مجلة جامعة بابل / العلوم الصرفة والتطبيقية والعلوم الهندسية / المجلد (٢٦)، العدد (١):٢٠١٨

دراسة الظروف المثلى لإنتاج السكر المتعدد Exopolysaccharide من بكتيريا *Lactococcus lactis subsp. Lactis*

ابتسام فاضل موسى مصطفى فلاح وتوت

جامعة بغداد– كلية الزراعة – قسم علوم الأغذية

Mw89s@yahoo.com

الخلاصة

تمت دراسة الظروف المثلى لإنتاج السكر المتعدد في البكتيريا *Lactococcus lactis subsp. lactis* وأظهرت النتائج ان افضل انتاج للسكر المتعدد هو عند تدعيم وسط الانتاج M17 بالمصدر الكربوني (10 % كلوكوز) وبلغت كمية السكر المتعدد 0.148 غرام وزن جاف والمصدر النتروجيني(١,٥ %كازين) وكمية السكر المتعدد كانت 0.209 غرام وزن جاف والاملاح المعدنية (كلوريد الكالسيوم) ٠,١ ملغم / لتر وكمية السكر المتعدد المتحصل علية بلغت 0.21 غراماً وزناً جافاً و الفيتامينات (Vit .C) ٠,٥ ملغم / لتر، وكانت كمية السكر المتعدد ٠,٢٠٤ غرم وزن جاف مقارنه مع السكر المتعدد في وسط M17 غير المدعم و٠,١ غراماً وزناً جافاً وان افضل درجة حرارة لإنتاج السكر المتعدد هي ٢٥ ْم وكمية السكر المتعدد هي 0.205 غرام وزن جاف، وافضل رقم هيدروجيني ابتدائي هو ٦,٥ وكمية السكر المتعدد هي 0.212 غراماً وزناً جافاً وبحجم لقاح ابتدائي 1×10^6 خلية/ مل، وبلغت كمية السكر المتعدد 0.2 غراماً وزناً جافاً، مدة التخمر بلغت ٢٤ ساعة في الوسط الغذائي المذكور انفاً وكمية السكر المتعدد كانت 0.216 غراماً وزناً جافاً .

الكلمات المفتاحية :الظروف المثلى،السكر المتعدد خارجي، كلوكوز، كازين .

Abstract

The optimum conditions of polysaccharides production studied from *Lactococcus lactis subsp. lactis* showed that the best condition was when used M17 supplemented by carbon source 10 % glucose the amount of polysaccharides was 0.148 gram dry Wight , and nitrogen source 1.5 % casein the amount of polysaccharides was 0.209 gram dry Wight and mineral salts gram dry Wight 0.1 m gm⁄L calcium chloride the amount of polysaccharides was 0.21 gram dry Wight and 0.5 m gm⁄ L Vit .C the amount of polysaccharides was 0.204 gram dry Wight compared with the amount of polysaccharides produced from this bacteria used M17 Non supplemented 0.1 gram dry Wight, the temperature 25 c̊ the amount of polysaccharides was 0.205 gram dry Wight, pH for exopolysaccharide production was amount 0.212 gram dry Wight , the size of the primary vaccine 1×10^6 cell / ml the amount of was polysaccharides 0.2 gram dry Wight and the duration of the fermentation reached 24 hours in media the amount of polysaccharides was0.216 gram dry Wight .

Keywords: Optimal Conditions , exopolysaccharide , glucose , casein .

المقدمة

تزايد الاهتمام بالسكر المتعدد الخارجي exopolysaccharide (EPS) المنتج من بكتيريا حامض اللاكتيك LAB في الآونة الاخيرة، لما لهذا السكر المتعدد من أهمية ريولوجية للأغذية ولاسيما في منتجات الالبان لدوره كمثخن ومستحلب و لقابليته على الارتباط بالماء (Sutherland،1990).

يرتبط وجود EPS المنتج من بكتيريا حامض اللاكتيك دائماً بتحسين خواص منتجات الحليب المتخمرة ولاسيما صفة اللزوجة وتحسين الصفات الريولوجية واحتباس الماء في منتجات الالبان (Ruas – madied *et al*., 2002) واكد عدد من الباحثين ان وجود EPS يسهم في تحسين الملمس والطعم والاستقرار

النهائي للمنتوج اللبني(Schffer- lequrtg and girard, Hassan *et al* .,Folkenberg *et al*. ,20052004; 1996).

