دراسة تأثير مصادر كاربونية ونيتروجينية مختلفة في إنتاج السكر المتعدد الزانثان بواسطة البكتريا *Xanthomonas campestris* ATCC13951

محمد بشير إسماعيل قاسم   زينة وجيه الجادر

قسم علوم الحياة / كلية التربية

جامعة الموصل

الاستلام   القبول

٢٣ / ٠٩ / ٢٠١٠   ٠٣ / ١١ / ٢٠١٠

Abstract

This research includes the study of effect of various carbon and nitrogen sources to achieve maximum production of Xanthan by bacterium *Xanthomonas campestris* ATCC 13951. the results showed that use of source as a carbon sucrose gave the highest production of xanthan(14.01g/l) polysaccharide after six days of incubation. Lowest production of xanthan (3.01 g/l) was obtained when lactose was used as a carbon source. maximum biomass (4.1g/l) was obtained when galactose was used as a carbon source and lowest biomass(1.41g/l) was obtained when xylose was used as a carbon source. The result also showed that maximum production of xanthan (13.98 g/l) was obtained when phenylalanine was used as a nitrogen source while lowest production of xanthan (7.39g/l) was obtained in case when thiourea was used as a nitrogen source. Maximum and minimum production of biomass (3.34 , 1.13g/l) were obtained when sodium nitrogen and thiourea used as a nitrogen source respectively.

الخلاصة

يتضمن البحث دراسة تأثير إضافة مصادر كاربونية مختلفة ومصادر نايتروجينية مختلفة للحصول على أفضل إنتاجية للزانثان بواسطة البكتريا *Xanthomonas cammpestris* ATCC 13951 حيث أظهرت النتائج أن استخدام المصدر الكاربوني السكروز قد أعطى

أقصى إنتاجية من السكر المتعدد الزانثان (١٤.٠١ غم/لتر) بعد ستة أيام من التحضين واقل إنتاجية للزانثان تم الحصول عليها كانت ٣.٠١ غم/لتر عند استخدام اللاكتوز بوصفه مصدراً كاربونياً أما بالنسبة للكتلة الحيوية فقد بينت النتائج أن أقصى إنتاج للكتلة الحيوية كانت ٤.١٠ غم/لتر عند استخدام س كر الكالكتوز بينما اقل إنتاجية كانت ١.٤١ غم/لتر باستخدام سكر زايلوز بوصفه مصدراً كاربونياً. أوضحت نتائج استخدام المصادر النايتروجينية ان استخدام الحامض الاميني فينايل الانين قد أعطى إنتاجية عالية من الزانثان (١٣.٩٨ غم/لتر) في حين اقل إنتاجية للزانثان تم الحصول عليها (٧.٣٩ غم/لتر) عند استخدام الثايويوريا أما أعلى إنتاجية للكتلة الحيوية فكانت ٣.٣٤ غم/لتر عند استخدام نترات الصوديوم واقل إنتاجية (١.١٣ غم/لتر) باستخدام الثايويوريا كذلك.

المقدمة

تم اكتشاف الزانثان عام ١٩٥٠ من قبل العاملين في مركز البحوث الأمريكي Northern Regional Research Laboratory of the U.S. Department of (NRRL) Agriculture وذلك خلال البحث عن الأحياء المجهرية التي لها القابلية على إنتاج الاصماغ Gums التي تذوب في الماء. وبدأ أول إنتاج صناعي للزانثان عام ١٩٦٠ (١) .الزانثان عبارة عن سكر متع دد polysaccharide ذو وزن جزيئي عال ينتج من المزارع النقية للبكتريا *X. campestris*.

يحوي الزانثان على وحدات السكريات كلوكوز Glucose ومانوز Mannose وحامض كلوكيورونيك Glucuronic acid ومجموعتي حامض البايروفيك pyruvic acid وحامض الخليك Acetic acid ويحضر كأملاح الصوديوم أو البوتاسيوم أو الكالسيوم ويكون متعادلاً في محلوله المائي وذو لون اكريمي (١،٢،٣).

ينتج الزانثان بزراعة البكتريا *X. campestris* هوائياً في وسط يتكون من مصدر كاربوني ملائم ومصدر نايتروجيني ومصدر فسفوري والعناصر الضرورية إذ يفصل الزانثان المنتج من الوسط عند اكتمال عملية التخمر (٤).

