Optimization of condiction for Exopolysaccharid(EPS) production from *Lactobacillus Plantarum* localy isolated

تحديد الظروف المثلى لأنتاج متعدد السكريات الخارج خلوي Exopolysaccharid (EPS) من بكتريا *Lactobacillus Plantarum* المعزولة محلياً

أ.م.د. ناجح هاشم كاظم [1] و بيداء مهدي عباس [x]
جامعة كربلاء /[1] قسم علوم الحياة / كلية العلوم
x البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

الخـــلاصـة

درست الظروف المزرعيـــة والبيئيـــة المثلـــى لانتـــاج متعـــدد السكريـــات الخـــارج خلـــوي مـــن العزلـــة المحليـــة *Lactobacillus Plantarum* المنتخبة في دراسة سابقة وأوضحـــت النتائج ان أفضل هذه الظروف كانت باستعمال الوسط الإنتاجي simplified synthetic medium الذي يحتوي على عصير التمر الزهدي بتركيز 5% (سكريات مختزلة) مصدراً للكاربون ومستخلص الخميرة بتركيز 0.2% مصدراً للنيتروجين ودعم هذا الوسط بـ(كبريتات المغنيسيوم وفوسفات البوتاسيوم) بتركيز كلي 0.9% مصدراً للأملاح المعدنية وعدل الرقم الهيدروجيني(pH) الابتدائي الى6.5 وحجم لقاح 3% حجم / حجم من الوسط و الحضن بظروف لاهوائية بدرجة حرارة 35م° ولمدة 24ساعة وتم استخلاص EPS باستعمال الايثانول بتركيز 95%

الكلمات المفتاحية :متعدد السكريات الخارج خلوي ، لاكتوباسلس بلانترم، بوليمر حيوي

Abstract

The optimum cultural and ecological condition for Exopolysaccharid Production from *Lactobacillus PLantarum* localy isolated were studied Results revealed that , using production medium (simplified synthetic medium)containing date juice (5%) as a carbon source and yeast extract (0.2%) as a nitrogen source, the media was supplemented with a total concentration 0.9% of (magnesium sulphate and potassium phosphate) as mineral salts. The primary pH was adjusted to 6.5 and the inoculum size was 3%(v/v), isolate were grown under anaerobic condition at 35 C^o for 24 h and the EPS extracted with ethanol 95%.

Key words: Exopolysaccharid, *Lactobacillus Plantarum*, biopolymer

1-المقدمـــــة

أدى الطلب المتزايد في السنوات الأخيرة للمتعددات الطبيعية وفي مختلف التطبيقات الصناعية والتقنيات الحيوية الى زيادة الاهتمام في انتاج المتعددات السكرية الخارج خلوية **Exopolysaccharide (EPS)** من الأحيـــاء المجهرية ، تستخـدم هذه المتعددات كمواد امتصاص حيوي ومغلفة وعوامل لإزالـــة الايونات الثقيلة فضلاً عن كونها عوامل حاملة للعلاجـــات(Cariar) وراتنجات للتبـــادل الأيـــوني(ion exchang resins) (1) .

ينتج EPS من النباتات والطحالب والاحياء المجهرية بيد أن استعمال الاحياء المجهرية لانتاج EPS يعد أكثر ملاءمة لان عوائد العملية الإنتاجية سريعة وبحصيلة كبيرة وفي ظروف تخمر مسيطر عليها إذ تستغرق عملية الإنتاج أياماً أو أسابيع اما في النباتات فتستغرق عملية النتاج عدة أشهر، فضلاً على التغيرات الموسمية والجغرافية التي قد تؤثر على النباتات (2) . كما ان لـ EPS المنتج من الأحياء المجهرية خصائص ريلوجية جيدة ، كذلك مقاومة جيدة للتحلل في درجات الحرارة العالية والثبات في مدى واسع من الرقـم الهيدروجينـــي ، وان أعتبـار الدكستران والزانثان المنتج من البكتريا آمن غذائياً من إدارة الأغذيـة والعقاقيـر الأمريكيـة مهـد الطريـــق لمـدى واسـع مـن التطبيقـــات للـ EPS المايكروبـي، ان الجدوى الأقتصادية المرتبطة مع الانتاج الصناعي العامل الرئيس الذي يحد من استعمالEPS . إذ انه غالباً ما يصاحب تسويق EPS الميكروبي عملية إنتاجية طويلة ومكلفة لضمان توافقها و سلامتها كمضافات غذائية لذلك فأن من بين الأنواع البكتيرية المختلفة والمنتجة لـ EPS أستقطبت بكتريا حامض اللاكتيك اهتماماً خاصاً وذلك لخصائص متعدد السكريات الخارجي الذي تنتجه كونه لا يحمل أي مخاطر صحية وكذلك فأن بكتريا حامض اللاكتيك تعتبر آمنة غذائياً (GRAS). كذلك لـ EPS المنتج من LAB تطبيقات واسعة ومهمة في تعزيز الخصائص الريلوجية والقوام والمذاق لمنتجات الحليب المخمرة التي تتضمن الألبان والأجبان وغيرهـا (3).

فضلاً عما سبق يستعمل EPS الذي تنتجه بكتريا حامض اللاكتيك بوصفه محفزات حيوية (prebiotic) تعمل على تحفيز نمو النبيت الطبيعي للأمعاء وزيادة أعداد البكتريا المفيدة في الأمعاء مثل بكتريا *Bifidobacterium* مما يشجع على تثبيط نمو الممرضات الميكروبية والتصاقها (4 ; 5) كما يمتاز بقابليته على البقاء في القناة الهضمية لمدة طويلة مما يتيح الفرصة لتحفيز استيطان بكتريا المعززات الحيوية(propbiotic) (6). وعلى الرغم من ذلك فأن المتعددات الحيوية الطبيعية لاتزال محددة بجزء صغير من أسواق المتعددات الحالي والسبب يعود الى التكلفة الإنتاجية العالية ، لذلك هدفت هذه الدراسة الى انتاج EPS من بكتريا محلية ودراسة الظروف المثلى للأنتاج وأمكانية إنتاجه من خلال استعمال مواد أساسية رخيصة الثمن ومتوفرة وجاءت هذه الدراسة متماشية مع الهدف .

