčešće je što neke od hranljivih tvari nisu u najpovoljnijem obliku za upotrebu, a ponekad je potrebna i duža adaptacija sojeva za rast u mlijeku, pa i dodatak promotora rasta (Hrabor, 1975). Collins i Hall (1984) su nakon obimnih istraživanja uočili da zbog boljeg rasta bifidobakterija u mlijeku treba dodati različite promotore rasta kao: MRS podlogu za uzgoj *Lactobacillus vrsta*, cistein, askorbinsku kiselinu, pirogroždanu kiselinu.

U ovom radu proučen je uzgoj čiste koncentrirane liofilizirane kulture *B. bifidum* u različitim hranljivim podlogama zbog pripreme najpogodnije radne kulture potrebne za proizvodnju fermentiranog napitka.

## Materijal i metode

### Čiste kulture

Za istraživanje korištena je čista kultura *Bifidobacterium bifidum*, proizvođača Lab. CHR., Hansen's. iz Danske. Koncentrirani liofilizirani proizvod sadrži  $1,0 \times 10^{10}$  bakterija/g.

### Tekuće hranjive podloge

Za uzgoj *B. bifidum* korištene su podloge:

- MRS-bujon (De Man, Rogosa i Sharpe, 1960), (Sharpe, 1960)
- Modificirani Rogosa-bujon (Collins i Hall, 1984)
- Bifidobacterium-bujon (Collins i Hall, 1984)
- Modificirano rekonstituirano obrano mlijeko (Collins i Hall, 1984).

### Čvrste hranjive podloge

Za određivanje broja stanica bakterije *B. bifidum* korištena je MRS-podloga pH 6,5.

### Uzgoj čiste kulture *B. bifidum* u odabranim hranljivim podlogama

100 ml tekuće hranjive podloge ( $t = 37^{\circ}\text{C}$ ) nacijepi se sa 5 g čiste kulture. Nakon 18 sati inkubacije ( $t = 37^{\circ}\text{C}$ ) kultura se precijepi (5% v/v) u 100 ml svježe tekuće podloge. U svakoj podlozi precijepljivo se tri puta uzastopno. Tijekom uzastopnog precijepivanja praćen je broj živih bakterija u pravilnim razmacima — svakih 6 sati.

## Metode analiza

### Određivanje broja kolonija u čvrstoj podlozi

Određivanje broja kolonija provedeno je metodom razređivanja, a podloga je inkubirana 72 sata pri  $37^{\circ}\text{C}$  (Sharpe, 1960).

### Izračunavanje brzine rasta bakterijske kulture

Korišten je izraz (Marić, 1988):

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{t}$$

gdje je:  $\mu$  — specifična brzina rasta ( $\text{h}^{-1}$ )  
 $N$  — broj stanica u vremenu  $t$   
 $N_0$  — početni broj stanica  
 $t$  — vrijeme (h)

### Rezultati rada

Rezultati praćenja uzgoja čiste kulture *B. bifidum* u odabranim hranljivim podlogama prikazani su u dijagramima 1 do 4. Prikazane vrijednosti rezultat su tri ponovljena ispitivanja ( $n = 3$ ). U Tablici 1 nalaze se vrijednosti specifične brzine rasta bakterijske kulture *B. bifidum* tijekom uzgoja.

