استعمال المانيتول المنتج من عزلة محلية لبكتيريا *Leuconostoc mesenteroides* في تحضير الوسط الزرعي mannitol salt agar

شيماء ذياب جدوع السهلاني• آمال كاظم غضبان الاسدي غياث حميد مجيد

قسم علوم الأغذية /كلية الزراعة/جامعة البصرة /البصرة /العراق

alsahlany.shayma@gmail.com

الخلاصة

تم الحصول على عزلة نقية من بكتيريا *Leuconostoc mesenteroides* معزولة من نبات البربين *Portulasa oleracea* والتي نميت على وسط انتاج للمانيتول احتوى على عصير التمر وبلغ المانيتول الناتج 12.8 غم / 100 مل وشخص المانيتول باستعمال كروماتوغرافيا الورق وكانت قيم *Rf* متساوية للمانيتول القياسي والمنتج وكما واجري تحليل طيف الاشعة تحت الحمراء IR وكانت طيف الاشعة للمانيتول المنتج متطابق مع الشكل القياسي لطيف الاشعة تحت الحمراء لمركب المانيتول ، استعمل المانيتول المنتج في تحضير الوسط Mannitol salt agar لتنمية بكتريا *Staphylococcus aureus* وباستعمال طريقة الصب والنشر وظهرت المستعمرات النامية تغير في لون الوسط وكانت اعداد المستعمرات والخصائص الشكلية لها مقاربة لأعداد واشكال تلك التي نميت على الوسط Mannitol salt

الكلمات المفتاحيه: المانيتول، بكتريا Leuconostoc ، وسط زرعي

البحث مستل من رسالة الباحث الاول

المقدمــة

المانيتول احد السكريات الكحولية يحتوي على ست ذرات كاربون وهو بنصف حلاوة السكروز قليل الذوبان في الماء وقابل للذوبان بشكل قليل جدا في المذيبات العضوية عدا الايثر وبعض الكيتونات والهيدروكاربونات وله وزن جزيئي مقداره 182 دالتون ، ودورانه النوعي 24.3-23.3 ، ودرجة انصهاره بحدود-168 165مْ ويعطي طاقة مقدارها 1.6 كيلو سعرة /غم (vonWeymarn,2002).

Lactobacillus و *coccus lactis* *plantarum* إذ عرفت قدرة بكتريا حامض اللاكتيك على إنتاج سكر المانيتول من السكريات المتنوعة (vonWeymarn *et al*.,2002) .

تمتاز بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* بقدرتها العالية على إنتاج المانيتول لامتلاكها أنزيم المانيتول ديهايدروجنيز إذ يعمل هذا الأنزيم على اختزال سكر الفركتوز وتحويله إلى المانيتول بوجود العامل المساعد $NADH+H^+$. وأنتج المانيتول باستعمال بكتريا*Leu. mesenteroides* بعدة طرائق منها استعمال المزرعة المستمرة ومزرعة الوجبة المغذاة ومزرعة الوجبة الواحدة وأظهرت الطريقتان الاخيرتان مستويات عالية من الإنتاج

تفضل الطريقة المايكروبية في انتاج المانيتول لمحاسنها المتعددة وتستعمل فيها الفطريات (الخمائر والاعفان) والبكتريا ولاسيما بكتريا حامض اللاكتيك غير متجانسة التخمر مثل أجناس *Leuconostoc* و *Lactobacillus* و *Oenococcus* ومتجانسة التخمر مثل الأنواع *Lacto*

لذا يفضل استعمالها في إنتاج المانيتول (Neves *et al*.,2005).

يعد المانيتول أحد المكونات الأساسية في تحضير عدد من الأوساط الزرعية التي تستعمل في عزل وتنمية البكتريا ومن أهم هذه الأوساط هو وسط Mannitol salt agar ووسط Coagulase mannitol agar اللذان يستعملان لعزل وتنمية بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* (Kloos and Bannerman ,1999).

