مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2010) ــ المجلد (26) ــ العدد 1 ــ الصفحات: 323-337

إنتاج المانيتول بوساطة عزلات محلية من بكتريا حمض اللاكتيك المنماة في أوساط غذائية مختلفة

عالية شفيق كامل و حامد صالح محمد

و وليد احمد محمود

الملخص

هدفت الدراسة إلى إنتاج المانيتول بوساطة بكتريا حمض اللاكتيك مختلطة التخمر (Heterofermentative) المنماة في أوساط غذائية رخيصة ومتوافرة، وتضمنت الدراسة مرحلتين هي: المرحلة الأولى: عُزلت فيها بكتريا حامض اللاكتيك مختلطة التخمر والمنتجة للمانيتول من براز الأطفال الرضع والمخللات التالفة وقد أمكن الحصول على عزلتين منتجة للمانيتول. شُخِّصت بإجراء الاختبارات الكيموحيوية المختلفة عليها، ووجد أنها تنتمي إلى الأنواع *Lactobacillus brevis* و*Lb. fermentum*. اختبرت هذه الأنواع في كفاءتها لإنتاج إنزيم المانيتول ديهايدر وجينيز (Mannitol dehydrogenase, MDH) وقد تفوقت بكتريا *Lb. brevis* إذ بلغ إنتاجها من الإنزيم 51.48 وحدة/ 100 مل مقارنة بـ 49.94 وحدة/ 100 مل لبكتريا *Lb. fermentum*. المرحلة الثانية: نُمّيت فيها البكتريا المنتخبة في أوساط غذائية طبيعية شملت مصل اللبن (الشرش) والمولاس والدبس، وقد أعطى الشرش أعلى إنتاجية من الإنزيم بلغت 135.71 وحدة/ 100 مل بالمقارنة مع المولاس والدبس إذ كانت 85.41 و23.71 وحدة/ 100 مل على التوالي. حُضّر وسط إنتاج الإنزيم من مزيج الشرش والمولاس وبنسب مختلفة وقد تفوقت النسبة 1:1 وأعطت أعلى فعالية إنزيمية بلغت 147.31 وحدة/ 100 مل. درس تأثير بعض العوامل في إنتاج الإنزيم وتبيّن أن: الأس الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم هو pH 5 . وكانت أفضل تراكيز من المصادر النتروجينية المضافة إلى الوسط هي 2 غم/ لتر من اليوريا و4 غم/ لتر من مستخلص الخميرة و2 غم/ لتر من نترات الأمونيوم و3 غم/ لتر من كبريتات الأمونيوم. أما فيما يخص المصدر المعدني فكان أفضل تركيز من فوسفات البوتاسيوم هو 3 غم / لتر ومن كبريتات المغنيسيوم هو 0.4 غم/ لتر. وكان أفضل مصدر كاربوني مضاف إلى الوسط هو الفركتوز والكلوكوز بنسبة 2:1على التوالي.

الكلمات المفتاحية: بكتريا حمض اللبن، إنتاج المانيتول.

قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، العراق.

Production of Mannitol Fromlocal Isolates of Lactic Acid Bacteria Grown in Various Cultural Media

A. Sh. Khamel ; H.S.Mohammed and W. A. Mahmoud

ABSTRACT

The aim of this study was to produce mannitol from heterofermentative lactic acid bacteria grown in available, and cheap cultural media. The study included two basic stages: First Stage: The isolation of Heterofermentative lactic acid bacteria, which produces mannitol, from brest fed babies feces and pickles. Two isolates were obtained, and identified by biochemical tests; they were found belong to the species, *Lactobacillus brevis*, *Lb. fermentum*. The ability to produce mannitol dehydrogenase enzyme were tested. *Lb. brevis* surpassed the other. It's production of the enzyme was 51.48 unit/100ml compared with 49.94 unit/100ml for *Lb. fermentum*. Second Stage: *Lb. brevis* was grown on natural cultural media included whey, molasses and date syrup (Debes). Whey gave the highest production of the enzyme 135.71 unit/100ml comparing with molasses and date syrup: 85.41 and 23.71 unit/100ml respectively. The enzyme producing medium was prepared from the mixture of whey and molasses of different rates. The rate 1:1 surpassed and gave the highest enzymic production 147.31 unit/100ml. The effects of some factors on the production of the enzyme were studied and the following results were obtained: Optimum pH for the enzyme production was pH 5. The best concentrations of nitrogen potassium and magnesium sources added to the medium were 2 g/l of urea, 4 g/l of yeast extract, 2 g/l of ammonium nitrate, and 3 g/l of ammonium sulphate. Potassium phosphate of 3 g/l and magnesium sulphate 0.4 g/l .The best carbonic sources added to the medium was fructose and glucose at concentrations of 2:1.

Key Words: Lactic acid bacteria; Mannitol production

Food Sci.Dept., Collage of Agric and Forestry, Mosul Univ, Iraq.

المقدمـــــة

ثبت علمياً أن استهلاك السكريات بكميات كبيرة له بعض المضار على صحة الإنسان إذ يؤدي إلى ظهور حالات مرضية مثـل الـسمنة والـسكري وتـسوس الأسـنان (Bisset وDavis، 1960)، ولتجنب هذه التأثيرات أجريت عدة دراسات لإنتاج بدائل لهذه السكريات مثل الكحولات السكرية (Polyols or sugar alcohols) وهي عبارة عن مركبات متعددة الهيدروكسيل ذات طعمٍ حلو وتمتص ببطء في الجهاز الهضمي. تنتج الكحولات السكرية من اختزال السكريات فمثلاً ينتج الزايلتول والريبتول من اختزال السكريات الأحاديـة خماسـية الكاربون وينتج المانيتول والسوربيتول من اختزال السكريات الأحادية سداسية الكاربون كما ينتج اللاكتيتول والمالتيتول من اختزال السكريات الثنائية. تستخدم بضع طرائق فـي إنتـاج الكحولات السكرية فمثلاً يمكن إنتاج المانيتول بطريقـة الهدرجـة الكيميائيـة والهدرجـة الإنزيمية واستخدام الأحياء المجهرية مثل الفطريات الخيطية والخمائر والبكتريا ولا سـيما بكتريا حامض اللاكتيك مختلطة التخمر (Weymarn، 2002).