يتميز الزانثان بأنه مادة كاربوهيدراتية متعددة تذوب في الماء البارد والحار وتعطي لزوجة عالية لمحاليلها باستعمال تراكيز واطئة منها وهي تقاوم التفاوت في درجات الحرارة والأس الهيدروجيني والملوحة العالية وبسبب هذه الصفات الشكلية فإنها تستخدم بوصفها عاملاً مسيطراً على الصفات الريولوجية Rheology control agent في الأنظمة السائلة بوصفها مثبتاً للمستحلبات والعوالق لهذا فان له عدة استخدامات في كثير من المجالات حيث يستخدم في الصناعات الغذائية بالدرجة الرئيسية وفي الصناعات النفطية وفي الصناعات الدوائية ويدخل في تركيب المراهم والكريمات ومنتجات العناية بالبشرة وفي ماكياج العيون كما يستخدم في المجالات الزراعية (٥،٦).

اكتشفت بكتريا الـ *X. campestris* من قبل العالم Smith عام ١٨٩٥ وتتميز بأنها عصوية سالبة لصبغة كرام تتحرك باسواط أحادية القطب، هوائية، والدرجة الحرارية المثالية لنموها هي ٢٨ ^{o}م وتنمو على شكل مستعمرات مخاطية صفراء اللون ناعمة ولزجة .

المواد وطرائق البحث

تم في هذه الدراسة استخدام البكتريا *X. campestris* ATCC 13951 وقد تم الحصول عليها من قسم الأحياء المجهرية /كلية الزراعة/ جامعة عين شمس / القاهرة/ جمهورية مصر العربية.

الأوساط الزراعية Culture Media

١- وسط مستخلص الخميرة والشعير الصلب Yeast Malt Extract Agar Medium

يستخدم هذا الوسط لحفظ البكتريا *Xanthomonas campestris* وزراعتها ويتكون هذا الوسط من المواد الآتية (غم/لتر): مستخلص الخميرة ٣، خلاصة الشعير ٣، بيبتون ٥، كلوكوز ٢٠، أكار ٢٠. حضر هذا الوسط من إذابة المواد كافة في لتر من الماء المقطر وضبط الأس الهيدروجيني عند ٧.٠، وعقم بجهاز الموصدة عند ضغط ١ كغم/سم^{٢} ودرجة حرارة ١٢١ ^{o}م مدة ١٥ دقيقة ثم وزع في أطباق بتري أو أنابيب معقمة (٧).

٢- وسط اللقاح Inoculum medium

يتكون هذا الوسط من نفس مكونات الوسط السابق نفسها عدا افتقاره إلى الاكار وزع الوسط في دوارق زجاجية سعة ٢٥٠ مل بواقع ٥٠ مل لكل دورق ثم عقم الوسط مدة ١٥ دقيقة.

٣- وسط الانتاج Production medium:

استخدم هذا الوسط كونه وسطاً إنتاجيا إذ يتكون هذا الوسط من المواد التالية (غم/لتر): كلوكوز ٣٠، فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 ٥.٠، كبريتات المغنيسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$ ٠.٠٢، كبريتات الامونيوم ٢.٠، حامض الستريك ٢.٠، حامض البوريك ٠.٠٠٦، اوكسيد الزنك ZnO ٠.٠٠٦، كلوريد الحديد المائية $FeCl_2.H_2O$ ٠.٠٠٢٤، كاربونات الكالسيوم $CaCO_3$ ٠.٠٢، حامض الهيدروكلوريك HCl ٠.١٣، حضر هذا الوسط من إذابة المواد كافة في لتر من الماء المقطر وضبط الأس الهيدروجيني عند ٧.٠ (٨). وزع في دوارق زجاجية سعة ٢٥٠ مل بواقع ١٠٠ مل لكل دورق ، عقم الوسط وبعد ذلك لقح بواسطة اللقاح المحضر بنسبة ٤% ثم حضن بالحاضنة الهزازة عند درجة حرارة ٢٨ ^{o}م ±١ وبمعدل ١٥٠ دورة بالدقيقة.