ومن اجل انتاج المانيتول من اوساط محلية بديلة رخيصة الثمن واستعماله في تحضير وسط زرعي ارتينا هذه الدراسة .

العزلة البكتيرية

تم الحصول على عزلة بكتيرية تعود لبكتيريا *Leuconostoc mesenteroides* معزولة من نبات البربين من قسم علوم الاغذية /كلية الزراعة / جامعة البصرة .

وسط الانتاج

استعمل هذا الوسط لإنتاج المانيتول وتكون من 10غم تربتون ، 10غم مستخلص الخميرة ، 10غم فوسفات البوتاسيوم الثنائية ، 30غم كلوكوز ، 60 غم فركتوز ، 10مل محلول الفيتامينات والمعادن { محلول الفيتامينات والمعادن يتكون من :- 40 غم كبريتات المغنسيوم ، 1غم كبريتات الحديدوز المائية، 20غم كبريتات المنغنيز المائية ،1غم ثيامين ، 5 غم حامض الاسكوربيك، 3غم حامض الستريك} تم إذابة الكلوكوز والفركتوز في 500 مل ماء مقطر والمكونات الأخرى ذوبت في 500 مل وعقم بالمؤصدة على 121مْ لمدة 15 دقيقة كل جزء لوحده تجنبا لحدوث تفاعلات ميلارد وبعد التعقيم مزجت المكونات وضبط الرقم الهيدروجيني إلى 6.5 باستعمال حامض الخليك الثلجي (Soetaert *et al*.,1999).بإضافة عصير التمر75 مل/100مل والمحضر حسب (بنيامين وآخرون ، 1988) .

المواد وطرائق العمل

طريقة إنتاج المانيتول Mannitol production method

اتبعت طريقة Soetaert *et al*.(1999) لإنتاج المانيتول.

- **تنمية البكتريا وانتاج المانيتول**

1- تنشيط بكتيريا *Leu. mesenteroides* في 10 مل من وسط (M.R.S.)السائل عند 25مْ لمدة 24 ساعة .

2- نقل بواسطة ماصة معقمة 1% من المزرعة البكتيرية المنشطة إلى وسط إنتاج المانيتول واستعمل الرقم الهيدروجيني 6.5 وحضن عند 25 مْ لمدة 48 ساعة وباستعمال الحاضنة الهزازة بسرعة 200 دورة / دقيقة المجهزة من شركة Kottermann .

- **استخلاص وتنقية المانيتول من وسط الانتاج**

1- بعد انتهاء مدة الحضن اجري الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة\دقيقة لمدة 30 دقيقة لفصل الراشح والتخلص من الكتلة الحيوية .

2- ركز الراشح بواسطة المبخر الدوار Rotary evaporator رقمه RE120 ونيوزلندي الصنع. عند درجة حرارة 40-50 مْ بحيث تكون نسبة المواد الصلبة المتبقية حوالي 60%.

- **بلورة وتقدير المانيتول الناتج**

1- أضيف 1 غم من المانيتول القياسي إلى الراشح المركز لبدء عملية البلورة.

2- برد الراشح من درجة 35- 5 م وبمعدل تخفيض درجتين لكل ساعة بدلاً من درجة لكل ساعة لمدة 15 ساعة لغرض البلورة ، ثم بقى على درجة 5 م لمدة 12 ساعة.

3- بعد 24 ساعة من بدء عملية البلورة ثم فصل البلورات عن السائل المتبقي باستعمال ورق الترشيح من Whatman No.3 تحت التفريغ وبوجود قمع بخنر Vacuum Buchner ، بعد ذلك غسلت البلورات المتكونة بالايثانول للتخلص من الشوائب ثم جففت البلورات عند 60 مْ .