يعد مصدر الكربون هو احد العوامل المهمة التي تؤثر على انتاج السكريات المتعددة EPS والذي يؤدي الى زيادة انتاج EPS لكن ليس دائماً (Miqueleto *et al*.,2010;Wang *et al*.,2006) تختلف مدعمات المصدر الكربوني(كلوكوز– كلاكتوز– سكروز– لاكتوز– فركتوز) باختلاف نوع بكتيريا حامض اللاكتيك المنتجة للـــ EPS وبحسب ما تميزه نوع السلالة (Nicolaus *et al* .,2004)، فقد استخدم Suzuki وجماعته (2013) المصدر الكربوني الكلوكوز في الوسط الغذائي M17 وكذلك الوسط الغذائي milk Skim لأفضل انتاج للسكر المتعدد من بكتيريا *Lactococcus lactis subsp.lactis*، في حين وجدTorino وجماعته (2001) ان أفضل مصدر كاربوني هو الكلوكوز واللاكتوز والكلاكتوز في تحديد الوسط الغذائي لتصنيع EPS من بكتيريا *L. helveticus ATCC 15807* ومع ذلك فان اقل انتاج للسكر المتعدد تم الحصول عليه عند استخدام المصدر الكربوني الكلاكتوز مقارنة مع الكلوكوز او اللاكتوز، وتنمو بكتيريا *Lb. casei* CG11 في وسط غذائي يحتوي على كميات قليلة من الكلاكتوز او الكلوكوز او السكروز لكن انتاجها يكون قليلاً من EPS عند استخدام الكلاكتوز في الوسط مقارنة مع السكريات الاخرى (Cerning *et al* . , 1994).

هناك ارتباط وثيق بين انتاج السكر المتعدد EPS والمصدر النتروجيني الذي يؤثر على الخصائص النهائية ونوعية EPSs ومن ثم التأثير على الصفات الريولوجية للسكر المتعدد(and Marshall،1999 Rawoson) واشارت عدد من الدراسات الى ان حصيلة EPSs المنتج من بكتيريا حامض اللاكتيك يمكن ان تتأثر بتغير المصدر النتروجيني (Grobben *et al*. 1997; Gamar *et al* . , Van den Berg *et al*1995 ; 1997 .)، إن تأثير نوع المصدر النتروجيني على انتاج السكر المتعدد يكون متشابهاً في اغلب عزلات LAB تقريباً، لكن الاختلاف يكون في التركيز وبحسب العزلة المستخدمة، وان الاوساط الغذائية التي تحتوي على مواد غذائية معقدة مثل مستخلص اللحم ومستخلص الخميرة والببتون فهذه الاوساط الغذائية جميعاً تكون غير مناسبة لإنتاج EPS لأنها تتداخل مع المونومير Monomer و التركيب الكيميائي للسكر المتعدد غير المتجانسHePS (Roberts and Kimmel،1998).

المواد وطرائق العمل

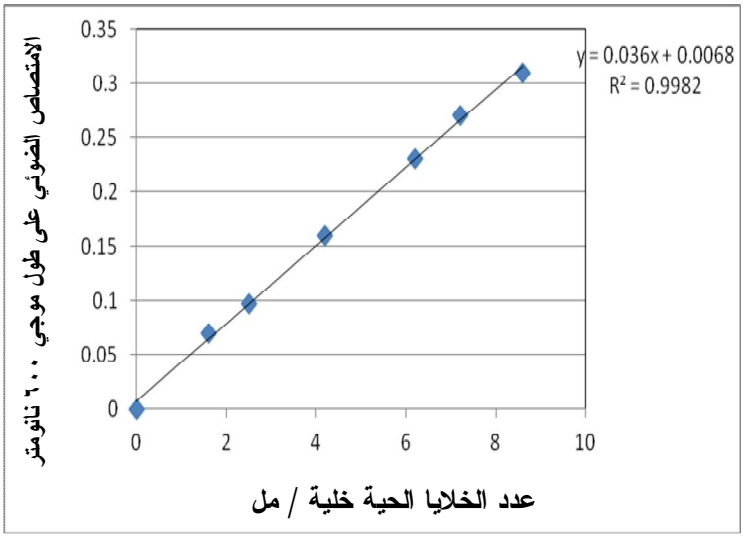
اولاً: تحضير و تنشيط البكتيريا

تم الحصول على بكتيريا *Lactococcus lactis subsp. lactis* مجفدة من شركة Sacco Sri الايطالية ثم نشطت على الوسط الغذائي M17 السائل(Himedia) ثم نميت على وسط M17 السائل المدعم بـــ 0.5 % كلوكوز (Aslim *et al* ., 2005 ; Sanlibaby and Akcelic 2002).

ثانياً : تقدير حجم اللقاح

حسبت اعداد خلايا بكتيريا *Lactococcus lactis subsp.lactis* باستخدام طريقة الامتصاص الضوئي(طريقة المنحنى القياسي) لحساب عدد الخلايا الحية للبكتريا_المذكورة اعلاه وحسب الطريقة المذكورة من (Atlas *et al*. , 1995) حضر 50 مل من وسط Nutreint السائل في دورق زجاجي سعة 250 م وعقم على درجة حرارة 121 ْ م لمدة 15 دقيقة. برد الوسط الى درجة حرارة ٤٥–٥٠ ْم ولقح بعدد معين من خلايا

البكتيريا باستعمال ابرة التلقيح (Loop)، وحضن الوسط الملقح في درجة حرارة 25 ْم لمدة 18 ساعة. اجريت تخافيف باستعمال وسط Nutreint السائل(1:1، 2:1، 3:1، 4:1، 5:1، 6:1)، قيست الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer بطول موجي 600 نانومتر، وقدرت الاعداد الحية (viable count) في الوقت نفسه بطريقة صب الاطباق القياسية، رسمت العلاقة بين الامتصاصية وعدد الخلايا المحصل عليها كما في الشكل (١)لاعتمادها لاحقاً في تقدير اعداد الخلايا في الدراسات اللاحقة.