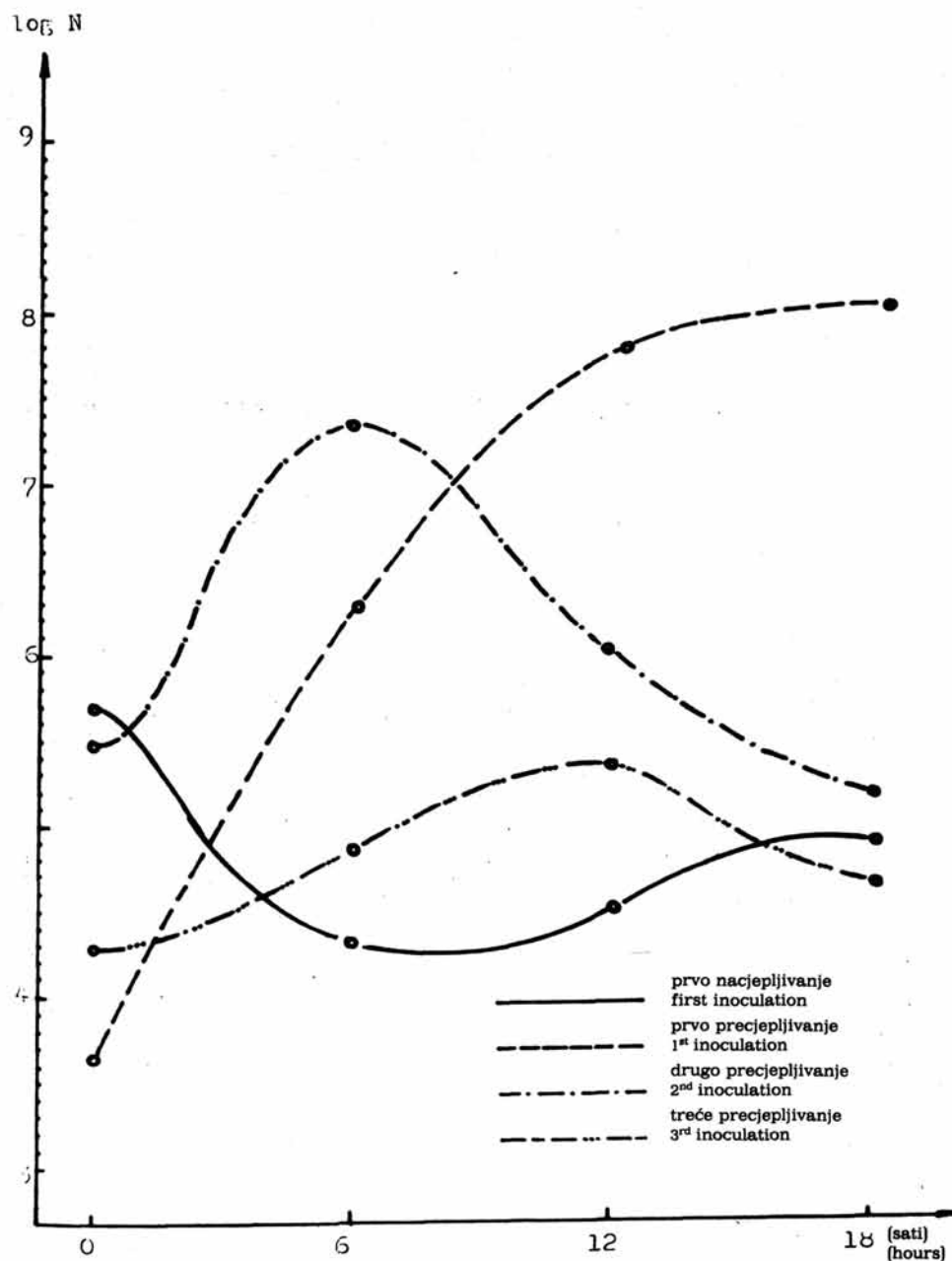
### Diskusija

Za uzgoj kultura mogu se koristiti sintetske, polusintetske ili prirodne hranjive podloge. Za uzgoj čiste kulture *B. bifidum* proučene su četiri tekuće hranjive podloge, i to tri polusintetske: MRS-bujon, modificirani Rogosa-bujon i Bifidobacterium-bujon, te prirodna hranljiva podloga: modificirano rekonstituirano obrano mlijeko.

Uspoređujući broj izraslih bakterijskih stanica — kolonija/ml u svakoj od istraživanih podloga tijekom prvog nacjepljivanja i tri uzastopna precjepljivanja (dijagrami 1, 2, 3 i 4) uočava se da je najveći broj kolonija — stanica izrastao u modificiranom rekonstituiranom obranom mlijeku. Rezultati pokazuju da je modificirano rekonstituirano obrano mlijeko najpovoljnija podloga za uzgoj *B. bifidum*, a od polusintetskih najpovoljnije rezultate rasta pokazala je Bifidobacterium podloga.