طرائق التحليل

١- تقدير الكتلة الحيوية Determination of Biomass

عند انتهاء فترة الحضانة المعينة سحبت الدوارق من الحاضنة وتم قياس الأس الهيدروجيني النهائي لكل دورق ثم أجريت عملية النبذ المركزي لمحتوى كل دورق عند ٦٠٠٠ دورة/دقيقة مدة ٣٠ دقيقة مع الأخذ بنظر الاعتبار لزوجة المزرعة، اذ خففت المزارع ذات اللزوجة العالية بالماء المقطر بنسبة ١:١ أو أكثر حسب الحاجة (٩). وبعد الترسيب ترك الرائق جانباً وقبل جمع الخلايا المترسبة تم غسلها بحجم معين من الماء المقطر لإزالة بقايا السكر المتعدد الملتصق بالخلايا ثم أعيدت عملية الترسيب للخلايا عند ٦٠٠٠ دورة/دقيقة مدة ٣٠ دقيقة ترك الراشح جانباً وأضيفت رواشح الغسل إلى الراشح الأولي لتقدير السكر المتعدد الزانثان، وجمعت الخلايا المترسبة بعد ذلك في أطباق زجاجية صغيرة معلومة الوزن وجففت في فرن كهربائي عند درجة حرارة ٦٠^{o}م لمدة ٢٤ ساعة. تم قياس الكتلة الحيوية بفارق الوزنين باستخدام ميزان حساس.

٢- عزل وتقدير السكر المتعدد (الزانثان)

تم اخذ ١٠ مل من راشح التخمر الرائق الخالي من الخلايا وأضيف إليه حجمان من الأسيتون المبرد، حرك المزيج بقوة بواسطة قضيب زجاجي ثم أجريت عملية النبذ المركزي للمزيج عند ٨٠٠٠ دورة/ دقيقة مدة ١٥ دقيقة وضع الزانثان المترسب في أطباق زجاجية معلومة الوزن وجففت محتوياته في الفرن الكهربائي عند درجة حرارة ٦٠^{o}م لمدة ٢٤ ساعة تم حساب وزن الزانثان بفارق الوزنين باستخدام ميزان حساس (١٠).

النتائج والمناقشة

- **تأثير إضافة مصادر كاربونية مختلفة في نمو البكتريا وإنتاج الزانثان:**

تم تنمية البكتريا *X. campestris* على وسط الانتاج باستخدام سكريات مختلفة بتركيز ٣% بوصفها مصادر كاربونية. أظهرت نتائج الجدول (١) إن أقصى إنتاجية من الزانثان كانت ١٤.٠١ غم/لتر عند استخدام السكروز بوصفه مصدراً كاربونياً . لقد عزز السكروز من إنتاج السكر المتعدد (الزانثان) وتتفق هذه النتيجة مع مابينه Souw وDemain (١٩٧٩) من أن السكروز عزز إنتاجية عالية من قبل البكتريا *X. campestris* NRRLB1459 (٨). وكذلك مابينه Farina وجماعته (١٩٩٨) من تعزيز السكروز لإنتاجية السكر المتعدد السكليروكلوكان من قبل الفطر *Sclerotium rolfsii* (١١). في حين أبدى الكلوكوز إنتاجية مقاربة (١٣.١٠ غم/لتر)، ان هذه النتيجة قريبة من نتائج كثير البحوث حيث أشارت عدة بحوث أن كلاً من

الكلوكوز والسكروز يدعمان إنتاج السكريات المتعددة من والفطريات على نحو جيد وذلك لسهولة تمثيل الأحياء الدقيقة لها (٨،١٢،١٣). وفي الجانب الأخر لم يدعم اللاكتوز بوصفه مصدراً كاربونياً أي إنتاج من الزانثان إذ أعطى إنتاجية قليلة جداً من السكر المتعدد الزانثان (٣.٠١ غم/لتر). وهذه النتيجة تتفق مع ما أشار إليه الباحثون من أن اللاكتوز لايدعم إنتاج السكريات المتعددة، فقد أشار الصميدعي (٢٠٠١) إلى ضعف قابلية بكتريا *X. campestris* على استغلال سكر اللاكتوز لغرض إنتاج الزانثان من وسط الشرش (١٤). كما بين الشاهري (١٩٩٩) أن اللاكتوز لايدعم إنتاج البوليولان من الفطر *Aureobasidium pullulans* ويعزى السبب في ذلك إلى الفعالية الواطئة لانزيم بيتا-كالكتوسايديس الذي يعمل على تكسير اللاكتوز الى كلوكوز وكالكتوز (١٥). اما سكر الكالكتوز فقد أعطى أقصى إنتاجية من الكتلة الحيوية (٤.١٠ غم/لتر) إلا أن إنتاجية الزانثان كانت ضعيفة (٦.١٣ غم/لتر) مقارنة بالكلوكوز والسكروز أما فيما يخص الأس الهيدروجيني النهائي فقد انخفض على نحو اعتيادي ويعزى هذا إلى طبيعة الزانثان وإنتاج البكتريا إلى *X. campestris* لعدد من النواتج الايضية الثانوية الحامضية التي أدت إلى انخفاض الأس الهيدروجيني النهائي.