4- حسب المانيتول الناتج بوزنه باستعمال الميزان الحساس المجهزمن شركة Sartorius AGGO Ttingen الألمانية مع الاخذ بنظر الاعتبار طرح كمية المانيتول المضافة لبدء البلورة .

تشخيص المانيتول

استعملت كروماتوغرافيا الورق Paper chromatography وبوجود الكاشف 5,3 ثنائي نيترو حامض السالسيليك للكشف عن المانيتول المنتج مقارنة مع المانيتول القياسي المجهز من شركة Oxide (Teitz 1982,) . استعمل ورق الترشيح من نوع Whatman No. 1 بطول 15 سم حسبت قيمة الحركة النسبية (R*f*) لكل عينة كالأتي

$$\text{الحركة النسبية } (Rf) = \frac{\text{المسافة التي قطعها المذاب من خط البداية}}{\text{المسافة التي قطعها المذيب من خط البداية}}$$

تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء (IR)

اتبعت الطريقة التي ذكرها Seymour and Julian (1979) وباستعمال جهاز المطياف الضوئي للأشعة تحت الحمراء المجهز من شركة Buck scientific الموديل M500 NPACKING ورقمه 997 الامريكي المنشأ التابع لقسم الكيمياء . كلية التربية. جامعة البصرة.

إدخال المانيتول المنتج في تحضير الوسط Mannitol salt agar

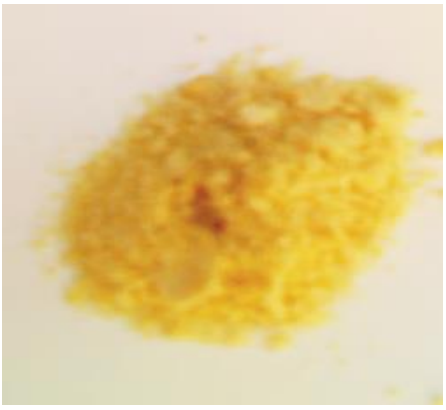
حضر الوسط Mannitol salt agar بإدخال المانيتول المنتج وبالنسب المذكورة نفسها

بالوسط واستعمل لتنمية وحساب أعداد بكتريا *Staphylococcus aureus* ، وبطريقتين الصب والنشر إذ استعملت عدة تخافيف ونقل 1 مل إلى إطباق بتري معقمة وصب عليه الوسط أو نشر0.1مل على سطح الوسط نفسه حضنت الإطباق عند 37 مْ ولمدة 24-48 ساعة وتم الحصول على عزلة مشخصة من بكتريا *Staph. aureus* من مختبرات كلية العلوم / جامعة البصرة .

النتائج والمناقشة

أنتاج المانيتول

بعد انتهاء عملية التخمر وفصل الخلايا باستعمال جهاز الطرد المركزي اخذ الراشح وكان لونه اصفر مائل إلى البني بينما الراسب الذي يمثل الكتلة الحيوية كان لونه ابيض مائل إلى الرمادي، ثم ركز الراشح وكانت نسبة المواد الصلبة 60 %بعدها أجريت البلورة للراشح وكان المانيتول الناتج لونه اصفر وشكله ابري وطعمه حلو بارد شكل (1) إذ كان الناتج 12.8غم / 100 مل وبسبب أن عصير التمر مادة غنية بالسكريات الأحادية ويحتوي عل نسب متساوية من الكلوكوز و الفركتوز الامر الذي يجعل ايض البكتريا يتجه نحو تخليق المانيتول لكون الفركتوز المادة المحفزة لإفراز أنزيم المانيتول ديهايدروجنيز بالإضافة إلى أن عصير التمر يحتوي على العديد من الفيتامينات والمعادن التي تساعد في نمو البكتريا والقيام بالفعاليات الايضية لإنتاج المانيتول. فقد بين kim *et al*. (2000) أن بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* تحتاج إلى وجود بعض العناصر المعدنية الرئيسة مثل المغنسيوم والمنغنيز والحديد في عملية نمو وانتاج المانيتول.