2-المواد و طرائق العمل

العزلة البكتيرية

أستخدمت العزلة البكتيرية *L. Plantarum* المعزولة والمشخصة في دراسة سابقة لانتاج EPS منها

انتاج EPS من بكتريا *Lactobacillus Plantarum*

أستعمل وسط (**Simplified synthetic medium**) حسب الطريقة الموصوفة من قبل(9) كوسط لانتاج EPS من بكتريا *L. Plantarum* إذ يتكون هذا الوسط من المواد التالية (غم/ لتر) فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين(Na_2HPO_4) 5غم ، فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) 6 غم ، سترات الأمونيوم الثلاثية 2 غم ، كبريتات المغنيسيوم ($MgSO_4$) 1غم، سكروز 50 غم و محلول الأملاح النزرة Trace element solution 10 مل .إذ ان **Trace element solution** يتكون من المواد التالية مذابة في لتر من الماء المقطر (كبريتات الحديد ($FeSO_4$) 5غم،كبريتات المنغنيز ($MnSO_4$)2غم، كلوريدالزنك1غم، كلوريد الكوبلت1غم . ثم وزع الوسط في عبوات زجاجية (Vials) معقمة سعة 20 مل وبواقع 9.98 مل لكل عبوة وبثلاث مكررات لكل عزل ولقح بأضافة 200 مايكروليتر .

استخلاص متعدد السكريات الخارجي

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (10) في استخلاص متعدد السكريات الخارجي مع بعض التحويرات إذ بعد انتهاء مدة الحضن تم وضع وسط التخمر في حمام مائي بدرجة 90 مئوية ولمدة 10 دقائق وتم فصل الخلايا عن وسط التخمر باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق ، جففت الخلايا لغرض حساب الوزن الجاف للكتلة الحيوية في حين أستعمل الراشح إذ أضيف اليه Trichloroacetic acid (TCA) بتركيز 8 % (حجم / حجم) وترك لمدة 3 ساعات بدرجة 4 م° ثم أجريت له عملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق وذلك لترسيب البروتين الموجود في الوسط بعد ذلك اهمل الراسب وأخذ الرشح وأضيف اليه حجمين من الإيثانول المبرد بتركيز 95% وترك بدرجة 4 م° لمدة 24 ساعة ثم فصل EPS بوساطة الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة / دقيقة لمدة 12 دقيقة إذ أهمل الراشح وجفف الراسب بدرجة 40 م° لمدة 24 ساعة لغرض حساب الوزن الجاف .

نوع المذيب المستخدم في استخلاص وترسيب EPS: تم استعمال وسط Simplified synthetic medium لإنتاج EPS وبعد انتهاء مدة الحضن تم استعمال عدد من المذيبات (الأيثانول والميثانول والأسيتون والكلوروفورم وأسيتون و فورمالدهايد والايزوبروبانول) لترسيب EPS . ثم استعملت تراكيز مختلفة من الايثانول لترسيب EPS من الراشح المستخلص إذ حضرت تراكيز مختلفة من الإيثانول (35, 50 ،65 ،80 ،95) % وتم أضافة حجمين من كل تركيز الى حجم من الراشح المستخلص .

تحديد الظروف المثلى لإنتاج EPS من العزلة المنتخبة

نوع الوسط الإنتاجي: تم اختبار ثلاث أوساط إنتاجية شائعة الاستعمال لإنتاج EPS من بكتريا *L.Plantarum* وهي: أوسط Simplified synthetic medium و وسط(MRS broth) ووسط (Skim Milk Medium) . .

تأثير مدة الحضن : لقح وسط الإنتاج بحجم لقاح 2% ووضع في الحاضنة في ظروف لاهوائية و بدرجة حرارة 35 م° ولفترات زمنية مختلفة (18 ،24 ،48 ،72 ،96) ساعة.

تأثير درجة حرارة الحضن : حضن وسط انتاج EPS والملقح ببكتريا *L.Plantarum* لمدة 24 ساعة بظروف لاهوائية في درجات حرارة حضن مختلفة (25،30 ،35، 37 ، 40 ،45) م° لتحديد درجة الحضن المثلى للإنتاج.

نوع المصدر الكاربوني وتركيزه: استعملت مصادر كاربونية مختلفة (عصير التمر والشرش و السكروز و الفركتوز والمالتوز و الكالاكتوز و عدم وجود مصدر كاربوني) لبيان تأثير المصدر الكاربوني في انتاج EPS. ثم استعملت تراكيز مختلفة من عصير التمرالزهدي الذي استعمل كمصدر للكاربون في الوسط الانتاجي ليعطي تراكيز متدرجة من السكريات المختزلة (2.5 ،5 ،7.5 ، 10 ،12.5) % لتحديد التركيز الأمثل من عصير التمر لإنتاج EPS من العزلة المنتخبة إذ قدرت السكريات المختزلة في وسط عصير التمر بطريقة (Miller,(1959.

نوع المصدر النيتروجيني وتركيزه : استعملت كبريتات الأمونيوم و سترات الأمونيوم الثلاثية ومستخلص الخميرة والتربتون واليوريا كمصادر نيتروجينية في الوسط الإنتاجي،ثم استعملت تراكيز متدرجة من مستخلص الخميرة (0.0، 0.1 ،0.2، 0.3 ، 0.4، 0.5) % لتحديد التركيز الأمثل من المصدر النيتروجيني لإنتاج EPS من العزلة البكتيرية المنتخبة.

نوع الأملاح المعدنية وتركيزها: درس تأثير كبريتات المغنيسيوم المائية ($MgSO_4.7\ H_20$) وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين(KH_2PO_4)ومحلول العناصر النزرة (Trace element solution) كمصادر للاملاح المعدنية لتحديد نوع

الاملاح المعدنية الأفضل لإنتاج EPS ، ثم استعملت كبريتات المغنيسيوم وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين معاً كمصدر للأملاح المعدنية وبنسب مختلفة

الرقم الهيدروجيني الابتدائي :وزع الوسط الإنتاجي في دوارق زجاجية وعدل الرقم الهيدروجيني في هذه الدوارق الى (4.5، 5 ، 5. 5 ، 6 ، 6.5، 7، 7.5) وبعد تلقيحه بالعزلة المنتخبة حضن الوسط في ظروف لاهوائية وبدرجة حرارة حضن 35 م° لمدة 24 ساعة ثم أستخلص EPS من الوسط وجفف ثم وزن لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لانتاج EPS .

