Mesopotamia J. of Agric. ISSN: 2224 - 9796 (Online) مجلــة زراعــة الـرافديـن
Vol. (45) No. (2) 2017 ISSN: 1815 - 316 X (Print) المجلد (45) العدد (2) 2017

إنتاج السكر الميكروبي المتعدد الجيلان من قبل البكتريا *Sphingomonas paucimobilis*
2- تركيب وسط النمو الامثل

نهان بهاء الدين جعفر موفق محمود أحمد
قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل – العراق
E-mail: nihanbayati@yahoo.com

الخلاصة

هدف البحث إلى إيجاد الظروف المزرعية التغذوية المثلى لإنتاج السكر الميكروبي الخارجي المتعدد، الجيلان، من قبل العزلة البكتيرية *Sphingomonas paucimobilis* بإستخدام طريقة مزارع الوجبات في البيئات المختبرية. تضمنت الدراسة إيجاد تأثير نوع وتركيز المصدر الكربوني ونوع وتركيز المصدر النتروجيني العضوي واللاعضوي فضلاً عن دراسة تأثير بعض المدعمات لوسط الإنتاج كإضافة الأحماض الأمينية والمواد الخافضة للشد السطحي اللاأيونية، وذلك بإستخدام الوسط الزرعي الأساسي لإنتاج الجيلان. تم تثبيت الظروف المزرعية الفيزيائية إذْ تم الإنتاج في مدة تحضين 48 ساعة وحجم لقاح 10% وأس هيدروجيني أولي للوسط 7.0 وعلى درجة حرارة 30 م° وبسرعة رج 250 دورة/دقيقة في الحاضنة الهزازة الدوارة. دلت النتائج بأن أفضل مصدر كربوني كان سكر الكلوكوز وبتركيز 2% إذْ بلغت كمية الجيلان المنتج 4.44غم/لتر من وسط الإنتاج، بينما كان أفضل مصدر نتروجيني عضوي هو مستخلص الخميرة وبتركيز 0.05% وأفضل مصدر نتروجيني لا عضوي كان كلوريد الأمونيوم بتركيز 0.10% وكانت كمية السكر المنتجة 4.27 و 4.41غم/لتر، على التوالي. أما بالنسبة للأحماض الأمينية فقد كان الحامض الأميني الثريونين الأفضل وقد أعطى أعلى إنتاجية للجيلان وبكمية 5.29غم/لتر، بينما كانت المادة الخافضة للشد السطحي الـ Triton X-100 الأفضل وبتركيز 0.1% وأعطت 5.59غم/لتر من وسط الإنتاج.

الكلمات الدالة: الجيلان، *Sphingomonas paucimobilis*، مصدر كربوني، مصدر نتروجيني، أحماض أمينية، مواد خافضة للشد السطحي لا أيونية.

تاريخ تسلم البحث: 2013/1/30 ، وقبوله: 2013/5/6.

المقدمة

الجيلان من السكريات الميكروبية المتعددة الخارجية الذي لها قيمة صناعية متميزة لما له من إستخدامات صناعية كثيرة (Sutherland، 1990). ينتج السكر من قبل البكتريا *Sphingomonas paucimobilis* (صنفت سابقاً على أنها *Pseudomonas elodea* لعزلها من نبات الإيلوديا المائية) وهي عصوية قصيرة، سالبة لصبغة كرام، متحركة بسوط قطبي مفرد وبعد إنتاجها للسكر المتعدد تصبح قدرتها على الحركة ضعيفة جداً ولهذا تسمى "pauci-mobilis" أي خلايا ذات حركة قليلة، وهي هوائية إجبارياً وغير مخمرة للسكريات (Vartak وآخرون، 1995). إن معظم البكتريا المنتجة للسكر المتعدد عزلت من الترب ومياه الأنهار ومياه الشرب ومن أسطح النباتات المائية (Ozdemir وآخرون، 2011). سكر الجيلان هو سكر رباعي غير متجانس وتتكون وحدات التكرار من سكر الـ د-كلوكوز والـ د-رامنوز والـ د-حامض كلوكويورونيك. السكر الخام هو مؤستر جزئياً حيث أن جزيئتي سكر الكلوكوز مرتبطة بجزيئة الكليسيريت على ذرة الكربون رقم (2) و/أو على رقم (6) وهناك مول واحد كليسيرت لكل مول وحدة تكرار واحدة من السكر (Kuo وآخرون، 1986). الدراسات السمية أشارت إلى أن الجيلان غير سام وهذا قاد إلى موافقة إدارة الغذاء والدواء (Food and Drug Administration, FDA) لإستخدامه في الأغذية عام 1992 (Pszczola، 1993).

ينتج الجيلان عند دخول البكتريا إلى طور النمو اللوغارتمي (Log phase) وهذا ما يؤكد بأن سكر الجيلان هو أحد مكونات الأيض الأولية للبكتريا (Primary metabolite) (Rajasekaran وآخرون، 2008). بالرغم من أن كمية الإنتاج وتركيب السكر وصفاته محددة بالعوامل الوراثية، إلاّ أنه ممكن التأثير على تلك العوامل بتغيير أو تحوير الصفات المزرعية مثل سرعة رج الوسط ودرجة حرارة التحضين وكذلك تركيب وسط النمو مثلاً المصدر الكربوني (Novak وآخرون، 1992) وتركيز الكاتيونات (Martins وآخرون، 1990) وغيرها.

البحث مستل من أطروحة الدكتوراه للباحث الأول.

يعد المصدر الكربوني من المكونات الأكثر أهمية في الأوساط الزرعية المستخدمة لإنتاج السكريات الخارجية البكتيرية بسبب تأثيرها المباشر على النتاج أو المحصول (Yield) وعلى مكونات وتركيب وخصائص السكر (Fialho وآخرون، 1999). فقد وجد Kang وآخرون (1982) أن الكاربوهيدرات كالكلوكوز والفركتوز والسكروز ممكن أن تستخدم لوحدها أو معاً كمصدر كربوني لإنتاج الجيلان والكمية المستعملة عادة تتراوح بين 2-4%. أما المصدر النتروجيني فيدخل في تركيب الكثير من الإنزيمات الضرورية في تمثيل المركبات السكرية والمركبات الأخرى ويدخل في تركيب الأحماض الأمينية والنيوكليوتيدات وبعض الفيتامينات، وأهم المصادر النتروجينية التي تستعملها البكتريا في إنتاج الجيلان هي أملاح الأمونيا والنترات والأحماض الأمينية ومستخلص الخميرة ومخلفات بعض العمليات الإنتاجية، إن اختيار المصدر النتروجيني له تأثيراً قوياً على خصائص وسط إنتاج الجيلان، فمثلاً أن استخدام النتروجين العضوي يدعم تصنيع الجيلان كما انه يزيد من لزوجة الوسط السائل (Dreveton وآخرون، 1994). كما إن النتروجين يعد عاملاً مهماً في تنظيم تصنيع الجيلان وكمية المصدر النتروجيني المستعمل عادة تتراوح بين 0.05-0.20% لذا يجب إضافة هذه المصادر بتراكيز متوازنة مع مصادر الكربون لخلق حالة توازن بينهما وبالتالي زيادة إنتاج السكر المتعدد (Lim وآخرون، 2003). فضلاً عن ضرورة تواجد عدد من المغذيات ومدعمات النمو كالفيتامينات والأحماض الأمينية في الوسط الزرعي الذي يحسن من النمو الخلوي وإنتاج السكر المتعدد (Giavasis وآخرون، 2000). فالأحماض الأمينية أستخدمت من قبل بعض الباحثين كمصادر نتروجينية أو كمحفزات لتحسين إنتاج الجيلان ووجد أن التربتوفان والثريونين والكلوتاميت من الأحماض الأمينية المستخدمة كمصدر نتروجيني وكمدعمات لإنتاج الجيلان وكان أفضل تركيز لاستخدامهم هو 0.05% (Ashtaputre وShah، 1995a وb ؛ Nampoothiri وآخرون، 2003؛ Bajaj وآخرون، 2006). كما استخدم West وFullenkamp (2000) احماض الـ Casamino acids لتدعيم انتاج الجيلان من قبل البكتريا *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461.

