تعريف عزلات محلية من بكتيريا حمض اللبن منتجة للسكريات المتعددة الخارجية

مهند حاج مصطفى[1] ولينة الأمير[2]
وبسام العقلة [1] وسمر عيسى[1]

الملخَّص

حُصل على 30 عزلة من بكتيريا حمض اللبن من مصادر غذائية محلية مختلفة، وصفت العزلات البكتيرية بوساطة الفحص المجهري وصبغة غرام واختبار الكاتلاز ونظام التعريف API، ثم غُربلت للوصول إلى أفضل عزلة منتجة للسكريات المتعددة الخارجية (EPS). أظهرت نتائج تشخيص بكتيريا حمض اللبن أن البكتيريا العصوية تمثل 33.33% والكروية 66.67% من مجموع العزلات. وبالاعتماد على نظام التعريف API في تصنيف بكتيريا حمض اللبن تبين أن البكتيريا الكروية ممثلة بثلاثة أجناس هي *Leuconostoc* (20%) تمثلت بنوعين، *Enterococcus* (40%) تمثلت بثلاثة أنواع و*Lactococcus* (6.67 %) تمثلت بنوع واحد. أما البكتيريا العصوية فكانت تتبع الجنس *Lactobacillus* إذ تمثلت بستة أنواع مختلفة. كما تبين أن جميع العزلات البكتيرية المدروسة لها القدرة على إنتاج السكريات المتعددة الخارجية، وتميزت العزلة *Leuconostoc dextranicum* بإنتاج أكبر كمية منها مقارنة مع العزلات الأخرى حيث بلغت (327.98 مغ /ل).

كلمات مفتاحية: بكتيريا حمض اللبن، السكريات المتعددة الخارجية (EPS).

[1] مساعد باحث، [2]أستاذ مساعد وباحث، الهيئة العامة للتقانة الحيوية، قسم التقانات الغذائية والصناعية، دمشق، سورية.

Screening of locally isolated lactic acid bacteria for production of exopolysaccharides (EPS)

Mustafa, M. H. [(1)], Lina Al-Amir[(2)], B. Oklah[(1)] and S. Issa [(1)]

Abstract

Thirty strains of lactic acid bacteria were isolated from different local fermented foods. Isolates were identified by using morphological, cultural and biochemical tests using the API 50-CHL and API 20 Strep systems. Preliminary characterization tests showed that 33.33% of the isolates were rod shaped and 66.67% belonged to cocci bacteria. Twenty percent of cocci strains belonged to the genus *Leuconostoc* consisting of two species, 40% to genus *Enterococcus* represented by three species and 6.67% of cocci belonged to the genus *Lactococcus* consisting of one species only. While rod bacteria were found to belong to the genus *Lactobacillus* and consisted of six species. Results indicated that all strains produced exopolysaccharides, where *Leuconostoc dextranicum* was the highest producer of exopolysaccharides in comparison with the other isolated strains with a value of 327.98 mg/L.

Keywords: Lactic acid bacteria, Exopolysaccharides (EPS).

[(1)]Assistant Researcher, [(2)] Associate professor, National Commission for Biotechnology، Department of food and industrial biotechnology, Damascus, Syria.

المقدمة

السكريات المتعددة الخارجية ميكروبية المنشأ هي بوليميرات ذات سلسلة طويلة ووزن جزيئي مرتفع (10 إلى 30 كيلو دالتون) تتألف من ارتباط وحدات سكرية (تكون غالباً مؤلفة من سكر الغلوكوز، الفالاكتوز والرامنوز) ولا سكرية (مثل البروتينات السكرية، البروتينات، الأحماض النووية، الفوسفوليبيدات، الإسترات المثيلية، الكبريتات والآيونات المعدنية)، ينتشر إنتاجها بشكل واسع بين البكتيريا وبشكل أقل بين الخمائر والفطريات (Welman وIan، 2003؛ Bhaskar وNaraan، 2005؛ Edwara وزملاؤه، 2011).