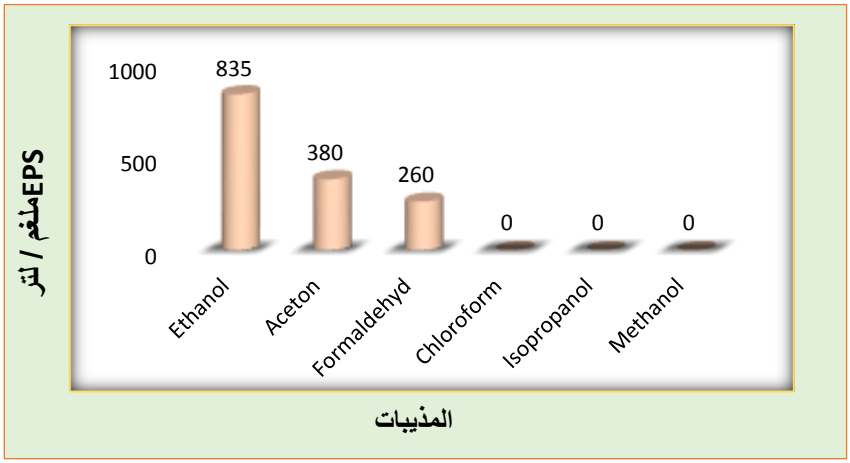
حجم اللقاح :لقح الوسط الانتاجي بحجوم لقاح مختلفة (1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5) % من حجم الوسط ثم أستخلص EPS من الوسط وتم تجفيفه ووزن لبيان تأثير حجم اللقاح في انتاج EPS من العزلة المنتخبة.

التحليل الأحصائي

أستعمل التصميم العشوائي الكامل (Completely Randomized Design) اذ أعتمدت قيمة (L.S.D.) على مستوى احتمالية 0.001 في جميع التجارب (11).

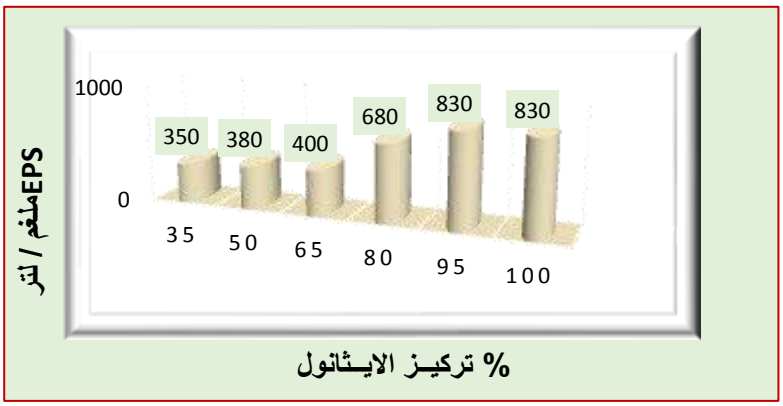
النتائـــــــــج والمناقشـــــــة

1-نوع المذيب المستخدم وتركيزه: يتضح من الشكل(1) ان كمية EPS المستخلص كانت (835) ملغم / لتر عند استعمال الايثانول و (380، 260) ملغم / لتر عند استعمال(الاسيتون و الفورمالديهايد) على التوالي في حين ان الميثانول والكلوروفورم و الايزوبروبانول لم يظهر أي تأثير في ترسيب EPS . تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما وجده (14) اذ أعطى الايثانول أعلى فعالية لترسيب EPS المستخلص من بكتريا *Bacillus subtilis* بالمقارنة مع المذيبات الأخرى المستعملة في تلك الدراسة. استعملت تراكيز مختلفة من الايثانول (35 ، 50 ، 65 ،80، 95 ، 100) % لاستخلاص EPS من الوسط ومن الشكل (2) يتضح انه أفضل ترسيب للـ EPS عند إضافة الايثانول بتركيز(95 ، 100) % وأستعمل التركيز 95% في التجارب اللاحقة لعدم وجود فرق معنوي .



L.S.D= 8.341

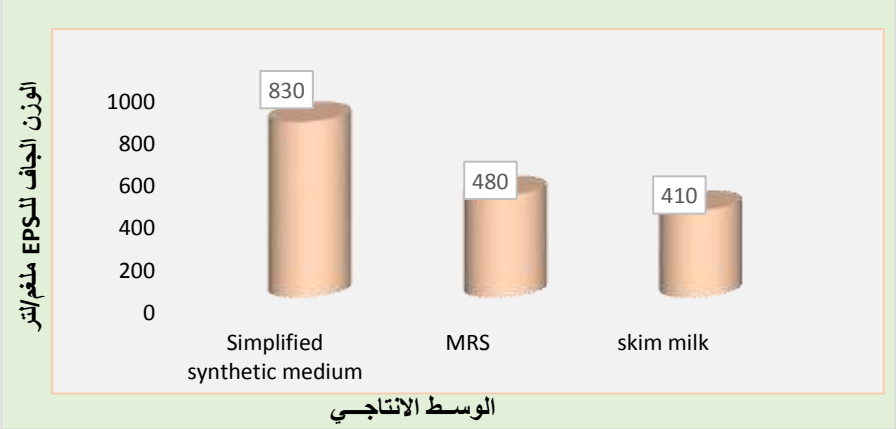
الشكل (1) :تأثير نوع المذيب المستخدم لأستخلاص EPS المنتج من بكتريا *L. plantarum*



L.S.D = 11.239

الشكل (2): تأثير تركيز الايثانول المستخدم في استخلاص EPS المنتج من بكتريا *L. plantarum*

2-نوع الوسط الإنتاجي : قورن انتاج EPS من بكتريا *L. plantarum* باستعمال ثلاثة أنواع من الأوساط الإنتاجية إذ أظهرت النتائج المبينة في الشكل (3) ان أعلى انتاج للمتعدد كان باستعمال وسط Simplified synthetic medium. أظهرت نتائج دراسات أخرى ان حصيلة انتاج EPS تعتمد على نوع الوسط الإنتاجي ،فقد بين (12) ان تنمية بكتريا *Lactobacillus plantarum*,strain 301102S في وسط الشرش المدعم بمستخلص الخميرة والسكروز اعطى حصيلة انتاج EPS بلغت 145 ملغم / لتر بينما بلغت كمية EPS المستخلص من بكتريا *L. plantarum* باستعمال وسط MRS السائل 659 ملغم / لتر(13) .

