Production and characterization of Exopolysaccharid(EPS) from local isolate *Lactobacillus Plantarum* and test the biological Activities

انتاج وتوصيف متعدد السكريات الخارج خلوي Exopolysaccharid(EPS) من بكتريا *Lactobacillus Plantarum* المعزولة محلياً وأختبار فعاليته البايولوجية

أ.م. د. ناجح هاشم كاظم بيداء مهدي عباس
جامعة كربلاء /[1] قسم علوم الحياة / كلية العلوم

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

الكلمات المفتاحية :متعدد السكريات الخارج خلوي ، لاكتوباسلس بلانترم ،الفعالية البايلوجية

الخـــلاصـــة

تم انتاج المتعدد السكري الخارج خلوي (EPS) من العزلة المحلية *Lactobacillus plantarum* والتي انتخبت من بين 45 عزلة بكتيرية منتجة لهذا المتعدد تمثلت بأجناس بكتريا *Lactobacillus* spp. و*Bacillus* spp. و *Psedomonas* spp. والتي شخصت

فيمـا بعـد بالفحوصات البايـوكيميائية والقابليـة على تخميـر السكريات على انهـا *Lactobacillus plantarum* ، وبعـد الإنتاج أخضع هذا المستخلـص الى التنقية الجزئية بأستعمال المذيب العضوي Trichloroacitic acid(TCA) و أغشيـة الديلـزة وكانت الحصيلـة لخطوتي التنقيـة (77.4 و63.8) %على التوالي . وتم توصيفه باستعمال مطيافية الأشعة تحـت الحمـراء Fourier Transform Infrared Spectroscopy(F.T.I.R) ، وقدر وزنه الجزيئي بـ 2.3 * 10^5 دالتون وذلك باستعمال مقياس اللزوجة (Viscometer) وظهرت بقعتان عند فصله بكروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) إذ ميزت على انها كلوكوز و كالاكتوز. وكانت له فعالية بايلوجية واضحة ضد بعض أنواع البكتريا المرضية مثمثلة بـ *Proteus* spp. و *Bacillus cererus* و *Stenotrophomonas* بأقطار تثبيط (23 و 21و 19) ملم على التوالي ، في حين لم يظهر فعالية تثبيطية للفطريات كما أظهرت النتائج امتلاكه فعاليته مضادة للأكسدة بطريقة كسح الجذور الحرة باستعمال الجذر ABTS إذ بلغت IC_{50} عند التركيز 100 مايكروغرام /مل .

Abstract

Exopolysaccharid (EPS) Produced by local isolate *Lactobacillus* spp. which selected among 45 bacterial isolates producing this polymer represented by *Lactobacillus* spp. , *Bacillus* spp. and *Psedomonas* spp. the isolate has been identified by biochemical test and the ability fermented sugars as *lactobacillus plantarum* . After production two steps were used for partial purification of the polymer as follows, the first step by using Trichloroacitic acid (TCA) solvent and the second step by dialysis the yields were(77.4 and 63.8)% for the two purification steps respectively.The polymer was characterization by using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (F.T.I.R) with molecular weight 2.3 * 10^5 Dalton by using viscometer and showed two spots when separated by Thin Layer Chromatography (TLC) which is identifide as a glucose and galactose. The polymem showed antibacterial activity against some types of pathologenic bacteria *Proteus* spp.,*Bacillus cererus* and *Stenotrophomonas* spp.with an inhibition zone diameter of (23,21 and 19) mm respectively.While, there was no inhibitory effect against fungi. Antioxidant activity has also been tested,where IC_{50} value against ABTS free radical was at 100 Mg / ml.

1-المقدمـــة

تمتلك بكتريا حامض اللاكتيك دوراً أساسياً في الإنتاج الصناعي لمنتجات الالبان المخمرة اذ ان أنشطتها الانزيمية ومنتجاتها الأيضية التي تتولد أثناء التخمر تمنح هذه المنتجات الصفات الريولوجية المطلوبة والمعروف ان بعض سلالات بكتريا حامض اللاكتيك تنتج متعدد السكريات الخارج خلوي (EPS) (1) وهي جزيئات عالية الوزن الجزيئي ، يتكون الهيكل التركيبي لها من وحدات سكرية ، اذ ان ثمالات السكريات الأحادية ترتبط مع بعضها بوساطة أواصر كلايكوسيدية مكونة متعدد السكريات (2).
ان إنتاج الـEPS البكتيري يتم بشكلين أساسيين: متعدد السكريات الخارجي المحفظي (capsular EPS) ومتعدد السكريات الخارجي الهلامي (slime EPS) ويتم التمييز بين الأثنين من درجة ارتباطهما بسطح الخلية ، خارج الخلية الميكروبية يرتبط EPS تساهمياً مع سطح الخلية مكون المحفظة ، أو يبقى غير مرتبط ويتواجد بشكل طبقة هلامية ، وان أغلب أنواع البكتريا تظهر ميلاً لتكوين وإنتاج احد الأنواع أكثر من الآخر (3) . يمتلك EPS دور هام في الصناعات الغذائية مثل الالبان المخمرة والاجبان والحلويات (4) وبسبب خصائصه الفيزيائية والكيمائية الفريدة من نوعها فأن EPSs البكتيرية تستخدم وبشكل واسع في الصناعات الغذائية كعوامل لزوجة واستحلاب ومثبت (5). كما ان EPS البكتيري أصبح في السنوات الأخيرة بديلاً بالغ الأهمية في مختلف الصناعات الطبية والصيدلانيـة كعوامل محفزة للمناعية ومضـادة للأورام ومضادة للفيروسـات ومضادات للحساسية ومضادات أكسدة (6) . ان المركبات المضـادة للأكسدة لهـا دور هـام فـي عـلاج الالتهابـات المزمنـة وتصلب الشـرايين والسرطان و الاضطرابات القلبيـة الوعائيـة ، لكـن معظم هـذه المضادات الكيميائية الصناعية لهـا تأثيـرات جانبيـة سلبيـة مثل أضـرار الكبـد والتسبب فـي أنـواع أخـرى مـن السرطان ، لـذا جـاءت الحاجة الـى تطويـر مضـادات أكسـدة طبيعيـة أكثر فعاليـة لمنـع الآثار الجانبيـة الضـارة المتولـدة مـن الجذور الحـرة (5)، ويعد EPS مضاد أكسدة طبيعي (7). وكان هدف هذه الدراسة انتاج EPS من عزلة ميكروبية محلية وتوصيفه واختبار فعاليته الحيوية مختبرياً .

2-المـــواد و طـــــرائـق العمـــل

العـــزلات البكتيريـــة :

- **بكتريا .*Bacillus* spp:** عزلت بكتريا.*Bacillus* spp من التربة (من مناطق مختلفة من محافظة كربلاء المقدسة) حسب الطريقة الموصوفة من قبل (8) وشخصت أوليا من خلال تصبيغ البكتريا بصبغة كرام و اختبار تكوين السبورات .
- بكتريا .**Pseudomonas spp** *:* تـم الحصول عليـها مـن دراسـات سابقـة كليـة العلوم / قسم علـوم الحيـاة فـي جامعة كربلاء.
- **بكتريا .*Lactobacillus* spp :** عزلت بكتريا .*Lactobacillus* spp من مصادر مختلفة (ألبان رائبة معملية (youghurt) و حليب خام والشـرش و ألبان ريفيـة) وحسب الطريقة المتبعة من (9) .