شكل (١) المنحنى القياسي لحساب الاعداد الحية لخلايا بكتيريا *Lactococcus lactis subsp.lactis*

ثالثاً : استخلاص و تنقية السكر المتعدد :

استخلص السكر المتعدد من وسط التنمية لبكتيريا المدروسة بحسب ما ذكــره (Van Geel schutten *et al*., 1998 ; Prathima *et al* ., 2014) بأتباع الخطوات الآتية :

١. عرض الوسط الغذائي الملقح بالبكتيريا وبعد انتهاء عملية التخمر الى الحرارة في حمام مائي بدرجة حرارة الغليان لمدة 15 دقيقة بعد انتهاء عملية التخمر.
٢. اجراء عملية طرد مركزي للوسط الغذائي على درجة حرارة 20 ْم والتخلص من الراسب.
٣. اضافة الايثانول المبرد الى الراشح المتحصل عليه بمقدار ضعف حجمه .
٤. حفظ المزيج في درجة حرارة – 20 ْم لمدة 24 ساعة لترسيب السكر المتعدد EPS.
٥. اجراء طرد مركزي للمزيج بسرعة 10000 دورة/بالدقيقة لمدة 15 دقيقة على درجة حرارة 4 ْم .
٦. اضافة ماء ساخن الى الراسب.
٧. اضافة الايثانول الى المزيج مرة اخرى وحفظه في – 20 ْم لمدة 24 ساعة.
٨. اجراء الطرد المركزي بسرعة 10000 دورة / بالدقيقة لمدة 15 دقيقة على درجة حرارة 4 ْم .
٩. إذابة بالماء المقطر وأجريت له عملية الديلزة باستعمال اكياس الديلزة ٧٠٠٠ دالتون المجهزة من شركة Guanghou Zhenrui ضد الماء المقطر لمدة ٢٤ ساعة على درجة حرارة الثلاجة.

١٠. إجراء عملية تجفيد والحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

رابعاً : تعيين الظروف المثلى لإنتاج السكر المتعدد

درست عدد من العوامل المؤثرة على انتاج السكر المتعدد من البكتيريا *Lactococcuc lactis subsp.lactis* وذلك لتحديد الظروف المثلى لإنتاج السكر المتعدد من الوسط الغذائي M17 المدعم بالكلوكوز، ان مكونات الوسط وظروف الانتاج تكون خاضعة للتغير او التحوير على وفق الاختبار المحدد في برنامج الدراسة الحالية :

أ. حجم اللقاح: دراسة تأثير استخدام مستويات لقاح متدرجة من بكتيريا *Lc. lactis* وهي 10^3 ، 10^4 ، 10^5، 10^6 ، 10^7، 10^8 خلية / مل من وسط التخمر على انتاج السكر المتعدد في الوسط.

ب. درجة الحرارة: اختبرت درجات الحرارة (20، 25، 30، 35 ، 40) ْم لتعيين درجة الحرارة المثلى لإنتاج السكر المتعدد من البكتريا المدروسة .

ت. مدة التخمر: درست المدة زمنية 24 – 48 – 72 – 96 ساعة لتحديد مدة التخمر المثلى لإنتاج السكر المتعدد في وسط التخمر M17 .

ث. الاس الهيدروجيني: لتحديد الاس الهيدروجيني الامثل لوسط انتاج السكر المتعدد اختبرت قيم الاس الهيدروجيني 4.5، 5، 5.5، 6، 6.5، 7.

ج. تحديد المصدر الكربوني الامثل: اختبرت مصادر كربونية هي كلوكوز وفركتوز وسكروز ولاكتوز وكلاكتوز بالتراكيز الآتية (2.5، 5، 7.5، 10،12.5) % من وسط التخمر.

ح. تحديد المصدر النتروجيني الامثل: بغية تحديد المصدر النتروجيني الامثل لإنتاج السكر المتعدد للبكتيريا قيد الدراسة درست تأثير سبعة مصادر نتروجينية هي الببتون ومستخلص الخميرة ومتحلل الخميرة الحراري والكازين وكبريتات الامونيوم ونترات الامونيوم ونترات الصوديوم بالتراكيز الآتية (0.5، 1، 1.5،2) %لكل واحدة منها الى وسط التخمر M17 وكمعاملات منفصلة.

حضر متحلل الخميرة الحراري بخلط خميرة الخبز الجافة (Active yeast) مع الماء المقطر بنسبة 5:1 (وزن: حجم) ثم عقم الخليط بالمؤصدة على درجة حرارة 121 ْم لمدة 15 دقيقة لإتمام عملية الهضم لخلايا الخميرة واستخلاصها، ثم اجريت عملية ترشيح ونبذ مركزي بسرعة (3000 × g) لمدة 15 دقيقة للتخلص من الراسب والحصول على الرائق ثم عقم على درجة حرارة 121 ْم لمدة 15 دقيقة (المدلج ,2002) .

خ. تأثير الفيتامينات: دُرس تأثير اربعة انواع من الفيتامينات في انتاج السكر المتعدد وهي vit. c، vit. B1، vit. B6، حامض الفوليك والتي اضيفت الى الوسط التخمري بالتركيز التالي: 0.5 ملغم / لتر بشكل معاملات منفصلة .