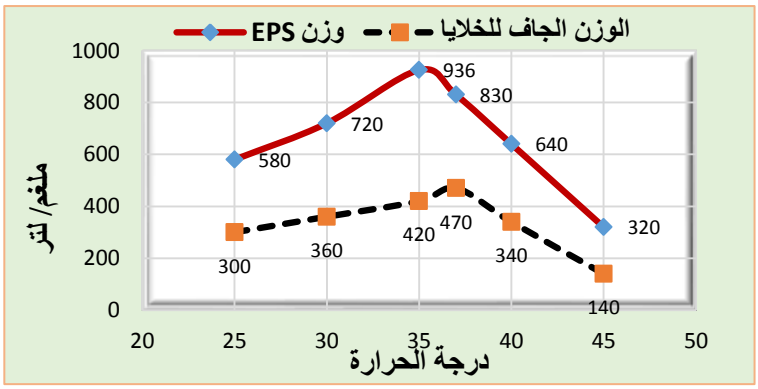


L.S.D = 15 .359

الشكل (3) :تأثير نوع الوسط في انتاج EPS من بكتريا *L. plantarum*

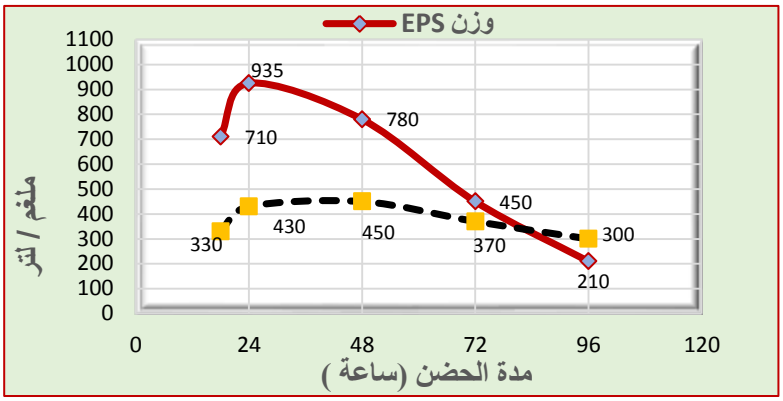
3-تأثير درجة حرارة الحضن: درس تأثير درجة حرارة الحضن في انتاج EPS من بكتريا *L. Plantarum* وأظهرت النتائج الموضحة في الشكل (4) ان أعلى انتاج للـ EPS عند درجة حرارة 35 م° اذ بلغت كمية EPS المنتج 936 ملغم / لتر ، مما يشير الى ان درجة الحرارة المثلى للانتاج هي 35 م° ،ومن الشكل (4) يلاحظ ان درجة الحرارة المثلى لنمو البكتريا 37 م° ومن ذلك يتبين بأن افضل انتاج للـ EPS يكون في درجات حرارية أقل من الدرجة المثلى لنمو الكائن المجهري المنتج للـEPS . ويمكن تفسير ذلك بأن تباطئ نمو الخلايا لانخفاض درجة الحرارة يؤدي الى تباطئ تصنيع بوليمرات الجدار الخلوي وبذلك فان فوسفات الأيزوبرينويد isoprenoid phosphate ستكون متوفرة لتعمل كناقل في تصنيع EPS(15) .

4-تأثير مدة الحضن :تم حساب الوزن الجاف للـ EPS المستخلص من بكتريا *Lactibacillus plantarum* خلال فترات زمنية مختلفة وكما مبين في الشكل (5)، يلاحظ ان ا أقصى انتاج للـ EPS كان بعد 24 ساعة من نمو المزرعة اذ وصل الى 935 ملغم / لتر وهذه النتيجة تتفق مع ما وجده(16) الذي ذكر انه عند تنمية بكتريا *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* CRC 002 في وسط يحتوي على اللاكتوز كمصدر للكاربون فان أعلى انتاج للـEPS كان بعد فترة حضن 24 ساعة إذ بلغ 1080 ملغم/لتر.وبعد مدة الحضن المثالية بدأ انتاج EPS بالانخفاض تدريجياً حتى انخفض الى 210 ملغم /لتر بعد 96 ساعة من الحضن .ان انخفاض انتاج EPS في مدة الحضن الطويلة يعزى الى وجود الانزيمات المحللة (enzymes degradation) التي تسبب تفكك المتعدد السكري (17) .



L.S.D = 8.137

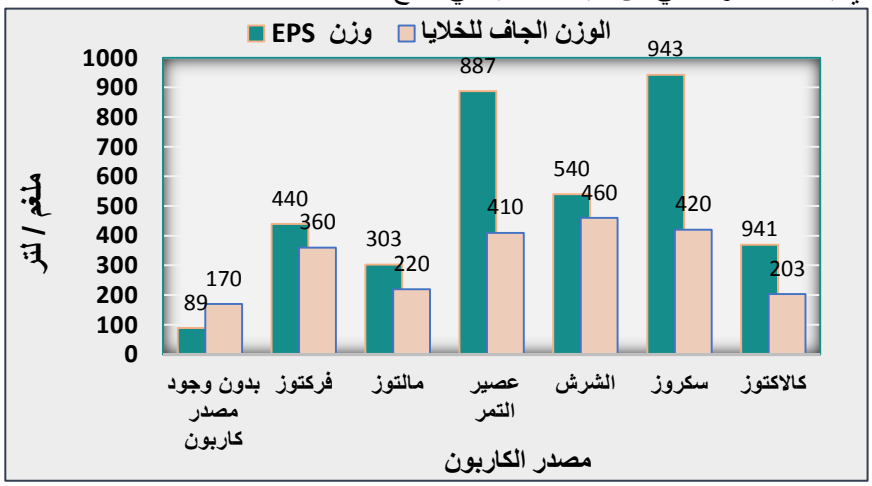
الشكل (4) :تأثير درجة حرارة الحضن في انتاج EPS من بكتريا *L. Plantarum*