هدف البحث إلى إيجاد أفضل تركيب لوسط نمو البكتريا *Sphingomonas paucimobilis* لإنتاج السكر الميكروبي الخارجي المتعدد، الجيلان، إذ درس تأثير عدد من المصادر الكربونية والنتروجينية وبتراكيز مختلفة وتأثير إضافة عدد من الأحماض الأمينية والمواد الخافضة للشد السطحي اللا أيونية إلى الوسط الزرعي.

مواد البحث وطرائقه

الكائن المجهري: أستخدمت البكتريا *Sphingomonas paucimobilis* التي تم الحصول عليها من مركز تجميع المزارع في جامعة غازي/أنقرة، تركيا (Gazi culture collection, Ankara, Turkey)، وتم تنشيطها على وسط الآكار المغذي وحفظت على الآكار المائل على درجة حرارة 4 م° .

تحضير المزروع الخزين للبكتريا: تم زرع البكتريا *S. paucimobilis* على وسط الآكار المغذي وحضنت على حرارة 30 م° لمدة يومين. نقل لقاح من هذا النمو البكتيري إلى وسط المرق المغذي وحضنت في الحاضنة الهزازة الدوارة (Orbital shaker incubator) موديل Wise Cube WCC شركة Digital Fuzzy control system اليابانية عند 250 دورة/دقيقة ودرجة حرارة 30 م° لمدة يوم واحد. أستعمل 1% من هذه المزرعة في تلقيح 100 مل من وسط المرق المغذي وتم ضبط الكثافة الضوئية إلى 0.8-1.0 للحصول على معلق البكتريا بشكل متجانس بإستخدام جهاز قياس الكثافة (McFarland densitometer) موديل DEN-1 شركة BioSan Ltd. الإنكليزية.

إنتاج الجيلان: حضر وسط إنتاج الجيلان الأساسي (Richau وآخرون، 1997) المحتوي على غم/لترمن الماء المقطر: 20غم كلوكوز و10غم فوسفات الصوديوم الهيدروجينية و1غم كلوريد الصوديوم و1غم كبريتات البوتاسيوم و0.15غم كبريتات الأمونيوم و0.01غم كلوريد البوتاسيوم المائية و0.001 غم كبريتات الحديد المائية و0.2غم كبريتات المغنيسيوم المائية و0.5غم مستخلص الخميرة وضبط الأس الهيدروجيني عند 7.0. في دوارق مخروطية سعة 250 مل وزع 50 مل من وسط الإنتاج. تم التعقيم (121 م° لمدة 15 دقيقة) والتبريد ولقح كل دورق بإضافة 10% من المزروع الخزين. حضنت الدوراق في الحاضنة الهزازة الدوارة على درجة حرارة 30 م° لمدة 48 ساعة (Kang وآخرون، 1982).

إستخلاص الجيلان وتقدير الكتلة الحيوية الجافة: بعد إنتهاء مدة التحضين غمرت الدوارق في الحمام المائي المجهز من شركة Memmert الألمانية موديل WNE14 على درجة حرارة الغليان لمدة 15 دقيقة ثم التبريد.

قدرت الكتلة الحيوية الجافة بجمع راسب الخلايا البكتيرية بعد الطرد المركزي بجهاز الطرد المركزي المبرد موديل 3-30K (شركة Sigma الألمانية) على g20.379 لمدة 30 دقيقة. تم غسل الراسب الخلوي المترسب بالماء المقطر البارد لإزالة بقايا الجيلان الملتصق. جفف الراسب باستخدام فرن على حرارة 80 م° لمدة 3 ساعات. تم ترسيب الجيلان بإضافة حجمان من كحول الأيزوبروبايل (99%) لحجم واحد من الراشح. رج المزيج بقوة وترك لمدة 24 ساعة على 4 م° لترسيب الجيلان الذي جمع بالطرد المركزي بالطريقة أعلاه وجفف في فرن على حرارة 60 م° لمدة 12 ساعة ثم وزن الناتج (Manna وآخرون، 1996).

تأثير الظروف التغذوية في إنتاج الجيلان: لتعيين تأثير الظروف التغذوية لإنتاج الجيلان من قبل البكتريا *S. paucimobilis* تمت عملية التخمر بزرع البكتريا بكمية 10% من اللقاح في دوارق مخروطية تحوي وسط الإنتاج والتحضين في الحاضنة الهزازة الدوارة بسرعة رج 250 دورة بالدقيقة على درجة حرارة 30 م° ولمدة 48 ساعة. تم تثبيت تركيب وسط الإنتاج بإستثناء العامل المطلوب دراسة تأثيره الذي تغير وفقاً لمتطلبات التجربة.

نوع المصدر الكربوني: أستخدمت سكريات الكلوكوز والسكروز والفركتوز واللاكتوز كلاً على حدة بتركيز 2% (و/ح) في وسط إنتاج الجيلان الأساسي. وزع بكميات 50 مل من كل وسط في دوارق سعة 250 مل ثم التلقيح والتحضين كما ذكر في أعلاه.

تركيز المصدر الكربوني (الكلوكوز): تم إضافة سكر الكلوكوز بتراكيز 1 و 2 و 3 و 4 % (و/ح) إلى وسط الإنتاج الأساسي ثم وزع بكميات 50 مل في دوارق سعة 250 مل ثم تلقيح الوسط والتحضين.

نوع المصدر النتروجيني: أستخدمت سبعة مصادر نتروجينية تضمنت كبريتات وكلوريد الأمونيوم ونترات الصوديوم والبوتاسيوم وخلاصة الخميرة والببتون والتربتون. أضيفت هذه المصادر كلاً على حدة بتركيز 0.05% إلى وسط الإنتاج ثم وزع بكميات 50 مل من الوسط في دوارق سعة 250 مل ثم التلقيح والتحضين.

تركيز المصدر النتروجيني العضوي (مستخلص الخميرة): أضيف مادة مستخلص الخميرة بتراكيز صفر و 0.03 و 0.05 و 0.10 % إلى 50 مل من وسط الإنتاج الأساسي ووضعت في دوارق سعة 250 مل ثم لقحت الأوساط الزرعية بإضافة 10% من اللقاح ثم التحضين.

تركيز المصدر النتروجيني اللاعضوي: أضيفت مادة كلوريد الأمونيوم بتراكيز 0.03 و 0.05 و 0.10 و 0.15 % إلى وسط الإنتاج الأساسي ثم وزع بكميات 50 مل في دوارق سعة 250 مل ثم لقحت الأوساط الزرعية بإضافة اللقاح والتحضين.

إضافة الأحماض الأمينية: أضيفت خمسة أحماض أمينية كلاً على حدة إلى وسط الإنتاج وهي الألانين والآرجنين والتربتوفان والثريونين والسستين وبتركيز 0.05% من وسط الإنتاج الأساسي ووزع بكميات 50 مل في دوارق سعة 250 مل ثم التقيح الأوساط ثم التحضين.

إضافة المواد الخافضة للشد السطحي اللاأيونية: أضيفت المواد الخافضة للشد السطحي اللاأيونية وهي الـ Triton x-100 و الـ Tween 40 والـ Tween 80 كلاً على حدة بتركيز 0.1% إلى وسط الإنتاج الأساسي ثم وزعت في دوارق سعة 250 مل ثم لقح الوسط وحضن كما في أعلاه.