يمكن إنتاج المانيتول من بكتريا حامض اللاكتيك مختلطـة التخمـر بـشكل واسـع، والغرض من ذلك هو تقليل تكاليف الإنتاج والتنقية والحـصول علـى نـاتج أكبـر. إن المانيتول المنتج من قبل بكتريا حامض اللاكتيك يمكن أن يؤدي إلى إنتاج أغذية متخمـرة ذات قيمة غذائية عالية (Makkee وآخرون، 1985) وللمـانيتول اسـتخدامات تغذويـة عديدة فهو يستخدم كمواد محلية في الأغذية التي يطلق عليها الأغذية الخفيفة "Light") (foods، لأنه ذو سعرات حرارية منخفضة بالمقارنة مع الـسكريات الأخـرى، وهـذه الأغذية تصلح للأشخاص الذي يعانون من السمنة، فضلاً عن ذلك يمكن استخدام المانيتول في المنتجات الغذائية لمرضى السكري لأنه لا يعتمد على الإنسولين عند تمثيلـه داخـل الجسم، ويستخدم في العديد من الصناعات الغذائية كالعلكة والمثلجات القشدية والحلويـات وغير ذلك، علاوة على استخدامه في الـصناعات الـصيدلانية (Furia، 1972؛ Yun وKim، 1998؛ Korakli وآخرون، 2000) وفي مجال الطب يستخدم المانيتول لتقليـل الاستسقاء الخلـوي (Cellular odema) وزيـادة إفـراز الكليـة (Urinary output) (Soetaert وآخرون، 1999).

هدف البحث

إنتاج سكر المانيتول من مصادر رخيصة وهي الشرش والمولاس والدبس باسـتخدام بكتريا حامض اللاكتيك مختلطة التخمر المنتجة للمانيتول والمعزولة من بعض المـصادر كبراز الأطفال والمخللات التالفة، ونُمّيت البكتريـا علـى الوسـط الغـذائي التركيبـي deMan–Rogosa and Sharpe, MRS (1960) المحور لغرض إنتاج إنزيم المانيتول ديهايدر وجينيز واختيار أفضل عزلة .

مواد البحث وطرائقه

مصادرعزل البكتريا

أخذت عينات من براز خمسة أطفال حديثي الولادة من كلا الجنسين، تراوحت أعمارهم بين 2–4 أسابيع اعتمدوا في تغذيتهم على حليب الأم وتمتعوا بصحة جيدة ولم يتعاطوا أي نوع من المضادات الحيوية أو الأدوية. وضعت النماذج مباشرة في وسط MRS السائل المعقم في أنابيب اختبار، وحُفظت في صندوق ثلجي ونقلت إلى المُختبر خلال بضع ساعات لإستكمال عمليات العزل. جمعت عينات من مخللات مختلفة ونُقل 10 مل من كل منها إلى 90 مل من مرق MRS المعقم وتحت الشروط الصحية، وحضنت على 37 م° مدة 48–72 ساعة. أجريت الفحوصات الكيموحيوية حسب ما جاء في Harrigan وMcCance (1976) ما لم يرد خلاف ذلك.

تكسير جدران الخلايا بالموجات فوق الصوتية

بعد انتهاء مدة تحضين البكتريا ولغرض الحصول على المستخلص الخلوي (Cell-free extract) الحاوي على إنزيم المانيتول ديهايدروجينيز ــ لكونه من الإنزيمات الداخل خلوية (Intracellular) ــ فصلت الخلايا عن وسط النمو بالنبذ المركزي بسرعة 4000 دورة/ دقيقة، ومن ثم عُرّضت الخلايا إلى الذبذبات فوق الصوتية في حمام مائي (Ultrasonicator water bath) مدة 60 دقيقة لتكسير جدران الخلايا حسب طريقة (Yoo وآخرون، 2005).

دراسة الظروف المثلى لإنتاج إنزيم مانيتول ديهايدروجينيز

الأس الهيدروجيني الأمثل:

حضر 100 مل من الوسط الغذائي المكون من الشرش والمولاس بنسبة 1:1. ووزعت في أنابيب وضبط الأس الهيدروجيني إلى 4.5 و5 و5.5 و6 و6.5 و7، ثم عقم الوسط ولقح بمقدار 1 مل من المزرعة، وحُضّن مدة 3 أيام لمعرفة الأس الهيدروجيني الأمثل للنمو وإنتاج الإنزيم.

المصدر النتروجيني:

استخدم مستخلص الخميرة واليوريا ونترات الأمونيوم وكبريتات الأمونيوم وأضيفت إلى الوسط المذكور سابقاً بالتراكيز الآتية: 1 و2 و3 و4 و5 غم/لتر لكل منها، وعقم ولقح بالبكتريا لمعرفة التركيز الأمثل.

المصدر المعدني:

حُضّر الوسط الغذائي المذكور سابقاً، وأضيفت إليه مادة ثنائي البوتاسيوم هيدروجين فوسفيت K_2HPO_4 بتراكيز 1 و3 و5 غم/ لتر، ومادة كبريتات المغنيسيوم $MgSO_4$

بتراكيز 0.1 و0.2 و0.3 و0.4 و0.5 غم/ لتر، وعقم ولقح بالبكتريا ولوحظت النتائج لمعرفة التركيز الأمثل من المادتين.

تأثير إضافة الكلوكوز والفركتوز:

استخدم الوسط الغذائي السابق نفسه، وأضيف إليه سكر الكلوكوز والفركتوز وبتراكيز 1 و 2 و 3 و 4 و 5% لكل منها، وعقم الوسط ولقح بالبكتريا، ولوحظت كمية الإنزيم المنتج في كل حالة لمعرفة التركيز الأمثل لكليهما.

طريقة تقدير فعالية إنزيم المانيتول ديهايدروجينيز:

استخدمت طريقة الكمية لتقدير الفعالية الإنزيمية الموصوفة من قبل الباحثين Martinez وآخرين (1963).

