Study the effects of some growth factors on the production of Xanthan by the bacterium *Xanthomonas campestris* using alkali hydolysate of date extract

دراسة تاثير بعض الظروف المزرعية على انتاج سكر الزانثان بواسطة البكتريا *Xanthomonas campestris* باستخدام المتحلل القاعدي لمخلفات عصير التمر

مصطفى محمد حيدر

جامعة دهوك \ كلية العلوم \ قسم علوم الحياة \ أقليم كردستان

الخلاصة

صممت هذه الدراسة لانتاج السكر الميكروبي المتعدد الزانثان بواسطة البكتريا *Xanthomonas campestris* ذات الاستخدامات الواسعة في مجال الصناعات الغذائية والدوائية واستخراج النفط من خلال استخدام نواتج التحلل القاعدي لمخلفات عصير التمر كمصدر كاربوني لنمو البكتريا وانتاج السكر, مع زيادة كفاءة البكتريا في الانتاج من خلال ايجاد الظروف المزرعية الملائمة للنمو والانتاج. وتبين من خلال النتائج ان افضل فترة زمنية للتحضين هو االيوم الخامس حيث بلغت كمية الانتاج 3.7غم\لتر (75.57%). وعند اضافة تراكيز مختلفة من مستخلص الخميرة لوسط الأنتاج ازداد كمية ونسبة الانتاج لتصل 4.71غم\لتر (80.47%). وازداد كمية الانتاج الى 6.10غم\لتر (86.98%) في الوسط الغذائي المضاف اليه 0.4% كبريتات المغنيسيوم. وتبين بأن فوسفات الامونيوم كمصدر نيتروجني هو الافضل من بين المصادر المختبرة حيث وصل الانتاج الى 11.19غم\لتر (128.40%). وكان لسرعة التدوير تاثيرا محفزا للأنتاج عند 200 دورة\دقيقة حيث ارتفع الانتاج لتصل الى 13.03غم\لتر (154.28%).

Abstract

This study was designed to produce microbial polysaccharide xanthan by using *Xanthomonas campestris*, which is used widely in food and pharmaceutical industries as well as in oil extraction using alkali hyrdolysate of date extract as a carbon source for the growth of bacteria and production of the polysaccharide. In addition, the objective of this study was to enhance the production of xanthan by the bacteria by finding the most favorable conditions of agriculture. It was revealed that the most optimal incubational period was the fifth day where 3.7 g/l was produced (75.57%). Upon addition of different concentrations of extract of fermentation to the medium, the production was increased up to 4.71 g/l (80.47%). It was further increased on addition of 0.4% of magnesium phosphate 0.4% to the nutritional medium. It was shown that ammonium phosphate was the best tested nitrogen source, where 11.19 g/l of xanthan was produced. It was also found that the revolution speed of centrifuge has a stimulating effect on the production of xanthan, in which 200 revolutions/min increased the production up to 13.03 g/l (154%).

المقدمة

سكر او صمغ الزانثان عبارة عن سكر متعدد متباين خارج خلوي يتكون من ثلاثة انواع من السكريات هي وحدتين من سكر الكلوكوز ووحدتين من سكر المانوز ووحده واحده من حامض الكليوكورونيك (1:2:2), تنتج من خلال تخمرات البكتيريا الهوائية السالبة لصبغة كرام *Xanthmonas campestris* ويعتبر من افضل السكريات الميكروبية (1, 2).

التركيب الكيميائي للسلسلة الرئيسية للزانثان تكون مشابهة للتركيب الكيميائي للسليلوز , اما اسلسلة الجانبية فتتكون من وحدة طرفية من سكر المانوز مرتبطة باصرة كلايكوسيدية مع حامض الكليوكورونيك من خلال ذرة الكربون رقم 4 والتي تلتف لترتبط مع وحدة المانوز البينية باصرة كلايكوسيدية من خلال ذرة الكاربون رقم 2 وهذه السلسلة الجانبية ترتبط مع السلسلة الرئيسية من خلال ذرة الكربون رقم 3 لوحدة الكلوكوز(3). الوحدة الطرفية لسكر المانوز تحمل مجموعة البيروفيت مرتبطة باصرة كيتالية بذرة الكاربون4 و6, والوحدة غير الطرفية تحتوي على مجموعة الخلات مرتبطة مع ذرة الكربون رقم 6 (4).

تبين من خلال العديد من الدراسات السابقة الى ان الانتاج الحيوي للزانثان بواسطة البكتيرية *X. campestris* يتاثر بشكل كبير بطيعة ومكونات وسط التخمر من حيث نوع وكمية الكاربون والنيتروجين ونسبة النيتروجين الى الكاربون والى نوع المغذيات العضوية واللاعضوية المضافة الى وسط التخمر يالاضافة الى درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني (5 , 6, 7 ; 8, 9, 10). ولوحظ ان الوزن الجزيئي للزانثان المنتج يتغير حسب طبيعة وسط التخمر , وبشكل عام يتراوح بين 2- 50 مليون دالتون (13,12).