د. تأثير كوريد الكالسيوم في الانتاج: دعم وسط التخمر بكلوريد الكالسيوم لدراسة تأثيره على انتاج السكر المتعدد أضيفت بالتراكيز الآتية (0.05،0.1،0.15، 0.2، 0.25) غم/لتر الى الوسط التخمري.

النتائج والمناقشة

اولاً : تحديد المصدر الكربوني

يبين الشكل (٢) نتائج استعمال(كلوكوز وفركتوز وسكروز ولاكتوز وكلاكتوز) كل واحد مصدراً يُعد كربونياً في الوسط التخمري لبكتيريا *Lc. lactis* لإنتاج السكر المتعدد وبالتراكيز الآتية (٢,٥، ٥،٧,٥،١٠، ١٢,٥) %. اذ تبين ان افضل تركيز كلوكوز لإنتاج للسكر المتعدد هو التركيز ١٠ % اذ بلغت كمية السكر المتعدد ٠,١٤٨ غراماً وزناً جافاً، وقد يعود تأثيره الايجابي الى فعاليته لتحفيز الانزيم glycosyltransferases الذي يعمل على ارتباط النيوكلوتيد بالسكر وبلمرته في تخليق السكر المتعدد المنتج من البكتيريا المدروسة (Madhuri and Prabhakar 2014)، هذه النتيجة جاءت متشابهة مع ما إليه اشار and Yuksekdag Aslim (2008) ان افضل مصدر كربوني لبكتيريا*St. thermophillus* W22 هو ١٠ % كلوكوز وبلغت كمية السكر المتعدد المنتج ٠,٢١١ غراماً وزناً جافاً مقارنة مع المصادر الكربونية اللاكتوز والفركتوز.

ثانياً : تحديد المصدر النتروجيني

وتشير النتائج المبينة في الشكل (٣) إلى تفوق المصادر العضوية على المصادر اللاعضوية (المعدنية) في كمية السكر المتعدد المنتج في الوسط التخمري، وقد يعزى سبب ذلك إلى احتواء المصادر العضوية على احماض امينية متنوعة وببتيدات تحفز الفعالية الايضية والانزيمات الخاصة بإنتاج السكر المتعدد في الوسط المنماة فيه البكتيريا المدروسة خلال تكوينه مقارنة بالمصادر غير العضوية التي تعمل على تكوين بعض المواد غير العضوية مثل H_2SO_4 وهذا يؤدي الى زيادة في سرعة نمو البكتيريا وانتاج كمية قليلة من السكر متعدد (Khan,2015)، في حين توصل Prathima وجماعته (٢٠١٤) الى ان تدعيم وسط إنتاج السكر المتعدد من بكتيريا *Lc. lactis* بالكازين بنسبة١% كمية السكر المتعدد وبلغت ١٥٣,٣٩ ملغم باللتر، واشار Degeest and De Vuyst (١٩٩٩) ان افضل انتاج للسكر المتعدد من العزلة *Streptococcus thermophilus* LY03 كان عند استخدام ٣% ببتون + ١,٢ % مستخلص خميرة في وسط التنمية البكتيريا .

ثالثاً : تأثير كلوريد الكالسيوم

ان تدعيم وسط التنمية M17 بكلوريد الكالسيوم عند التركيز ٠,١ ملغم / لتر ادى الى زيادة كمية السكر المتعدد المنتج الى٠,٢١ غراماً وزناً جافاً كما مبين في الشكل (4) وقد يعزى ذلك إلى كون كلوريد الكالسيوم من أهم العوامل المؤثرة في نمو البكتيريا في اثناء وجود او غياب الأملاح في تركيب وسط الإنتاج فهو مهم لتركيب الانزيم المسؤول عن تخليق السكر المتعدد او التركيب الخلوي وهو عنصر أساس للوصول إلى التوازن الأيوني (1990, الخفاجي) وقد ترجع الزيادة في انتاج السكر المتعدد هو دور كلوريد الكالسيوم في تحفيز وتخليق انزيم .glycosyltransferases الذي يساهم في عملية تخليق السكر المتعدد(Purama & Goyal, ,2008) .

رابعاً : تأثير عوامل نمو (الفيتامينات)

يبين الشكل(٥) نتائج تأثير اضافة الفيتامينات (Vit. C، folic acid، Thiaminchloride (B1)، pyridoxol (B6) الى وسط تمنية *Lc. lactis* لإنتاج السكر المتعدد، وتشير النتائج إلى إن اعلى انتاجية للسكر المتعدد كانت عند إستخدام Vit. C وبلغت ٠,٢٠٤غراماً وزناً جافاً وانخفض الانتاج عند استخدام (pyridoxol

B6) إلى ٠,١٢غراماً وزناً جافاً وكانت هنالك فروق عالية المعنوية بين متوسطات هذه المعاملات ومعاملة السيطرة، وقد يعزى السبب في ذلك هو ان هذه الفيتامينات تزيد من تنويع الاحماض الامينة المساعدة في تكوين وانتاج السكر المتعدد ويعتقد ان آلية عملها غير مفهومة (Jiménez-Diaz & Ruiz-Barba،1994).