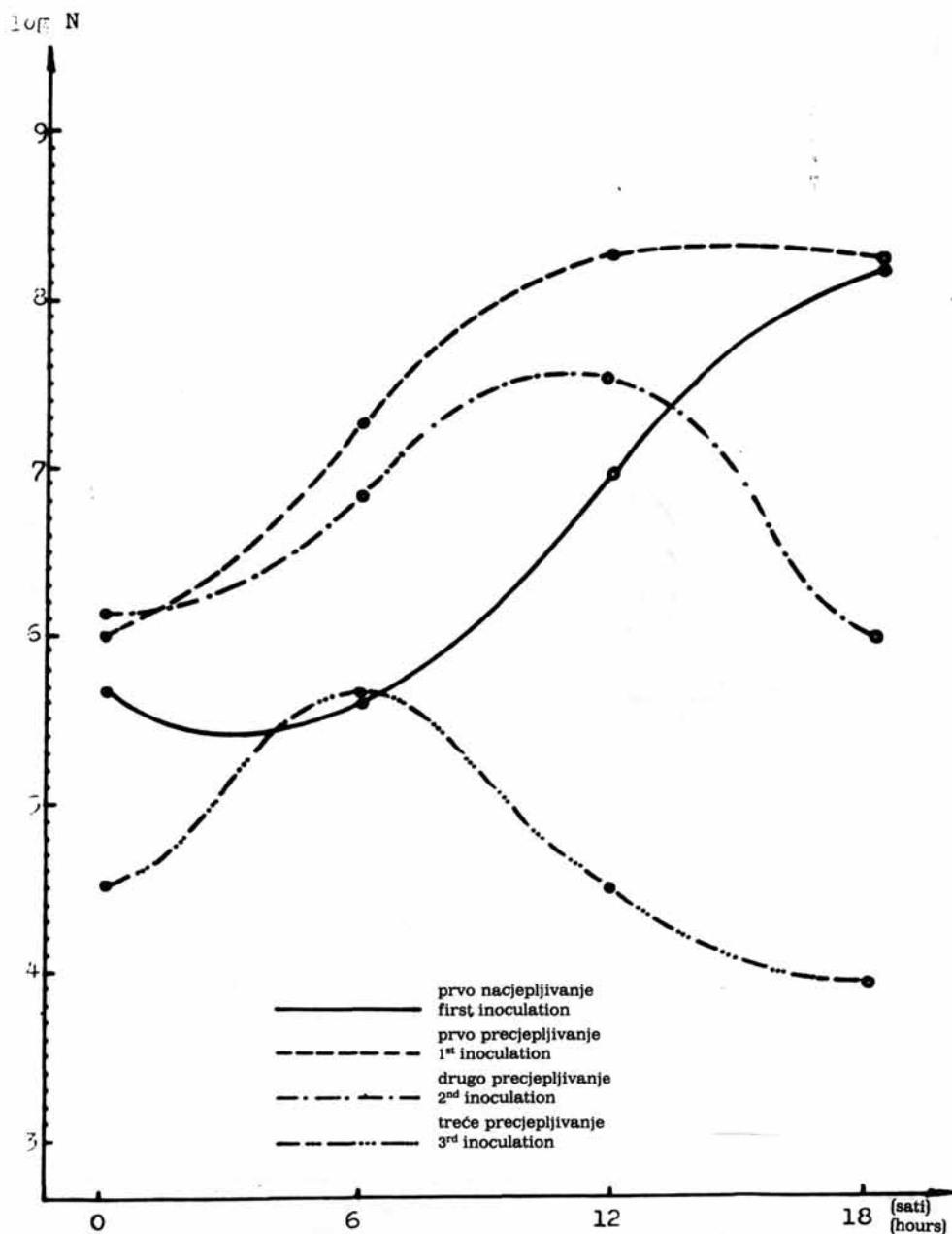
Nakon nacjepljivanja najbolji rast bakterije uočen je u modificiranoj Rogosa podlozi ( $10^7$  do  $10^8$  stanica/ml) i u modificiranom rekonstituiranom obranom mlijeku ( $10^7$  do  $10^8$  stanica/ml) (dijagram 2 i 4, broj kolonija u eksponencijalnoj fazi rasta).