وبسبب الخصائص الاستثنائية التي يمتلكها الزانثان ومنها صفة السيولة والقدرة على التحكم في الانسياب للانظمة المائية والثبات لدرجات الحرارة العالية حتى 100م^0 والرقم الهيدروجيني (2-11) pH وتركيز الاملاح المعدنية حتى150جم\لتر كلويد الصوديوم (15,14) فانه يستخدم على نطاق واسع في مجال الصناعات الغذائية والطبية والصيدلانية والعطور والصناعات الاخرى. ومن بين هذه الاستخدامات هو استخدامه وبشكل كبير في زيادة استخراج النفط في المراحل الثانية والثالثة للاستخراج (18,17,16). والغرض من هذه الدراسة هو بيان مدى كفاءة السلالة البكتيرية في استخدام نواتج التحلل القاعدي لمخلفات تصنيع عصير التمر كمصدر كاربوني لغرض النمو وانتاج الطاقة الضرورية للبناء الحيوي للزانثان مع زيادة كفاءة البكتيريا في انتاج الزانثان من خلال تغيير الظروف المزرعية لوسط التخمر.

المواد وطرق العمل

الكائن المجهري المستخدم:

استخدم في هذه الدراسة سلالة معرفة من البكتريا *Xantthomonas campestris* ATCC13951 وهي من اهم السلالات المنتجة لصمغ الزانثان وقد تم شراؤها من مركز الثروة الميكروبية بكلية الزراعة , جامعة عين شمش, القاهرة, جمهورية مصر العربية.

حفظ وتنشيط السلالة:

تم حفظ وتنشيط السلالة البكتيرية ياستخدام وسط مستخلص الشعير الصلب malt extract agar الذي يتركب من (مستخلص الخميرة 0.3% و مستخلص الشعير 0.3% و الكلوكوز 2.0% والاكار 2.0%).

وسط اللقاح:

تم تحضير وسط اللقاح الساثل بشكل مستمر ومتجدد لكل تجربة وبالنسب المئوية التالية: كلوكوز 0.5% وببتون 0.3% ومستخلص الخميرة 0.3%. اذيبت هذه المكونات في 100مل من الماء المقطر وتم توزيعها في دورقين زجاجيين حجم 250مل بواقع 50مل لكل دورق . سدت فوهات الدوارق بالقطن وعقم في جهاز المعقام نوع (American model Autoclave Model 25X, Germany) عند درجة حرارة 121 م^0 لمدة 15 دقيقة وبعد التبريد تم التلقيح بنقل جزء من مستعمرات البكتيريا النامية على وسط مستخلص الشعير الصلب باستخدام الابرة الخاصة بالزرع, ثم وضعت في الحاضنة الهزازة عند سرعة دوران 150 دورة لكل دقيقة لمدة 72 ساعة وعند درجة حرارة 28±1 م^0 .

المصدر الكاربوني:

المصدر الكاربوني الذي استخدم في جميع تجارب هذه الدراسة عبارة عن نواتج التحلل القاعدي لمخلفات تصنيع عصير التمر . وقد استخدم المصدر الكاربوني بتركيز 6% وذلك بوزن 150غم من مسحوق مخلفات تصنيع عصير التمر مضافا اليها 1000مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.8عياري) ووضع بعد ذلك في حمام مائي عند درجة حرارة 100م^0 لمدة 30 دقيقة ثم تركت لتبرد. تم فصل الراسب عن الراشح بواسطة جهاز الطرد المركزي نوع (Sigma, England, UUVE NF 800) عند سرعة دوران 5000 دورة لكل دقيقة لمدة 10 دقائق , ثم قدر نسبة السكريات الذائبة في الراشح بطريقة Dubois واخرون (19).

ظروف التخمر:

استخدمت في تجارب هذه الدراسة دوارق مخروطية حجم 250مل بحيث يستلم كل دورق 45مل من وسط التخمر الذي يحتوي على 6.0% كاربون فضلا عن المعاملات المطلوبة وبواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة مع مراعات تعديل الرقم الهيدروجيني عند pH7 , ثم سدت الدوارق بسدادات قطنية وعقمت بجهاز المعقام عند درجة حرارة 121م^0 وضغط 15باوند\ انج^2 لمدة 15 دقيقة. بعد تبيرد الأوساط لقحت ب 5مل من لقاح البكتيريا (10%), ثم وضعت الدوارق في الحاضنة الهزازه بسرعة دوران 150 دورة لكل دقيقة ودرجة حرارة 28±1 م^0 . وبعد كل فترة حضانة محددة اخذت ثلاثة دوارق من كل معاملة وبشكل عشوائي واجري عليها التحاليل المطلوبة.