انتاج متعدد السكريات الخارج خلوي (EPS) : أخضعـت جميـع العـزلات البكتيرية للغربلـة الكميـة الخاصـة بإنتاج EPS إذ استعملت طريقة الترسيب بالكحول الاثيلـي البـارد لاستخلاص متعدد السكريات الخارجي حسب الطريقـة المتبعة من قبل(10) باستعمال الوسط الإنتاجي **Mineral growth medium** للعزلات التابعة لجنس .*Bacillus* spp (11). واستعمل الوسـط الانتاجي (**Nitrogen free medium** (NFM للعـزلات التابعـة لجنس .*Pseudomonas* spp (12). بينـما استعمل الوسـط الإنتاجـي (**Simplified synthetic medium**) للعزلات التابعة لجنس .***Lactobacillus* spp** (13).

اسـتخلاص متعدد السكريات الخارجي: أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (10) فـي استخلاص متعـدد السكريـات الخارجـي مـع بـعض التحويرات إذ بعـد انتهاء مدة الحضن تم وضع وسط التخمر في حمام مائي بدرجـة 90 مئوية ولمدة 10 دقائق وتم فصل الخلايا عن وسط التخمر باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق . جففت الخلايـا لغـرض حساب الوزن الجاف للكتلة الحيويـة في حيـن أستعمل الراشح إذ أضيف اليه Trichloroacetic acid (TCA) بتركيزه 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 بدرجـة 40 م° لمدة 24 ساعة لغرض حساب الوزن الجاف .
تشخيص العزلة المنتخبة : شخصت بكتريا *Lactobacillus* على وفق ما جاء في(14) إذ تم الأعتماد على الصفات المظهرية والفحوصات الكيموحيوية في تشخيص البكتريا والتي تضمنت تصبيغ البكتريا و اختبار الحركة واختبارات الكاتليز والأوكسديز والاندول واستهلاك السترات وتمييع الجيلاتين وتخمر السكريات واختزال النترات واليوريز والمثيل الأحمر وفوكس بروسكار .

التنقيـة الجزئيـة لمتعـدد السكريـات الخارج خلوي

تمت التقية الجزئية بخطوتين : الخطوة الأولى بأضافة مذيب عضوي (Trichloroacetic acid (TCA والخطوة الثانية باستعمال أغشية الديلزة (14 KDa) لمدة 24 ساعة وبـدرجة حـرارة 4 مئوية مع تبديل الماء الموجود في الانـاء كل 6 ساعات(15)

توصيف متعدد السكريات الخارج خلوي

تحليل مطيافية الأشعة تحت الحمراء Fourier transform infrared spectroscopy(FTIR) : تم دراسة طيف الأشعة تحت الحمراء لمادة EPS في ثلاث مراحل : المرحلة الأولى بعد استخلاص EPS من وسط الإنتاج باستعمال الايثانول والمرحلة الثانية بعد إضافة TCA والمرحلة الثالثة بعد تنقيته جزئياً بعملية الديلزة وتم قياس طيف الأشعة تحت الحمراء في مدى من الأعداد الموجية (400-4000)سم$^{-1}$ وتم تثبيت جميع الحزم الظاهرة مع أعدادها الموجية .

تقدير الكاربوهيدرات الكلية بطريقة (الفينول – حامض الكبريتيك) : تم تقدير الكاربوهيدرات الكلية بطريقة (الفينول – حامض الكبريتيك) الموصوفة من قبل (16).

تقدير البروتين: أستعملت طريقة (17) لتقدير البروتين في EPS المستخلص والمنقى جزئياً باستعمال ألبومين المصل البقري (Bovine Serum Albumin,BSA) بروتيناً قياسياً .

تقدير الوزن الجزيئي: تم تقدير الوزن الجزيئي للـ EPS المستخلص حسب الطريقة الموصوفة من قبل (18) . باستعمال مقياس اللزوجة (viscometer).

فصل متعدد السكريات الخارجي المستخلص بطريقة كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة

Thin Layer Chromatography(TLC):

تم فصل EPS حسب الطريقة المستخدمة من قبل (19) مع بعض التحوير وذلك باستعمال صفائح هلام السليكا بأبعاد 20×20 سم طوراً ثابتاً اما الطور المتحرك تكون من (الأسيتونايترل وخلات الأثيل و ايثانول و ماء مقطر) بنسبة(85 و 25 و 25 و 15 حجم / حجم / حجم /حجم) على التوالي أما محلول الأظهار(كاشف الرش) فقد حضر بمزج حامض الكبريتيك بتركيز 5% مع الايثانول(حجم / حجم) .

أختبار الفعالية البايلوجية لمتعدد السكريات الخارج خلوي المستخلص من العزلة المنتخبة

أختبار فعالية متعدد السكريات الخارج خلوي في تثبيط الأحياء المجهرية

أ – البكتريا

-العزلات البكتيرية المستخدمة في الدراسة :أستعملت عشر عزلات بكتيرية ستة منها سالبة لصبغة غرام وأربع موجبة لهذه الصبغة وذلك لاختبار الفعالية التثبيطية لـ(EPS) المستخلص وكما مبين في الجدول (1) .

الجدول (1) : العزلات البكتيرية المستخدمة في الدراسة ومصادر الحصول عليها

ت	الاسم العلمي	مصدر الحصول عليها
1	*Proteus*	قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة كربلاء
2	*Staphylococcus aureus*	
3	*Enterobacter clocal*	
4	*Escherichia coli*	
5	*Klebsiella* spp.	
6	*Stenotrophomonas* spp.	
7	*Bacillus subtilis*	كلية العلوم الطبية التطبيقية / جامعة كربلاء
8	*Bacillus cererus*	
9	*Streptococcus agalactia*	مختبر الصحة العامة / كربلاء
10	*Pseudomonas aeruginosa*	

إذ تم اختبار الفعالية التثبيطية للـ EPS المستخلص والمنقى جزئياً ضد العزلات البكتيرية المبينة في الجدول (1) وبتركيز (10 ملغم / مل) وفق طريقة الانتشار في الأكار بوساطة الحفر (20)

ب-الفطريات

تم الحصول على ثلاث عزلات فطرية من قسم علوم الحياة / كلية العلوم /جامعة كربلاء (*Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* و *Penicillium expansum*) . تمت دراسة تأثير EPS المستخلص والمنقى جزئياً في تثبيط نمو الفطريات المذكورة أعلاه حسب الطريقة الموصوفة من قبل (21) مع بعض التحوير .

تقدير فعالية متعدد السكريات الخارج خلوي المضادة للأكسدة بطريقة كسح الجذور الحرة

أستعملت الطريقة الموصوفة من قبل (22) مع بعض التحويرات و قدرت نسبة تثبيط الجذر ABTS بحسب المعادلة الآتية :

$$PI\ (\%) = [1-(At/Ar)] \times 100$$

إذ ان At و Ar هما امتصاصيتي العينة و ABTS على التوالي .

النتائـــج والمناقشـــة

تم الحصول على45 عزلة منتجة لمتعدد السكريات الخارج خلوي أشتملت على 25عزلة عائدة لبكتريا.*Bacillus* spp و13 عزلة عائدة لجنس .*Lactobacillus* spp فضلاً عن 7 عزلات عائدة لجنس .*Pseudomonas* spp .