خامساً : درجة حرارة التخمر

اظهرت نتائج دراسة تأثير درجة الحرارة في انتاج السكر المتعدد من بكتيريا *Lc. lactis* الموضحة في الشكل (٦) ان افضل درجة حرارة تخمر لإنتاج السكر المتعدد من البكتيريا المذكورة هي ٢٥ ْم حيث كانت كمية الانتاج (٠,٢١٦) غراماً وزناً جافاً، ويعزى السبب في ذلك إلى ان البكتيريا *Lc. lactis* في درجات الحرارة المعتدلة تزيد من الانتاج السكر المتعدد اثناء طور الثبات(Novel and Gancel،1994)، هذه النتيجة جاءت مشابهة لما توصل اليه Prathima وجماعته(٢٠١٤) الذي حصل على أعلى إنتاجية للسكر المتعدد EPS عند درجة ٢٥ ْم من البكتيريا Lactococcus lactis NCDC 191 وبلغت ١٥٣,٣٩ ملغم/لتر. وذكر Bennama وجماعته(٢٠١١) ان درجة الحرارة المثلى لإنتاج EPS من البكتيريا *Streptococcus thermophilus* BN1 في وسط حليب الفرز والحليب الكامل وشرش الجبن كانت ٣٧ ْم وبلغت كمية السكر المتعدد المنتج (٥٤٨، ٣٧٥ ، ٣٢٥) ملغم / لتر لكل منهم على التوالي .

سادساً : مدة التخمر

يتضح من النتائج المبينة في الشكل (٧) ان أعلى انتاجية للسكر المتعدد في وسط التنمية بلغت٠,٢١٦ غراماً وزناً جافاً بعد مرور ٢٤ ساعة من التخمر بعد إن تم تثبيت المدعمات و درجة حرارة التخمر، وتفوقت هذه المعاملة في كمية السكر المتعدد المنتج معنوياً على باقي المعاملات المدروسة، وقد يعزى سبب انخفاض انتاج كمية السكر المتعدد المنتج من البكتيريا المدروسة بإطالة إلى نفاذ المواد المغذية في وسط الانتاج بمرور الوقت ووصول البكتيريا الى طور الهلاك (Khan,2015)، في حين اشار Zhang وجماعته (٢٠١١) ان مدة التخمر المثالية لإنتاج EPS من عزلة *Lactobacillus fermentum* F6 كانت ٢٤ ساعة وبلغت كمية السكر المتعدد ١٥٣,٨ ملغم / لتر.

سادساً : مدة التخمر

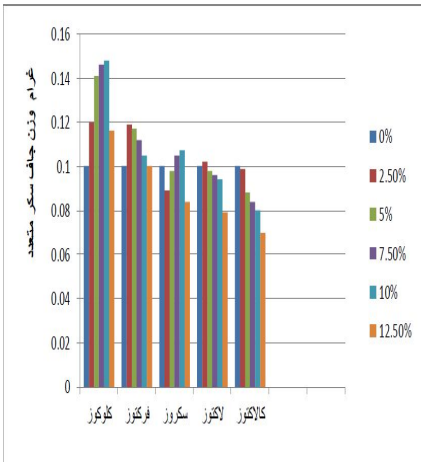
يتضح من النتائج المبينة في الشكل (٧) ان أعلى انتاجية للسكر المتعدد في وسط التنمية بلغت٠,٢١٦ غراماً وزناً جافاً بعد مرور ٢٤ ساعة من التخمر بعد إن تم تثبيت المدعمات و درجة حرارة التخمر، و تفوقت هذه المعاملة في كمية السكر المتعدد المنتج معنوياً على باقي المعاملات المدروسة، وقد يعزى سبب انخفاض انتاج كمية السكر المتعدد المنتج من البكتيريا المدروسة بإطالة إلى نفاذ المواد المغذية في وسط الانتاج بمرور الوقت ووصول البكتيريا الى طور الهلاك (Khan,2015) وهذا يتفق مع ما توصل اليه Prathima وجماعته (٢٠١٤) إلى ان افضل مدة تخمر لإنتاج السكر المتعدد لبكتيريا *Lactococcus lactis NCDC 191* هي ساعة واعطى كمية سكر متعدد بلغت ١٥٣,٣٩ملغم / لتر، واشار Zhang وجماعته (٢٠١١) ان مدة التخمر المثالية لإنتاج EPS من عزلة *Lactobacillus fermentum* F6 كانت ٢٤ ساعة وبلغت كمية السكر المتعدد ١٥٣,٨ ملغم / لتر.