تقسم السكريات المتعددة الخارجية حسب تركيبها الكيميائي إلى سكريات متعددة متجانسة تتألف من نوع واحد من السكريات الأحادية (غلوكوز أو فركتوز) وسكريات متعددة غير متجانسة تتألف على الأقل من نوعين مختلفين من السكريات الأحادية (Tallon وزملاؤه، 2003).

تتضمن السكريات المتعددة الخارجية المتجانسة أربع مجموعات فرعية وهي α - D - غلوكان مثل الدكستران (*Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* و*Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum*)، وß - D– غلوكان ينتج بوساطة أنواع (*Pediococcus* و*Streptococcus*)، فروكتان وبولي غلاكتان. تنتج السكريات المتعددة غير المتجانسة بوساطة البكتيريا المحبة للحرارة المتوسطة مثل (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*، *L. lactis* subsp. *Cremoris*، *Lactobacillus casei*، *Lb. sake*، *Lb. rhamnosus* وغيره) والبكتيريا المحبة للحرارة العالية مثل (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*، *Lb. helveticus*، *Lb. acidophilus* و(S. thermophilus) (De Vuyst وBart، 1999). تكون السكريات المتعددة الخارجية البكتيرية إما بشكل كبسول ترتبط مباشرة بسطح الخلية الجرثومية أو تكون بشكل لزج ضعيفة الارتباط بسطح الخلية وتترشح إلى خارج الخلية (Bauer وزملاؤه، 2009).

لقي إنتاج السكريات المتعددة الخارجية بوساطة بكتيريا حمض اللبن في السنوات الأخيرة اهتماماً متزايداً بشكل رئيس كونها بوليميرات حيوية تؤدي دوراً مهماً في تحسين الخواص الفيزيائية للمنتجات الغذائية المتخمرة (Zhang وزملاؤه، 2011). تستخدم السكريات المتعددة الخارجية في الصناعات الغذائية بشكل عام مثبتات ومستحلبات ومثخنات قوام وغيره، ومثال على ذلك يستخدم الدكستران في صناعة الحلويات في ربط الماء وتحسين اللزوجة ولمنع بلورة السكر، ويستخدم في صناعة الخبز لزيادة قابلية الحفظ وتحسين حفظ الرطوبة (Yang، 2000). يمكن أن تستخدم السكريات المتعددة الخارجية إضافات آمنة لتحسين قوام ومنتجات الألبان المتخمرة ولزوجتها كما أنها تمنع ظاهرة النضوح ويمكن أن تحسن خاصية الشعور بملء الفم (Zhang وزملاؤه، 2011)،

بالإضافة إلى ذلك لها تأثيرات فيزيولوجية مهمة مختلفة بالنسبة إلى الإنسان من جملة ذلك أنها تعمل باعتبارها عاملا مضادا للتقرح وتحسن الالتصاق المعوي لبكتيريا البروبيوتيك، ويمكن أن تحفز المناعة وتمنع الورم وتلك المجموعة من السكريات المتعددة الخارجية التي تتضمن في تركيبها مجموعات الفوسفات تؤدي دوراً في تنشيط الماكروفاجات والخلايا الليمفاوية (Bauer وزملاؤه، 2009؛ Degeest وزملاؤه،2001). أدى منع استخدام السكريات المتعددة الخارجية المعدلة كيميائياً (التي يتم تأمينها من المصادر النباتية مثل النشاء والأعشاب البحرية مثل الكاراجينين، ألجينات) في مجال الصناعات الغذائية إلى بروز اهتمام خاص حول إمكان إنتاج هذه المادة باستخدام الأحياء الدقيقة ولاسيما بوساطة مجموعة بكتيريا حمض اللبن باعتبارها بكتيريا أمنة من الناحية الميكروبيولوجية (De Vuyst و Bart، 1999).