تشخيص العزلة المنتخبة *Lactobacillus*

الصفات المزرعية والمجهرية : تميزت مستعمرات بكتريا *Lactobacillus* والتي تم تنميتها على وسط MRS الصلب بكونها دائرية الشكل وصغيرة الحجم ، بعضها مسطحة والبعض الآخر محدبة ، ناعمة ملساء ولماعة ، وكان لون بعض المستعمرات أبيض فيما كان لون المستعمرات الأخرى ابيض مسمر ، وكانت أشكالها متباينة في الفحص المجهري ، إذ كان بعضها عصويا" بينما كان البعض الآخر عصوي كروي ، بعضها مفردة أو ثنائية بينما كان البعض الآخر بشكل سلاسل طويلة أو قصيرة وهذ يطابق مع ما ورد في (14) بالإضافة الى كونها موجبة لصبغة غرام غير متحركة وغير مكونة للسبورات وهذا يتطابق مع ما ذكره (23).

الفحوصات الكيموحيوية والقابلية على تخمير السكريات : من خلال نتائج الفحوصات الكيموحيوية والقابلية على تخمير السكريات الموضحة في الجداول (2) و(3) واعتمادا" على مصنف بيرجيز لتشخيص البكتريـــا (14) فـــأن مثـــل هذه الصفات تشير الى احتمال ان العزلة المنتخبة هي *Lactobacillus plantarum*

الجدول (2) : نتائج الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص العزلة Lac 3

الاختبـــار الكيموحيوي	انتاج الكاتليز	انتاج الأوكسيديز	استهلاك السترات	انتاج الاندول	تحلل الجيلانتين	المثيل الأحمر	فوكس بروسكور	استهلاك االيوريا	اختزال النترات
النتيجـــة	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) نتيجة موجبة ، (-) نتيجة سالبة

الجدول (3): أختبار قابلية العزلة Lac 3 على تخمير السكريات

نـــــوع السكر	كلوكوز	زايلوز	سكروز	فركتوز	كالاكتوز	لاكتوز	مانوز	أرابينوز	رامينوز	مانيتول
النتيجـــة	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

(+) نتيجة موجبة ، (-) نتيجة سالبة

التنقية الجزئية للمتعدد السكري الخارج خلوي المستخلص من العزلة المنتخبة : تمت عملية تنقية جزئية للـ EPS المستخلص للتخلص من بعض بقايا الاحياء المجهرية المستعملة في انتاج EPS ونواتج عملياتها الأيضية وكذلك مكونات الوسط الأنتاجي وقد أجريت عملية التنقية بخطوتين وقد تم حساب الوزن الجاف للمتعدد وكذلك قدرت كمية الكاربوهيدرات الكلية والبروتينات الكلية بعد كل خطوة تنقية وكما هو موضح في الجدول رقم (4) :-

الجدول (4) : التنقية الجزئية لمتعـدد السكريـــات الخارج خلوي الخام المستخلص من بكتريا *Lactobacillus plantarum*

خطوة التنقية	الوزن الجاف للـ EPS ملغم / لتر	الكاربوهيدرات الكلية %	البروتينات الكلية %	الحصيلة %
المستخلص الخام	500	69.3	16	100
أضافة TCA	387	78	3.1	77.4
الديلزة	319	83	1.9	63.8

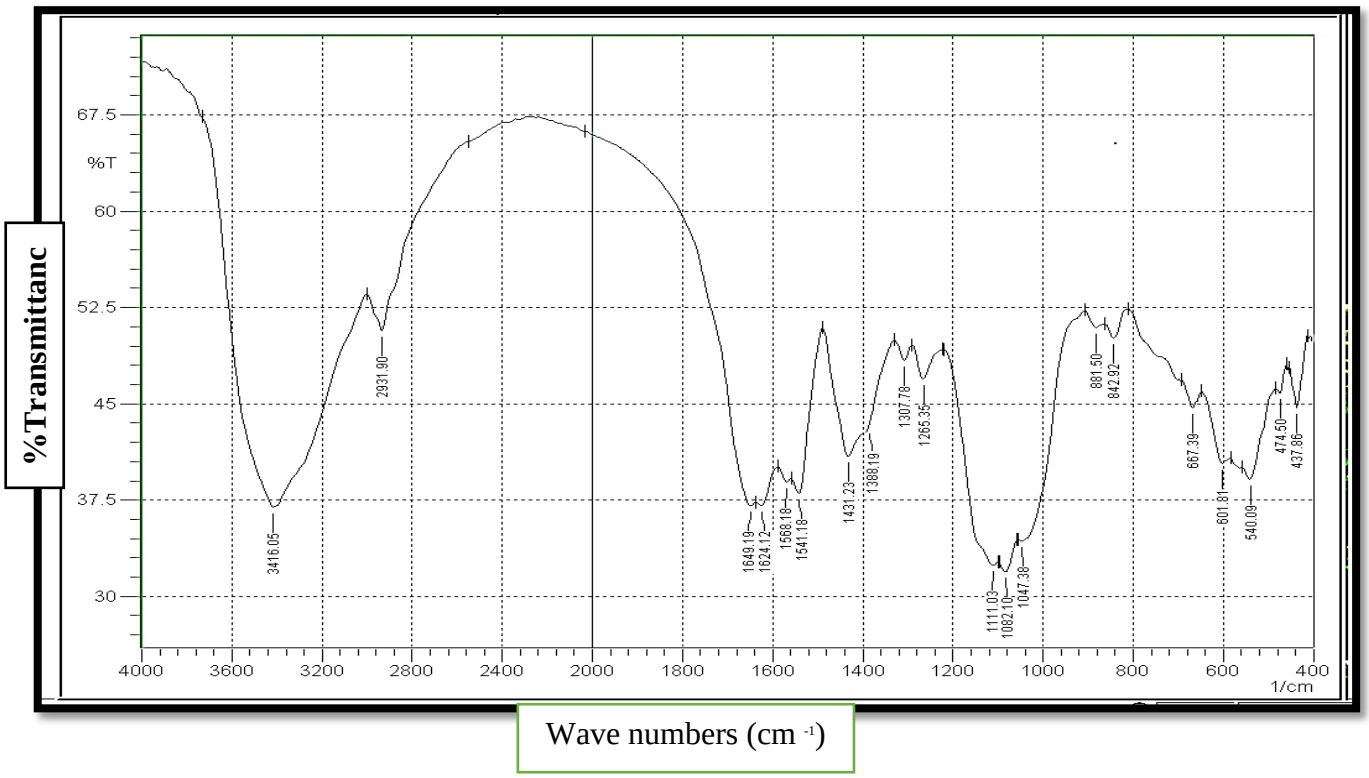
أستعملت الديلزة كأحدى خطوات تنقية EPS المنتج من أحياء مجهرية مختلفة في دراسات عدة ،فقد أستعمله(24) كخطوة تنقيـة ثانيـة فـي تنقية EPS المنتـــج مـن بكتـريـــا *L. helveticus* MB2-1Wei .وقد بينت نتائج تقدير الكاربوهيدرات والبروتينات ان كمية الكاربوهيدرات والبروتينات الكلية في متعدد السكريات الخارجي الخام الذي تنتجه بكتريا *L. plantarum* بلغت(69.3 و16)% على التوالي وبعد عمليات التنقية الجزئية ازدادت كمية الكاربوهيدرات إذ بلغت 83% اما كمية البروتين فانخفضت الى 1.9% . لقد تباينت كمية الكاربوهيدرات الكلية تبعاً لنوع EPS المنتج وطرائق تنقيته ، فقد بلغت كمية الكاربوهيدرات الكلية 96.8 للـ EPS الذي تنتجه بكتريا *L. reuteri* (25) .