L.S.D = 11.386

الشكل (5) :تأثير مدة الحضن في انتاج EPS من بكتريا *L. plantarum*

5-تأثير نوع المصدر الكاربوني وتركيزه : أظهرت النتائج المبينة في الشكل (6) ان أعلى انتاج للـ EPS كان عند استعمال السكروز كمصدر للكاربون إذ بلغت كمية الإنتاج 941 ملغم / لتر بينما بلغت كمية EPS المنتجة عند استعمال عصير التمر كمصدر للكاربون 887 ملغم / لتر ، ويبدأ الإنتاج بالانخفاض استعمال المصادر الكاربونية الأخرى ومن تلك لنتائج يتضح ان عصير التمر الزهدي يعد المصدر الثاني من حيث الأهمية في انتاج EPS

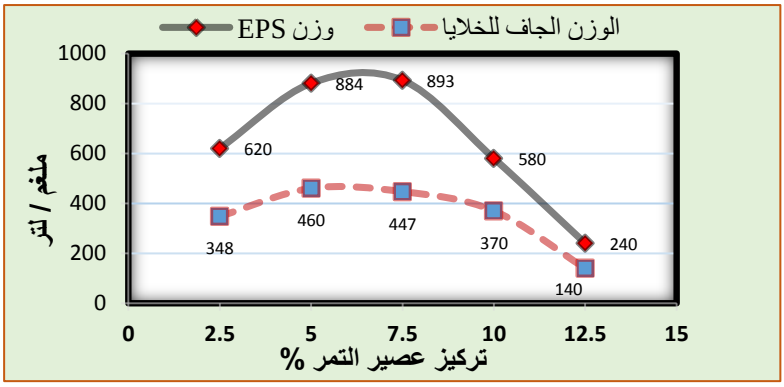


L.S.D =10.334

الشكل (6) : تأثير نوع المصدر الكاربوني في انتاج EPS من بكتريا *L. plantarum*

يتبين من النتائج أعلاه ان انتاج المتعددات السكرية الخارج خلوية يختلف بأختلاف نوع المصدر الكاربوني وقد أشير الى ذلك في دراسات أخرى فقد ذكر (18) الى ان أعلى انتاج للـEPS أستحصل عليه عند تنمية بكتريا *Streptococcus thermophiles* LY03 لانتاج المتعدد في وسط يحتوي على اللاكتوز كمصدر وحيد للكاربون . ويلاحظ مما سبق ذكره اختلاف المصادر الكاربونية المناسبة لانتاج EPS باختلاف الكائن المجهري وعزى (19) سبب ذلك الى اختلاف قابلية الأحياء المجهرية على استهلاك المادة الأساس والمسار الحيوي الذي تسلكه ، إضافةً الى ذلك فان خطوات الأيض الأضافية التي تدخل في تخليق EPS من المصادر الكاربونية المختلفة قد تؤثر في معدل انتاج EPS . لقد كان هناك اهتماماً كبيراً لاستعمال المصادر الخام في دراسات انتاج EPS من الأحياء المجهرية نظراً لأن كلفة المادة الأساس المستخدمة كمصدر للكاربون في الوسط الذي تنمى فيه الأحياء المجهرية يشكل عبئاً على الكلفة الكلية في انتاج EPS لذلك فقد تم استعمال عصير التمر كمصدر للكاربون في جميع التجارب اللاحقة .

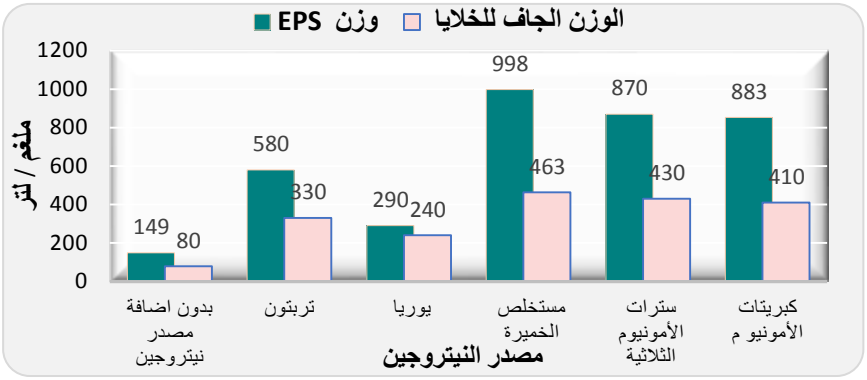
اما بالنسبة لتأثير تركيز عصير التمر كمصدر وحيد للكاربون في انتاج EPS فقد أظهرت النتائج المبينة في الشكل (7) ان أعلى كمية انتاج من EPS عند التراكيز (5 و 7.5) % إذ بلغت (884 و893) ملغم / لتر ولعدم وجود فرق احصائي معنوي بينهما فقد استعمل التركيز 5% كأفضل تركيز من عصير التمر وتم استخدامه في جميع مراحل الدراسة اللاحقة. وقد أوضح (20) ان سبب النقصان في كمية EPS المنتج والكتلة الحيوية لبكتريا *Rhodotorula glutinis* المنماة في وسط يحتوي على الكلوكوز كمصدر للكاربون بأن الزيادة في تركيز الكلوكوز في الوسط الزرعي السائل يؤدي الى زيادة لزوجة الوسط بسبب زيادة المتعدد السكري الخارجي المتجمع وان الزيادة في لزوجة الوسط تؤدي الى قلة الأوكسجين المتوفر وتوزيع غير صحيح للمواد في الوسط (imperfect mixing) وتثبيط النقل بين الخلايا والمواد الغذائية وبالتالي نقصان في انتاج EPS.



L.S.D = 9.973

الشكل (7): تأثير تركيز عصير التمر في انتاج EPS من بكتريا *L. plantarum*

6-تأثير نوع المصدر النيتروجيني وتركيزه : أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (8) ان مستخلص الخميرة هي المصدر النيتروجيني الأكفأ في انتاج EPS مقارنة بباقي المصادر النيتروجينية المستخدمة اذ بلغت كمية المتعدد المنتج 998 ملغم / لتر بينما كان اقل انتاج للمتعدد عند استعمال اليوريا كمصدر للنيتروجين في الوسط إذ بلغت 290 ملغم / لتر لذا فقد تم اعتماد هذه النتيجة وتم استخدامها في جميع مراحل الدراسة اللاحقة .