التحليل الإحصائي: تم تحليل البيانات وفق نظام التجارب العاملية والبسيطة باستخدام التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (CRD) ضمن البرنامج الإحصائي الجاهز (Anonymous، 2001). في حالة وجود فروقات معنوية استخدم اختبار دنكن المتعدد المدى (1955) لتحديد معنوية الفروقات مابين المتوسطات المختلفة عند مستوى إحتمالية 0.05.

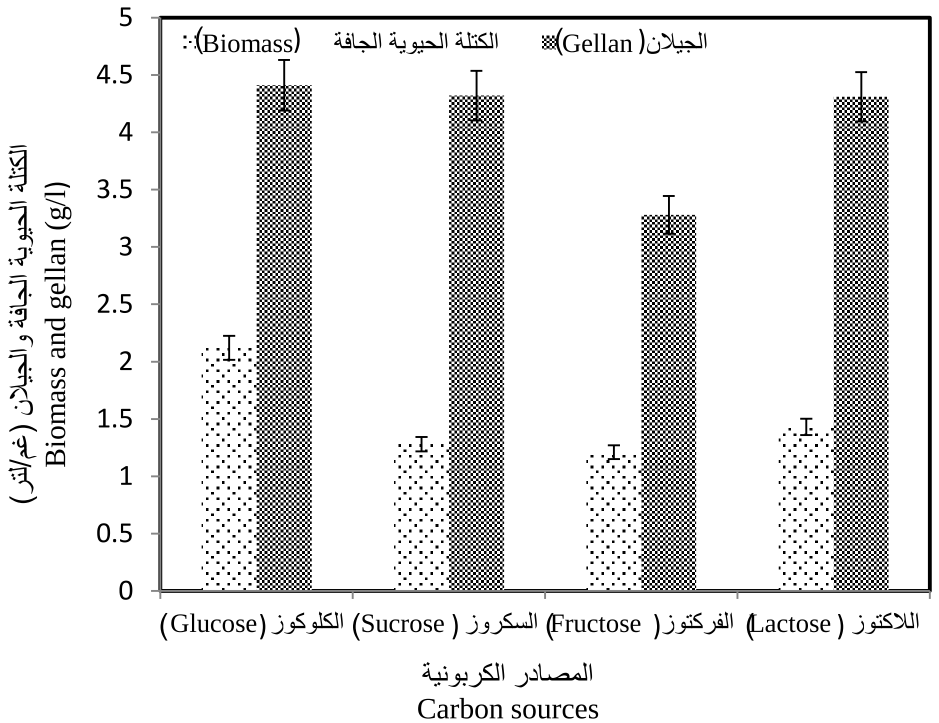
النتائج والمناقشة

تأثير نوع المصدر الكربوني: أستخدمت في هذه التجربة أربعة من المصادر الكربونية وهي الكلوكوز والسكروز والفركتوز واللاكتوز بتركيز 2% كمصدر وحيد للكربون والطاقة لتنمية البكتريا *S. paucimobilis* على وسط الإنتاج الأساسي لإنتاج الجيلان. أظهرت النتائج المبينة في الشكل (1) أن أقصى إنتاجية من الجيلان كانت 4.41غم/لتر وذلك عند إستخدام الكلوكوز بوصفه مصدراً كربونياً ويعزى سبب ذلك إلى كون الكلوكوز

من السكريات البسيطة وسريعة الإستهلاك والتمثيل من قبل الأحياء المجهرية وجاءت هذه النتائج مطابقة مع ما وجده Kang وآخرون (1982) و Lobas وآخرون (1992) عندما استخدموا الكلوكوز كأفضل مصدر كربوني لإنتاج الجيلان بسبب تأثيرها المباشر على النتاج أو المحصول وعلى مكونات وتركيب وخصائص السكر وبكمية 8-10غم /لتر. كما تشير النتائج إلى عدم وجود فروقات معنوية بين سكر الكلوكوز وسكر السكروز 4.32غم/لتر وسكر اللاكتوز 4.31غم/لتر.

إن إمتلاك هذه البكتريا لإنزيم الـ ß- galactosidase الذي يعمل على تكسير اللاكتوز إلى كلوكوز وكالاكتوز يفسر سبب دعم سكر اللاكتوز لإنتاج الجيلان، ولكون هذه السكريات تؤثر على الخصائص الريولوجية والتركيب الكيميائي للسكر المتعدد، وهذا ما أشار إليه Fialho وآخرون (1999) عند إستخدام الكلوكوز واللاكتوز بنفس التركيز فقد وجدوا بأن الاختلاف كان في خصائص السكر وليس في كمية السكر الناتج لكون المصدر الكربوني من المكونات الأكثر أهمية في الأوساط الزرعية لتأثيرها المباشر على النتاج من جهة وعلى مكونات وتركيب السكر الناتج من جهة أخرى. أما عند إستخدام الفركتوز كمصدر وحيد للكربون فقد حصل إنخفاض معنوي في كمية الجيلان والذي بلغ 3.28غم/لتر، وجاءت هذه النتيجة مطابقة لنتائج Kanari وآخرون (2002) حيث كان الكلوكوز الأفضل من بين المصادر الكربونية المختلفة المستخدمة.

فيما يخص الكتلة الحيوية كان أعلى إنتاج 2.12غم/لتر عند إستخدام الكلوكوز في حين لم تسجل أية فروقات معنوية في إنتاجية الكتلة الحيوية عند إستخدام كل من السكروز والفركتوز أو اللاكتوز إذْ كانت الكتلة الحيوية 1.28 و 1.21 و 1.34غم/لتر، على التوالي. وهذا ماشار اليه Wang واخرون (2006) عندما استخدموا وسط مبسط لانتاج الجيلان مع وقت تحضين قصيرباستخدام الكلوكوز كمصدر كربوني. يلاحظ من الشكل بأن إنتاج الجيلان لا يعتمد بصورة كبيرة على كمية الكتلة الحيوية المنتجة بإستخدام سكر معين. فعند استخدام الكلوكوز كانت كمية الكتلة الحيوية أكبر من الكتلة الحيوية المنتجة من سكر السكروز إلاّ أنه لا يوجد فرق معنوي بين كمية الجيلان المنتجة من السكرين، وهذا ما أشار إليه Kanari وآخرون (2002) بأن تصنيع الجيلان يعتمد جزئياً على النمو (Partial growth dependet) فبالرغم من أن إنتاج الجيلان يستمر حتى طور الثبات(Stationary phase) إلا إن النسبة تنخفض مقارنة بطور النمو اللوغارتمي.



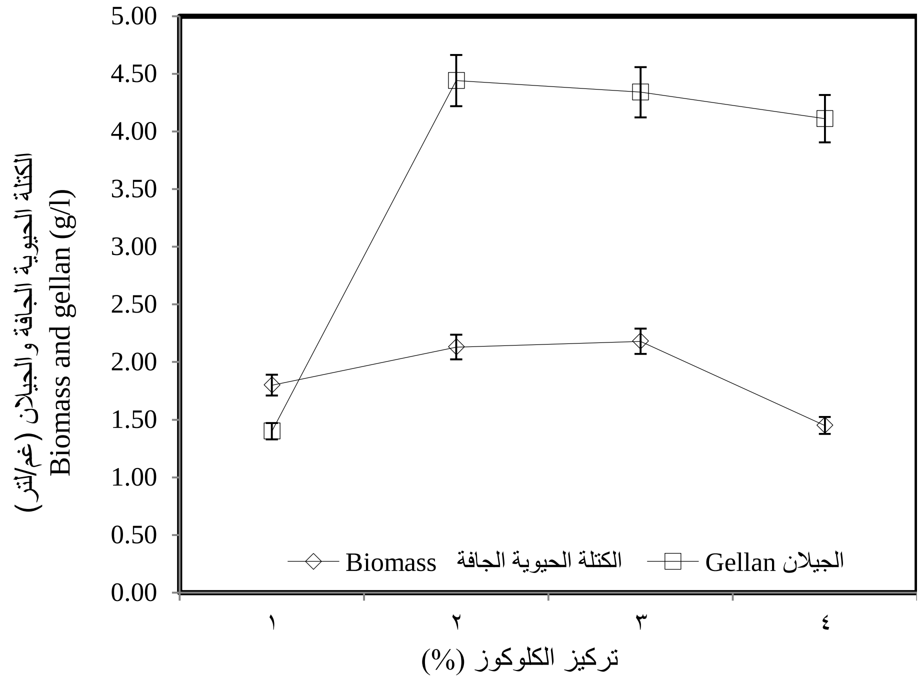
الشكل (1): تأثير المصدر الكربوني بتركيز 2% في إنتاج الجيلان.