توصيف متعدد السكريات الخارجي

التحليل الطيفي للـ EPS المنتج بواسطة تحليل مطيافية فورير بالأشعة تحت الحمراء

أ-مطيافية الأشعة تحت الحمراء للـEPS المستخلص الخام : يظهر طيف (F.T.I.R) للـ EPS المستخلص الخام الشكل (1) حزمة عريضة بسبب التآصر الهيدروجيني البيني عند 3416 سم $^{-1}$ تعود لاهتزاز مط مجموعة O-H وقد تكون مندمجة مع اهتزاز مط مجموعة -NH- الموجود في المتعدد السكري في تركيب بروتيني في ضمن مدى التردد نفسه ويمكن اثبات ذلك من خلال ظهور حزمة اهتزاز مط مجموعة كاربونيل الامايد الثانوي (حزمة أمايد 1) في المدى 1624 - 1649 سم $^{-1}$ في حين ان الحزمتين عند 1541 و 1568 سم $^{-1}$ تعودان الى الى انحناء اصرة N-H- ومط مجموعة -CO-NH- للبروتين (حزمة أمايد2) ,اما الحزمة عند التردد 2931 سم$^{-1}$ فتعود الى اهتزاز مط اصرة C-H الاليفاتية(26) .

اظهر طيف الاشعة تحت الحمراء العديد من الحزم المهمة منها الحزمة عند التردد 1431 سم $^{-1}$ والتي تعود لاهتزاز انحناء مجموعة -CH_2- المتماثل وكذلك انحناء مجموعة C-OH- اما الحزمة عند 1388 سم$^{-1}$ فتعود الى اهتزاز الانحناء المتماثل لمجموعة -CH_3- التي قد توجد في تركيب *N*-acetyl group (27)، وكذلك تشير الحزمة الظاهرة في المدى 1074 - 1111 سم $^{-1}$ الى تردد اهتزاز انحناء مجاميع C-OH و C-O-C و C-O-P فـــي الهيكل السكري وممكن ان تعود الحزمة الاخيرة 1111 سم$^{-1}$ الى اهتزاز ممط مجمـوعة C-O-C فـــي تركيـــب استري لسكـــر حامضي (29).

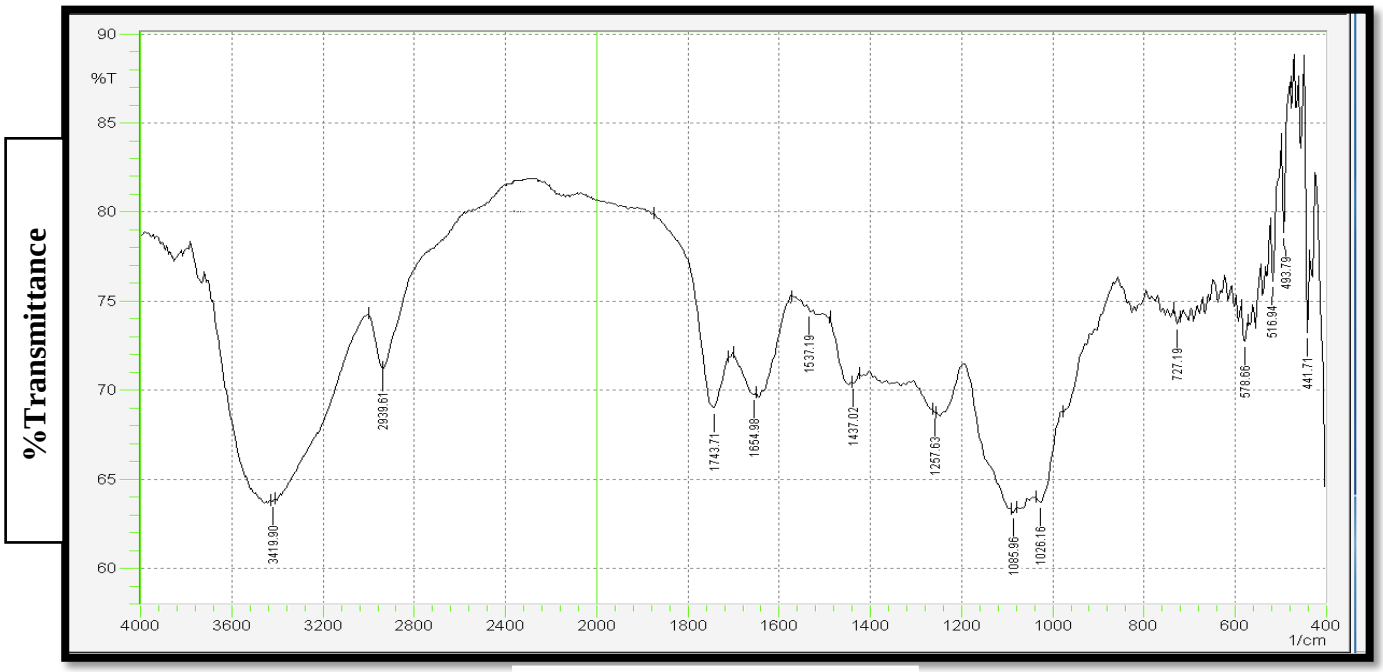


الشكل (1): طيف الأشعة تحت الحمراء للـEPS المستخلص الخام

ب-مطيافيـــة الأشعة تحت الحمراء لمتعدد السكريات الخارجي المنقى جزئياً بأستعمال المذيب العضوي (TCA)

بعد تنقية المتعدد الخام من خلال معاملته بـ 1,1,1- ثلاثي كلور حامض الخليك وترسيب البروتين وتشخيص الناتج بواسطة تقنية مطيافية الاشعة تحت الحمراء الشكل (2) تم تحليل الطيف كالاتي :

يلاحظ وجود حزمة عريضة بسبب التآصر الهيدروجيني البيني عند التردد 3419 سم $^{-1}$ تعود لاهتزاز مط مجموعة O-H وقد تكون مندمجة مع اهتزاز مط مجموعة -NH- الموجود في المتعدد السكري في تركيب N-acetyl group فقد تكون بعض السكريات المكون للمتعدد السكري هي من نوع N-acetylated sugar ويمكن اثبات ذلك من خلال ظهور حزمة اهتزاز مط مجموعة كاربونيل الامايد الثانوي (حزمة أمايد 1) عند 1654 سم $^{-1}$ في حين ان الحزمة عند التردد 1537 سم $^{-1}$ تعود الى انحناء اصرة N-H- ومط مجموعة -CO-NH- (حزمة أمايد2) (26) اما الحزمة عند التردد 2939 سم$^{-1}$ فتعود الى اهتزاز مط اصرة C-H الاليفاتية وقد اظهر الطيف حزمة جديدة عند 1743 سم$^{-1}$ تعود لاهتزاز مجموعة كاربونيل C=O الاستر لم تكن موجودة في الطيف الاول قبل التنقية ويعزى عدم وجودها الى التعقيد الكبير في تركيب المتعدد السكري الخام واحتمالية اختفائها واندماجها ككتف صغير لم يلاحظه جهاز الـ FT-IR مـــع حزمة مـط كاربونيـل البروتين (حزمة أمايد2) او قد ظهرت في الطيف بسبب حدوث تفاعل استرة بين مجاميع الهيدروكسيل للمتعدد السكري والـ TCA بسبب انزياح الحزمة عن قيمتها في المراجع والتي تساوي 1735 سم$^{-1}$ بسبب الحث الالكتروني الساحب لذرات الكلور المرتبطة بالكاربون والتي تزيد من قوة آصرة C=O (30) إذ ظهر اهتزاز آصرة C-C في التردد 727 سم$^{-1}$ او قد تعـــزى الى مط مجموعة الكاربونيل في حامض سكـــري وهـــو حامض اليورونيك وهـــذا احتمال ضعيف (29). ان الحزمة عند التردد 1256 سم -1 تعود الى اهتزاز انحناء الالتوائي لمجاميع -CH2- لان الانحناء المقصي لهذه المجاميع ممكن ان يكون في التردد 1437 سم$^{-1}$ او قد يعزى الى انحناء N-H او مط آصرة C-N او اهتزاز مط آصرة C-O وكلها قد يثبت وجودها في تركيب المتعدد السكري بعد التنقية وكذلك تشير الحزم الظاهرة في المدى 1026 - 1085 سم $^{-1}$ الى تردد اهتزاز انحناء مجاميع C-OH و C-O-C (28).