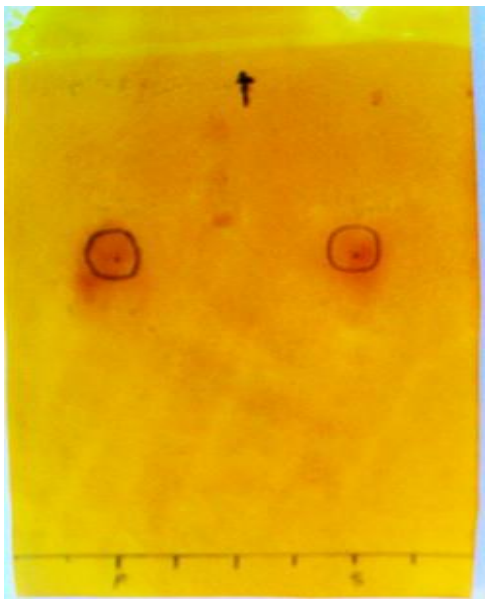


شكل(1) المانيتول الناتج من *Leuconostoc mesenteroides* في وسط يحتوي عصير التمر75 مل/100مل

تشخيص المانيتول Mannitol identification

كروماتوغرافيا الورق Paper chromatography

يبين الشكل (2) حركة عينة المانيتول المنتج من وسط عصير التمر على ورقة الترشيح عند أجراء تحليل كروماتوغرافيا الورق ومقارنتها مع المانيتول القياسي إذ ظهر أن المانيتول المنتج كان مشابها للمانيتول القياسي وقيمة R*f* (الحركة النسبية) بلغت 0.55 لعينات المانيتول المنتج والقياسي وهذه النتائج تتفق مع Chalfan *et al*.(1975) إذ بينوا إمكانية فصل المانيتول الناتج من بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* باستعمال كروماتوغرافيا الورق .



شكل (2) تحليل كروماتوغرافيا الورق للمانيتول القياسي(S) والمانيتول المنتج (P)

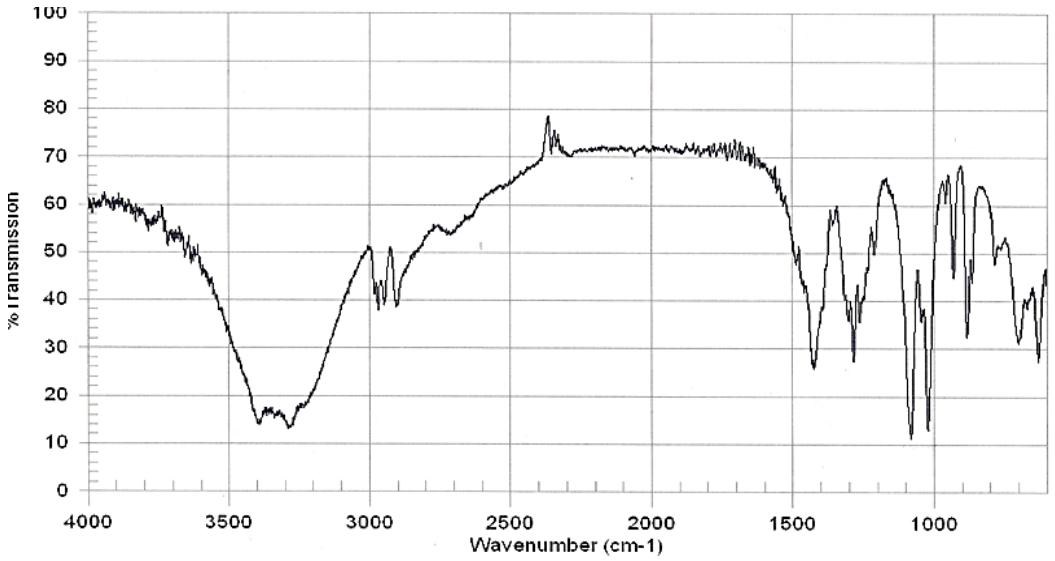
تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء (IR)