سابعاً : الاس الهيدروجيني

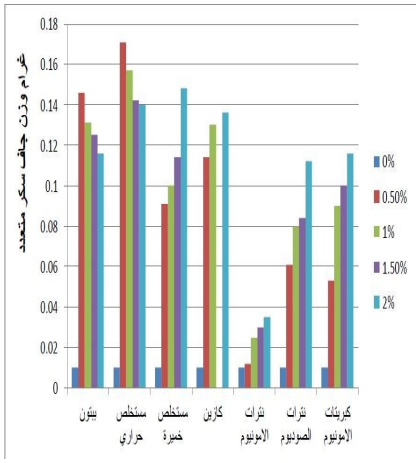
ازدادت كمية السكر المتعدد بزيادة الاس الهيدروجين الابتدائي لوسط التخمر إلى pH (٦,٥) وبلغت ٠,٢١٢ غراماً وزناً جافاً بينما وصلت كمية السكر المتعدد الى ادنى مستوى بزيادة الاس الهيدروجيني الى (٧) وبلغت ٠,٠٨٣ غراماً وزناً جافاً الشكل(٨)، وقد يعزى سبب ذلك هو ان نمو البكتيريا المدروسة على الاس الهيدروجين الذي يتراوح بين (٦ –٦,٥) يتيح لها القدرة على نقل الاحماض الامينية والببتيدات في عملية التخليق في السايتوبلازم وعلى وجه التحديد الحامض الاميني glutamate وبذلك يمكن الحصول على اكبر كمية من الحامض الأميني الأخير ومن ثم يمكن الحصول على اكثر كمية من السكر المتعدد (Van Niel , 1999 ; Van den Berg *et al* ., 1995 ; Poolman and Konings , 1988) في حين توصل Mozzi وجماعته (١٩٩٦) الى ان إنتاج السكر المتعدد من البكتيريا *Lb. casei* CRL 87 على الاس هيدروجيني الذي تراوح ما بين (٦ – ٦,٢) واعطت كمية السكر المتعدد المنتج ٠,٤٨٨ غرام / لتر وكانت هذه الكمية ثلاثة اضعاف كمية السكر المتعدد المنتج عند الاس هيدروجيني ٥,٨ لوسط التنمية للبكتيريا المذكورة .

ثامناً :حجم اللقاح

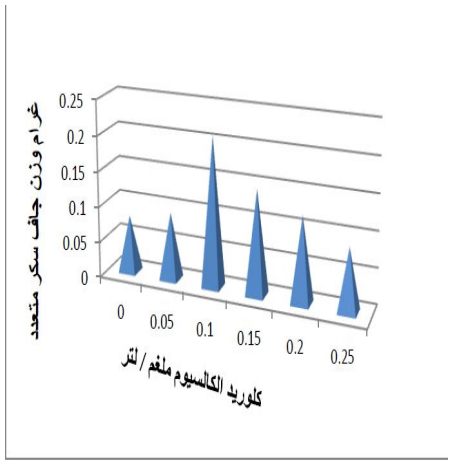
يظهر من النتائج المبينة في الشكل (٩) زيادة كمية السكر المتعدد المنتج الى٠,٢غراماً وزناً جافاً بزيادة حجم اللقاح الى1 × 10 ^{6} خلية / مل حدوث انخفاض كبير في كمية السكر المتعدد بزيادة حجم اللقاح الى 1 × 10 ^{٨} خلية / مل، ويعزى سبب ذلك هو ان هذا الحجم من اللقاح لبكتيريا *Lc. lactis* مناسب مع كمية حجم الوسط الغذائي المعد للتخمر وبذلك يقل وقت التأخير وتخليق البوليمرات من خلال توفير اكبر قدر كافٍ من المغذيات لتخليق البوليمرات الخارجية(الخفاجي،١٩٩٠)، في حين انخفض انتاج السكر المتعدد للبكتيريا المدروسة عند زيادة حجم اللقاح واعزي السبب في ذلك إلى كون حجم اللقاح المستخدم كان غير مناسب ولتلافي حدوث الطفرات يجب قدر المستطاع اختزال وقت التنمية للبكتيريا بزيادة حجم اللقاح (الحيدري والمصلح، ١٩٨٩).



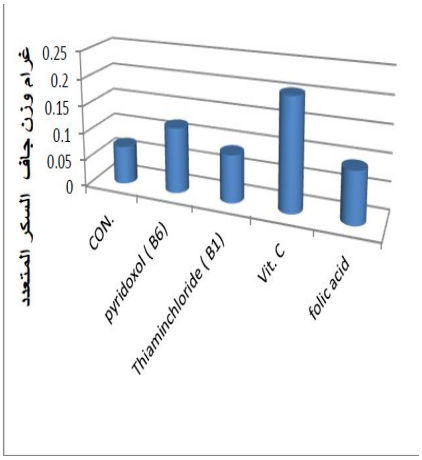
شكل (٢) تأثير المصادر الكربونية في انتاج السكر المتعدد من بكتيريا *Lactococcus lactis*



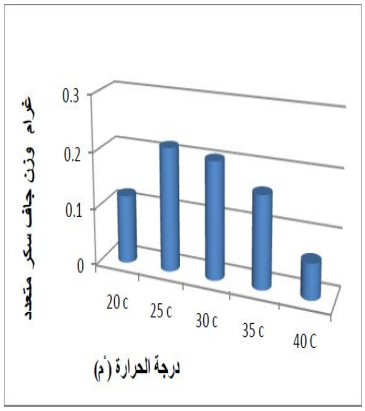
شكل (٣) تأثير المصادر النتروجينية في انتاج السكر المتعددة من بكتيريا *Lactococcus lactis*