هدف البحث إلى عزل بكتيريا حمض لبن المنتجة للسكريات المتعددة الخارجية من مصادر محلية وتوصيفها وغربلة العزلات اعتماداً على قدرتها على إنتاج السكريات المتعددة الخارجية لاختيار أفضل عزلة في الإنتاج.

مواد البحث وطرائقه

عزل بكتيريا حمض اللبن: عُزلت بكتيريا حمض اللبن من مصادر غذائية محلية (حليب ومنتجات الألبان المتخمرة، منتجات التخليل، لحومات حمراء و بيضاء، خضراوات) وذلك بتحضير التخفيفات المناسبة، ثم أخذ 100 مكروليتر من التخفيف المطلوب والزرع في طبق بتري يحتوي على وسط الـ MRS و M17 آغار، ثم حضن عند درجتي حرارة 37 و45 °س مدة 72 ساعة في ظروف النمو الهوائية واللاهوائية (Bukola و Abiodun، 2008).

توصيف عزلات بكتريا حمض اللبن: تم توصيف هذه العزلات البكتيرية بالفحص المجهري وصبغة غرام واختبار الكاتلاز إذ إن بكتيريا حمض اللبن تتميز بأنها موجبة الغرام وسالبة الكاتلاز. أما دراسة الصفات الفيزيولوجية فأجريت باستخدام نظام تعريف API إذ استخدم نظام API 20 Strep للتمييز بين أنواع المكورات اللبنية المعزولة من وسط الـ M17 ونظام API 50 CHL للتمييز بين أنواع العصيات اللبنية المعزولة من وسط الـ MRS وهذا النظام يمكن أن يحدد جنس البكتريا ونوعها.

غربلة عزلات بكيتريا حمض اللبن المعزولة محلياً اعتماداً على قدرتها في إنتاج السكريات المتعددة الخارجية: تمت الغربلة بإجراء مقارنة بين مجموعة من العزلات البكتيرية المنتجة للسكريات المتعددة الخارجية بهدف تحديد أي منها أكثر فعالية وقدرة

على التعبير عن تلك الصفة وإمكانية استخدامها لاحقاً على نطاق تجاري. عُرّفت أفضل عزلة بكتيرية منتجة للسكريات المتعددة الخارجية من خلال إجراء عملية التخمير المغمور في دوارق مخروطية سعة 250 مل تحتوي على 50 مل من وسط الـ MRS و M17 السائل المعقم و1% (حجم/ حجم) لقاح بكتيري (overnight) مع استخدام حاضنة هزازة ذات سرعة 100 دورة/ الدقيقة عند درجة حرارة 37 و45 ˚س لمدة 24 ساعة وبدون ضبط درجة الحموضة pH (Madied و Reyes-Gavilan، 2005). (تم تقدير كمية السكريات المتعددة الخارجية المنتجة بوساطة كل عزلة في ثلاثة مكررات).

تقدير كمية السكريات المتعددة الخارجية: نُقل 10 مل من وسط التخمير إلى أنابيب تثفيل بحجم 50 مل و بهدف تثبيط عمل الأنزيماَت المحللة للبوليميرات وتحرير السكريات المتعددة الخارجية المتصلة بجدران الخلايا تم تحضين هذه الأنابيب في حمام مائي عند درجة حرارة 100 ˚م لمدة 10 دقائق (Cerning وزملاؤه، 1994) بعد تبريد أنابيب التثفيل إلى درجة حرارة الغرفة أجريت عملية تثفيل عند 8000 دورة لمدة 20 دقيقة عند درجة حرارة 4 ˚س من أجل فصل الخلايا والبروتينات، ثم أُضيفت حجمين من الإيتانول المطلق 95% إلى الطافي لترسيب السكريات المتعددة الخارجية وحفظ المزيج لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 4 ˚س. بعد انقضاء مدة الحفظ وللحصول على الراسب أجري التثفيل عند 8000 دورة لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة 4 ˚س. قُدّرت كمية السكريات المتعددة الخارجية الناتجة بداية بحل الراسب الناتج في ماء مقطر منزوع الشوارد ثم أجريت عملية تثفيل أخرى عند 8000 دورة لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة 4 ˚س لاستبعاد أي كمية راسب متبقّ (Korakli وزملاؤه، 2003). تم تقدير السكريات المتعددة الخارجية الكلية في كل عينة بطريقة فنول–حمض الكبريت بقياس الامتصاصية عند طول موجة 480 نانومتر وفق Dubois وزملاؤه (1956) بالاستعانة برسم منحنٍ قياسي باستخدام سكر الغلوكوز وعُبّر عن كمية السكريات المتعددة الخارجية الناتجة بـ مغ/ ل (Torino وزملاؤه، 2001).