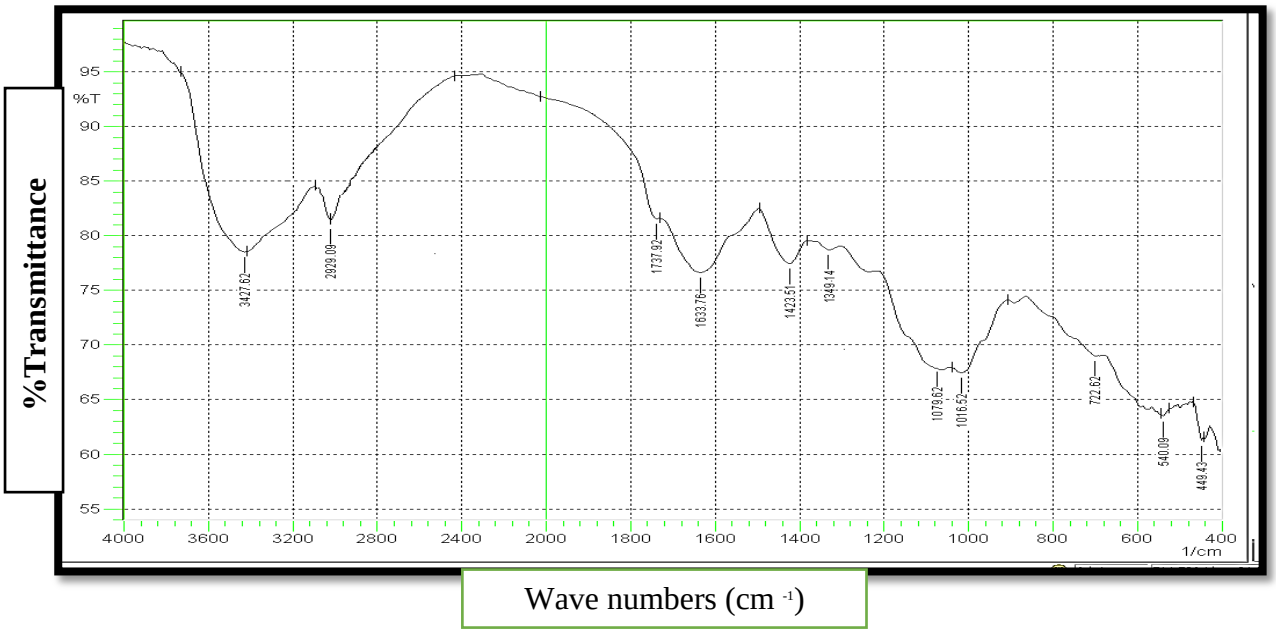
Wave numbers (cm $^{-1}$)

الشكل (2) : طيف الأشعة تحت الحمراء للـEPS المنقى جزئياً باستعمال المذيب العضوي TCA

ج-مطيافية الأشعة تحت الحمراء للمتعدد السكريات الخارجي المنقى جزئياً بالديلزة

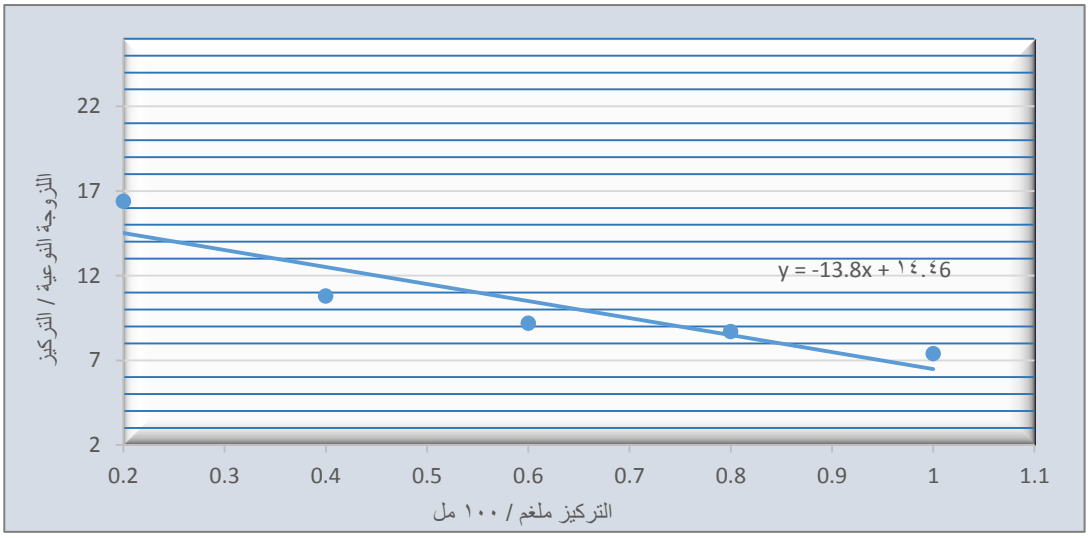
يوضح الشكل (3) طيف الأشعة تحت الحمراء للمتعدد السكري بعد اجراء عملية الديلزة إذ اظهر الطيف الحزم التالية :

حزمة عريضة بسبب التآصر الهيدروجيني البيني او مع بعض من جزيئات الماء عند التردد 3427 سم $^{-1}$ تعود لاهتزاز مط مجموعة O-H ونلاحظ انزياح في قيمة التردد عنه في الطيف السابق وهذا ان دل على شيء انما يدل عن فصل عدد كبير من جزيئات المتعدد السكري كبيرة الحجم (ذات الوزن الجزيئي الاعلى) والحاوية على تركيب *N*-acetylated sugar ونجاح عملية الديلزة في حين ان الحزمة عند التردد 2929 سم$^{-1}$ تعود الى اهتزاز مط اصرة C-H الاليفاتية لمجموعة $-CH_2-$ في السكر إذ يظهر تردد اهتزاز الانحناء المقصي لهذه المجموعة عند 1423 سم$^{-1}$ (26). ان الحزمة ضعيفة الشدة عند التردد 1737 سم $^{-1}$ تعزى الى اهتزاز مط مجموعة الكاربونيل للأستر السكري الناتج من تفاعل مجموعة الهيدروكسيل للمتعدد السكري والـ TCA او ان تركيب استري موجود في تركيب المتعدد السكري بالأصل لكون الحزمة الاخيرة ظهرت بتردد مطابق لما هو مذكور بالمراجع وغير مزاح الى تردد اعلى ولكن ظهور حزمة اهتزاز آصرة C-Cl في التردد 722 سم$^{-1}$ تنفي ذلك لكون هذا التركيب ينتمي الى مركب الـ TCA الذي تفاعل مع المتعدد السكري . ومن ما لاشك فيه ان الحزمة 1633 سم$^{-1}$ هي لاهتزاز انحناء جزيئات الماء(31) . كما يلاحظ ايضا ظهور حزمة واضحة بعض الشيء عند التردد 1349 سم$^{-1}$ تعود الى اهتزاز انحناء مجموعة $-CH_2-$ المتصلة بمجموعة اوكسجين الاستر عند ذرة كاربون رقم (6) (32) وتعزى قيمة تردد الحزمة عند التردد 1079 سم$^{-1}$ الى اهتزاز مط هيكل المتعدد السكري المتمثل بمجاميع -C-O-C- في حلقة السكر (26)