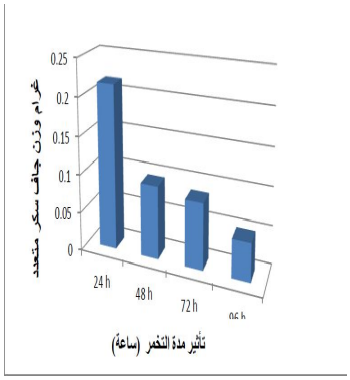
شكل (٤) تأثير كلوريد الكالسيوم في انتاج السكر المتعدد من بكتيريا
Lactococcus lactis



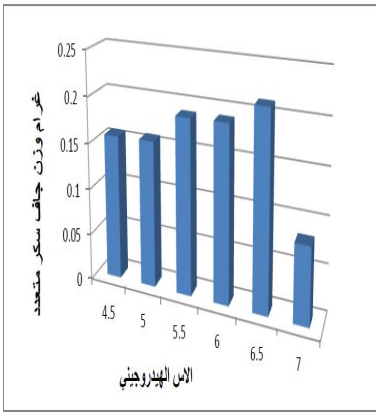
شكل (٥) تأثير الفيتامينات في انتاج السكر المتعدد من بكتيريا
Lactococcus lactis



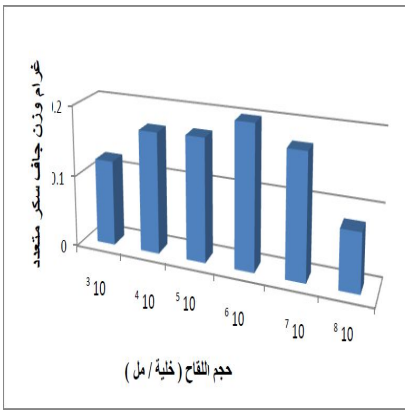
شكل (٦) تأثير درجة الحرارة في انتاج السكر المتعدد من بكتيريا
Lactococcus lactis



شكل (٧) تأثير مدة التخمر في انتاج السكر المتعدد من بكتيريا
Lactococcus lactis



شكل (8) تأثير الاس الهيدروجيني في انتاج السكر المتعدد من
بكتيريا *Lactococcus lactis*



شكل (٩) تأثير استخدام حجوم مختلفة من اللقاح في انتاج السكر المتعدد
من بكتيريا *Lactococcus lactis*

المصادر

الحيدري، نظام كاظم عبد الامير والمصلح، رشيد محجوب، ١٩٨٩، الاحياء المجهرية الصناعية، بيت الحكمة، جامعة بغداد .

الخفاجي، زهرة محمود، 1990، التقنية الحيوية، مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر، جامعة بغداد .

المدلج، وليد خالد كافي، 2002، انتاج صمغ الزانثان من عزلة محلية بكتيريا Xanthomonas *campestris pv phaseolf* و رسالة ماجستير، كلية الزراعة – جامعة بغداد .

Akcelik, M. and Sanlibaba, p.,2002, Characterisation of an exopolysaccharide preventing phage adsorption in lactococcus lactis subsp. cremoris MA3a, TURK. J. Vetamin Sci . p.p 20: 1151 -1156 .

Aslim, B., Yuksekday, Z . N., Beyatli, y . and Marcan, N., 2005, Exopolysaccharide Production by Lactobacillus delbrukii subsp. bulgaricus and Streptococcus thermophillus strains under different growth condition, world journal of microbiology & biotechnology. 21: 673 – 677 .

Atlas, R. M., Parks, L. C., and Brown, A. E., 1995, Laboratory munual of expermimental microbiology . Mosby-Year Book , Inc. Missouri. U.S.A.

Bennama, R., Ladero,V., Alvarez, M. A., Fernandez, M.and Bensoltane , A., 2011, Effect of fermentation conditions (culture media and incubation temperature) on exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* BN1, *International Conference on Biology, Environment and Chemistry, IPCBEE vol.24 P.P* 433-437 .

Cerning, J.; Renard, C.M.G.C.; Thibault, J.F.; Bouillanne, C.; Landon, M.; Desmazeaud, M. and Topisirovic, L. ; 1994; Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer; Appl. Envir. Microbiol: 60,3914–3919.

De Vuyst L, Degeest B ,1999,Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev 23: 153-177.

Folkenberg, D. M., Dejmek, P., Skriver, A .and Ipsen, R., 2005, Relation between sensory texture properties and exopolysaccharides haride distribution in set and in stirred yoghurts produced with different starter cultures , J. Fexture Studies 36 : 174– 89.

Gancel, F., and Novel, G., 1994, Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures 1 Conditions of production. J Dairy Sci. 77, 685 688.

Gamar, L., Blondeau, K. and Simonet, J. M .,1997, Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. J. Appl. Microbiol. 83: 281-287.

Girard, M. and Schaffer – Lequart, C ., 2007, Gelation and resistance to shearing of fermented milk : role of exopolysaccharides , Int. Dairy J. 17 : 666 – 673 .

Grobben, G. J., Van Casteren, W. H. M., Schols, H. A., Oosterveld, A., Sala, G., Smith, M. R., Sikkema,J. and De Bont, J. A. M. ,1997, Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in continuous culture on glucose and on fructose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48:516–521.