Figure (1): Effect of carbon source on gellan production

تأثير تركيز سكر الكلوكوز: تم في هذه التجربة إستخدام المصدر الكربوني سكر الكلوكوز كونه أعطى أعلى إنتاج من السكر في وسط إنتاج الجيلان الأساسي بتراكيز 1 و2 و3 و4% لتحديد التركيز الأمثل لإنتاج الجيلان.

الشكل (2) يبين إن أعلى إنتاج للجيلان كان 4.44 و 4.34غم/لتر وذلك عند إستخدام السكر بالتركيزين 2 و3%، على التوالي، مع عدم ملاحظة فرق معنوي بينهما، في حين بدأ إنتاج الجيلان بالإنخفاض إلى أن وصل 4.11غم/لتر عند تركيز 4%، وهذا ربما يشير إلى أن التركيز 2% زود الكائن المجهري بالطاقة الضرورية للنمو والإنتاج الأفضل من الجيلان.

أشارت دراسات عدة إلى تفاوت تراكيز الكلوكوز المستخدمة في إنتاج الجيلان. فقد أشار كل من Kang وآخرون (1982) و Lobas وآخرون (1992) و Vanderhoff وآخرون (2010) بأن الكلوكوز بتركيز 3% كان أفضل مصدر كربوني لإنتاج الجيلان وبكمية تراوحت بين 8-10غم/لتر في حين إستخدم Lim وآخرون (2003) الكلوكوز بتركيز 1% وحصل على نتاج بكمية 1.52غم/لتر. أما فيما يخص النمو الخلوي للبكتريا فقد بدا واضحاً إن هناك زيادة في إنتاج الكتلة الحيوية حصلت عند إستخدام التركيز 3% ولا يوجد فرق معنوي في إنتاج الكتلة الحيوية عند إستخدام التركيزين 2 و 3% إذ بلغت كمية الكتلة الجافة 2.12 و 2.18غم/لتر، على التوالي، فالبرغم من إن كمية الكتلة الحيوية كانت أكبر عند إستخدام التركيز 3% مقارنة بالتركيز 2% إلا أن الأخير دعم إنتاج الجيلان. في حين حصل إنخفاض معنوي في النمو الخلوي للبكتريا ووصل إلى 1.45غم/لتر بزيادة تركيز الكلوكوز إلى 4%. ويعزى سبب إنخفاض إنتاج الجيلان والكتلة الحيوية بزيادة تركيز الكلوكوز إلى حدوث الكبح الهدمي (Catabolic repression) مما أدى إلى تثبيط النمو الخلوي وإنتاج الجيلان وهذا يتفق مع نتائج Kanari وآخرون (2002) و Wang وآخرون (2006) و Lee وآخرون (2010).

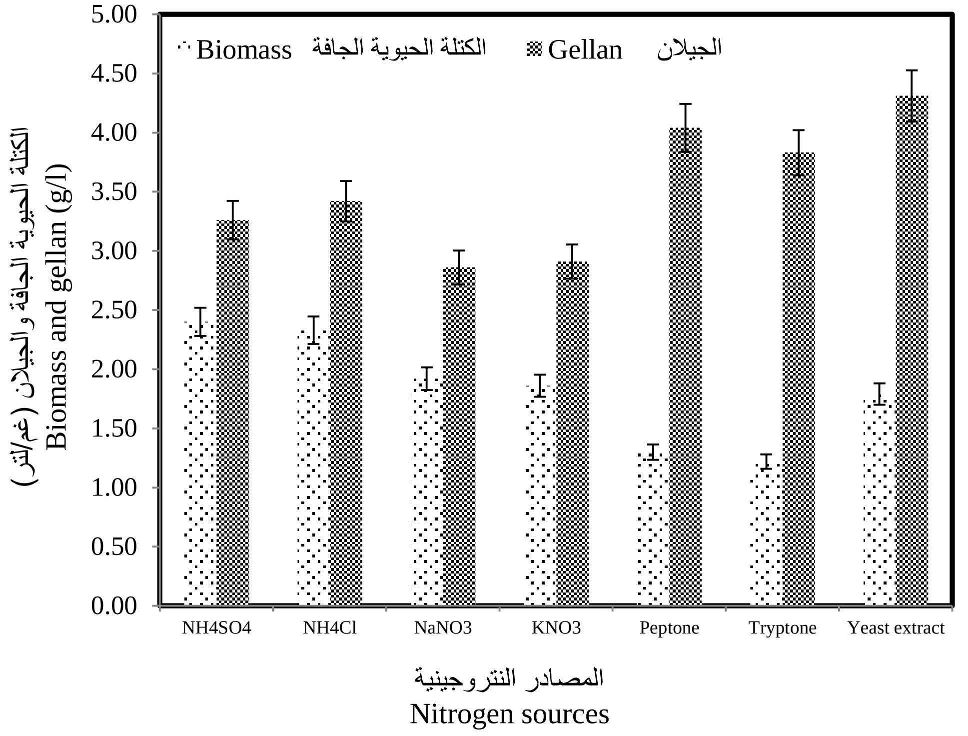


الشكل (2): تأثير تركيز سكر الكلوكوز في إنتاج الجيلان.

Figure (2): Effect of glucose concentration on gellan production.

تأثير نوع المصدر النتروجيني: أضيفت مصادر نتروجينية مختلفة إلى وسط إنتاج الجيلان الأساسي بهدف تحسين إنتاج الجيلان من قبل البكتريا *S. paucimobilis*. كانت أربعة من هذه المصادر لاعضوية وهي كبريتات الأمونيوم وكلوريد الأمونيوم ونترات الصوديوم ونترات البوتاسيوم وأثنين منها كانت عضوية وهي الببتون والتربتون إضافةً إلى مستخلص الخميرة الموجود في الوسط الأساسي (عينة سيطرة) إلى وسط الإنتاج وبتركيز 0.05%.بينت النتائج في الشكل (3) إن أقصى إنتاج للجيلان كان 4.31غم/لتر وذلك عند إستخدام مستخلص الخميرة وتلاه الببتون والتربتون اللذان أعطيا 4.04 و 3.83غم/لتر، على التوالي، كمصادر نتروجينية عضوية. إن المصادر النتروجينية العضوية ومنها مستخلص الخميرة غنية بمحتواها من الأحماض الأمينية والفيتامينات والتي من الممكن تلعب دوراً في تحسين إنتاج الجيلان وجاءت هذه متفقة مع نتائج West و Strohfus (1999) اللذان أشارا إلى أن تركيز الجيلان والكتلة الحيوية بدون إضافة مستخلص الخميرة تكون