الشكل (3) :طيف الأشعة تحت الحمراء للـEPS المستخلص بعد تنقيته جزئياً بالديلزة

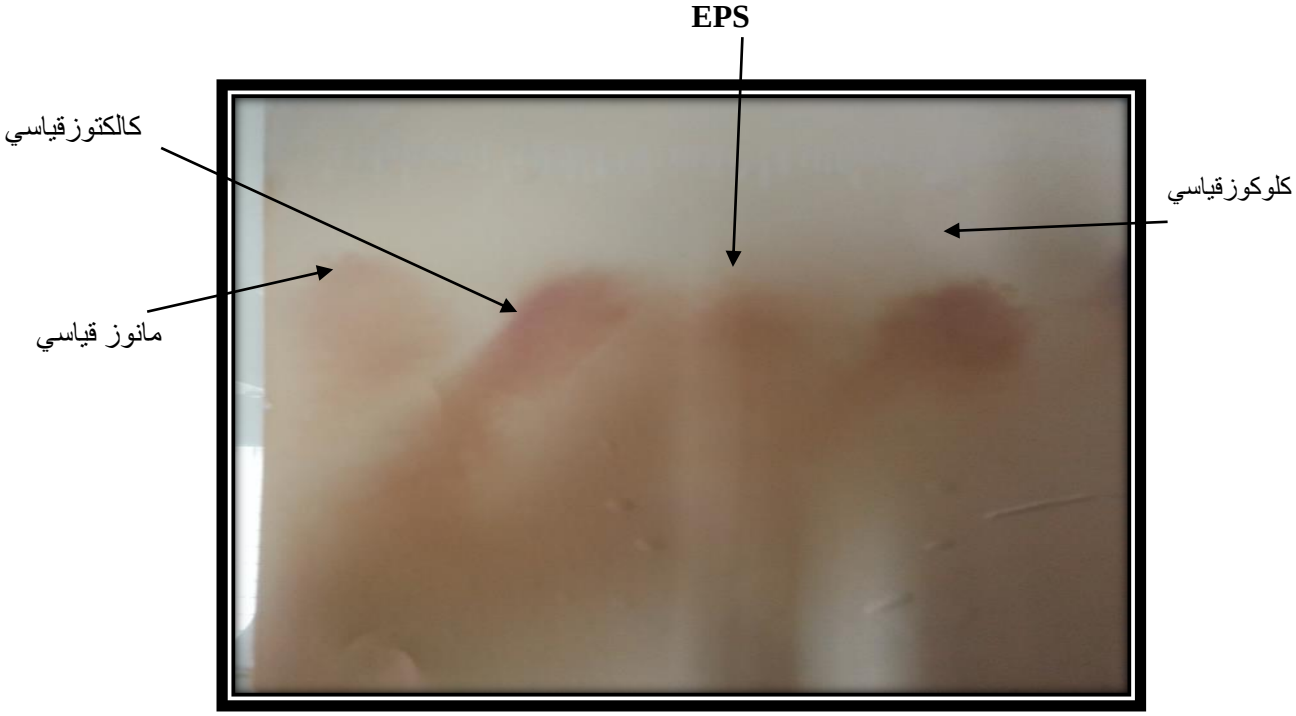
الوزن الجزيئي لمتعدد السكريات الخارج خلوي : تم حساب الوزن الجزيئي لمتعدد السكريات الخارجي المستخلص في هذه الدراسة بطريقة قياس اللزوجة بأستعمال مقياس اللزوجة (viscometer) اذ تم الحصول على نقطة تقاطع مع المحور الصادي مقدارها (14.46) تمثل لزوجة ذاتية كما موضح في الشكل (4) بلغ الوزن الجزيئي للـ EPS المستخلص في هذه الدراسة 2.3×10^5 دالتون . هناك عدة عوامل تؤثر في قيمة الوزن الجزيئي لمتعدد السكريات منها نوع الكائن المجهري وظروف الأنتاج ومكونات الوسط الإنتاجي (33). اذ بلغ الوزن الجزيئي لـEPS المنتج من بكتريا *Streptococcus thermophiles* ST 111 المنماة في وسط الحليب 5000 كيلو دالتون (34).



الشكل (4) :حساب اللزوجة الذاتية لـEPS المنتج من بكتريا *Lactobacillus plantarum*

وفي دراسة أخرى (35). بينوا فيها انه عند تنمية بكتريا *L. bulgaricus* strain NCFB 2772, في وسط chemically defined media لانتاج EPS بأستعمال مصادر كاربونية مختلفة (الكلوكوز والفركتوز) بلغ الوزن الجزيئي للـ EPS المنتج (1700و 40) كيلو دالتون على التوالي .في حين بلغ الوزن الجزيئي للـ EPS المستخلص من بكتريا *Streptococcus phocae* PI80 المنماة في وسط MRS 2.8×10^5 دالتون (10).

كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة: أستعمل هذا النوع من الكروموتوغرافيا لمعرفة نوع السكريات الأحادية المكونة للمتعدد السكري الخارجي المستخلص في هذه الدراسة ، إذ وضع EPS المحلل بأستعمال حامض الهيدروكلوريك على الصفيحة بشكل spot كما أستعملت عدد من السكريات القياسية مثل الكلوكوز والكالكتوز والمانوز . و قد أظهرت نتائج المبينة في الشكل(5)ان للـEPS بقعتان غير منفصلة تماماً إذ بلغت قيمة R_F للبقعة الأولى 0.742 والتي ميزت على انها كالاكتوز الذي بلغت قيمةR_F له 0.748 اما قيمة R_F للبقعة الثانية فقد بلغت 0.700 والتي ميزت على انها كلوكوز والذي بلغت قيمة R_F له 0.693 . وقد أشارت احدى الدراسات الى ان EPS المستخلص من بكتريا *E. faecium* MC13 يتألف من الكلوكوز والكالكتوز إذ بلغت قيمة (R_F) لهما (0.795 و 0.598) على التوالي (10) .وفي دراسة أخرى أظهرت نتائج تحليل EPS ان الكلوكوز والمانوز يمثلان السكريات الرئيسية الموجودة في EPS المستخلص من بكتريا *Bacillu thermoantarcticus* (36).



الشكل (5): كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة لـEPS المنتج من بكتريا *Lactobacillus plantarum*

الفعالية البايلوجية لمتعدد السكريات الخارجي المستخلص من العزلة المنتخبة والمنقى جزئياً

أ- الفعالية التثبيطية اتجاه بعض أنواع البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام

تم دراسة فعالية EPS التثبيطية اتجاه بعض الأنواع البكتيرية ستة منها سالبة لصبغة غرام واربع موجبة لهذه الصبغة ومقارنة النتائج مع المضاد الحيوي التتراسايكلين لكل من بكتريا *Proteas* و*S. aureus* و *E. coli* و *Klebsiella* و *Stenotrophomonas* و*S. agalagtia* و *B. subtilis* و *B. cererus* والمضاد الحيوي الماينوسايكلين لكل من بكتريا *P. aeruginosa* و *Enterobacter clocal* . ويتضح من النتائج المبينة في الجدول (5) ان أعلى فعالية تثبيطية للـ EPS اتجاه بكتريا *Proteus* و *B. cererus* و *stenotrophomonas* وبقطر تثبيط (23 و 21و 19) ملم على التوالي . هناك دراسات عديدة أشارت الى الفعالية التثبيطية للـ EPS المنتج من أحياء مجهرية مختلفة ، فقد أشار (37) الى أن EPS الذي تنتجه بكتريا *B. cereus* قد أظهر فعالية تثبيطية اتجاه بكتريا *Lydinibacillus* و. *Panibaccillus* spp و *E.coli* و *P. aeruginosa* .