طرق التحليل:

تقدير الوزن الجاف للبكتيريا:

قدر الوزن الجاف للكتلة الحيوية للخلايا البكتيرية وذلك بفصل الخلايا عن وسط التخمر السائل بطريقة الطرد الوركزي عند سرعة دوران 10000دورة لكل دقيقة ولمدة 15دقيقة ووضعت انايب الطرد المركزي الموزونة سابقا في فرن كهربائي من نوع (Memmert, Model 600, Germany) عند درجة حرارة 60 م^0 لمدة 24ساعة و وقدر الوزن الجاف للبكتيريا بدقة من خلال الفارق بين الوزنين باستخدام ميزان حساس من نوع (Sartorius AG, Germany).

قياس الرقم الهيدروجيني الاولي والنهائي:

تم ضبط وقياس الرقم الهيدروجيني للاوساط الزراعية قبل وبعد التخمر بواسطة جهاز قياس الرقم الهيدروجيني pH meter من نوع (Meter Schit Tube) بعد معايرتها بمحاليل منظمة بارقام هيدروجينية 4 و7 و9 .

تقدير نسبة السكر الاولي والمتبقي:

قدر نسبة السكر الاولي والمتبقي باستخدام جهز المطياف الضوئي نوع (Spectrophotometer, Model 6300, England) حسب الطريقة المبتكرة من قبل Dubois واخرون (19).

تقدير كمية سكر الزانثان المنتج:

قدر كمية سكر الزانثان في وسط التخمر بعد كل فترة حضانة وذلك باخذ 10مل من الراشح وتضاف اليه ضعف الحجم من الاسيتون (20), ثم تمزج بشكل جيد بواسطة قضيب زجاجي حيث يتجمع الزانثان الناتج من الترسيب حول القضيب الزجاجي بعد ذلك يتم وضع الزانثان في طبق جاف معلومة الوزن وتجفف في الفرن كهربائي بدرجة 60م^0 لمدة 24 ساعة ثم توزن بدقة وتحسب وزن الزانثان بفارق الوزنين.

لتجارب

استخدمت خلال هذه الدراسة خمسة تجارب لغرض نمو البكتيريا وانتاج الزانثان وهذه التجارب كالاتي:

1- تاثير الفترات الزمنية للتحضين على نمو البكتريا وانتاج الزانثان, حيث استمرت التجربة لمدة ستة ايام وبعد (2 و3 و4 و5 و 6) ايام اخذت ثلاثة دوارق من وسط التخمر بشكل عشوائي واجري عليها التحاليل المطلوبة.

2- تاثير اضافة تراكيز مختلفة (0.1 و 0.2 و 0.3 و0.4 و0.5)% من مستخلص الخميرة الى وسط التخمر على نمو البكتيريا وانتاج الزانثان حيث استمرت التجربة لمدة خمسة ايام ثم اجري عليها جميع الاختبارات المطلوبة.

3- تاثير اضافة تراكيز مختلفة (0.01 و0.02 و0.04 و0.04 و0.05)% من كبريتات المغنيسيوم على نمو البكتيريا وانتاج الزانثان. وبعد نهاية التجربة المحددة بخمسة ايام سحبت الدوارق من الحاضنة واجريت عليها التحاليل المطلوبة.

4- تاثير اضافة مصادر نيتروجينية مختلفة (البيتون وكلوريد الامونيموم وفوسفات الامونيوم وكبريتات الامومنيوم والبيتون ونترات الصوديوم). حيث استخدمت هذه المصادر بحيث تحتوي جميعها على نفس النسبة من النيتروجين الموجودة في 0.3% من البيتون, واستمرت التجربة لمدة خمسة ايام ثم اجريت على الاوساط الغذائية جميع التحاليل.

5- تأثير سرع تدوير مختلفة للحاضنة الهزازة على نمو البكتريا وانتاج الزانثان حيث استخدمت (150 و 175 و 200 225 و250) دورة لكل دقيقة لتحديد افضل سرعة دوران و استمرت التجربة ايضا خمسة ايام بعدها اجري جميع التحاليل المطلوبة.