النتائج والمناقشة

تصنيف عزلات بكتيريا حمض اللبن و دراسة بعض خصائصها: عزل ما مجموعه 30 عزلة محلية من بكتيريا حمض اللبن من مصادر غذائية مختلفة وذلك باستخدام وسط الـ MRS و M_{17} آغار والتحضين عند درجتي حرارة 37 و45 ˚س مدة 72 ساعة في ظروف النمو الهوائية وغير الهوائية كما أجريت بعض الاختبارات الكيموحيوية المحددة للأجناس، تبين من خلالها أن جميع العزلات كانت موجبة غرام، سالبة الكاتلاز (الجدول1).

الجدول (1) الخصائص الشكلية وتوزع النسب المئوية لعزلات بكتيريا حمض اللبن

العزلة البكتيرية	عدد العزلات	صبغ غرام	الشكل	اختبار الكاتالاز	النسبة المئوية %
L.brevis	3	+	عصوي	-	10
L. fermentum	1	+	عصوي	-	3.33
L. plantarum	2	+	عصوي	-	6.67
L. paracasi	2	+	عصوي	-	6.67
L. rhamnosus	1	+	عصوي	-	3.33
L.acidophilus	1	+	عصوي	-	3.33
Leu. dextranicum	1	+	كروي	-	3.33
Leu. mesenteriodes	1	+	كروي	-	3.33
Leu.spp	4	+	كروي	-	13.34
E. avium	1	+	كروي	-	3.33
E. faecalis	9	+	كروي	-	30
E. faecium	2	+	كروي	-	6.67
Lc. lactis	2	+	كروي	-	6.67

أظهرت نتائج تشخيص بكتيريا حمض اللبن أن البكتيريا العصوية تمثل 33.33% والكروية 66.67% من مجموع العزلات اعتماداً على نظام API في تصنيف بكتيريا حمض اللبن، وتبين أن البكتيريا الكروية ممثلة بثلاثة أجناس هي *Leuconostoc* شكلت نسبة 20% وكانت الأنواع السائدة منه *Leu. Dextranicum* و*Leu. mesenteriodes*، وشكلت *Enterococcus* نسبة 40%، وكانت الأنواع السائدة منه *E. avium*، *E. faecium* و*E. faecalis*، في حين شكل الجنس *Lactococcus* نسبة 6.67% وتمثل بنوع واحد هو *Lc. lactis*. أما البكتيريا العصوية فكانت تتبع الجنس *Lactobacillus* حيث تمثلت بستة أنواع وهي *L. brevis*، *L. fermentum*، *L. plantarum*، *L. paracasi*، *L. acidophilus* و*L. rhamnosus* .

غربلة العزلات البكتيرية اعتماداً على قدرتها في إنتاج السكريات المتعددة الخارجية:

يبين الجدول (2) متوسطات كمية السكريات المتعددة الخارجية المنتجة بوساطة بكتيريا حمض اللبن المعزولة محلياً. كما هو واضح من الجدول أبدت أغلب عزلات*Enterococcus faecalis* نشاطاً ضعيفاً في إنتاج السكريات المتعددة الخارجية بينما أنتجت العزلات البكتيرية الأخرى من 30 حتى 327.97 مغ من السكريات المتعددة الخارجية في كل لتر من وسط الـ MRS و M17 السائل وهذا يظهر أن نوع العزلة البكتيرية لها تأثير معنوي في إنتاج السكريات المتعددة الخارجية، إذ أن إنتاج السكريات المتعددة الخارجية بوساطة بكتيريا حمض اللبن يعتمد بشكل كبير على الظروف البيئية، وقد أكد Degeest وزملاؤه (2001) و Macedo وزملاؤه (2002) أن درجة الحرارة،