الجدول (5): الفعالية التثبيطية لمتعدد السكريات الخارج خلوي المستخلص من بكتريا *Lactibacillus plantarum* اتجاه بعض الأنواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة غرام

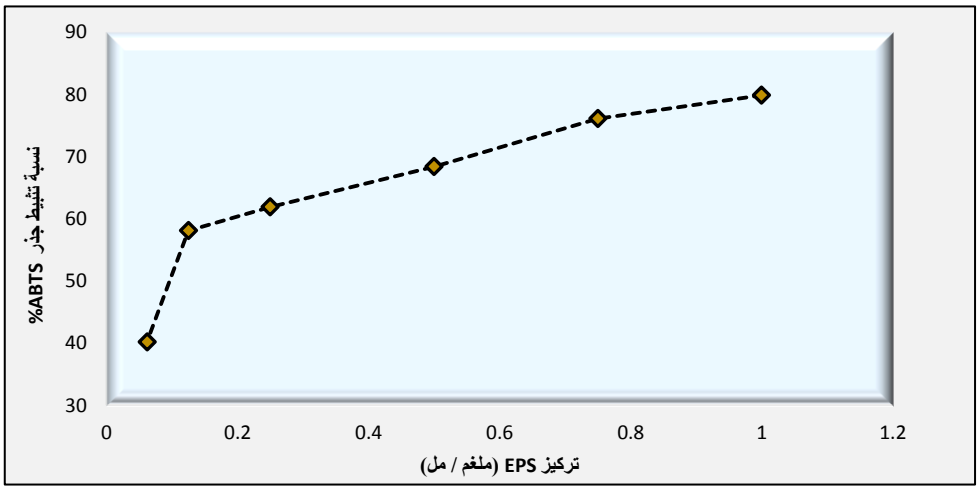
النوع البكتيري	أقطار التثبيط (ملم) EPS المستخلص	Control	
Proteus	23	18	Tetracycline
S. aureus	0	11	Tetracycline
E. coli	11	17	Tetracycline
***Stenotrophomonas* spp.**	19	22	Minocycline
S. agalagtia	5	16	Tetracycline
***Klebsiella* spp.**	0	12	Tetracycline
B. subtilis	8	15	Tetracycline
B. cererus	21	16	Tetracycline
P. aeruginosa	0	4	Minocycline
E. clocal	9	15	Tetracycline

ب-الفعالية التثبيطية لمتعـدد السكريـــات الخارج خلوي اتجاه بعض الانواع الفطرية:

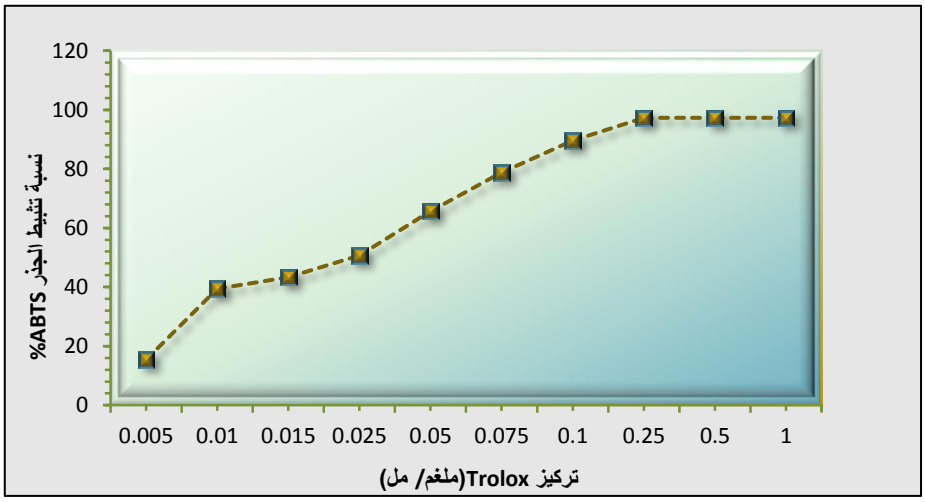
درست الفعاليـــة التثبيطيـــة للمتعدد السكري الخارجي المستخلص في هذه الدراسة ضد ثلاثة أنواع فطرية أشتملت على *A. flavus* و *A.parasiticus* و *P.expansum*.وقد بينت نتائـــج هذه الدراسة عدم وجود فعاليـــة تثبيطية للـ EPS المستخلـــص من بكتريـــا *L. plantarum* اتجـــاه أي نوع من الأنواع الفطرية المستعملة في هذه الدراسة . اشارت دراسات عديدة الى الفعالية الحيوية للمتعدد السكري اتجاه العديد من الأنواع الفطرية ، فقد بينت نتائج دراسة قام بها (38) ان المتعدد السكري المستخلص من *pleurotus florida* قد أظهر فعالية ضدالاحياء المجهرية عالية وبصورة خاصة اتجاه بعض الأنواع الفطرية وهي*Penicillum* و *Mucor* وبقطر تثبيط (22 و 14) ملم على التوالي في حين لم يظهر أي فعالية تثبيطية اتجاه الفطر*Aspergillus* .

ج-الفعالية المضادة للأكسدة لـمتعدد السكريات الخارج خلوي بطريقة كسح الجذور الحرة :

أستعملت طريقة كسح الجذور الحرة في تقدير الفعالية المضادة للأكسدة للمتعدد السكري الخارجي المستخلص في هذه الدراسة والمنقى جزئياً من خلال تحديد التركيز الذي له القابلية على أختزال أو تثبيط أمتصاص الجذر ABTS الى النصف (IC_{50}) والذي عادة ما يعبر عنه بشكل نسبة مئوية (PI) % . والنتائج الموضحة في الشكل (6) تبين ان EPS قد أظهر فعالية مضادة للأكسدة عند التركيز 100 مايكروغرام /مل وهي أعلى من تركيز المضاد القياسي Torolox القادر على اختزال أو تثبيط امتصاص الجذر الحر ABTS بتركيز 25 مايكروغرام / مل الشكل (7) هناك دراسات عديـدة ذكرت ان EPS من البكتريـــا والفطريات يعمـــل كمضادات أكسدة (39 ; 40) . لكن المعلومات محدودة فيما يتعلق بآلية عمل EPS كمضـــاد أكســـدة علـــى المستوى الجزيئي . لقد وضح (41) في دراسة قام بهـا لاختبار فعالية EPS المضادة للأكسدة من بكتريـــا *L. rhamnosus* E/N ان EPS قد أظهر فعالية مضادة للأكسدة وان هذه الفعالية تختلف باختلاف المصادر الكاربونية المستعملة في الوسط الإنتاجي،كما اقترح من خلال النتائج التي استحصل عليها من دراسة فعالية EPS المضادة للأكسدة بطريقتين (ABTS/myoglobin و ABTS/potassium persulphate)ان الفعالية المضادة للأكسدة تتأثر بقوة بالمواد التي تستعمل في تفاعل الأكسدة



الشكل (6) :الفعالية المضادة للأكسدة لمتعدد السكريات الخارج خلوي المستخلص من بكتريا *L. plantarum*



الشكل (7) : الفعالية المضادة للأكسدة للمضاد القياسي (Trolox)

المصـــــــادر :

1- **Hassan**, A.N. (**2008**) ADSA Foundation Scholar Award: Possibilities and challenges 7 of exopolysaccharide-producing lactic cultures in dairy foods. J Dairy Sci 91: 1282-8 1298 .