النتائج والمناقشة

1- تاثير الفترات الزمنية للتحضين على انتاج الزانثان بواسطة البكتيريا *X. campestris*

اظهرت نتائج تاثير الفترات الزمنية المختلفة للتحضين لانتاج اعلى كمية من الزانثان بواسطة البكتيريا*X. campesteris* والموضحة في الجدول رقم (1) بان نمو البكتيريا وانتاج الزانثان تتاثران بالفترات الزمنية للتحضين, ونلاحظ زيادة تدريجية في نمو البكتيريا وكمية انتاج الزانثان الى اليوم الخامس من التحضين حيث وصل اعلى معدل للوزن الجاف للكتلة الحيوية للبكتيريا الى 4.40غم\لتر, واعلى معدل للانتاج 3.70غم\لتر وهذه الكمية تعادل 75.52% من الوزن الجاف للبكتيريا. وتبين من النتائج بان نمو البكتريا وانتاج الزانثان بدأ بالهبوط في اليوم السادس وقد يعزى السبب في ذلك الى نفاذ بعض المكونات الاساسية للوسط الغذائي او نتيجة لنفاذ الاوكسجين الضروي لانتاج الطاقة الضرورية للخطوات الايضية لبناء الزانثان وهذ يتطابق مع ماذكره (21). أو للتاثيرات السامة الناتجة عن تجميع الدهون المتخللة اثناء البناء الحيوي لسكر الزانثان (22) . وفي دراسة مماثلة لاحظ الباحث Marzieh واخرون (23) ان افضل فترة زمنية لأنتاج الزانثان بواسطة نفس البكتيريا هو 4 أيام باستخدام مولاس القصب كمصدر كاربوني للنو والانتاج, في حين Lopez و Morcho (24) ذكرا بان اليوم الثالث من التحضين هو الافضل من حيث انتاج أعلى كمية من الزانثان باستخدام مخلفات ثمار الزيتون كمصر للكاربون وانتاج الطاقة الضرورية للخطوات الايضية لبناء الزانثان.

2- تاثير اضافة تراكيز مختلفة من مستخلص الخميرة على انتاج الزانثان بواسطة البكتيريا *X. campestris*

تنين من الناتئج الموضحة في الجدول (2) بان نمو البكتيريا وانتاج سكر الزانثان تتأثران بوجود تراكيز مختلفة من مستخلص الخميرة في وسط التخمر, حيث نلاحظ وجود زيادة في معدل نمو البكتيريا وانتاج الزانثان مع زيادة تركيز مستخلص الخميرة في وسط التخمر مقارنة مع وسط المقارنة , وان افضل تركيز لمستخلص الخميرة للحصول على اعلى معدل للنمو (5.82غم\لتر) وانتاج سكر الزانثان (4.71غم\لتر) هو 0.3% و 0.4% وعلى التوالي.والسبب في ذلك يعود الى احتواء مستخلص الخميرة على

العديد من العوامل المحفزة للنمو والانتاج وهذا يتطابق مع ما ذكره (25 و26). وعند زيادة تركيز مستخلص الخميرة عن 0.4% نلاحظ هبوط في كمية الانتاج وقد يعزى السبب الى التغيير في نسبة النيتروجين الى الكاربون الموجود في وسط التخمر نتيجة لاحتواء مستخلص الخميرة على النيتروجين حيث تتاثر الانتاج بشكل كبير عند زيادة هذه النسبة عن 1 : 20 نيتروجين: كاربون (27). وعند مقارنة هذه النتائج مع دراسات مماثلة نلاحظ تطابق هذه النتائج مع النتائج التي توصل اليها بن صريتي (22) عندما ذكر ان افضل تركيز محفز لانتاج سكر الزانثان عند وجوده في وسط التخمر هو 0.4% من مستخلص الخميرة, في حين ذكر Loواخرون (28) و Roseiro واخرون (29) ان تركيز مستخلص الخميرة 0.3% و0.75% وعلى التوالي هو الافضل من حيث الانتاج. ويعزى السبب في اختلاف هذه النتائج الى طبيعة وسط التخمر والسلالة البكتيرية المستخدمة في الدراسة.

3- تأثير تراكيز مختلفة من كبريتات المغنيسيوم على انتاج الزانثان بواسطة البكتيريا *X .campestris*

من خلال الدراسات السابقة تبين بأن وجود المغذيات اللاعضوية ومنها كبريتات المغنيسيوم في الاوساط الزراعية للكائنات المجهرية دور مهم في السيطرة على نفاذية الغشاء الخلوي وانتقال مصادر الطاقة(Jana وGhosh, 1999). لذلك صممت هذه التجربة باستخدام تراكيز مختلفة من كبريتات المغنيسيوم وبيان مدى تاثيرها على نمو البكتيريا وانتاج الزانثان, وتبين من النتائج المدونة في جدول (3) بان لهذا المصدر اللاعضوي تاثير محفز على نمو البكتيريا, حيث بلغ معدل الوزن الجاف للكتلة الحيوية 9.22غم\لتر في الوسط الغذائي االمضاف اليه 0.01% كبريتات المغنيسيوم في حين وصل كمية ونسبة الزانثان المنتج الى 6.10غم\لتر و88.23 % بوجد 0.03% و 0.04% من كبريتات المغنيسيوم وعلى التوالي. ويستدل من هذه النتائج بانه للتراكيز الواطئة من كبريتات المغنيسيوم دور محفز للنمو اما التكيز المرتفعة منها فلها دور في زيادة انتاج الزانثان, يرجع سبب في زيادة الانتاج ايضا الى ان لكبريتات المغنيسيوم تأثير محفزعلى نشاط انزيمي phosphomannose isomerase و phosphoglucose isomerase اللذان يلعابان دورا مهما في الانتاج الحيوي للزانثان (17 , 27). وتظهر نتائج هذه الدراسة مطابقة تماما مع نتائج (15 , 26) في حين ذكر (30) بان افضل تركيز من كبريتات المغنيسيوم هو 0.01% لانتاج اعلى كمية من سكر الزانثان بواسطة البكتيريا *X. campestris* .