Nakon prvog precjepljivanja, u svim podlogama zapažen je dobar rast kulture, ali već nakon drugog uzastopnog precjepljivanja, u MRS-podlozi uočen je nakon 6 sati inkubacije manji broj stanica i pad specifične brzine rasta (Tablica 1) dok je u modificiranoj Rogosa-podlozi i Bifidobacterium podlozi u eksponencijalnoj fazi rasta bilo  $10^7$  kolonija/ml, a u modificiranom obranom mlijeku  $10^8$  kolonija/ml (dijagram 4). Također, na modificiranoj Rogosa-podlozi, nakon drugog uzastopnog precjepljivanja uočen je pad specifične brzine rasta (od 0,28 do 0,22  $\text{h}^{-1}$ ) (Tablica 1, drugo precjepljivanje), dok je na Bifidobacterium podlozi nakon 6 sati inkubacije uočen porast brzine rasta (Tablica 1).



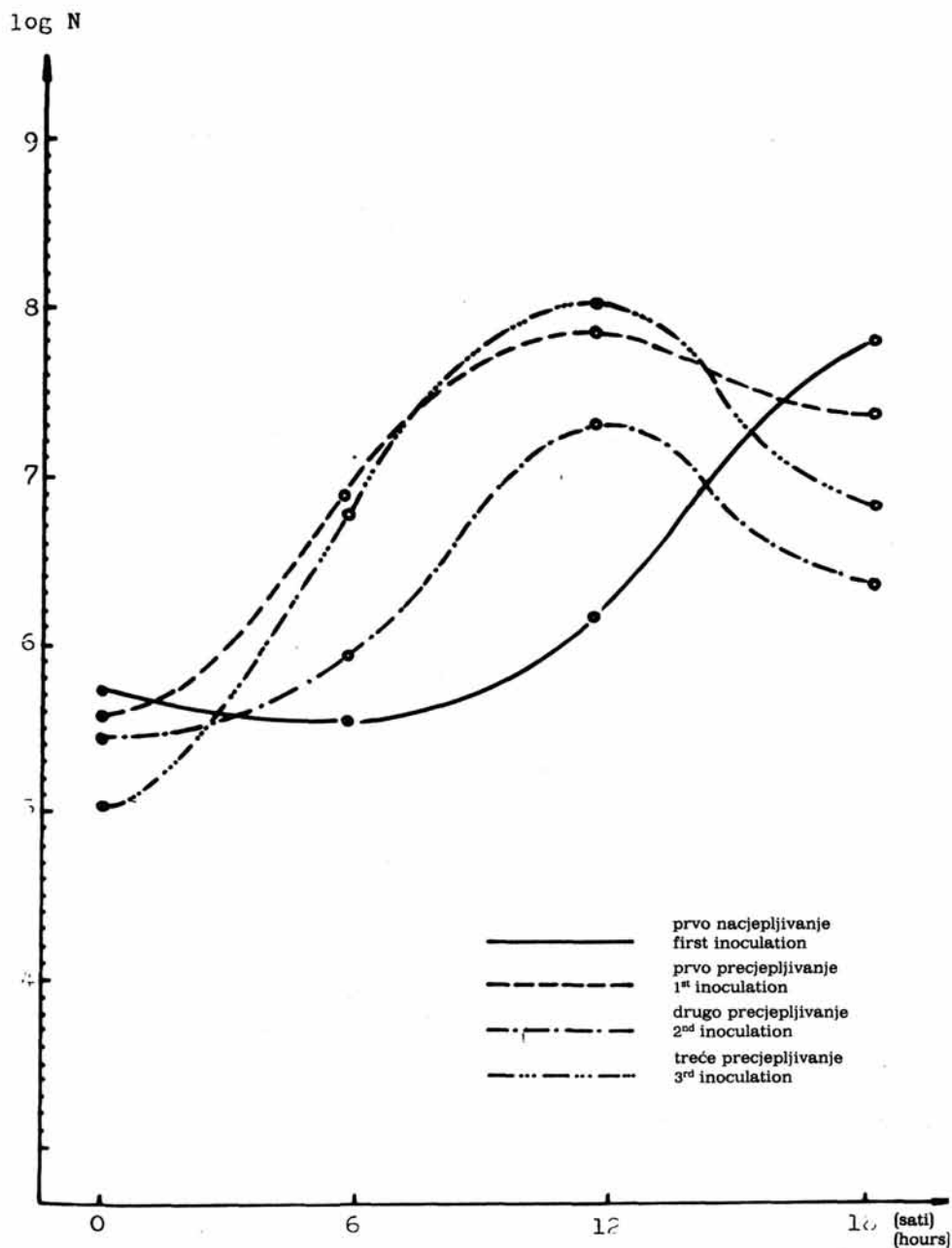
Dijagram 1. Rast i aktivnost kulture *B. bifidum* [broj stanica/ml] tijekom uzgoja u MRS — bujonu, kroz tri precjepljivanja, (n = 3).