جدول (١): تأثير إضافة المصادر الكاربونية المختلفة في نمو البكتريا وإنتاج الزانثان.

المصدر الكاربوني ٣٠ غم/لتر	الكتلة الحيوية غم/لتر	الزانثان غم/لتر	pH النهائي
الكلوكوز	٣.١٠ (٠.٢٨)	١٣.١٠ (٠.٧١)	٥.٨٤ (٠.١٤)
لاكتوز	٢.٩٠ (٠.٧٠)	٣.٠١ (٠.٤٤)	٦.٢٤ (٠.٣١)
فركتوز	٣.٧١ (٠.١٩)	١١.٢٨ (٠.٧٦)	٥.٨٥ (٠.٦٤)
كالكتوز	٤.١٠ (٠.٢٨)	٦.١٣ (١.١٨)	٥.٤٥ (٠.٠٧)
سكروز	٢.٨٨ (٠.٥٩)	١٤.٠١ (٠.٥٨)	٥.٥٥ (٠.٦٤)
مانوز	٣.٣٠ (٠.٥٦)	١٠.٢٤ (٠.٥٩)	٥.٢٥ (١.٣٤)
رامينوز	٢.١١ (٠.٣٠)	٩.٢ (١.١٣)	٥.٣٠ (١.٢٧)
سيليوبايوز	١.٦٠ (٠.٩٩)	٥.٦٩ (٠.٠٥)	٦.٠٧ (٠.٦٢)
ارابينوز	٢.٢٠ (٠.٥٦)	٦.٢٢ (١.٣٦)	٦.٢٥ (٠.٥٠)
زايلوز	١.٤١ (٠.٥٧)	٨.٧٧ (٠.٦١)	٥.٤٥ (١.٤٨)

القيم الواردة في أعلاه تمثل معدل مكررين، القيم بين القوسين تمثل الانحراف المعياري (S.D).

- **تأثير إضافة مصادر نيتروجينية مختلفة في نمو البكتريا وإنتاج الزانثان:**

تم استخدام مصادر نايتروجينية مختلفة لغرض التعرف إلى المصدر النايتروجيني الأمثل الذي يدعم إنتاج الزانثان. وأضيفت المصادر النتروجينية المختلفة بتركيز تدرجي أظهرت

النتائج الجدول (٢) ان إضافة الحامض الاميني phenylalanine كمصدر نايتروجيني أعطى أقصى إنتاجية للزانثان (١٣.٩٨ غم/لتر) بعد ستة أيام من التحضين في حين كانت اقل إنتاجية للزانثان عند استخدام الثايويوريا بوصفه مصدراً نايتروجينياً إذ بلغت الإنتاجية ٧.٣٩ غم/لتر كذلك أعطى المصدر النايتروجيني نترات الصوديوم إنتاجية جيدة للزانثان (١٣.٤٥ غم/لتر) أما الكتلة الحيوية فقد تم الحصول على أقصى إنتاجية لها (٣.٣٤ غم/لتر) باستخدام نترات الصوديوم في حين كانت اقل إنتاجية للكتلة الحيوية ١.١٣ غم/لتر باستخدام الثايويوريا بعد ستة أيام من التحضين . وهذه النتائج تتفق مع ما توصل إليه الباحثين من أن أفضل إنتاج للزانثان يمكن الحصول عليه باستخدام الحامض الاميني phenylalanine بوصفه مصدراً نايتروجينياً كونها تعزز المسارات الايضية لإنتاج الزانثان (٨). أما الأس الهيدروجيني النهائي فقد انخفض عن الأس الهيدروجيني الأولي بسبب النواتج الايضية الثانوية الحامضية.

جدول (٢): تأثير إضافة المصادر النايتروجينية المختلفة في نمو البكتريا وإنتاج الزانثان.