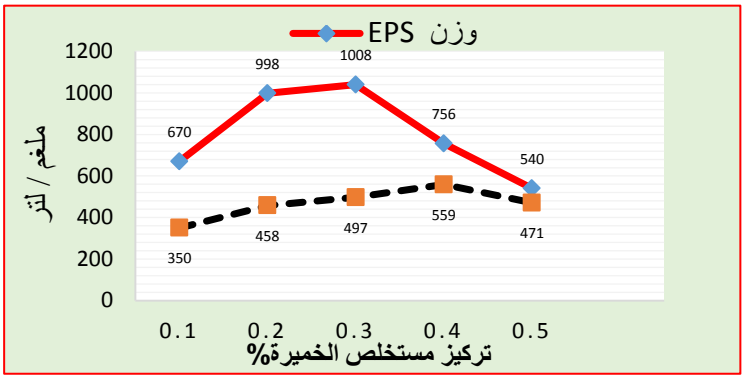


L.S.D = 11.409

الشكل (8) : تأثير نوع مصدر النيتروجين في انتاج EPS من بكتريا *L. plantarum*

وقد يعزى ذلك الى احتواء هذا المصدر النيتروجيني العضوي على الأحماض الأمينية والببتيدات والأملاح والكثير من عوامل النمو والتي تؤثر في نمو الكائن المجهـــري وإنتـاجEPS (21). ولحاجة بكتريا *Lactobacilli* الى الفيتامينات المختلفة للنمو وإنتاج EPS (22) فأن مستخلص الخميرة هي مصدر مناسب للنيتروجين لأنها توفر المكونات الأساسية مثل الفيتامينات و الأحماض النووية (13) .

وبعد ان تم تحديد المصدر النيتروجيني الأمثل لأنتاج EPS درس تأثير تراكيز مختلفة من مستخلص الخميرة لتحديد التركيز الأمثل لأنتاج المتعدد ، وقد بينت النتائج الموضحة في الشكل (9) ان انتاج EPS بدأ يرتفع بزيادة تركيز مستخلص الخميرة في الوسط إذ كان أعلى انتاج للمتعدد عند استعمال مستخلص الخميرة بتركيز(0.2 و 0.3) % اذ بلغ (998 و 1008) ملغم / لتر على التوالي واعتماداً على النتائج المستحصل عليها فقد تم استعمال مستخلص الخميرة بتركيز 0.2% في مراحل الدراسة اللاحقة لعدم وجود فرق معنوي في الإنتاج عند استعمال التركيزين(0.2 و0.3) % .



L.S.D = 10.215

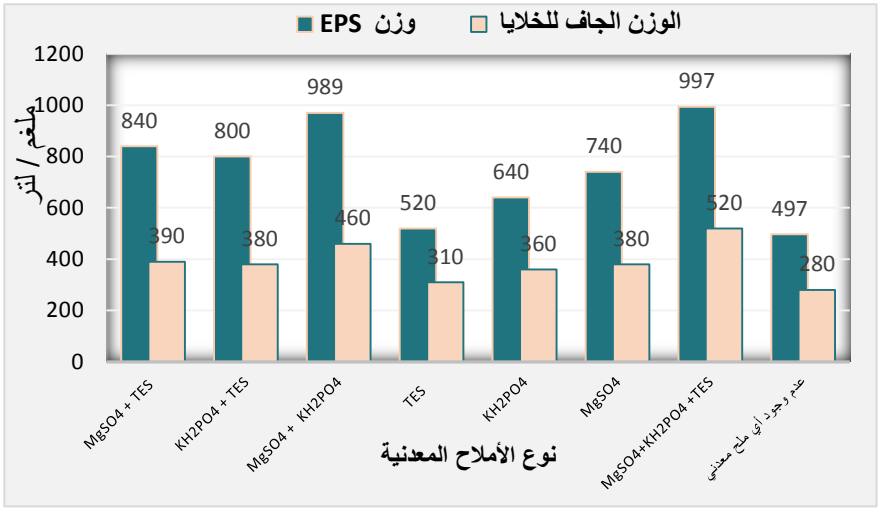
الشكل (9): تأثير تركيز مستخلص الخميرة في انتاج EPS من بكتريا *L. plantarum*

ان النتيجة المستحصلة من هذه الدراسة تتفق مع ما ورد في العديد من الدراسات فقد أظهرت نتائج دراسة (24) انه عند تنمية بكتريا *Rhodotorula glutinins* في وسط يحتوي على مستخلص الخميرةبتركيز3% كمصدر للنيتروجين تم الحصول على أعلى انتاج للمتعدد (EPS) إذ بلغت كميته 2.6 غم / لتر .

7-نوع الأملاح المعدنية وتركيزها

درس تأثير نوع الأملاح المعدنية في انتاج EPS من بكتريا *L. plantarum* إذ أظهرت النتائج المبينة في الشكل (10) ان أفضل انتاج للمتعدد997 ملغم / لتر عند احتواء الوسط على كبريتات المغنيسيوم وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ومحلول العناصر النزرة ولم يكن هنـاك فرق كبيـر في الإنتـاج عند احتواء الوسط على كبريتات المغنيسيوم وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين فقط إذ بلغـت كمية الإنتاج 989 ملغم / لتر ، في حين انخفض انتاج المتعدد عند استعمال كبريتات المغنيسيوم وفوسفات البوتاسيوم ومحلول العناصر النزرة (كلاً على حده).

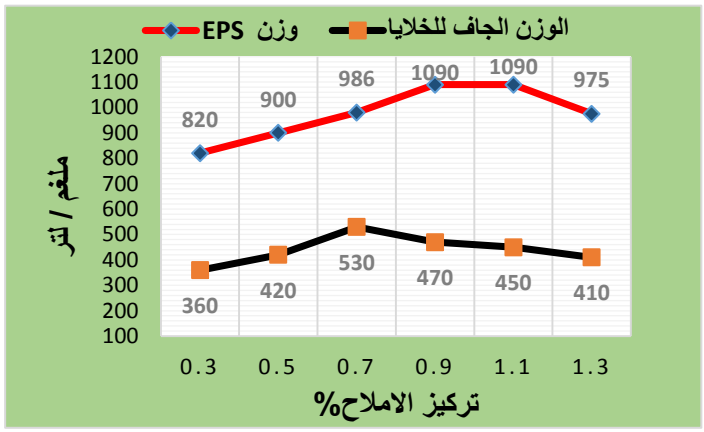
ان توفر الأملاح المعدنية في وسط التخمر يعد أحد العوامل الضرورية لأنتاج EPS من الأحياء المجهرية إذ ذكر (25)ان الأملاح المعدنية المضافة تشكل مصدراً للأيـونات التي تؤثـر علـى الفعالية التحفيزية للإنزيمات اللازمة لنمو الخلايا وإنتاج EPS . كما يـعد أيون المغنيسيوم أحد المكونات الرئيسية في وسط التخمر التي تدعم نمـو الخلايا وعمليات الأيض الإنتاجية المختلفة ، وله أيضـاً دور كبـير في تفعيـل نظام امتصاص السكر(26) .