Diagram 1. Growth and activity of *B. bifidum* culture (cell count/ml) during the cultivation in MRS broth through 3 inoculation



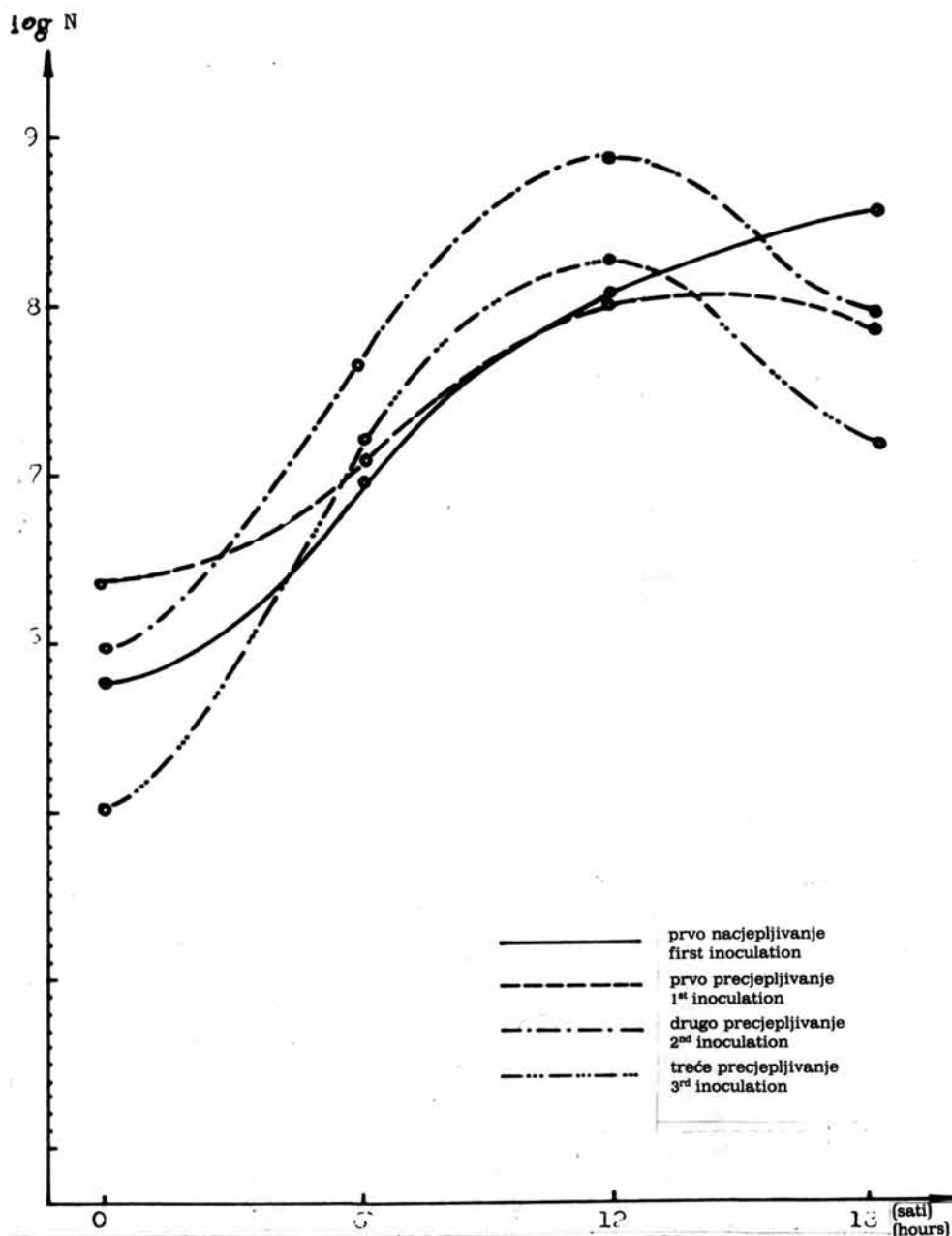
Dijagram 2. Rast i aktivnost kulture *B. bifidum* (broj stanica/ml) tijekom uzgoja u modificiranom Rogosa-bujonu, kroz tri precjepljivanja, (n = 3).