جدول (1) : تاثير الفترات الزمنية للتحضين على انتاج سكر الزانثان بواسطة البكتيريا *X. campestris*

فترة الحضانة بالأيام	الوزن الجاف لبكتيريا غم/لتر	وزن سكر الزنتان غم/لتر	النسبة المئوية للزانثان %	السكر المتبقي %	الرقم الهيدروجيني النهائي
2	0.80 0.017	0.91 0.010	115 0.803	4.93 0.115	6.25 0.050
3	3.01 0.011	1.70 0.049	54.67 0.300	4.47 0.115	5.557 0.128
4	3.96 0.015	2.75 0.023	68.67 0.176	3.60 0.173	5.44 0.062
5	4.40 0.036	3.70 0.011	75.57 0.686	2.733 0.306	6.21 0.030
6	4.11 0.136	3.11 0.020	79.77 0.035	1.37 0.057	6.80 0.020

الرقم الأول يمثل المعدل لثلاث تكرارات اما الرقم الثاني يمثل الانحراف المعياري للمتوسطات

جدول (2): تأثير تراكيز مختلفة من مستخلص الخميرة على انتاج سكر الزانثان بواسطة البكتيريا*X. Campestris*

مستخلص الخميرة %	الوزن الجاف لبكتيريا غم/لتر	وزن السكر المتعدد غم/لتر	النسبة المئوية للزانثان %	السكر المتبقي %	الرقم الهيدروجيني النهائي
وسط المقارن	5.20 0.005	0.27 0.323	53 2.571	5.0 0.000	6.56 0.268
0.10	5.24 0.0116	3.43 0.0100	61.97 3.164	5.1 0.000	6.52 0.090
0.20	5.13 0.127	3.500 0.011	61.67 2.875	5.27 0.058	6.58 0.072
0.30	5.82 0.023	3.81 0.017	65.83 0.289	5.1 0.000	6.52 0.096
0.40	5.66 0.005	4.71 0.011	80.47 1.762	3.07 0.115	7.06 0.065
0.50	5.32 0.000	4.00 0.005	74.23 1.097	1.53 0.058	7.07 0.080

الرقم الأول يمثل المعدل لثلاث تكرارات اما الرقم الثاني يمثل الانحراف المعياري للمتوسطات.

جدول (3): تأثير تراكيز مختلفة من كبريتات المغنيسيوم على إنتاج سكر الزانثان بواسطة البكتيريا *X. campestris*

كبريتات المغنيسيوم %	الوزن الجاف للبكتيريا غم/لتر	وزن السكر المتعدد غم/لتر	النسبة المئوية للزانثان %	السكر المتبقي %	الرقم الهيدروجيني النهائي
وسط المقارن	6.70 0.260	3.91 0.047	51.45 6.053	0.65 0.152	6.38 0.0060
0.01	9.22 0.011	4.33 0.009	49.13 0.635	0.78 0.830	6.35 0.057
0.02	8.05 0.052	5.20 0.021	64.59 0.822	0.78 0.054	6.50 0.120
0.03	7.02 0.010	6.10 0.020	86.89 0.532	0.77 0.200	6.63 0.038
0.04	6.12 0.010	5.42 0.135	88.23 0.632	0.77 0.000	6.62 0.007
0.05	5.50 0.503	4.61 0.162	83.63 0.070	0.45 0.068	6.76 0.043

الـرقـم الاول تمثل معدل لثلاثة تكرارات اما الرقم الثاني فتمثل الأنحراف المعياري للمتوسطات.