2-Telefoncu, A.(**1992**). *Tıp ve Fen Bilimleri İçin Biyokimya*. Kırklareli:Sermet Matbaası.

3-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.

4-Welman,A.D.& Maddox, I.S.(**2003**) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: 5 perspectives and challenges. Trends Biotechnol 21: 269-274 6

5- Liu, C.; Lu, J.; Lu, L.; Liu, Y.; Wang, F.; Xiao, M.(**2010**). Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by Bacillus licheniformis. *Bioresour. Technol*. 101: 5528–5533.

6- Pan, D.; & Mei, X. (**2010**). Antioxidant activity of an exopolysaccharide purified from Lactococcus lactis subsp. lactis 12. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 908–914.

7-Mao,Y.; Mao,J.; Meng,X.(**2013**). Extraction optimization and bioactivity of exopolysaccharides from Agaricus bisporus . *Carbohydrate Polymers*. 92 .1602– 1607

8-Aslim, B.; Yuksekdag, Z. N. & Beyatli, Y. (**2002**). Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology.p*. 24-30.

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

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

11-Szumigaj,J ;Zakowska,Z; &Kliek,L.(**2008**). Exopolysaccharid Production by Bacillus strains Colonizing Packaging Foils. *Polish Journal of Microbiology*,vol.57,No4,281-287.

12-Ranganayaki S., Mohan C.,(**1981)** Effect of Sodium molybdate on microbial fixation of nitrogen, Z. Ally. Microbiol; 21(8): 607-10.

13- 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.

14-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.

15-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.

16-Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P & Smith F (**1956**) .Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350–356.

17- Braford, M. M. (**1976**) Protein estimation method , *Anal Biochem* .72.

18-James ,A. M.& Prichard, F. E.(**1974**). Practical Physical Chemistry. 115-118.

19-Yan, J.; Guo, X.Q.; Li, X.G.; Wu, X.Y.; Gou, X.J**.(2006**) . TLC to fleetly analyze monosaccharide composition of polysaccharide. *Food Sci*. 27 (12), 603–607.

20-Egorove,N.S.(**1985**) .Antibiotics ascientific approach .Mir Publishers,Moscow.

21-Wang, S.L.;Lin,T.Y.;Yen,Y.H.;Liao,H.F.and Chen,y.j.(**2006**).Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase.*Carbohydrate Research* ,341:2507-2515.

22- Budrat,P.& Shotipruk,A.(**2008).** Extraction of phenolic compounds from fruits Bitter Melon (Momordica charantia) with subcritical water extaction and antioxidant activities of these extracts.*Chiang Mai j Sci*. 35(1):123-130.

23- Desai, A.(**2008**).Strain identification viability and probiotic prpperties *of Lactobacillus casei* .ph. D .Thesis ,Vctoria university ,Werribee Campus Victoria ,Australia.

24-Li, W. ; Ji,J.; Chen,X.; Jiang,M.; Rui, X. & Dong,M.(**2014**). Structural elucidation and antioxidant activities ofexopolysaccharides from Lactobacillus helveticus MB2-1. *Carbohydrate Polymers*, 102 : 351– 359.

25- Sims I. M., Frese .S. A., Walter J., Loach D. ,Wilson M. , Appleyard K. , Jocelyn Eason J., Livingston M., Baird M., Cook G. and Tannock G.W **.(2011**) ."Structure and functions of exopolysaccharide produced by gut commensal *Lactobacillus reuteri*100-23", *International Society forMicrobial Ecology*, 5:1115–1124.

26- Omoike,A. & Chorover,J.(**2004**) Spectroscopic Study of Extracellular Polymeric Substances from Bacillus subtilis: Aqueous Chemistry and Adsorption Effects. *Biomacromolecules .Vol*, 5,P, *1219-1230.*

27-Chiu,C-H.; Peng,C-H.; Ker,Y. ; Chen,C. ; Lee,A.; Chang,W. ; Chyau ,c and Peng,r.y. (**2014**). Physicochemical Characteristics and Anti-nflammatory Activities of Antrodan. *ISSN.* 1420-3049.

28-Naumann, D.(**2000**). Infrared spectroscopy in Microbiology. Meyers RA. ed. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley &Sons, Chichester, UK, 102-131.

29-Vijayabaskar,P.; Babinastarlin,S.; Shankar,T.; Sivakumar,T. & Anandapandian, K.T.K.**(2011**). Quantification and Characterization of Exopolysaccharides from *Bacillus subtilis* (MTCC 121). *Advances in Biological Research* 5 (2): 71-76.

30-Bellamy, L. J. (**1975**) The lnfrared Spectra of Complex Molecules, , John Wiley and Sons, Inc., New York, 1975.

31-Kim, S.; Burgula Y.; Ojanen-Reuhs, T.; Cousin, M.A.; Reuhs, B.L.; Mauer, L.J.(**2006**). Differentiation of crude lipopolysaccharides from *Escherichia coli* strains using Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics. *J. Food Sci*. 2006, 71:M57-M61.

32-Pereira, J. F.B.; Gudiña, E. J.; Costa,R.; Vitorino,R. Teixeira, J. A. ; Coutinho, J. A.P. &Rodrigues, L.R.(**2013**). *Journal Fuel*, 111: 259–268.

33-Looijesteijn, P.J.; Boels, I.C.; Kleerebezem, M.; Hugenholtz, J. (**1999**).Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp.*cremoris* by the sugar source. *Appl. Environ. Microbiol*. 65,5003–5008.

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

35-Grobben, G. J., van Casteren, W. H. M., Schols, H. A., Oosterveld, A.,Sala, G., Smith, M. R., (**1997**). Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB2772 grown in continuous culture on glucose and fructose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 516–521.

36-Manca, M. C.; Lama, L.; Improta, R.; Esposito, E.; Gambacorta A. and B Nicolaus.(**1996**). Chemical Composition of Two Exopolysaccharides from Bacillus thermoantarcticus.

37- Orsod, M.; Joseph,M. & Huyop,F. (**2012**). "Characterization of Exopolysaccharides Produced by *Bacillus cereus* and *Brachybacterium* sp. Isolated from Asian Sea Bass (*Lates calcarifer*) ". *Malaysian Journal of Microbiology*, Vol 8(3) 2012, pp. 170-174.

39-Meera.C.R.; Chandran,S.; Jain,R.;Wilson,W.;Anjang,J.C.; Ruveena,T.N. (**2011**). Antimicrobial and Anti-oxidant Activity of polysaccharide isolated from an Edible Mushroom, Plearotus florida , *Advanced Biotech*.Vol,10.

40- Kodali V.P. & Sen, R**.(2008**). Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharides from a probiotic bacterium. *Biotechnol J*, 3: 245–251.

41-Guo, S.; Mao, W. ;Han, Y.; Zhang, X. (**2010**). Structural characteristics and antioxidant activities of the exracellular polysaccharides produced by marine bacterium *Edwardisiella tarda*. *Bioresour. Technol.* 101: 4729–4732.

42-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