Diagram 2. Growth and activity of *B. bifidum* culture (cell counts/ml) during the cultivation in modified Rogosa-broth, through 3 inoculations



Dijagram 3. Rast i aktivnost kulture *B. bifidum* (broj stanica/ml) tijekom uzgoja u *Bifidobacterium*-bujonu, kroz tri precjepljivanja, (n=3)

Diagram 3. Growth and activity of *B. bifidum* culture (cell counts/ml) during the cultivation in *Bifidobacterium*-broth, through 3 inoculations



Dijagram 4. Rast i aktivnost kulture *B. bifidum* (broj kolonija/ml) tijekom uzgoja u modificiranom rekonstituiranom obranom mlijeku, kroz tri precjepljivanja, (n=3)

Diagram 4. Growth and activity of *B. bifidum* culture (colony counts/ml) during cultivation in modified reconstituted skim milk through 3 inoculations

**Tablica 1. Vrijednosti specifične brzine rasta ( $\mu$ ) tijekom uzgoja čiste kulture *B. bifidum* u odabranim hranjivim podlogama**

**Table 1. Values of specific growth rate ( $\mu$ ) during cultivation of pure culture *B. bifidum* on selected nutrient media**

Hranjiva podloga Culture medium	Specifična brzina rasta ( $\mu$ ) – Specific growth rate ( $\mu$ )											
	I nacjepljivanje			I precjepljivanje			II precjepljivanje			III precjepljivanje		
	Vrijeme (h) – Length of inoculation											
	6	12	18	6	12	18	6	12	18	6	12	18
MRS – bujon MRS – broth	–	0,07	0,19	0,99	0,59	0,18	0,72	–	–	0,20	0,25	–
Modificirani Rogosa – bujon Modified Rogosa broth	–	0,56	0,45	0,47	0,37	–	0,28	0,22	–	0,46	–	–
Bifidobacterium bujon B. broth	–	0,27	0,58	0,54	0,33	–	0,17	0,55	–	0,71	0,38	–
Modificirano rekonstituirano obrano mlijek Modified, reconstituted skim milk	0,48	0,38	0,25	0,38	0,29	–	0,65	0,48	–	0,87	0,37	–

Veći pad broja stanica primijećen je u MRS-podlozi i nakon trećeg precjepljivanja, a isto tako opao je i broj stanica u modificiranoj Rogosa-podlozi (dijagrami 1 i 2).

Tijekom uzgoja *B. bifidum* u MRS-podlozi za trećeg precjepljivanja broj stanica je nakon 12 sati inkubacije bio  $10^4$  do  $10^5$  stanica/ml, a nakon 18 sati inkubacije pao je na  $10^4$ . Isti podaci uočeni su i u modificiranoj Rogosa-podlozi, gdje je broj stanica nakon 18 sati opao na  $10^3$  stanica/ml. U ovim podlogama zapažen je i pad specifične brzine rasta (Tablica 1).