قليلة مقارنة مع الوسط المضاف إليه وبتركيز 0.05 و 0.1% بعد 1-3 أيام بوجود الكلوكوز كمصدر كربوني، كما أشار Bajaj وآخرون (2006) إنه من بين المصادر النتروجينية المختلفة فقط مستخلص الخميرة والببتون وبتركيز 0.05% أعطيا أعلى إنتاجاً للجيلان بعد 48 ساعة تحضين. اما Nampoothiri وآخرون (2003) فقد وجدوا إن التربتون بتركيز 0.05% كان الأفضل بالمقارنة مع باقي المصادر النتروجينية العضوية في إنتاج الجيلان. بالنسبة للمصادر النتروجينية غير العضوية، فيلاحظ من الشكل نفسه بأن كلوريد الأمونيوم كان الأفضل في دعم إنتاج الجيلان إذ بلغ إنتاج الجيلان عند إستخدامه 3.42غم/لتر، تلاه كبريتات الأمونيوم 3.26غم/لتر وجاءت هذه مخالفة لنتائج Nampoothiri وآخرون (2003) الذين إستخدموا مصادر نتروجينية مختلفة لإنتاج الجيلان ووجدوا أن كبريتات الأمونيوم كانت الأفضل من بين المصادر الأخرى المستخدمة. يلاحظ من الشكل أيضاً إنخفاض معنوي في الإنتاجية عند إستخدام كلاً من نترات الصوديوم والبوتاسيوم اللذان أعطيا 2.86 و 2.91غم/لتر، على التوالي، مما يدل إلى ضعف قدرة البكتريا في الإستفادة من هذه المصادر وتمثيلها بشكل جيد.



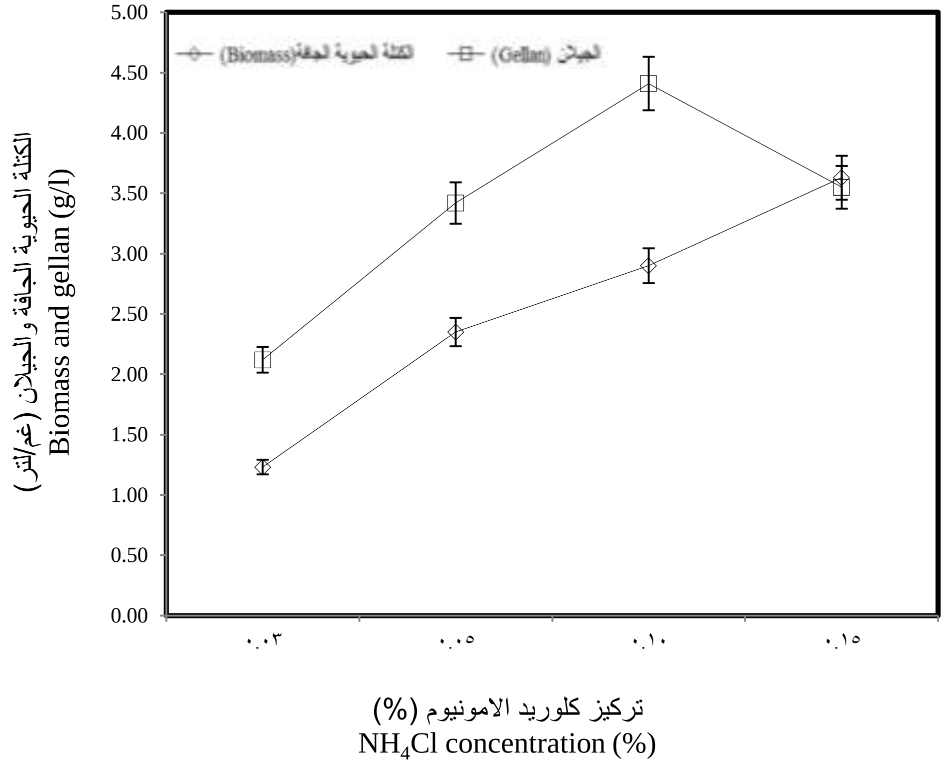
الشكل (3): تأثير المصدر النتروجيني بتركيز 0.05% في إنتاج الجيلان.
Figure(3): Effect of nitrogen source on gellan production.

أما فيما يخص النمو الخلوي فقد كان أقصى إنتاج للكتلة الحيوية 2.40غم/لتر عند إستخدام كبريتات الأمونيوم ولم يسجل فرق معنوي مع كلوريد الأمونيوم 2.33غم/لتر في حين كانت اقل إنتاجية للكتلة الحيوية 1.22غم/لتر عند إستخدام التربتون. واللاعضوية على إنتاج الجيلان والكتلة الحيوية ووجدوا أن إستخدام المصادر النتروجينية العضوية تدعم إنتاج الجيلان على حساب الكتلة الحيوية والعكس صحيح عند إستخدام المصادر اللاعضوية حيث دعمت النمو الخلوي للبكتريا على حساب إنتاج الجيلان.وهذا ما لوحظ في نتائج الشكل (3) إذْ إن كمية الكتلة الحيوية المنتجة بإستخدام مصادر نتروجينية لاعضوية كانت أكبر مقارنة بالمصادر النتروجينية العضوية إلاّ أن إنتاج الجيلان كان أكبر بإستخدام المصادر النتروجينية العضوية.

تأثير تراكيز مختلفة من كلوريد الأمونيوم كمصدر نتروجيني وحيد: يبين الشكل (4) تأثير إستخدام كلوريد الأمونيوم كأفضل مصدر نتروجيني لاعضوي، بتراكيز مختلفة وهي 0.03 و 0.05 و 0.10 و 0.15% في إنتاج الجيلان. يشير الشكل إلى أن أقصى إنتاج للجيلان بلغ 4.41غم/لتر وذلك عند إستخدام كلوريد الأمونيوم بتركيز 0.10%، وأن إستخدام تراكيز أعلى أو أدنى من كلوريد الأمونيوم سبب إنخفاض معنوي في إنتاج الجيلان، في حين لوحظ إرتفاع معنوي في إنتاج الكتلة الحيوية مع زيادة تركيز كلوريد الأمونيوم حيث أعطى

التركيز المستخدم وهو 0.15% أعلى إنتاج للكتلة الحيوية والتي بلغت 3.63غم/لتر، بينما كانت أقل إنتاجية وهي 1.23غم/لتر عند إستخدام التركيز 0.03%.

إن إختلاف النسبة بين C/N في وسط إنتاج الجيلان تعد من العوامل الرئيسية التي تؤثر على إنتاج الجيلان والنمو الخلوي للبكتريا (Huang وآخرون، 2012). إن إختيار المصدر النتروجيني المناسب وتركيزه يؤثر على إتاحة المصدر الكربوني بإتجاه تكوين الكتلة الحيوية أو إنتاج الجيلان لذا فمن المهم خلق حالة توازن بين المصدر الكربوني والنتروجيني (Lim وآخرون، 2003). إذ يلاحظ من الشكل (4) إنه بالرغم من إن أعلى قيمة للكتلة الحيوية كانت عند إستخدام التركيز 0.15% إلا أنها لم تدعم إنتاج الجيلان مقارنة بالتركيز 0.10% وهذا ما يدل على أن إنتاج الجيلان لا يعتمد كلياً على الكتلة الحيوية.