المصادر النايتريتروجينية	التراكيز غم/لتر	الكتلة الحيوية غم/لتر	الزانثان غم/لتر	pH النهائي
phenylalanine	٤.٩٩٧	٢.٥٦ (٠.٦١)	١٣.٩٨ (١.٤١)	٥.٣١ (٠.٦٩)
NH_4NO_3	١.٢١	٢.١٥ (٠.٧٨)	١٠.٧٤ (٠.٥٥)	٦.٢٢ (٠.٩٩)
NH_2CONH_2	٠.٩٠٩	٢.١٤ (٠.٤١)	١١.١٦ (١.٣٣)	٦.١٢ (٠.١٣)
$(NH_4)_2SO_4$	٢.٠	٣.١٦ (٠.٣٧)	١٢.٩٣ (١.٠٤)	٥.٧١ (٠.٨٣)
NH_4Cl	١.٦٠٥	٢.٣٤ (٠.٨٢)	١١.٧٢ (١.٢٦)	٥.٦٥ (٠.٢٨)
$NaNO_3$	٢.٥٧	٣.٣٤ (٠.٥٥)	١٣.٤٥ (١.٣٤)	٦.١٠ (٠.٩٩)
NH_2CSNH_2	١.١٥٠	١.١٣ (٠.٤٤)	٧.٣٩ (١.١٥)	٥.٣٢ (٠.٧٢)
$NaNO_2$	٢.٠٩	١.١٤ (٠.٩٩)	٨.٣٦ (٠.٦٨)	٥.٣٥ (٠.٤٨)

القيم الواردة في أعلاه تمثل معدل مكررين، القيم بين القوسين تمثل الانحراف المعياري (S.D).

المصادر

1) Karin, B.; V. Langendorff and P. Boulenguer. "Xanthan". http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdfv05/bpo/5o11-259269 (2000).

2) Omoto, T. Characteristics and food applications of xanthan gum.Japonica. J. of Food Ingredients208: 11-12(2003).

3) Chaplin, M. Water structure and behavior: Xanthan gum. http://www.sbu.ac.uk./water/hyxan.html. (2003).

4) Kang, K. S. and I. W. Cottrell, Polysaccharides in: Microbial Technology. pp: 418-475. Academic press. New York, Sanfrancisco. USA. (1979).

5) Zibo, Z. Xanthan gum- application. http://www.zzbp.com/doce/application. (2003).

6) Anon, Kelco comp. In-Cosmetic: the Energizing formula. http:/www. in-cosmetics.com/page.cfm/action=Exhib/ExhibID=00210. (2004).

7) Hayens, W. C.; L. J. Wickerham and C. W. Hesseltine. Maintenance of culture of industrially important microorganisms. Appl. Microbiol. 3: 361-368. (1955)

8) Souw, P., and A. L. Demain. Nutritional studies on Xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1259. Appl. Environ. Microbiol. 37:1186-1192. (1979).

9) Kawahara, H., and H. Obata. Production of Xanthan gum and ice-nucleating material from whey by *Xanthomonas campestris* pv.transfucens Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 353-358.(1998).

10) Kassim, M. B. I., and R. H. Sultan. Pullulan production From sugar beet molasses by *Aureobasidium pullulans*. Qatar Univ. Sci. J. 7: 313-320. (1997).

11) Farina, J. I.; F. Sineriz; O. E. Molina, and N. I. Perotti. High. Scleroglucan production by *Sclerotium rolfsii* Influence of medium composition. Biotechnol. Lett. 20: 825-831.(1998).

12) Shin, L.; Y. H. Kim; K. S. Lee; Y. N. Kim and S. M. Byun. Production of pullulan by fed-batch fermentation. Biotechnol. Letts. 9: 621-624.(1987).

13) West, T. P. and B. Reed-Hamer. Ability of *Aureobasidium pullulans* to synthesize pullulan upon selected sources of carbon and nitrogen. Microbios. 67: 117-124. (1991).

١٤) الصميدعي، طه عبد الوهاب خميس جمعة . انتاج الزانثان بوساطة البك تريا *Xanthomonas campestris* ATCC13951 من الشرش. رسالة ماجستير / كلية التربية/ جامعة الموصل/ العراق. (٢٠٠١).

١٥) الشاهري، يوسف جبار اسماعيل . تحسين انتاجية العزلة المحلية من الفطر *Aureobasidium pullulans* 1(AP1) من السكر المتعدد (البوليولان) باستخدام الاشعة فوق ال بنفسجية، رسالة ماجستير / كلية التربية / جامعة الموصل / العراق.(١٩٩٩).