تركيب وسط الزرع، درجة الحموضة pH، مصدر الكربون والنيتروجين ونوع البكتيريا تؤثر على كمية السكريات المتعددة الخارجية المنتجة.

الجدول (2) كمية السكريات المتعددة الخارجية المنتجة بوساطة عزلات بكتيريا حمض اللبن

العزلة البكتيرية		المصدر الغذائي	متوسط كمية السكريات المتعددة الخارجية (مغ /ل) ± الانحراف المعياري
Lactobacillus brevis	*Lactobacillus*	نقانق	219.48 ± 9.58
Lactobacillus brevis		نقانق	275.61 ± 13.36
Lactobacillus brevis		همبرغر	71.08 ± 4
Lactobacillus plantarum		بسطرما	110.16 ± 10.8
Lactobacillus plantarum		مخلل قتة	144.74 ± 29.28
Lactobacillus paracasi		قشطة	233.6 ± 20.09
Lactobacillus paracasi		جبنة	227.87 ± 44.86
Lactobacillus rhamnosus		جبنة	260.89 ± 33.03
Lactobacillus acidophilus		حليب	59 ± 2
Lactobacillus fermentum		سجق	144.56 ± 40.73
Leuconostoc spp	*Leuconostoc*	كباب	246.33 ± 5.48
Leuconostoc spp		حليب	46.08 ±3.5
Leuconostoc spp		حليب	49.08 ± 1.01
Leuconostoc spp		حليب	30.17 ±1.04
Leuconostoc dextranicum		حلاوة جبن	327.98 ± 16.18
Leuconostoc mesenteriodes		قطايف	272 ± 12.98
Enterococcus avium	*Enterococcus*	حليب	195.6 ± 6.5
Enterococcus faecalis		جبنة	136.29 ± 9.9
Enterococcus faecalis		جبنة	178.26 ± 7.94
Enterococcus faecalis		حليب	80.08 ± 13.35
Enterococcus faecalis		حليب	26.08 ± 2.01
Enterococcus faecalis		حليب	24 ±4
Enterococcus faecalis		حليب	22.25 ±1.09
Enterococcus faecalis		حليب	22.17 ±3.01
Enterococcus faecalis		حليب	18.08 ±2.01
Enterococcus faecalis		حليب	12 ±1
Enterococcus faecium		حليب	183.7 ±2.01
Enterococcus faecium		حليب	48.08 ±1.01
Lactococcus lactis	*Lactococcus*	حليب	250 ±8
Lactococcus lactis		حليب	53.08 ±3

أظهرت النتائج أن جميع العزلات البكتيرية المدروسة ما عدا أغلب عزلات *E. faecalis* لها القدرة على إنتاج السكريات المتعددة الخارجية، وهذا يتوافق مع نتيجة الأبحاث التي تشير إلى أن معظم بكتيريا حمض اللبن المنتجة للسكريات المتعددة الخارجية تنتمي إلى الأجناس *Streptococcus*، *Lactobacillus*، *Lactococcus*، *Leuconostoc*، و*Pediococcus* (Madied و Reyes-Gavila، 2005). إن متوسط كمية السكريات المتعددة الخارجية المنتجة بوساطة العزلة *Leuconostoc dextranicum* (327.98 مغ/ل) كان الأكثر وهذا يعود إلى أن كمية السكريات المتعددة الخارجية المتجانسة المنتجة بوساطة بكتيريا حمض اللبن تكون عادة أكثر من كمية السكريات المتعددة الخارجية غير المتجانسة (Jolly وزملاؤه، 2002) وهذا يتوافق مع Macedo وزملاؤه (2002)، أما عن تفوق هذه العزلة على العزلات الأخرى التابعة لنفس جنس *Leuconostoc* فقد يعود إلى المصدر الذي تم عزلها منه.