وضح جدول (4) أهم القمم الظاهرة في طيف المانيتول المنتج مع إسناد كل قمة إلى المجموعة الفعالة المعينة في المركب ويبين الشكل (3،4) طيف الأشعة تحت الحمراء للمانيتول القياسي والمنتج ويلاحظ من وجود تشابه واضح وهذه النتيجة تتفق مع Chartes (1981) في موسوعة أطياف الأشعة تحت الحمراء للمركبات الكيمياوية (الشكل 5). اذ تبين وبشكل واضح إلى الحزمة الخاصة بمجموعة OH الكحولية الموجودة في المانيتول والتي تظهر بشكل قمة عريضة عند التردد 3100-3400 سم$^{-1}$ ويمكن تفسير ظهورها بهذا الشكل لسببين: الأول هو وجود الأواصر الهيدروجينية بين مجاميع OH

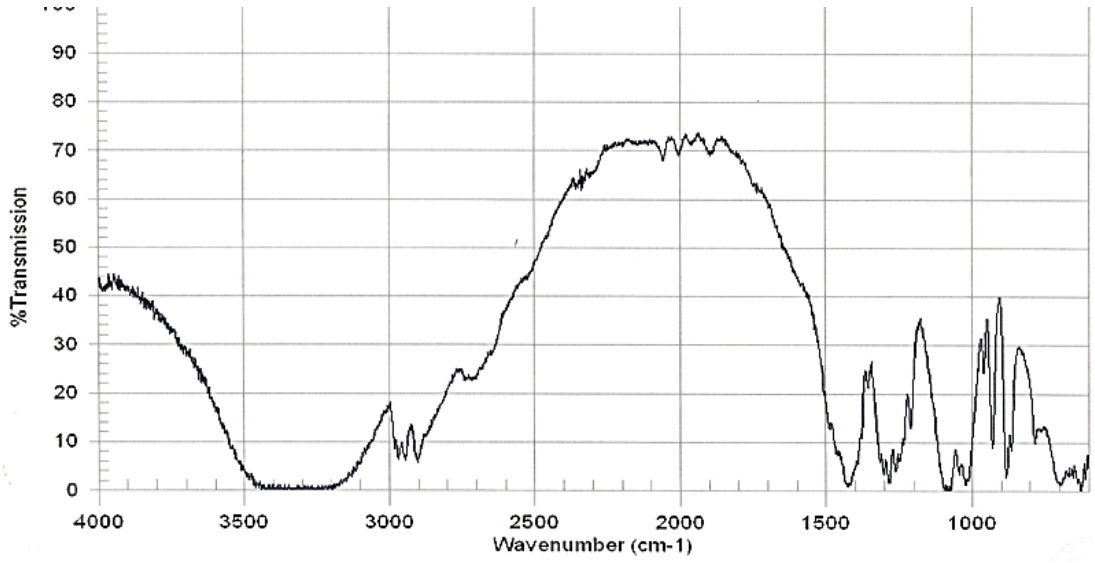
في مركب المانيتول والثاني هو وجود مجموعة OH الموجودة في المذيب (الايثانول) والتي كثيرا ما تظهر في أطياف الأشعة تحت الحمراء للسكريات والكاربوهيدرات عامة لصعوبة التخلص هذه المركبات من المذيبات والرطوبة بشكل تام . وتظهر بشكل واضح في جميع الأطياف الحزمة الخاصة ب C-H stretching (الفاتية) بشكل قمة حادة عند التردد 2900-2840 سم$^{-1}$، أما التي تظهر مابين 1500-1000سم$^{-1}$ فهي تعطي دليلاً مقبولاً على أنها عائدة إلى الآصرة C-H bending الانحنائية والتي تظهر عند التردد 1467سم$^{-1}$ والآصرة OH الكحولية Alcoholic-C-OH والتي تظهر بشكل قمة قوية وعريضة عند التردد 1070سم$^{-1}$ والآصرة C-O sterch المتأرجحة والتي تظهر عند التردد 1040 سم$^{-1}$ وهذه هي ابرز المجاميع الفعالة في المانيتول أما المنطقة الواقعة من 1000 سم$^{-1}$ فما دون فهي ليست بذات أهمية لأنها تعود إلى تأرجح وانحناء الآصرة C-C والتي تظهر عند التردد 1000-800 سم$^{-1}$ وعند التردد 500 سم$^{-1}$ والتي لا يخلو منها مركب عضوي وهذا ما اكده (Silversteino *et al*.,1996) .