Hassan, A.N., Corredig, M ., FranK , J.F. and Elsoda , M., 2004, Microstructure and rheology of an acid-coagulated cheese (Karish) made with an exopolysaccharide-producing

Streptococcus thermophilus strain and its exopolysaccharide non-producing genetic variant: J. Dairy Res.:71(1):116-120

Khan,T.; Khan ,S. and Park, J. K.,2015, "Simple Fed-Batch Cul- tivation Strategy for the Enhanced Production of a Sin-gle-Sugar Glucuronic Acid-Based exopolysaccharides - Producing lactic acid Strain" n;*Biotechnology and Bioprocess Engineering*; Vol. 12, No. 2, pp. 235-242.

Kimmel, S. A., and R. F. Roberts.,1998, Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. Int J Food Microbiol. 40, 87− 92.

Korakli, M., Ganzle, M.G. and Vogel, R.F. , 2002, Metabolism of bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *lactobacillus sanfrancinsensis*. J.Appl. Microbiol., 92: 958-965.

Madhuri, K.V. and Prabhakar, K.V. ,2014, Microbial Exopolysaccharides: Biosynthesis and Potential Applications. Orient J Chem 30: 1401-1410.

Marshall, V. M. and Rawson, H. L.,1999,Effects of exopolysaccharide-producing strains of *thermophilic lactic acid bacteria* on the texture of stirred yoghurt. International Journal of Food Science & Technology 34: 137-143.

Miqueleto, A.P., Dolosic, C.C., Pozzi, E., Foresti, E.and Zaiat, M. ,2010, Influence of carbon sources and C/N ratio on EPS production in anaerobic sequencing batch biofilm reactors for wastewater treatment. Bioresour Technol.,101, 1324–1330.

Mozzi F, de Giori, G. S., Oliver, G. and de Valdez G F., 1996 ,Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH. Biotechnol Lett.;18:435–439.

Nicolaus, B.; Schiano, M.V.; Lama, L.; Poli, A.; Gambacorta, A. ,2004, Polysaccharides from extremophilic microorganisms. Origins. Life. Evol. Biospheres. 34,159–169.

Poolman, B. and Konings, W.N. ,1988, Relation of growth of Streptococcus lactis and Streptococcus cremoris to amino acid transport. J Bacteriol 170: 700-707.

Prathima , P. C., Lule , V. K., Tomar , S . K . , and Singh , A . K . , 2014 , Optimization of Exopolysaccharide production by lactococcus lactis NCDC 191 by Response Surface metodalong , Int. J. Microbiology and Appl . Sci . 3(5) : 835-854 .

Purama, R. K. and Goyal, A., 2008, Effect of nutrients by one variable at a time (OVAT) approach on the dextransucarase production from *Leuconostoc mesenteroides NRRL B- 640* , Int . J . Microbiol. 5 .

Ruiz-Barba, J. L., Jiménez-Diaz, R., 1994,Vitamin and amino acid requirements of *Lactobacillus plantarum*strains isolated from green olive fermentations. J Appl Bacteriol.; 76:350–355.

Ruas-Madiedo, P.; Hugenholtz, J. and Zoon, P., 2002, An owerview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria; Int Dairy J 12: 163-171.

Schomburg, D., and D. Stephan,1996, Enzyme handbook, vol. 12. Springer Verlag, Berlin, Germany.

Sutherland, I. W. ,1990, Food usage of polysaccharides, p. 117–125. *In* I. W. Sutherland (ed.), Biotechnology of microbial polysaccharides. Cambridge University Press, Cambridge, England

Suzuki, C., Kobayashi, M. and Kimoto – Nira, H., 2013, Novel exopolysaccharides produced by Lactococcus lactis subsp. lactis and the diversisty of epsE Gene in the exopolysaccharides biosynthesis Gene Clusters , Biosci. Biotechnol. Biochem. , 77(10),2013-2018 .

Torino, M.I., Taranto, M.P., Sesma, F.and Font, D.V.G.,2001, Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by Lactobacillus helveticus ATCC 15807 in response to environmental pH. Appl. Microbiol. 91,846–852.

Van den Berg D. J. C, Robijn G. W, Janssen A. C, Giuseppin M. L. F, Vreeker R, Kamerling J. P, Vliegenthart J. F. G, Ledeboer A. M. and Verrips C. T .,1995, Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2840-2844.

Van geel – Schutten , G . H ., Flesch , F., T en brink, B., Smith, M . R. , and Dijkhuizen, L., 1998, Sareening and Charaterization of Lactobacillus srtrains producing large amounts of exopolysaccharides , Appl. Microbial biptechnol. 50: 697 – 703.

Van Niel, E. W. J., and Hahn-Hagerdal, B., 1999, Nutrient requirements of lactococci in defined growth media. Appl Microbiol Biotechnol. 52, 617-627

Wang, X., Xu, P., Yuan, Y., Liu, C. and Zhang, D.,2006, Modeling for gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 in a simplified medium. Appl Environ Microbiol., 72, 3367–3374.

Yuksekdag, Z. N. and Aslim, B., 2008, Influence of Different Carbon Sources on Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22); Braz. arch. biol. technol. v.51 n.3: pp.581-585 .

Zhang, C.T., Li S., and Zhang Y., 2011, Growth and exopolysaccharide production by Streptococcus thermophilus ST1 in skim milk , Braz J Microbiol.;42(4):1470–1478.