L.S.D = 8.129

الشكل (10) : تأثير نوع الأملاح المعدنية في انتاج EPS من بكتريا *L. plantarum*

كما تم دراسة تأثيـــر التراكيز المتدرجة للأملاح المعدنية في انتاج EPS إذ أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (11) ان انتاج هـذا المتعدد يزداد بزيادة تراكيز االملحين الكلية في الوسط ،إذ ان انتاج EPS بلغ أقصاه عند التركيزين (0.9 و1.1) % ،اما عند زيادة التركيز فيلاحظ انخفاض كمية EPS المنتج .

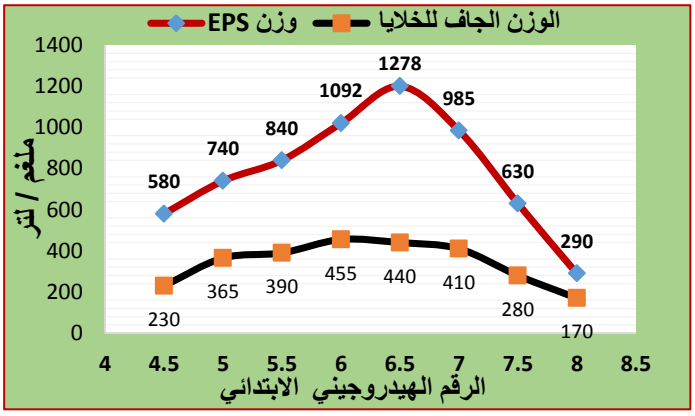


L.S.D = 8.832

الشكل (11): تأثير تركيز الأملاح المعدنية (كبريتات المغنيسيوم +فوسفات البوتاسيوم) في انتاج EPS من بكتريا *L. plantarum*

8-تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي

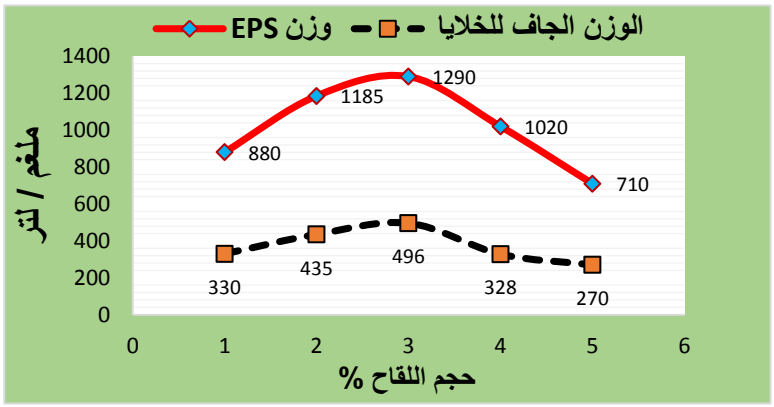
ان تأثير الرقم الهيدروجيني الأبتدائي للوسط الزرعي في انتاج EPS من بكتريا *L. plantarum* موضح في الشكل (12) إذ يلاحظ ان انتاج المتعدد بشكل أفضل في مدى رقم هيدروجيني(PH) يتراوح بيـن 6-7 الا ان أعلى انتاج للمتعدد تحقق عند الرقم الهيدروجيني6.5 إذ بلغت كمية EPS المنتج 1278 ملغم / لتر .اما عند الرقم الهيدروجيني 5 فيلاحظ انخفاض في انتاج المتعدد ، وقد يعزى ذلك الى ارتفـاع حموضة الوسط مما يسبب الضغط الحامضي (acid stress) على الخلايا (27)، وان البكتريا المنتجة للمتعدد السكري قد تحمـــي نفسهـــا اتجاه الضغط البيئي (environmental stress) من خلال تنظيم طـــرح EPS الذي تنتجـــه (28)



L.S.D = 8.281

الشكل (12) : تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في انتاج EPS من بكتريا*L. plantarum*

9-تأثير حجم اللقاح : لبيان تأثير حجم القاح في انتاج EPS من بكتريا *L. plantarum* لقح وسط الإنتاج باستعمال حجوم لقاح متدرجة (1 و 2 و3 و 4 و5)% وبينت النتائج الموضحة في الشكل(13) ان انتاج EPS يزداد بزيادة حجم اللقاح حتى يصل الى أعلى انتاج للمتعدد 1290 ملغم /لتر عند استعمال حجم القاح 3% . ان نتائج هـذه الدراسة تتفـــق مع دراسات أخرى اذ استعمل حجم اللقاح 3% لانتـــاج EPS من بكتريـــا *Lactococccus lactis* NCDC (29) . بينمـا استعمل حجـم اللقاح 2% لانتـــاج EPS مـــن بكتريا *Lactobacillus bulgaricus* (30) .



L.S.D = 11.360

الشكل (13) : تأثير حجم اللقاح في انتاج EPS من بكتريا *Lactibacillus plantarum*

المصادر:

1- Donot, F.; Fontana, A.; Baccou, J.C.; Schorr-Galindo, S. (**2012**) Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohyd Polym*, 87:951–962.

3- Garai-Ibabe G, Aeizaga J, Aznar R, Elizaquivel P, Prieto A, Irastorza A & Dueñas MT (**2010**) Screening and selection of 2-branched (1,3)-β-D-glucan producing lactic acid bacteria and exopolysaccharide characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,58: 6149-6156.

4-Callaway T. R. , Edrington T. S., Anderson R. C., Harvey R. B.,Genovese K. J., Kennedy C. N. ,Venn D.W. and Nisbet D. J.(**2008**). Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease, *Animal Health Research Reviews*. 9(2):217–225.