جدول (1) المجاميع الفعالة للمانيتول المنتج الناتجة من تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء (IR)

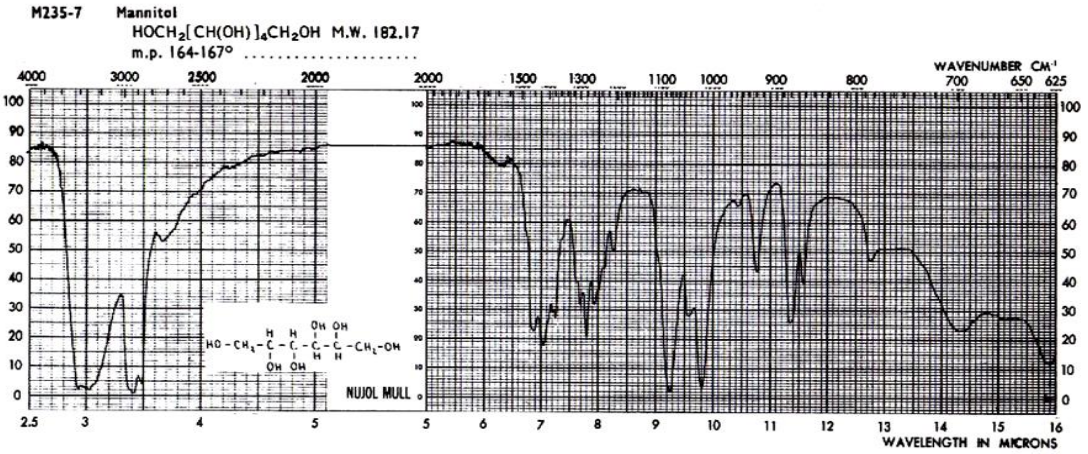
ت	المجموعة الفعالة	موقع الآصرة سم$^{-1}$
1	OH Alcoholic الكحولية	3400-3100
2	C-H stretching الفأتية	2900-2840
3	C-H bending الانحنائية	1467
4	C-OH- الكحولية OH	1070
5	C-O strech المتأرجحة	1040
6	C-C stretching vibration الاهتزاز المتأرجح	1000-800
7	C-C bending vibration الاهتزاز الانحنائي	500



شكل(3) تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء للمانيتول القياسي



شكل (4)تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء للمانيتول المنتج من عصير التمر