4- تأثير اضافة مصادر نيتروجينية مختلفة على انتاج الزانثان بواسطة البكتيريا *X. campestris*

اجريت هذه التجربة لنبين فها مدى استجابة البكتربا للمصادر النتيروجينية المختلفة والتي تحتوي على نفس النسبة من النتروجين من حيث نموها وانتاج سكر الزانثان. واظهرت النتائج المدونة في جدول (4) الى ان البكتيريا تستجيب لهذه المصادر بشكل مختلف وكما كان متوقعا. وتبين بان وسط التخمر المضاف اليه فوسفات الامونيوم هو الافضل من بين المصادر النيتروجينية المختبرة حيث حفز نمو البكتيريا ليصل الوزن الجاف للكتلة الحيوية الى 8.74غم\لتر وكذلك ازداد كمية ونسبة الزانثان المنتج حيث بلغ 11.19غم\لتر وتقدر هذه الكمية نسبة 128.40% من الوزن الجاف للبكتيرية . ويعزى السبب في ذلك بالاضافة لكونه مصدر نيتروجيني عمل كمحلول منظم حيث لم يرتفع او ينخفض الرقم الهيدروجيني النهائي عن الرقم الهيدروجيني الاولي وهو 7.0 حيث يتحفز انتاج الزنثان ضمن هذا الرقم الهيدروجيني وجاءت هذه النتائج مطابقة مع نتائج (27) عندما استخدما النشاء كمصدر كاربوني لنمو البكتيريا وانتاج الزانثان. وتبين من النتائج ايضا بان البيتون ياتي بالمرتبة الثانية من حيث الافضلية كمصدر نيتروجيني, وقد يعود السبب في ذلك باحتواء البيتون على بعض المواد المحفزه للنمو البكتيري والانتاج الحيوي للزانثان كوجود بعض الاحماض العضوية. واظهرت النتائج ايضا بان اضافة كلوريد الامونيوم كمصدر نيتروجيني ثبط نمو البكتريا وانتاج الزانثان مقارنة مع باقي المصادر النيتروجينية المختبرة وذلك لتجمع كلوريد الهيدروجين في وسط التخمر نتيجة لتفاعل ايون الكلور مع ايون الهيدروجين مما ادى الى انخفاظ الرقم الهيدروجيني النهائي الى 5.63 والذي يؤثر بشكل سلبي على نمو البكيريا وعلى نشاط النزيمات التي تدخل في خطوات الانتاج الحيوي للزانثان وهذا ما اكده (31). وفي دراسة مماثلة اجراها (25) تبين بان كبريتات الامونيوم هو الافضل من بين المصادر النيتروجينية المختبره وذلك باستخدام نواتج التحلل المائي لقشور ثمار الخروب كمصدر كاربوني لنو البكتيريا وانتاج الزانثان, في حين اكد (32) بان وجود املاح النترات كمصدر نيتروجيني في وسط التخمر الافضل من حيث نمو البكتيريا وانتاج السكر الزانثان. ويرجع السبب في اختلاف النتائج بالدرجة الاساس الى نوع السلالة البكتيرية المستخدمة والمصدر الكاربوني المستخدم.

جدول(4): تأثير مصادر نيتروجينية مختلفة على إنتاج سكر الزانثان بواسطة البكتيريا *X. campestris*

المصدر النيتروجيني %	الوزن الجاف بكتيريا غم\لتر	وزن السكرالمتعدد غم\لتر	النسبة المئوية للزانثان %	السكر المتبقي %	الرقم الهيدروجيني النهائي
ببتون	7.85 0.013	9.20 0.230	117.3 2.887	1.89 0.147	6.88 0.001
فوسفات الامونيوم	8.74 0.020	11.19 0.012	128.40 0.892	2.20 0.008	7.01 0.216
كلوريد الامونيوم	5.63 0.032	6.41 0.019	4.11 1.014	1.87 0.149	5.63 0.067
كبريتات الامونيوم	7.44 0.000	8.73 0.000	111.25 0.270	0.92 0.000	6.87 0.000
نترات الصوديوم	7.40 0.005	4.80 0..031	64.86 0..025	2.28 0.035	6.56 0.402

الرقم الأول تمثل معدل لثلاث مكررات اما الرقم الثاني يمثل الانحرهف المعياري للمتوسطات.

5- تأثير سرع تدوير مختلفة للحاضنة الهزازه على انتاج الزانثان بوسطة البكتيرية *X. campestris*

استخدمت في هذه التجربة خمس سرع تدوير لايجاد افضل سرعة تدوير للحاضنة الهزازه والتي من خلالها يمكن الحصول على اعلى انتاجية للزانثان. وتبين من النتائج الموضحة في جدول (5) الى ان نمو البكتيريا وانتاج الزانثان بدأ بالازدياد التدريجي مع زيهدة سرعة دوران الحاضنة الهزازه الى ان وصل سرعة التدوير الى 200 دورة\دقيقة حيث ازداد نمو البكتيريا (8.46جم\لتر) وارتفع كمية الزانثان المنتج (13.03جم\لتر) وتقدر هذه الكمية نسبة 154.28% من الوزن الجاف للكتلة الحيوية للبكتيريا. ويرجع السبب في ذلك الى توفير الاوكسجين الذائب في وسط التخمر ضمن التركيز المثالي في هذه السرعة حيث حفز البكتريا على النمو وانتاج الطاقة الضرورية في خطوات الانتاج الحيوي للزانثان وهذا ما اكده (30 , 33 , 34). وتبين من التائج ايضا عند زيادة سرعة الدوران عن 200دورة\دقيقة انخفض نمو البكتيريا وكذلك كمية ونسبة الزانثان المنتج وذلك لزيادة الاوكسجين الذائب في