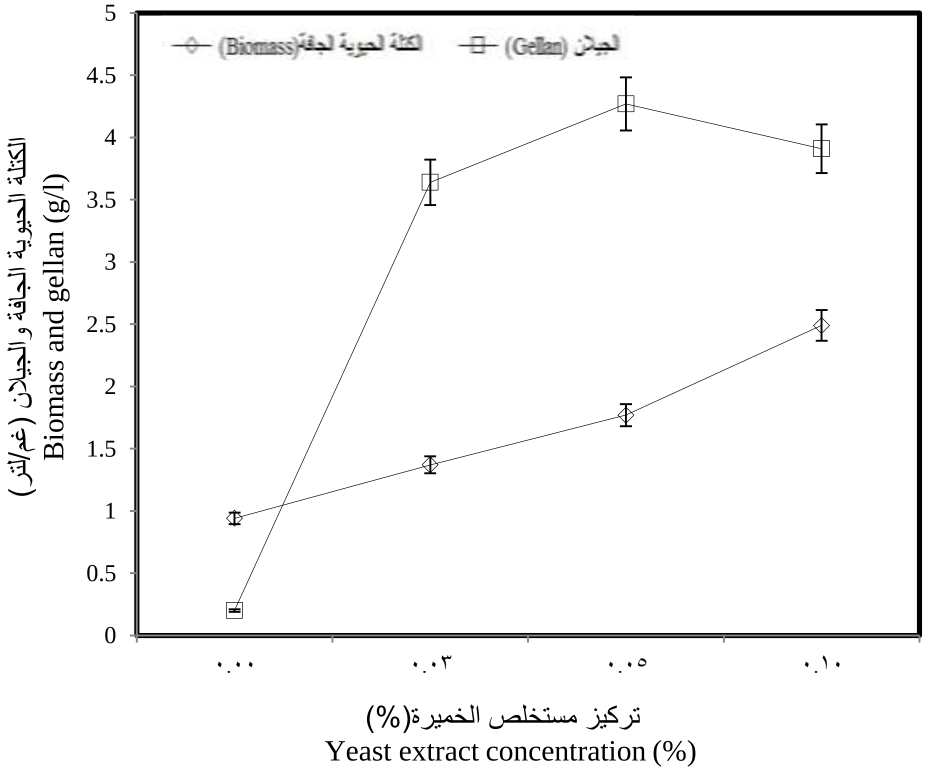


الشكل (4) : تأثير تركيز كلوريد الأمونيوم في إنتاج الجيلان.
Figure(4): Effect of ammonium chloride concentration on gellan production.

تأثير مستخلص الخميرة كمصدر نتروجيني وحيد: توضح النتائج في الشكل (5) تأثير إضافة مستخلص الخميرة، والتي أعطت أعلى إنتاجية، بتراكيز مختلفة (0.00 و 0.03 و 0.05 و 0.10%) كمصدر وحيد للنتروجين العضوي في إنتاج الجيلان من قبل البكتريا *S. paucimobilis* يلاحظ من الشكل وجود إختلافات معنوية في تراكيز الجيلان المنتج في وسط الإنتاج، فعند غياب مستخلص الخميرة من الوسط لوحظ إنخفاض معنوي كبير في كل من النمو الخلوي وكمية الجيلان فبلغا 0.94 و0.20غم/لتر، على التوالي، في حين كان أقصى إنتاج للجيلان 4.27غم/لتر عند إستخدام التركيز 0.05%، كما لوحظ إنخفاض معنوي في إنتاج الجيلان عند إستخدام تركيز أعلى أو أدنى من هذا التركيز الأمثل، وجاءت هذه النتيجة متفقة مع نتائج كل من Kang وآخرون (1982) و Manna وآخرون (1996) و Richau وآخرون (1997)، في حين كانت غير متفقة مع نتيجة Dlamini وPeiris (1997) اللذان وجدا بأن مستخلص الخميرة بتركيز 0.10% أعطى أفضل إنتاج للجيلان في وسط الشرش.

يلاحظ من الشكل نفسه إن إنتاج الكتلة الحيوية تزداد تدريجياً وبشكل معنوي مع زيادة تركيز مستخلص الخميرة إلى أن وصل 2.49غم/لتر عند التركيز 0.10%، وربما يعود سبب هذه الإختلافات إلى نوعية الخميرة المستخدمة إذ يعد ذلك عاملاً مؤثراً في الأنزيمات الفعالة في عملية تصنيع السكر المتعدد الجيلان بسبب

الاختلافات في محتواها من الفيتامينات والأحماض الأمينية والكربوهيدرات (Barker و Ajongwen، 1991).

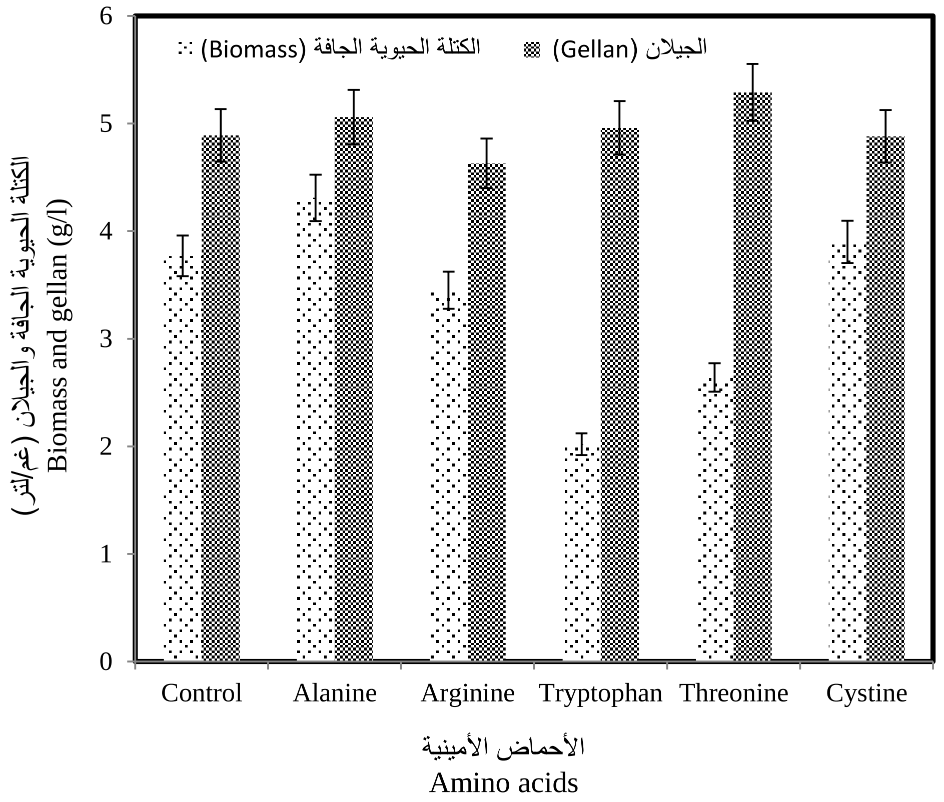


الشكل (5): تأثير تركيز مستخلص الخميرة في إنتاج الجيلان.

Figure(5): Effect of yeast extract concentration on gellan production.