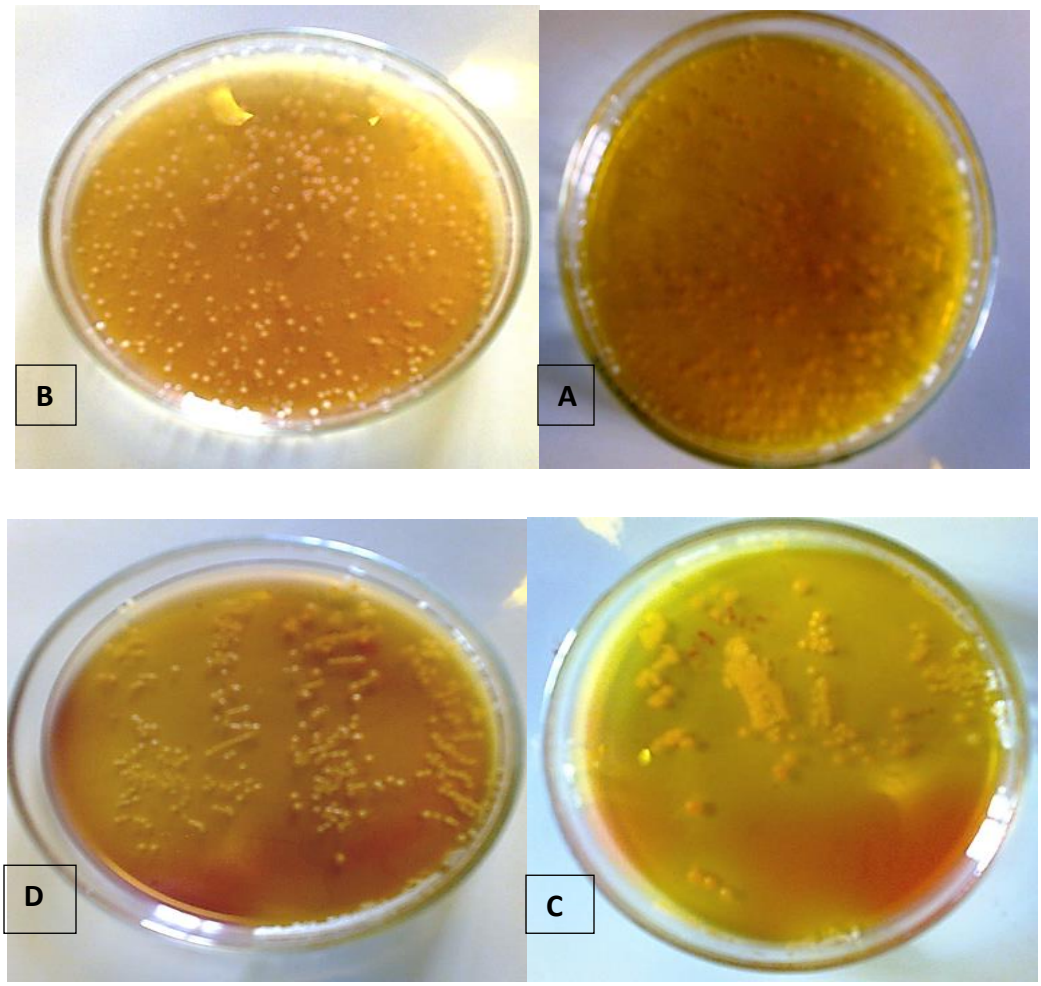


شكل (5) تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب المانيتول مقتبس من (Chartes,1981)

استعمال المانيتول المنتج في تحضير الوسط Mannitol salt agar

يبين الشكل (6) نمو بكتريا *Staphylococcus aureus* على وسط Mannitol salt agar القياسي والمحضر من المانيتول المنتج إذ كانت أعداد البكتريا النامية على الوسط القياسي 173× 10^2(وحدة تكوين مستعمرة / مل) والوسط المحضر 180×10^2(وحدة تكوين مستعمرة / مل) بينما كان شكل المستعمرات دائرية صغيرة ذات لون ابيض مائل إلى الأصفر وان تنمية المستعمرات على الوسطين أدى إلى تغير اللون الأحمر إلى الأصفر بسبب استهلاك المانيتول من قبل البكتريا كمصدر للكاربون وإنتاج الحامض أدى إلى خفض الرقم الهيدروجيني ومن ثم تغير لون الصبغة الموجودة في الوسط phenol red وهذه النتيجة تتفق مع Kloos and Bannerman (1999) إذ أشارا إلى قدرة البكتريا *Staph.aureus* على استهلاك المانيتول والنمو على تركيز ملحي يصل إلى 7.5% وتغير لون الوسط لذا يعد هذا الوسط من الأوساط الانتقائية لتنمية هذه البكتريا

.