5-Macfarlane S., Macfarlane G. T. and Cummings J. H. (**2006**).ًReview article- Prebiotics in the gastrointestinal tractً,Alimentary *pharmacology and Therapeutics*, 24: 701 – 714.

6- Yadav,V.; Prappulla,S.G.; Jha,A. & Poonia,A.(**2011**). A novel exopolysaccharide from probiotic *Lactobacillus fermentum* CFR 2195: Production, purification and characterization . Research Article, *Biotechnol. Bioinf. Bioeng*. 1(4):415-421.

7-الطائي ، سعاد رضا متعب .(**2011**) . انتاج وتنقية حامض اللاكتيك من خلايا مقيدة لبكتريا *Lactobacillus* المعزولة محليا" . رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة كربلاء.

8- Holt, J.H.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.T. & Williams, S.T. (**1984**). Group 17: gram-positive cocci. In W. R. Hensyl (Ed.) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th ed.). Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins., 527-558.

9- Vijayendra, S.V.N.; Palanivel, G. Mahadevamma, S.& Tharanathan, R.N .(**2008**). Physico-chemical characterization of 4 an exopolysacchairde produced by a non-ropy strain of *Leuconostoc* sp. CFR 2181 . 72:300-307.

10- Kanmani P., Satishkumar R., Yuvaraj N., Paari K. A., Pattukumar V., Arul V., (**2011**). Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium functional characteristics activity in vitro, *Bioresource Streptococcus phocae* PI80 and its *Technology*,102(7): 4827–4833.

11-Levesque , R. (**2007**). Spss Programing and Data Management : Aguid for SPSS and SAD Users , Fourth Edition , SPSS Inc ., Chicago.

12- Tsuda,H.&Miymoto,t.(**2009**).Production of Exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the Prebiotic Activity of the Exopolysaccharide. *Food Sci. Technol. Res.*, 16 (1), 87 – 92.

13- Haroun,B.M.; El- Menoufy, H.A.; Amin, H.A.& A. El-Waseif,A.(**2013**). Biosynthesis and Morphology of an Exopolysaccharide from a Probiotic *Lactobacillus plantarum* under different growth conditions. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(2): 1256-1265, ISSN 1819-544X.

14-Razack, S.A.; Velauyutham,V.; Thangavelu,v.(**2013**). Medium optimization for the production ofexopolysaccharide by *Bacillus subtilis* usingsynthetic sources and agro wastes **.** *Turk J Biol*, 37: 280-288.

15- Sutherland, I.W. (**2001**). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, 11: 663-674.

16- Audy, J.; Labrie, S.; Roy, D.& LaPointe, G .(**2010**). Sugar source modulates exopolysaccharide biosynthesis in *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* CRC 002. *Microbiology* .156: 653–664.

17- Zisu,B.& Shah,N.P .(**2003**). Effects of pH, Temperature, Supplementation with Whey Protein Concentrate, and Adjunct Cultures on the Production of Exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *J. Dairy Sci*. 86:3405–3415.

18- Degeest, B., L. De Vuyst. (**2000**). Correlation of activities of the enzymes α-phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. *Applied and Environmental Microbiology* 66(8):3519–3527.

19-Lindberg, B. (**1990**). Components of bacterial polysaccharides. *Adv. Carbohyd. Chem.Biochem*.48:279-318.

20- Cho, D.H.; Chae,H.J.& Kim, E.Y. (**2001**). Synthesis and characterization of a novel Extracelluular polysaccharide by *Rhodotorula glutinis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 95: 183-193.

21- Polak-berecka,M.; Wasko,A.;Szwajgier,D.& Choma,A.(**2013**). Bifidogenic and Antioxidant Activity of Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus rhamnosus* E/N Cultivated on Different Carbon Sources. *Polish Journal of Microbiology* Vol. 62, No 2, 181–189.

22- Grobben G.J.; Chin-Joe,I.; Kitzen, V.A. ; Boels, I.C. ; Boer, F. ; Sikkema, J. ; Smith, M.R. & De Bont, J.A.M. **(1998**). Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1333–1337.

23- Amrane A. & Pringent,Y.(**1998**). Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: Growth and production coupling. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 529–534.

24- Ibrahim,G.S.; Mahmoud,M.G, ; Asker,M.M.S. & Ghazy,E.A**.(2012**). Production and Biological Evaluation of Exopolysaccharide From Isolated *Rhodotorula glutinins* . Australian *Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(3): 401-408, ISSN 1991-8178.

25- Kaur, V.; Bera, M.B. ; Panesara, P.S. & Chopra, H.K.(2013). Production and Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Alcaligenes Faecalis* B14 Isolated from Indigenous Soil. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research.ISSN* 2231-1238, Vol: 4(4), pp. 365-374.

26-El Enshasy, H.; Then, C.; Othman, N. Z. ;Al Homosany, H; Sabry, M.; Sarmidi, M. R.& Aziz, R. A. (**2011**). Enhanced xanthan production process in shake flasksand pilot scale bioreactors using industrial semi-defined medium. *Afr. J.Biotech.* **10**(6): p. 1029-1038.

27- Vaningelgem, F.; Van der Meulen, R.; Zamfir, M.; Adriany, T.;, Laws, A.P.; & De Vuyst, L. (**2004a**). *Streptococcus thermophilus* ST 111 producesa stable high-molecular-mass exopolysaccharide in milk-based medium.*International Dairy Journal*, 14, 857–864.

28- Broadbent, D.J. ; McMahon, D.L.; Welker, C.J.; Oberg & S. Moineau. (**2003**). Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science* .86:407–423.

29- Prathima1, P.C.; Lule1,V.K.; Tomar,S.K. & Singh,A.K.(**2014**). Optimization of Exopolysaccharide production by *Lactococccus lactis* NCDC 91 by Response Surface Methodology .

30- EL-Gizawy, S.A.; Olfat; Barakat,S.; Sharaf,M.; EL-Shafei,K.; Fathy,F.A. & EL-Sayed,S.H.(**2013**). Effect of growth conditions on the production of exopolysaccharides by microencapsulated *Lactobacillus bulgaricus* and use it to improve quality of Kareish cheese. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(2): 1097-1109.