الطريقة الكمية لتقدير الفركتوز:

قُدّر حسب الطريقة المذكورة من قبل Ashwell (1957).

النتائج والمناقشة

عزل بكتريا حمض اللاكتيك وتشخيصها

عزل بكتريا *Lb. brevis* و *Lb. fermentum*:

تم الحصول على إحدى عشرة عزلة لبكتريا حامض اللاكتيك من نماذج المصادر المستخدمة، وهي: المخللات التالفة وبراز الأطفال الرضع، وبعد سلسلة من مراحل العزل تم التقاط عزلات من مستعمرات نامية تميزت بلون كريمي وغير شفاف وذات حافات كاملة بملاحظتها تحت المجهر ،بعد ذلك حضرت شريحة وصبغت بطريقة غرام (Gram stain) ووجد أنها بكتريا *Lb. brevis* العصوية المنفردة أو بشكل سلاسل قصيرة ذات نهاية مستديرة. أما بكتريا *Lb. fermentum* فكانت خلاياها عصوية مختلفة الطول مفردة، أو بشكل سلاسل طويلة وكلاهما موجبة لصبغة غرام وغير مكونة للأبواغ.

الاختبارات الكيموحيوية المتبعة لتشخيص العزلات البكتيرية:

يبيّن الجدول (1) عدم قدرة العزلات المنتخبة على إسالة الجيلاتين لعدم قدرتها على إفراز إنزيم الجيلاتينيز (Gelatinase)، وهذا يتفق مع ما ذكره Holt وآخرين (1986)، وقد أظهرت العزلات عدم قدرتها على تحليل الكازين في وسط أكار الحليب لعدم مقدرتها على إنتاج إنزيمات محللة للبروتين (Proteolytic enzyme)، وهذا يتفق مع ما ذكره Robinson (1990) بأن هذه البكتريا غير محللة للبروتين، وأبدت العزلات المحلية قدرتها على تحليل النشاء وذلك بإفرازها لانزيمات Diastase إلى خارج الخلايا وأمكن ملاحظة هالات شفافة حول المستعمرات البكتيرية عند إضافة محلول اليود إليها، وهذا

يتفق مع ما ذكره Holt وآخرون (1986)، وكانت العزلات المنتخبة جميعها غير قادرة على إنتاج الكاتاليز بدلالة عدم تكون فقاعات غازية عند إضافة بيروكسيد الهيدروجين حيث تشترك بكتريا Lactobacilli في هذه الصفة. أما إنتاج الأمونيا من الآرجنين فقد أبدت العزلات المنتخبة قدرتها على إنتاج الأمونيا نتيجة تحلل الحامض الأميني الآرجنين، إذ أدت إضافة كاشف نسلر إلى المزرعة البكتيرية إلى تغير في اللون من الوردي إلى الأحمر نتيجة انفراد الأمونيا، كما يتبيّن من النتائج أن العزلات المنتخبة جميعها غير قادرة على تحليل الحامض الأميني التربتوفان وفصل حلقة الأندول منه لعدم قدرتها على إنتاج Tryptophinase. أبدت العزلات المنتخبة اختلافات في النمو بنطاق حراري يتراوح بين 5–54م° ووجد أن بكتريا *Lb.brevis* أبدت قدرتها على النمو بدرجة حرارة 5 م°، ولكنها أخفقت في النمو بدرجة 45 م°، وكان أفضل نمو لها في المدى 30–37 م°، وعلى العكس من ذلك أبدت بكتريا *Lb. fermentum* قدرتها على النمو بدرجة حرارة 45 م° في حين أخفقت في النمو بدرجة 5م°، ولكنها أظهرت نمواً جيداً بدرجة حرارة 37م°، وهذا يتفق مع ما ذكره Holt وآخرون (1986) وRobinson (1990)، ويعدُّ هذان النوعان من البكتريا ضمن المجموعة الثالثة من تقسيم Orla Jensen التي يطلق عليها Betabacterium وهي مختلطة التخمر إجبارياً (Obligately heterofermentative) حسب ما ذكره Harrigan وMcCance (1976).

كما يوضح الجدول (1) نتائج اختبارات تخمير السكريات للعزلات المنتخبة وتأكيد تشخيصها على مستوى النوع عن طريق قابليتها لتخمير أنواع مختلفة من السكريات ومقارنتها بما جاء في Bergey's manual (1986)، إذ أبدت العزلتان عدم قدرتهما على استهلاك سكريات التريهالوز والرامنوز والسالسين والسليبايوز وكل من الكحول السكري والمانوز والسوربيتول والمانيتول في حين أظهرت قدرتها على استهلاك الأرابينوز والرافينوز والرايبوز والزايلوز والسكروز والفركتوز والكالاكتوز والكلوكوز واللاكتوز والمالتوز واختلفتا في استهلاكهما للايسكولين، إذ أبدت بكتريا *Lb. brevis* قدرتها على استهلاكه في حين أخفقت بكتريا *Lb. fermentum* في استهلاكه، وهذا يتفق أيضاً مع ما أشار إليه Holt وآخرون (1986) وRobinson (1990).

اختبار قدرة العزلات البكتيرية على إنتاج إنزيم المانيتول ديهايدروجينيز:

يبيّن الشكل (1) العلاقة بين مدة التعرض للذبذبات فوق الصوتية وكفاءة عملية تكسير الجدران الخلوية معبراً عنها بقياس الفعالية الإنزيمية في المستخلص الخلوي، وكانت مدة 10 دقائق كافية للحصول على فعالية جيدة؛ مما يعني ضمان تكسير كل الخلايا. ويلاحظ انخفاض الفعالية الإنزيمية في المستخلص عند تعريض الخلايا للذبذبات مدة طويلة الذي يعزى إلى حصول مسخ لبعض جزيئات الإنزيم بتأثير الذبذبات فوق الصوتية فضلاً عن

الحرارة المتولدة عن هذه الذبذبات، وعلى الرغم من عملية التبريد المستمرة المستخدمة خلال عملية التكسير.