وسط التخمر مما يؤدي الى زيادة سرعة التنفس وبالتالي الى تجمع غاز ثنائي اوكسيد الكاربون في وسط التخمر والذي يؤثر بشكل سلبي على نمو البكتيريا وكذلك على الفعاليات الايضية المختلفة ومنها عمليات البناء الحيوي للزانثان وتظهر هذه النتائج مطابقة تماما مع نتائج (26 , 17).

جدول (5): تأثير سرعة الدوران للحاضنة الهزازة على إنتاج سكر الزانثان بواسطة البكتريا *X. campestris*

سرعة الدوران دورةادقيقة	الوزن الجاف لبكتيريا غم\التر	وزن السكر المتعدد غم\التر	النسبة المئوية للزانثان %	السكر المتبقي %	الرقم الهيدروجيني النهائي
100 RPM	5.92 0.034	5.10 0.007	84.74 0.503	0.73 0.003	6.78 0.004
125	6.11 0.007	6.43 0.050	99,22 1.043	0.99 0.004	6.83 0.000
150	6.67 0.042	9.16 0. 291	137.40 0.004	0.78 0.093	6.80 0.006
175	7. 61 0.020	11.08 0.017	145.61 0.080	0.57 0.261	6.87 0.0061
200	8.46 0.070	13.03 0.000	154.28 0.142	0.49 0.107	7,01 0.0719
225	8.01 0.109	10.27 0.014	131.2 0.009	0.55 0.067	7.13 0.146
250	7.82 0.008	7.72 0.009	98.78 0.007	0.21 0.206	7.11 0.0821

الرقم الأول تمثل معدل لثلاث تكرارات اما الرقم الثاني فتمثل الأنحراف المعياري للمتوسطات.

الاستنتاج

نستنتج من هذه الدراسة بان للبكتيريا القابلية على الاستفادة من نواتج التحلل القاعدي لمخلفات عصير التمر كمصدر كاربوني للنمو وانتاج الطاقة, وكذلك يتحفز نمو البكتيريا وانتاج الزانثان مع وجود بعض المغذيات العضوية واللاعضوية كما نستنتج اضا بان لهذه البكتيريا القابلية على تحويل المواد الرخيصة من حيث قيمتها الاقتصادية الى مواد ثمينة من الناحية الغذائية والطبية والصناعية والمتمثلة بسكر الزانثان.

المراجع

المراجع العربية:

21- الجادرو زينة وجيه (2005). تأثير المتطلبات الغذائية لبكتيريا *Xanthomonas campesrris* في انتاج السكر المتعدد الزانثان., رسالة ماجستيرو كلية التربيةو جامعة الموصل, موصل, العراق.

22- بن صريتي, نيللي يوسف (2006). تدوير مخلفات رب التمر في انتاج سكر الزانثان بواسطة البكتيريا *Xanthomonas campestris* ., رسالة ماجستير, اكاديمية الدراسات العليا, قسم علوم وهندسة البيئة, بنغازي, ليبيا.

25- الخفاجي, زهرة محمود(1990). التقنية الحيوية, مطبعة دار الكتب للطباعة والنشر, الموصل, العراق.

26- مصطفى, اسماء رمضان (2008). نواتج التحلل المائي لقشور ثمار الخروب في انتاج سكر الوانثان بواسطة البكتيرية *Xanthomonas. campestris* ., كلية العلوم, جامعة قاريونس, بنغازي, ليبيا.

المراجع الانكليزية :

1- Paul, F. Morin, A. and Monsan, P. (1986). Microbial polysaccharides with actual potential industrial application. *Biotechnol. Adv*. 4: 245-259.

2- Sanchez, A., Ramirez, M. E., Torres, L. G. and Galindo, E. (1997). Characterizatin of xanthan from selected *Xanthomonas* strains cultivated underconstant dissolved oxygen., *World J. Microbiol. Biotechnol.,* 13: 443-451.

3-Cottrell, H. W. and kang, K. S. (1978). Xanthan gum a unique bacterial polysaccharide for food application., *Develop. Indust. Microbiol.*, 19:117-131.

4- Sandford, P. A. and baird, J. (1983). The polysaccharides. In "Aspinall" G. O. ed., Academic Press, pp: 470-473.

5- Casas, J. A, Santos, V. E. and Garcia-Ochoa, F. (2000). Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and Rheological properties., *Enzym. Microb. Technol*., 26:282–291.