واستنتج أن جميع العزلات البكتيرية المدروسة لها القدرة على إنتاج السكريات المتعددة الخارجية، وتميزت العزلة *Leuconostoc dextranicum* بأنها كانت الأكثر إنتاجاً، ومن أهم العوامل الرئيسة المعوقة لإنتاج السكريات هو مستويات الإنتاج المنخفضة خلال عملية التخمير، لذلك يوصى باستخدام التقانات الحيوية والبيولوجيا الجزيئية في تحري عزلات جديدة وتحري الاحتياجات من الوسط ودرجة الحرارة ودرجة الحموضة والكربون والنتيروجين لتحسين الإنتاج.

References

Bauer, R., P. Jan. V. Nathan. D. Christian. M. Leon and K. Jens. 2009. Exopolysaccharide production by lactose-hydrolyzing bacteria isolated from traditionally fermented milk. Int. J. Food Microbiology.131 : 260–264.

Bhaskar, P. and B. Naraan. 2005. Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. Currentscience. 88: 1-10.

Bukola, C. and A. Abiodun. 2008. Screening of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Some Nigerian Fermented Foods for EPS Production. World Applied Sciences Journal. 4 : 741-747.

Cerning, J., C. Renard. J. Thibault. C. Bouillanne, M. Landon. M. Desmazeaud and L. Topisirovic. 1994. Carbon Source Requirements for Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus casei* CG11 and Partial Structure Analysis of the Polymer. Appl. Environ. Microbiol.3914-3919.

Degeest, B., V. Frederik and L. DeVuyst. 2001. Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. Int.Dairy Journal. 11: 747–757.

DeVuyst, L and D. Bart. 1999.Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 23: 152-177.

Dubois, M. K. Gilles. J. Hamilton. P. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350–356.

Edwara, A., G. Melchias. J. Antony Prabhu. A. Willson. V. Anbananthan and K. Sivaperumal. 2011. Detection of Exopolysaccharides/ Bioemulsifier Producing Bacterial Isolates from Petroleum Contaminated Soil. Int. J. Biological Technology. 2: 1-7.

Jolly, L., J. Sebastien. D. Philippe and N. Jean-richard. 2002. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Kluwer Academic Publishers. Antonie van Leeuwenhoek .82: 367–374.

Korakli, M., M. Pavlovic. M. Ganzie and R. Vogel. 2003. Exopolysaccharide and Kestose Production by *Lactobacillus sanfranciscensis*LTH2590. Appl. Environ.Microbiol. 69: 2073-2079.

Macedo, M., L. Christophe and P. Claude. 2002. Combined Effects of Temperature and Medium Composition on Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus rhamnosus*RW-9595M in a Whey Permeate Based Medium. Biotechnol.Prog. 18: 167-173.

Madiedo, P and C. Reyes-Gavilan. 2005. Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid bacteria. J. Dairy Sci. 88: 843–856.

Torino, M., M. Taranto. F. Sesma and G. De Valdez. 2001. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus*15807 inresponse to environmental pH.J. Appl. Microbiol. 91: 846–852.

Tallon, R., B. Philippe and C. Maria. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides producedby *Lactobacillus plantarum*EP56. Research in Microbiology.154:705–712.

Welman, A and S. Ian. 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. Trends in Biot.21.

Yang, Z. 2000. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria:structures and properties. Academic Dissertation, Department of Food Technology, University of Helsinki.

Zhang, Y., L. Shengyu. Z. Chunhong. L. Yongkang. Z. Heping and Y. Zhennai. 2011. Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus fermentum*F6 in skim milk. African Journal of Biotechnology.10: 2080-2091.

Received	**2013/11/18**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2014/06/09**	**قبول البحث للنشر**