الجدول (1) الاختبارات الكيموحيوية واختبار تخمر السكريات لبكتريا *Lb. brevis* و*Lb. fermentum*

نوع الاختبار	العزلات البكتيرية	
	Lb. brevis	*Lb. fermentum*
1- إسالة الجيلاتين	−	−
2- تحلل الكازين	−	−
3- إنتاج أنزيم Diastase	+	+
4- إنتاج الكاتاليز	−	−
5- إنتاج الأمونيا من الأرجنين	+	+
6- إنتاج الأندول من التربتوفان	−	−
7- النمو بدرجات حرارة مختلفة (م°)		
5	+	−
20	+	+
30	+	+
37	+	+
45	−	+

نوع السكر	*Lb. brevis*	*Lb. fermentum*	نوع السكر	*Lb. brevis*	*Lb. fermentum*
1- أرابينوز	+	+	10- سليبابوز	−	−
2- إيسكولين	+	−	11- فركتوز	+	+
3- تريهالوز	−	−	12- غالاكتوز	+	+
4- رافينوز	+	+	13- غلوكوز	+	+
5- رامنوز	−	−	14- لاكتوز	+	+
6- رايبوز	+	+	15- مالتوز	+	+
7- زايلوز	+	+	16- مانوز	−	−
8- ساليسين	−	−	17- سوربيتول	−	−
9- سكروز	+	+	18- مانيتول	−	−

اختيار العزلة الفُضلى:

نُميّت العزلتان في وسط MRS المحور والمحتوي على سكري الكلوكوز والفركتوز بنسبة 1:2 والمذكورة من قبل Weymarn (2002)، وعدل الأس الهيدروجيني إلى 6.2، وحُضّن بدرجة الحرارة الملائمة لنمو أنواع البكتريا المعزولة مدة 48 ساعة. بعدها قيست فعالية إنزيم المانيتول ديهايدروجينيز باستخدام العلاقة الآتية والمذكورة من قَبل Martinez وآخرين (1963). ويتبيّن من الجدول (2) أن بكتريا *Lb. brevis* أعطت

إنتاجية إنزيمية أعلى مقدارها 51.48 وحدة إنزيمية/ 100 مل وسط غذائي بالمقارنة مع بكتريا *Lb.fermentum* بفعالية مقدارها 49.94 وحدة إنزيمية/ 100 مل، علماً بأن الوحدة الأنزيمية هي كمية الأنزيم التي تحول مايكرومولاً واحداً من المانيتول إلى الفركتوز في الدقيقة الواحدة ضمن ظروف التفاعل. وقد يكون السبب هو ملاءمة الوسط لهذا النوع من البكتريا وعدم ملاءمته للبكتريا الأخرى فضلاً عن التباين الوراثي.

يُعدُّ إنتاج المانيتول ديهايدروجينيز من قبل البكتريا مؤشراً جيداً على قدرتها لإنتاج المانيتول، لكون هذا الإنزيم هو المسؤول عن عملية اختزال الفركتوز إلى المانيتول؛ ولذلك اختيرت بكتريا *Lb. brevis* لاستخدامها في إنتاج المانيتول في المراحل اللاحقة من الدراسة.

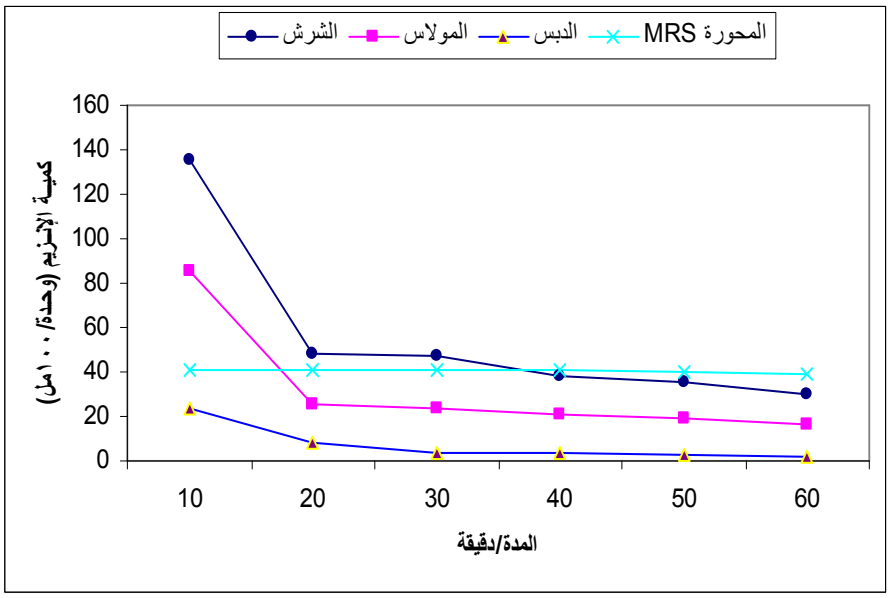
الجدول (2) قياس فعالية الإنزيم (MDH) في العزلات المحلية

العزلات البكتيرية	تركيز الإنزيم (وحدة/مل)
Lb. brevis	51.48
Lb. fermentum	49.94

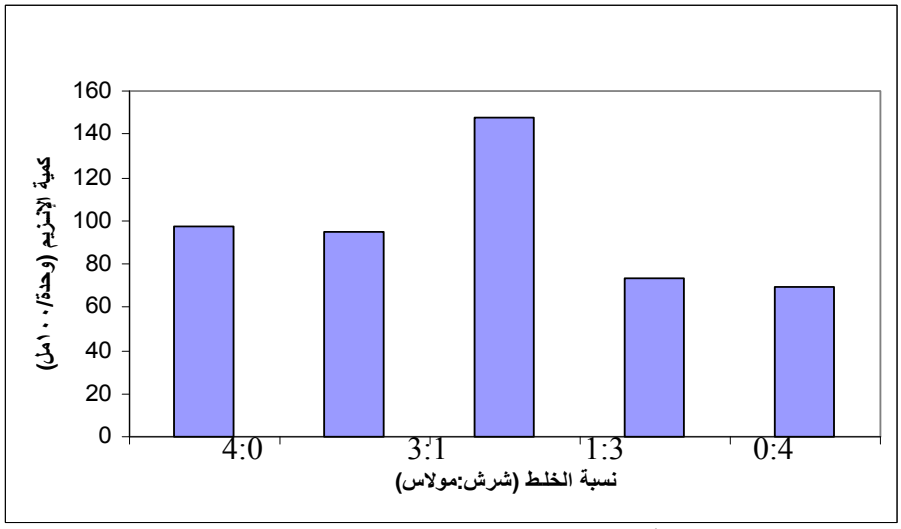
إنتاج إنزيم المانيتول ديهايدروجينيز باستخدام أوساط غذائية طبيعية:

نُميّت البكتريا المنتخبة *Lb. brevis* في أوساط غذائية طبيعية شملت الشرش (من معمل ألبان قسم علوم الأغذية والتقانات الإحيائية) والمولاس (من الشركة العامة لصناعة السكر في الموصل) (14% مواد صلبة) والدبس (من معمل طيبة في الموصل) المعدل 10% مواد صلبة وعدّل الأس الهيدروجيني إلى 5.8 للأوساط جميعها. وبعد تنميتها مدة يومين قيست الفعالية الإنزيمية في المستخلص الخلوي للبكتريا المنماة في الأوساط الثلاثة فكانت 135.74 و85.41 و23.71 وحدة انزيمية/ 100 مل بعد عشر دقائق من التعرض للموجات فوق الصوتية على التوالي (الشكل 1). وقد اختير الشرش والمولاس للدراسات اللاحقة بسبب إعطائهما نتائج جيدة للنمو، ولكونهما نواتج عرضية يمكن الحصول عليهما بسهولة من مصانع الألبان والسكر. أما الدبس فقد استبعدَ لإعطائه نتائج غير مشجعة، وقد يعود السبب إلى افتقاره لبعض العناصر الغذائية الضرورية لنمو البكتريا أو لاحتوائه على بعض مثبطات النمو.

استخدم مزيج الشرش والمولاس بنسب مختلفة لتنمية البكتريا شملت 4:صفر و3: 1 و1:1 و1: 3 وصفر:4. وبعد انتهاء النمو وجمع الخلايا وتكسيرها قدّرت الفعالية الإنزيمية في المستخلصات الخلوية حيث بلغت الفعالية 97.566 و95.253 و147.314 و73.657 و69.415 وحدة إنزيمية/ 100 مل وسط غذائي للأوساط المذكورة أعلاه على التوالي (الشكل 2). وتبيّن النتائج أن مزيج الشرش والمولاس (1:1) كان الأفضل في إنتاج إنزيم المانيتول ديهايدروجينيز من بكتريا *Lb. brevis*، لذلك فقد اختير للدراسات اللاحقة واستبعدت بقية الأوساط.



الشكل (1) تأثير مدة التعرض للموجات فوق الصوتية في كفاءة استخلاص الإنـــزيم مـــن الخلايا واختيار الوسط الأفضل



الشكل (2) تأثير نسبة الخلط بين الشرش والمولاس في إنتاج الإنزيم

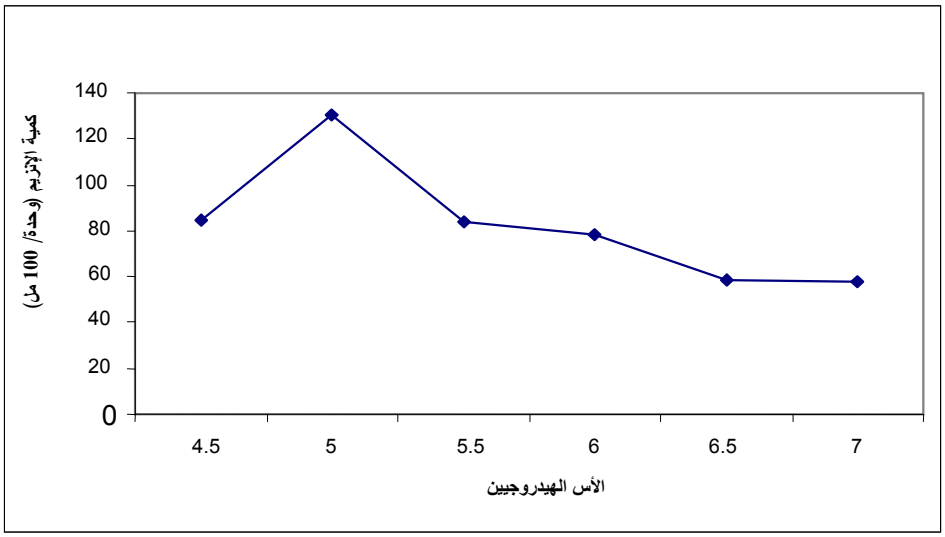
تأثير بعض العوامل في إنتاج الإنزيم

تأثير الأس الهيدروجيني:

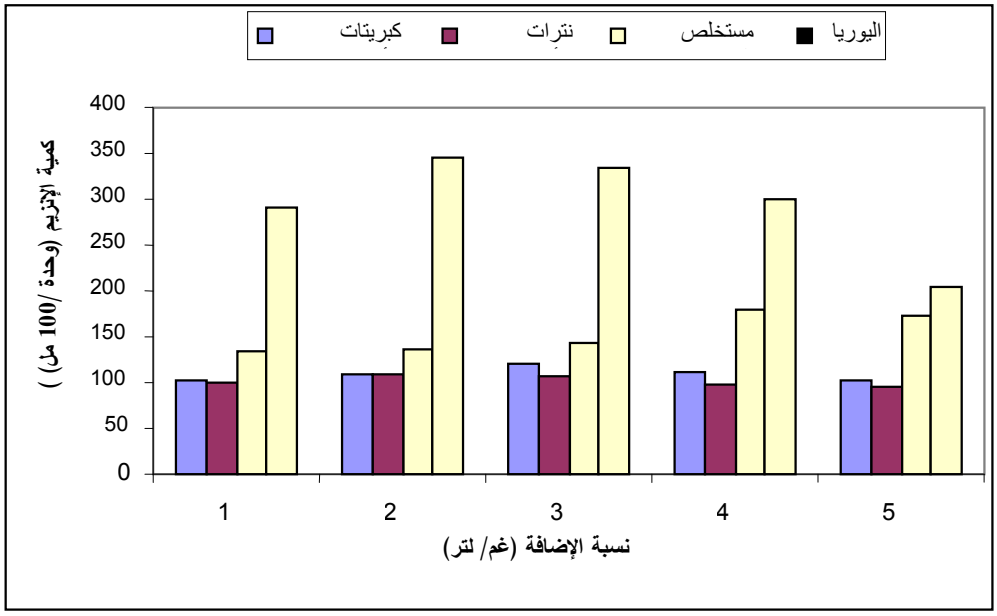
نُمّيت البكتريا في وسط مزيج الشرش والمولاس بنسبة 1:1 بعد ضبط الأس الهيدروجيني بقيم متتالية تراوحت بين 4.5–7، وحضنت بدرجة حرارة 37 ْم مدة يومين، ثم أجريت عملية تكسير الخلايا البكتيرية وقدّرت الفعالية الأنزيمية في المستخلص الخلوي، وقد لوحظ أن الأس الهيدروجيني 5 كان الأفضل في إنتاج الأنزيم إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 130.1 وحدة أنزيمية/ 100 مل، وانخفض إنتاج الخلايا للأنزيم كلما ابتعدنا عن هذا الرقم إذ انخفضت الفعالية الأنزيمية إلى 57.84 وحدة أنزيمية/ 100 مل عند الأس الهيدروجيني 7 والمبينة في الشكل (3)، وهذه النتيجة مقاربة لما ذكره Martinez وآخرون (1963) وLiu وآخرون (2005)، حيث وجدوا أن الأس الهيدروجيني لإنزيم المانيتول ديهايدروجينيز هو 5.35 مما يمكّنه من استخدام كل من NADH وNADPH كعامل مساعد لاختزال الفركتوز إلى المانيتول. وقد ذكر Weymarn (2002) أن إنتاج المانيتول يتأثر بالأس الهيدروجيني كثيراً، في حين أنه لا يتأثر كثيراً بدرجات الحرارة، وأن أفضل ناتج للمانيتول كان عند الأس الهيدروجيني 4.8 ودرجة حرارة 28 ْم من بكتريا *Leuc. Mesenteroides*، وذكر أيضاً أن الناتج النوعي للمانتيول يتأثر بهذه الظروف، وكانت أحسن منطقة للاستجابة المثلى للناتج النوعي عندما تراوح الأس الهيدروجيني بين 5.4–5.8 وفي درجة حرارة بحدود 33–35 م°، وعلى هذا الأساس اختير الأس الهيدروجيني 5.2 ودرجة حرارة 32 م° لتنمية هذه البكتريا ودراسة الظروف المثلى لإنتاج المانيتول.

تأثير المصدر النتروجيني:

أُضيفت كبريتات الأمونيوم ونترات الأمونيوم كمصدر غير عضوي للنتروجين إلى وسط مزيج الشرش والمولاس 1:1 بتراكيز 1 و2 و3 و4 و5 غم/ لتر، كما أضيف كذلك مستخلص الخميرة واليوريا كمصدر عضوي للنتروجين وبالنسب السابقة الذكر نفسها. لقحت الاوساط بالبكتريا وحضنت، ثم أجريت عملية التكسير للخلايا وقيست الفعالية الإنزيمية للعينات جميعها كما هو مبين في الشكل (4)، وقد لوحظ أن التراكيز 0.3% من كبريتات الأمونيوم و0.2% من نترات الأمونيوم و0.4% من مستخلص الخميرة و0.2% من اليوريا قد أعطت أعلى فعالية للإنزيم، إذ بلغت 119.35 و108.36 و178.55 و344.56 وحدة إنزيمية/ 100 مل على التوالي.



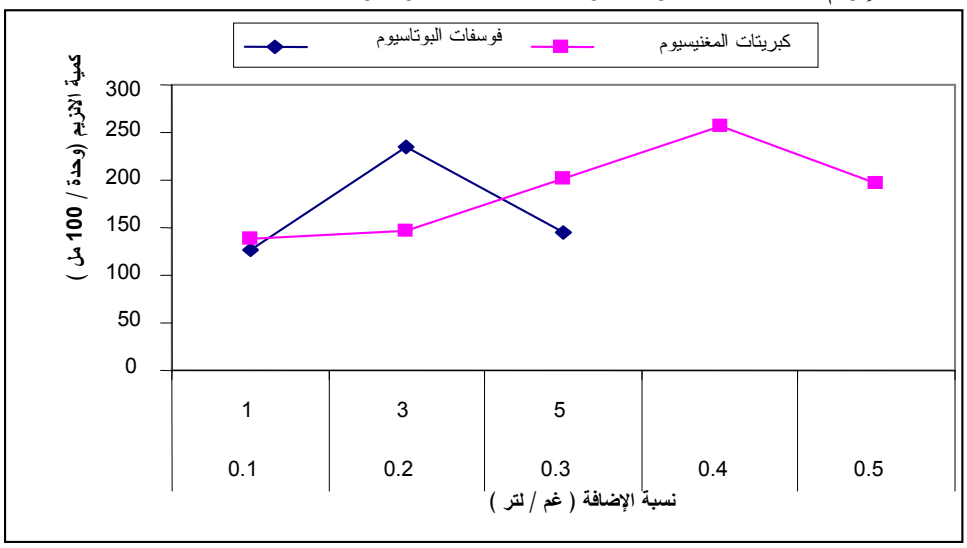
الشكل (3) تأثير الأس الهيدروجيني في إنتاج الإنزيم في وسط مزيج الشرش والمولاس (1:1)



الشكل (4) تأثير المصدر النتروجيني في إنتاج الإنزيم في وسط مزيج الشرش والمولاس (1:1)

تأثير المصدر المعدني:

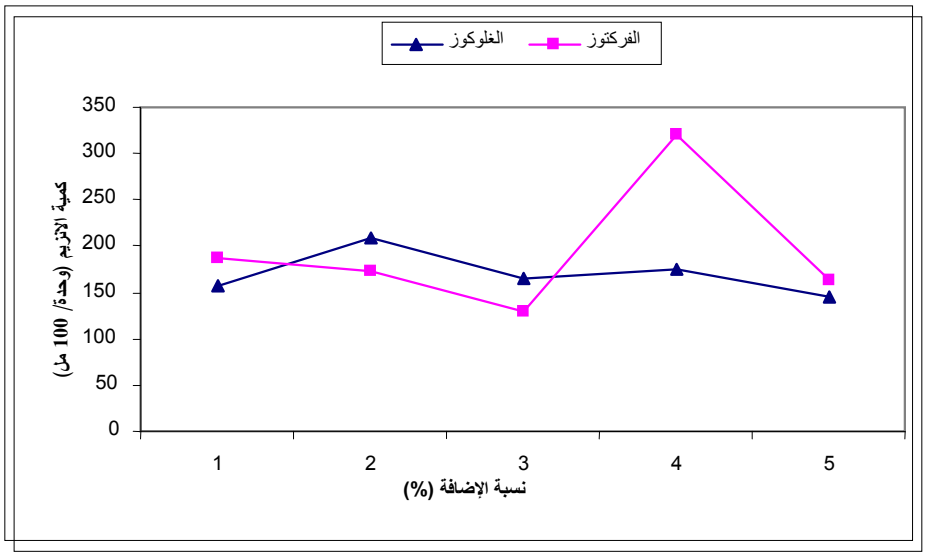
حُضّر الوسط الغذائي من مزيج الشرش والمولاس 1:1 وأضيف إليه مادة فوسفات البوتاسيوم الثنائي بتراكيز 1 و3 و5 غم/ لتر، ومادة كبريتات المغنيسيوم بتراكيز 0.1 و0.2 و0.3 و0.4 و0.5 غم/لتر، وبالطريقة السابقة نفسها تم التلقيح بالبكتريا والتحضين وإجراء التكسير ثم قياس الفعالية الإنزيمية في المستخلص الخلوي. وتفوقت النسبة 3 غم/لتر من فوسفات البوتاسيوم الثنائي 0.4 غم/ لتر من كبريتات المغنيسيوم إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 235.43 و256.25 وحدة إنزيمية/100 مل على التوالي (الشكل 5) حيث وجد Weymarn (2002) أن إنتاج المانيتول الحجمي يتأثر نوعاً ما لدى إزالة أيونات المنغنيز ($Mn2^{+}$) من وسط النمو لكل من بكتريا *Lb. brevis* و*Lb. fermentum* و*Leuc. mesenteroides* و*Leuc. pseudomesenteroides* حيث انخفض الناتج الحجمي بنسبة 6 و32 و9 و17% على التوالي بالمقارنة مع الانخفاض الأقل عند إزالة أيونات المغنيسيوم ($Mg2^{+}$)؛ وذلك بنسبة 2–4% للبكتريا نفسها جميعها، ولذلك كانت إضافة أيونات المنغنيز وأيونات المغنيسيوم إلى الوسط ضرورية، كما وجد أيضاً عدم تأثير فعالية إنزيم المانيتول ديهايدروجينيز لدى مضاعفة التراكيز.



الشكل (5) تأثير تركيز فوسفات البوتاسيوم وكبريتات المغنيسيوم في إنتاج الإنزيم في وسط مزيج الشرش والمولاس (1:1)

تأثير المصدر الكاربوني:

أضيف كل من الفركتوز والكلوكوز كل على حدة إلى وسط مزيج الشرش والمولاس 1:1 وبتراكيز بلغت 1 و2 و3 و4 و5% لكّل منهما، ولقحت بالبكتريا وأجريت عملية التكسير وقياس الفعالية الإنزيمية فيها. يبيّن الشكل (6) أن الوسط الحاوي على 2% من الكلوكوز والوسط الحاوي على 4% من الفركتوز قد أعطيا أعلى فعالية للإنزيم بلغت 208.43 و 320.65 وحدة إنزيمية /100 مل وسط على التوالي.



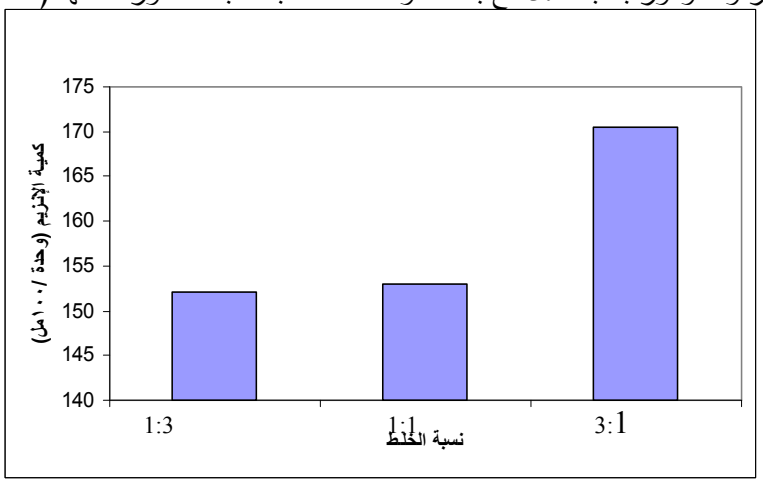
الشكل (6) تأثير المصدر الكاربوني في إنتاج الإنزيم في وسط مزيج الشرش والمولاس (1:1)

بعدها أجريت تجربة أُضيف فيها الفركتوز والغلوكوز بنسبة 1:3 و1:1 و3:1 إلى الوسط المذكور لتوضيح تأثيرهما المشترك وبنسب مختلفة، حيث لوحظت زيادة في إنتاج البكتريا للإنزيم بزيادة نسبة الفركتوز إلى الغلوكوز، وقد بلغ الناتج 152.13 و152.90 و170.45 وحدة إنزيمية/ 100 مل على التوالي ويوضحها الشكل (7).