Broj bakterijskih stanica u Bifidobacterium podlozi, nakon trećeg precjepljivanja, u eksponencijalnoj fazi rasta bio je  $10^7$  stanica/ml (dijagram 3), a u modificiranom obranom mljeku  $10^8$  stanica/ml (dijagram 4).

Upravo stoga što je broj kolonija/ml u ovim podlogama u sva tri uzastopna precjepljivanja bio gotovo jednak u eksponencijalnoj fazi rasta, povoljno je ove podloge odabrati za uzgoj kulture *B. bifidum* potrebne u proizvodnji fermentiranih proizvoda.

Tijekom uzgoja u podlogama praćene su i morfološke promjene *B. bifidum*, koji je prema Kurmannu i Rašiću (1988) veoma sklon tim promjenama. Izvorna kultura je po svom obliku bila slična *Streptococcus* vrstama (koncentrirana, liofilizirana), dok je uzastopnim precjepljivanjem kultura poprimila oblik štapića (Kurmann i Rašić, 1988), a na mjestima u mikroskopskom preparatu uočeni su i karakteristični oblici Y ili V (Kurmann i Rašić, 1988) u koje se štapići slažu.



### Zaključak

Na osnovi eksperimentalnih rezultata i diskusije moguće je zaključiti:

1. Za uzgoj bakterijske kulture *B. bifidum* najpovoljnije su podloge: Bifidobacterium podloga i modificirano rekonstituirano obrano mlijeko.

2. Za proizvodnju fermentiranog mlijeka povoljnije je koristiti modificirano rekonstituirano obrano mlijeko za uzgoj kulture *B. bifidum*.

### CULTIVATION OF PURE CULTURE OF BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM IN VARIOUS NUTRIENT MEDIA

#### Summary

*Consumer's interest in sour milk products containing bifido bacteria is primarily due to their favourable effect on health. In production of fermented milk beverages containing Bifidobacterium bifidum, bacterial culture should be grown in a convenient nutrient medium in order to obtain a culture of good technological properties. The present study is relative to growth of B. bifidum in various nutrient media. A comparison of cell counts or colony-forming units (cfu)/ml in each of the media during the first inoculation (lyophilized culture) and five subsequent re-inoculations showed the highest cell counts/ml in natural medium, evaluated as the most favourable one. During the cultivation in various media, morphological changes of B. bifidum were closely observed; experimental results confirmed the data (Rašić and Kurman, 1978) on the proneness of this Bacterium to morphological changes in the course of cultivation.*

*Additional index words: Pure cultures Bifidobacterium bifidum nutrient media, Colony-forming units*

#### Literatura

- COLLINS, E. B., HALL, B. J. (1984): *J. Dairy Sci.*, **67** 1376—1380.
- HRABOR, H. (1975): *Prümysl potravin* **26**, 479—481.
- KRŠEV, Lj. (1989): Mikrobne kulture u proizvodnji mliječnih proizvoda, Udruženje mljekarskih radnika SR Hrvatske, Zagreb.
- KURMANN, J. A. (1988): IDF, B-Doc., 139.
- KURMANN, J. A., RAŠIĆ, J. Lj. (1988) u: IDF B-Doc. 139.
- MARIĆ, V. (1988): Biokemijsko inženjerstvo, PBF, Zagreb, skripta.
- RAŠIĆ, J. Lj., KURMANN, J. A. (1978): Bifidobacteria and their role, Basel, Birkhauser Verlag.
- ROBINSON, R. K. (1981): Dairy Microbiology, London, Elsevier App. Sci. Publ.
- SCHULER-MALYATH, R., RUPPERT, A., MÜLER, F. (1988): *Milchwissenschaft* **23**, 554-558.
- SHARPE, M. E. (1960): *Practice* **9** (4) 223—227.
- TAMIME, A. Y. i ROBINSON, R. K. (1985): Yogurt — Science and Technology, Pergamon Press, Oxford.
- TAMIME, A. Y. u: Dairy Microb. Vol 2. pp. 113—156. (ed. R. K. Robinson, London 1981).