6- Papagianni M., Psomas, S. K., Batsilas, L., Paras, S. V., Kyriakidis, D. A. and Liakopouloukyriakides, M. (2001). Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures., *Process Biochem*., 37:73–80

7- Druzian, J. I. and Pagliarini, A. P. (2007). Xanthan gum production by fermentation from residue of apple juice., *Cie^ncia e Tecnologia de Alimentos*., 27:26–31.

8- Faria S, Vieira, P.A., Resende M.vM., Franc¸ F. P. and Cardoso, V.L. (2009). A Comparison between shaker and bioreactor performance based on the kinetic parameters of xanthan gum production. *Appl Biochem Biotechnol*., 156:475–48.

9- Garignatto, C. R., Olivera, K. S., de-Lima, U.m. and neto, P. O. (2011). New culture medium to xanthan production by *X. campestris., Indian J. Microbiol.*,3:283-288.

10- Shehni, S. A. Soudi, M. R., Hosseinkani, S. and behzadipour, N. (2011). Improvement of xanthan gum production in batch culture using stepwise acetic acid stress., *African J.of Biotechnol.,* 10:19425-19428.

11-Shu, C. H. and Yang, S.T. (1990). Effect of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultureof *Xanthomonas campestris., Biotechnol. Bioeng.*, 35:454-4

12-Herbst, H., Suh, T. S., Peters, H. U., Schumpe, A. and Deckwer, H. (1989). Comparision of various fermentor types used for production of xanthan., *Biotechnology conference,* partA, pp: 495-498.

13- Lachke, A. (2004).Xanthan gum. *Resonsnce.*, 9:25-33.

14- Lee, H. B. (1996). Fundamental of Food Biotechnology. VCH puplisher,Inc., USA.

15- Kamal, f. and Mehrgan, H. (2002). Mutagenesis of *Xanthomonas campestris* and Selection of starins with enhanced xanthan production, Tehran University, *Biomed. J.*, 3:91-98.

16- Sharma, B. R., Naresh, L., Dhuldhoga, N. C., Merchant, S. U. and Merchant, U. M. (2006). Xanthan gum, A- Boon to food industry., *Food Promotion Chronicle.,* 1: 27-30.

17- Wadhai, V. S. and and Dixit, A. N. (2011). Production of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* and comparative study of *Xanthomonas campestris* isolate for the selection potential xanthan producer., *Indian Streams Research J.*,1: 1-4

18- Vidhyalakshmi, R. Vallinachiyar, C. and Radhika, R. (2012). Production of xanthan from agro-industrial waste., *J Adv Scien. Res,* 3: 56-59.

19-Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rober, P. A. and Smith, F.(1956). Colorimetric method for the determination of sugars., *Anal. Chem.*, 26:350-356.

20- Tait, M. H., Sutrerland,I. W. and Sturman, A. J. (1986). Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *xanthomonas campestris* polysaccharide., *J., Gen. Microbiol.,* 132: 1483-1492.

23- Marzieh, M. M., Safdora, P. and Maryam, R. (2010). Effect of fermentation time on xanthan gum production from sugar beet molasses., *World academy of Science,i ngineer. and Technol.,* 44: 1244-1247.

24- Lopez, m. J. and Morcho, J. (2001). *Xanthomonas campestris* strain selection for xanthan production from olivemill wastes., *Water Research.*, 5: 1828-1830.

27- Rosalam, S. and England, R. (2006). Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. Enzym. Microbial. Technol., 39:197–207.

28- Lo, Y. M., Yang, S. T. and Min, D. B. (1997). Effects of yeast extractand glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris., Appl. Microbiol. Biotechnol*., 47: 689-694.

29- Roseiro, J. C., Girio, F. M. Kara, A. and Collacom, T. A. (1993). Kinetic and Metabolic effects on nitrogen , magnesium and sulpher restriction in *Xanthomonas campestris* batch culture., *Appl. Bacterial.*, 75: 381-386.

30- Kassim, M. B. (2011). Production and characterization of the polysaccharide "xanthan"gum by a local isolate of the bacterium *X. campestris., African Biotechnol.*,74: 16924-16928.

31- Moat, A. G. and Foster, J. W. (1988). Microbial Physiology. 2nd ed., John Wiley and Sons. Inc. USA.

32- Leela, J. K. and Sharma, G. (2000). Studies on xanthan production from *Xanthomona Campestris., Bioprocess and Biosystems Engineer.*, 23: 687-689.

33-Saied, H. M., Gabr, S. A., Hamed, A. S. and Hefnawy, H. T. (2002). Production of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*., *Biotechnol*ogy *Conference*,.California, USA.

34- Saied, H. M., Gabr, S. A., Hamed, A. S. and Hefnawy, H. T. (2004). Production of anthan gum by *Xanthomonas campestris.,Biotecnology Conference.*, California, USA.

.