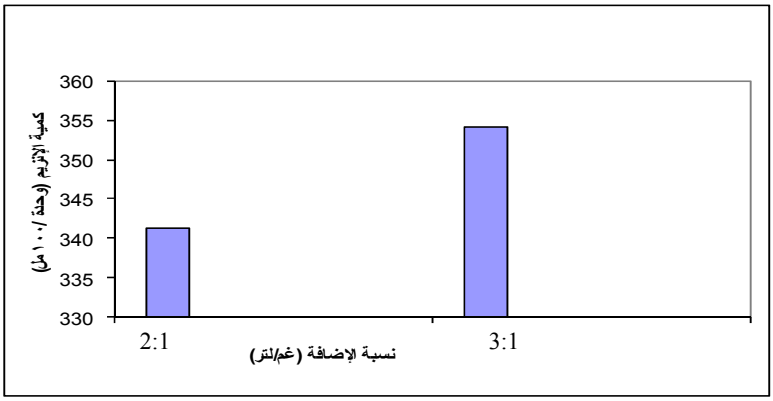
مما يدل على زيادة كفاءة البكتريا لإنتاج الإنزيم بوجود الفركتوز كمحفز ولكونه ركيزة (Substrate) للإنزيم المذكور؛ مما يدل على أن هذا الإنزيم هو من الإنزيمات الاستبداء (Induced enzymes) التي يحفز اصطناعها في الخلية عند توافر الركيزة في وسط النمو. وهذا يتفق مع ما ذكره Weymarn (2002) وWeymarn وآخرون (2002) إلا أن زيادة نسبة الفركتوز في بيئة التحول الحيوي تؤدي إلى زيادة سرعة تحول الفركتوز إلى مانيتول ولكنها لا تزيد من إنتاج المانيتول مما يشير إلى الإنتاج الكبير للإنزيم ويؤدي أيضاً إلى زيادة سرعة التحول.

دراسة تأثير مجمل الظروف المثالية في كمية الإنزيم:

قيست الفعالية الإنزيمية للوسط الغذائي مزيج الشرش والمولاس 1:1 بتطبيق النسب التي حصلنا عليها والتي أعطت أعلى قيمة لفعالية الإنزيم بعد ضبط الأس الهيدروجيني على 5 إضافة الفركتوز والغلوكوز بنسبة 2:1 وفوسفات البوتاسيوم 3 غم/ لتر و0.4 غم/ لتر كبريتات المغنيسيوم و0.3% كبريتات الأمونيوم و0.2% نترات الأمونيوم و0.4% مستخلص الخميرة و0.2% يوريا، وقد تم الحصول على فعالية إنزيمية مقدارها 341.29 وحدة إنزيمية/ 100 مل مقارنة بـ 354.2 وحدة إنزيمية/100 مل عند إضافة الفركتوز والكلوكوز بنسبة 3:1 مع بقاء المواد المضافة بالنسب المذكورة نفسها (الشكل 8).



الشكل (7) تأثير نسبة الخلط بين الفركتوز والكلوكوز



الشكل (8) تأثير مجموع الظروف المثلى في إنتاج الإنزيم في وسط مزيج الشرش والمولاس (1:1)

REFERENCES المراجع

Ashwell, G. (1957). Colorimetric analysis of saccharides, In: Colowich SP, Kaplan NO, eds. Methods in Enzymology, Vol. 3. New York. Academic Press Inc., p. 73-105.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. (1986). Williams and Wilkins. Baltimore. MD21202. U.S.A. P. 1208-1232.

Bisset, K. A.; and G. H. G. Davis. (1960). The microbial flora of the mouth. London Heywood & Company/LTD. p. 45-53.

De-Man, J. C.; M. Rogosa; and M. E. Sharp. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 23: 130-135.

Furia, T. E. (1972). Handbook of food additives, 2nd ed. CRC Press, West Palm Beach, Fla.

Harrigan, W. F.; and M. E. McCance. (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. INC. (London). LTD.

Holt. J. G.; M. E. Sharpe ; N. S. Mair ; and P.H.A. Sneath. (1986). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore and London.

Korakli, M. ; E. Schwarz; G. Wolf; and W. P. Hammes. (2000). Production of mannitol by Lactobacillus sanfranciscensis. Adv. Food Sci. 22: 1-4.

Liu, S.; B. Saha; and M. Cotta. (2005). Cloning, expression, purification, and analysis of mannitol dehydrogenase gene mtlk from Lactobacillus brevis. Appl. Brochem Biotechnol. 121-124: 391-401 (ISSN: 0273-2289).

Makkee, M.; A. P. Kieboom; and H-von Bekkum. (1985). Production methods of D-mannitol. Starch, 37: 136-141.

Martinez, G.; H. A. Barker; and B. L. Horecker. (1963). A specific mannitol dehydrogenase from Lactobacillus brevis, J. Biol. Chem. 238: 1598-1603.

Robinson, R. K. (1990). Dairy Microbiology Vol. 1. The microbiology of milk. Second edition. London and New York.

Soetaert, W.; P.T. Vanhooren; and E. J. Vandamme. (1999). Production of mannitol by fermentation, methods Biotechnol. 10 (Carbohydrate Biotechnology Protocol) 261-275.

Weymarn, N.; M. Hujanen; and M. Leisola. (2002). Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. Proc. Biochem. 37: 1207-1213.

Weymarn, N. (2002). Process development for mannitol production by Lactic acid Bacteria. Espoo, Finland. Dissertation of Dictorial.

Yoo, S.K.; Y. S. Chang; and S. Kim.(2005). Production of mannitol by Leuc. sp. strain immobilized activated carbon. IFT Annual Meeting, July 15-20 New Orleans Louisiana.

Yun, J. W.; and D. H. Kim. (1998). A comparative study of mannitol production by two lactic acid bacterial. Journal of Fermentation and Bioengineering. Vol. 85, No. 2, . 203-208.

Received	2008/01/31	إيداع البحث
Accepted for Publ.	2008/10/13	قبول البحث للنشر