شكل (6) استعمال طريقة النشروالصب لتنمية بكتريا *Staphylococcus aureus* على وسط Mannitol salt agar (A,C) المحضر من المنتج (B,D) القياسي.

المصادر

بنيامين، نمرود داود؛ محمد ،نواز عبد الله؛ الشاكر، سمير عبد الحميد و مروكي، أحمد سعد (1988) مقارنة تطبيقية لتنقية ،استخلاص وترويق عصير التمر على نطاق شبة صناعي وصناعي .مجلة نخلة التمر ،المجلد 11،العدد6.

Chalfan,Y.;Levy,R. and Mateles,R.I.(1975) Detection of mannitol formation by bacteria. Appl. Microbiol. 30(3):476.

Seymour,F.R. and Julian, R.L.(1979) Fourier-transformation infrared difference spectrometry for structural analysis of sugar .**J**. Carbohydr. Res. 74:63-75.

Silversteino,R.M. and weloster,F.X.(1996) Spectrometric identification of organic compounds, 6th ed. John Wiley and Sons eds. Inc. U.S.A.

Soetaert,W.; Vanhooren, P.T. and Vandamme,E.J.(1999) Production of mannitol by fermentation, Methods Biotechnol . Vol.10(Carbohydrate Biotech-nology Protocols). Edited by Bucke, C. Humana Press Inc. Totowa, NJ. pp:261-275.

Teitz,N. W.(1982) Fundamentals of clinical chemistry. Press of N.B. Squnders company.

von Weymarn, N.(2002) Process development for mannitol production by lactic acid bacteria,

Chartes,J.P.(1981) The Aldrich library of Infrared spectra. 3rd ed. U.S.A. p.M235-7.

Kim,D.;Thomas,S. and Fogler, H.S.(2000) Effects of pH and trace minerals on long-term starvation of *Leuconostoc mesenteroides* . Appl. Environm. Microbiol. 66(3):976-981.

Kloos, H. and Bannerman, K.(1999) Manual of clinical microbiology In: Murray; Baron; Pfaller; Tenover and Yolken (eds.) 7th ed. American Society for Microbiology Washington, D.C. U.S.A.

Neves, A.R.;Pool, W.A.;Kok, J.;Kuipers, O.P.;Santos, H. (2005) Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* - the input from in vivo NMR. FEMS Microbiol. Rev. 29:531-54.

Ph.D. thesis, Helsinki University of Technology, Espoo, Finland .110p.

von Weymarn ,N.;Hujanen,M. ;Leisola,M.(2002) Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria.**J**. Proc Biochem 37:1207-1213.

Using of mannitol produce from local isolate of *Leuconostoc mesenteroides* in preparation of mannitol salt agar media

Shayma T. G. Al-Sahlany Amal K. Al-Asadi Gheyath H.Majeed

Department of Food Science and Biotechnology College of Agriculture-University of Basrah Basrah-Iraq.

Summary

Leuconostoc mesenteroides pure isolate was obtained from Purslane plant (*oleracea Portulasa*) , It which grown on mannitol media production contained on date extract . The yield of mannitol production yield was 12.8g/100 ml that identified by paper chromot agraphy which revealed that R*f* value of standard mannitol and produced mannitol were equal .The results of infra-red spectra (IR) analysis of produced mannitol were compatible to that of the Aldrich library of Infra-red spectra of mannitol .

The produced mannitol was used to prepare mannitol salt agar for cultivation of *Staphylococcus aureus* using pour plate and spread methods which changed the medium color, also colonies numbers and characters approached those which grew on standard mannitol salt agar medium .

Key words: mannitol, leuconostoc bacteria, culture media.

A parts of thesis by the first author