تأثير إضافة الأحماض الأمينية: تم إستخدام أحماض أمينية مختلفة بوصفها مدعمات لوسط إنتاج الجيلان فضلاً عن كونها مصادر نتروجينية. تبين النتائج في الشكل (6) أن إضافة الحامض الأميني الثريونين قد أعطى أقصى إنتاجية للجيلان 5.29غم/لتر، في حين كان أقل إنتاجية للجيلان 4.63غم/لتر عند إضافة الحامض الأميني الآرجنين. يلي الثريونين في دعم إنتاج الجيلان الحامض الأميني الألانين إذ بلغت إنتاجية الجيلان 5.06غم/لتر. كما أعطى كلاً من السستين وعينة السيطرة (Control) إنتاجية متقاربة للجيلان بلغت 4.88 و 4.89غم/لتر، على التوالي. وهذا ما أشار إليه كل من Ashtaputre و Shah (a1995 وb) و Nampoothiri وآخرون (2003) و Bajaj وآخرون (2006) الذين وجدوا أن أفضل الأحماض الأمينية المستخدمة كمصادر نتروجينية ومدعمات وسط إنتاج الجيلان هي التربتوفان والثريونين وحامض الكلوتاميك وبتركيز 0.05%. إذ إن الأحماض الأمينية استخدمت من قبل بعض الباحثين كمصادر نتروجينية أو كمحفزات للإنتاج الجيلان. فيما يخص الكتلة الحيوية فقد تم الحصول على أقصى إنتاجية لها 4.31غم/لتر عند إضافة الحامض الأميني الألانين في حين كانت اقل إنتاجية لها 2.02غم/لتر عند إضافة الحامض الأميني التربتوفان، كما يتبين من الشكل أيضاً إن أعلى قيمة للكتلة الحيوية كانت عند استخدام الألانين الذي لم يدعم إنتاج الجيلان مقارنة بالحامض الأميني الثريونين الذي دعم إنتاج الجيلان على حساب الكتلة الحيوية. إن أوساط إنتاج الجيلان عادة تحتوي على مركبات معقدة كالفيتامينات والأحماض الأمينية التي تحسن من النمو الخلوي والجيلان (Giavasis وآخرون، 2000).

تأثير إضافة المادة الخافضة للشد السطحي اللاأيونية: تم إضافة المواد الخافضة للشد السطحي اللاأيونية وهي Triton x-100 وTween 80 و Tween 40 بتركيز 0.1 % كون هذه المواد تعمل على زيادة نفاذية الأغشية والتكتل الخلوي وبالتالي إفراز البوليمر الى وسط إنتاج الجيلان الأساسي.

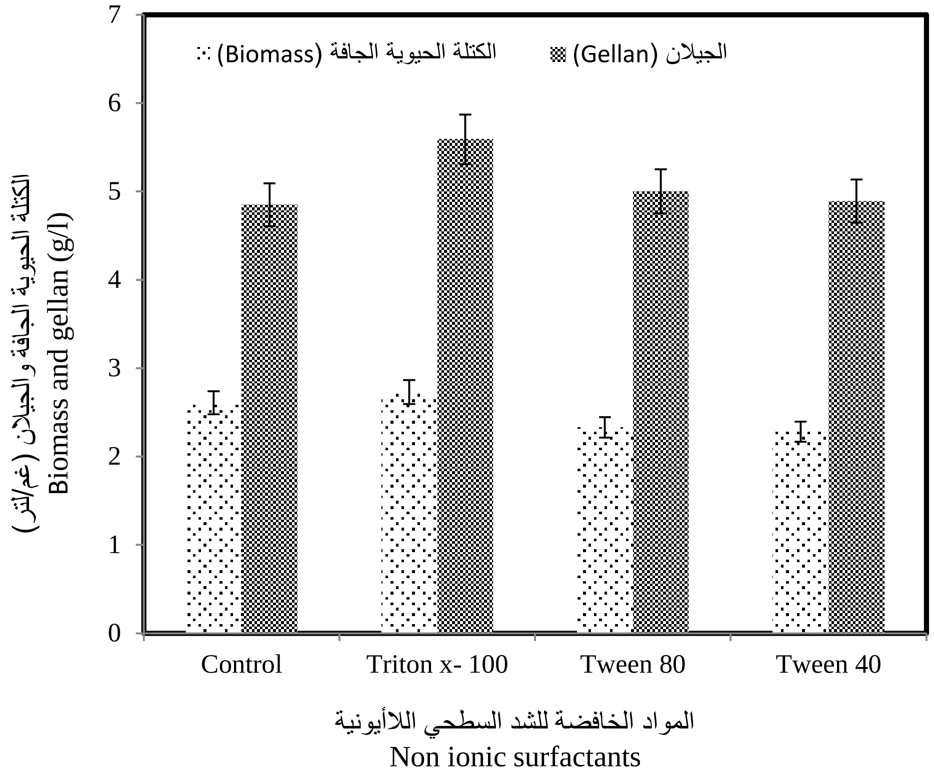


الشكل(6): تأثير إضافة الأحماض الأمينية بتركيز 0.05% في إنتاج الجيلان.

Figure(6): Effect of addition amino acids on gellan production.

يلاحظ من النتائج في الشكل (7) أن أقصى إنتاج للجيلان بلغ 5.59غم/لتر وكان عند إضافة مادة الـ Triton x-100 في حين أعطى كلاً من الـ Tween 80 والـ Tween 40 وعينة السيطرة إنتاجية أقل من الجيلان ومتقاربة وبلغت 5.00 و 4.89 و 4.85غم/لتر، على التوالي. بالنسبة للكتلة الحيوية كان أقصى إنتاجية لها 2.73غم/لتر عند إضافة الـ Triton x-100 ولم يسجل فرق معنوي مع عينة السيطرة، كما أعطى كل من الـ Tween 80 والـ Tween 40 إنتاجية متقاربة من الكتلة الحيوية وبلغت 2.33 و 2.28غم/لتر، على التوالي. جاءت هذه النتيجة مطابقة لنتائج Arockiasamy و Banik (2008) إذْ إستخدما المواد الخافضة للشد السطحي الـ Triton x-100 والـ Tweens لتحسين إنتاج الجيلان حيث كان أفضل هذه المواد الـ Triton x-100 التي أعطت أعلى إنتاج للجيلان بلغ 10.44غم/لتر ثم الـ Tween 80 ثم الـ Tween 40 مقارنة بدون إضافة هذه المواد. كما ذكر Banik وSanthiagu (2007) أن عمل هذه المواد يكون من خلال تفاعلها مع الغشاء الخلوي بطريقة ما تؤدي إلى تحسين عملية بلمرة جزيئات الجيلان أو/و بالنقل المسهل كما إنها تحسن من انتقال المغذيات والأوكسجين مسببة زيادة استهلاك المغذيات لإنتاج الجيلان وبالتالي تحسن الصفات الريولوجية له.

يستنتج من هذا البحث إن أفضل الظروف التغذوية لإنتاج سكر الجيلان هي بإستخدام سكر الكلوكوز كمصدر كربوني بتركيز 2-3%، ومستخلص الخميرة بتركيز0.5% كمصدر نتروجيني عضوي وكلوريد الأمونيوم بتركيز 0.1% كمصدر نتروجيني لا عضوي، كما إن إضافة بعض المدعمات الى وسط الإنتاج دعم إنتاج الجيلان كالحامض الأميني الثريونين بتركيز 0.05% والمادة الخافضة للشد السطحي الـ Triton x-100 بتركيز 0.1%.



الشكل (7) : تأثير إضافة المادة الخافضة للشد السطحي اللا أيونية بتركيز 0.1% في إنتاج الجيلان
Figure(7): Effect of addition non-ionic surfactants on gellan production.

PRODUCTION OF THE MICROBIAL EXOPOLYSACCHARIDE, GELLAN, BY *SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS* BACTERIA.
2.OPTIMIZATION OF GROWTH CULTURAL COMPOSITION

Jafar, N. B. Moafak M. Ahmad
Food Sci.Dept., College of Agriculture and Forestry, Mosul University. Iraq
E-mail: nihanbayati@yahoo.com

ABSTRACT

The purpose of this study was to find the optimum growth cultural composition for the production of the microbial exopolysaccharide, gellan, by the bacteria *Sphingomonas paucimobilis* using batch cultural method in laboratory media. The study included the effect of the type and concentration of organic compounds as a sole carbon source, type and concentration of organic and non-organic nitrogen source, as well as, the effect of adding of some amino acids and non-ionic surfactants to the gellan production basal medium. The physical cultural conditions were fixed, and the production was carried for 48hrs incubation period, 10% inoculums volume, initial pH of 7.0, incubation temperature at 30^{o}c and agitation speed of 250 rpm in an orbital shaker incubator. Results indicated that the best organic source was glucose at a concentration of 2% as it resulted in 4.44g of gellan/l of production medium, and the best organic nitrogen source was yeast extract at 0.05% and the best non-organic nitrogen source was ammonium chloride at 0.1% concentration, as they gave 4.27 and

4.41 g/l, respectively. On the other hand, the amino acid threonine at 0.05% was the best among other amino acids, and the non-ionic surfactant Triton X-100 at 0.1% was the best and they produced 5029 and 5.59 g of gellan/l of the medium.

Keywords: Gellan, *Sphingomonas paucimobilis,* carbon source, nitrogen source, amino acids, non-ionic surfactants.

Received: 30/1/2013, Accepted: 6/5/2013.

المصادر

Anonymous (2001). Statistical Analysis System User′s-Guide. Version 15, Statistical Analysis System Institute. Cary Inc., North Carolina, U.S.A.

Arockiasamy, S. and R. M. Banik (2008). Optimization of gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 with nonionic surfactants using central composite design. *Journal of Bioscience and Bioengineering 105(3): 204-210.*

Ashtaputre, A. A. and A. K. Shah (1995a). Studies on a viscous gel-forming exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1. *Applied and Environmental Microbiology 61(3): 1159-1162.*

Ashtaputre, A. A. and A. K. Shah (1995b). Studies on the exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1: Nutritional requirements and Precursor-forming enzymes. *Current Microbiology 31: 234-238.*

Bajaj, I. B.; P. S. Saudagar; R. S. Singhal and A. Pandy (2006). Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. *Journal of Bioscience and Bioengineering 102(3): 150-156.*

Banik, R. M. and A. Santhiagu (2007). Improvement in production and quality of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* under high dissolved oxygen tension levels. *Biotechnology Letters 28: 1347-1350.*

Barker, P. E. and N. T. Ajongwen (1991).The production of the Enzyme dextran sucrase using non aerated fermentation techniques. *Biotechnology and Bioengineering 37: 703-707.*

Dlamini, A. M. and P. S. Peiris (1997). Production of exopolysaccharide by *Pseudomonas* sp.ATCC 31461(*Pseudomonas elodea*) using whey as fermentation substrate. *Applied Of Microbiology and Biotechnology 47: 52-57.*

Dreveton, E.; F. Monot; D. Ballerini; J. Lecourtier and L. Choplin (1994). Effect of mixing and mass transfer conditions on gellan production by *Auromonas elodea*. *Journal of Fermentation and Bioengineering 77: 642-649.*

Duncan, D. B. (1955). Multiple range and F. test, Biometric, 11: 42.

Fialho, A. M.; L. O. Martins; M. Donval; J. H. Leitao; M. J. Ridout; A. J. Jay; V. J. Morris and I. Sa-Correia (1999). Structures and properties of gellan polymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 from lactose compared with those produced from glucose and from cheese whey. *Applied and Environmental Microbiology 65(6): 2485-2491.*

Giavasis, I.; L. M. Harvey and B. McNeil (2000). Gellan gum. *Critical Review Biotechnology 20(3): 177-211.*

Huang, J.; S. Jiang; X. Xu; H. Wu; X. Zhu; Z. Ke; J. Cai; L. Huang and Z. Xu (2012). Effects of carbon/nitrogen ratio, dissolved oxygen and impeller system on gellan gum production in *Sphingomonas paucimobilis*. *Annals of Microbiology 62: 299-305.*

Kanari, B.; R. R. Banik and S. N. Upadhyay (2002). Effect of environmental factors and carbohydrate on gellan gum production. *Applied Biochemistry and Biotechnology 102-103: 129-140.*

Kang, K. S.; G. T. Veeder; P. J. Mirrasoul; T. Kaneko and I. W. Cottrell (1982). Agar-like polysaccharide produced by *Pseudomonas* species: Production and Basic Properties. *Applied and Environmental Microbiology 43(5): 1086-1091.*

Kuo, M. S.; A. J. Mort and A. Dell (1986). Identification and location of L-glycerate, an unusual substituent in gellan gum. *Carbohydrate Research 56:173–187.*

Lee, N.; H. Seo; Y. Cho; C. Son; W. Gao and J. Lee (2010). Enhanced production of gellan by *Sphingomonas paucimobilis* NK 2000 with shifts in agitation speed and aeration rate after glucose feeding into the medium. *Journal of Life Science 20(6): 811-818.*

Lim, S.; J. R. Wu; J. Lee and S. Kim (2003). Optimization of culture condition for the gellan production by *Pseudomonas elodea* ATCC 31461. *Korean Journal of Life Science 13(5): 705-711.*

Lobas, D.; S. Schumpe and W. D. Deckwer (1992). The production of gellan exopolysaccharide with *Sphingomonas paucimobilis* E2(DSM 6314). *Applied Micobiology and Biotechnology 37: 411-415.*

Manna, B.; A. Gambhir and P. Ghosh (1996). Production and rheological characteristics of the microbial polysaccharide gellan. *Letters in Applied Microiology 23: 141-145.*

Martins, L. O.; L. C. Brito and I. S-Correia (1990). Roles of Mn^{+2}, Mg^{+2}, and Ca^{+2} on alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa. EnzymeMicrobiology and Technology 12: 794-799.*

Nampoothiri, K. M.; R. R. Singhania; C. Sabarinath and A. Pandey (2003). Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. *Process Biochemistry 38: 1513-1519.*

Novak, J. S.; S. W. Tanenbaum and J. P. Nakas (1992). Heteropolysaccharide formation by *Arthrobacter viscosus* grown on xylose and xylose oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology 58**:**3501–3507.*

Ozdemir, M.; S. Pekcan, M. Demicili; F. Tasbent; B. Feyzoglu; S. Pirinc and M. Baykan (2011). A Rare cause of Bacteremia in a pediatric patient with down syndrome: *Sphingomonas Paucimobilis . International Journal of Medical Sciences 8(7): 537-539.*

Pszczola, D. E. (1993). Gellan gum wins IFTS Food Technology Industrial Achievement Award. *Food Technology 47: 94-96.*

Rajasekaran, R.; R. Chandrasekaran and M. Muthuselvan (2008). Microbial biotechnology, Rapid advances in an area of massive impact. *Review, Advanced Biotechnology 4: 19-25.*

Richau, J. A.; D. Choquenet; A. M. Fialho; L. M. Moreira and I. Sa-Correia (1997). The biosynthesis of the exopolysaccharide gellan results in the decrease of *Sphingomonas paucimobilis* tolerance to copper. *Enzyme Microbial Technology 20: 510-515.*

Sutherland, I. W. (1990). Biotechnology Of Microbial Exopolysaccharides. Cambridge University Press.

Vanderhoff, A.; W. R. Gibbons; N. Bauer and T. P. West (2010). Development of a low-cost medium for production gellan from *Sphingomonas paucimobilis*. *Journal of Biotechnology Research 2: 67-78.*

Vartak, N. B.; C. C. Lin; J. M. Cleary; M. J. Fagan and M. H. Saier (1995). Glucose metabolism in *Sphingomonas elodea* pathway engineering via costuction of a glucose 6-phosphate dehydrogenase insertion mutant. *Microbiology 141: 2339-2350.*

Wang, X.; P. Xu; Y. Yuan; C. Liu; D. Zhang; Z. Yang; C. Yang and C. Ma (2006). Modeling for gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 in a simplified medium. *Applied and Environmental Microbiology 72(5): 3367-3374.*

West, T. P. and B. Strohfus (1999). Influence of yeast extract on gellan production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. *Microbios 97: 85-93.*

West, T. P. and N. A. Fullenkamp (2000). Ability of casamino acids to support gellan production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. *Microbios 102: 89-101.*