قدرة بعض انواع جراثيم *Corynebacterium spp.* المعزولة من التربة على انتاج حامض الكلوتاميك من بعض المواد الخام المستخدمة كمصدر للكاربون والطاقة

أ.د.صبحي حسين خلف
قسم التمريض
كلية التمريض

أ.م.د.أسامة محمد سعيد ألنعيمي
قسم علوم الحياة
كلية العلوم
جامعة الموصل

م.م.داليا عبد الإله محمد رحاوي
قسم علوم الحياة
كلية التربية للبنات

تاريخ تسليم البحث: ٢٠١٢/١٠/٨ ؛ تاريخ قبول النشر: ٢٠١٢/١١/٢٩

ملخص البحث:

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص بعض انواع جراثيم *Corynebacterium* من عينات التربةالمأخوذة من مناطق مختلفة، ثم تم اختبار قدرة الجراثيم المعزولة لإنتاج حامض الكلوتاميك في الوسط التخمري المضاف اليه المواد الخام (قشور التفاح، الشرش، درنات البطاطا المتحللة والدبس) كل على حده. قُدِرَتْ الانتاجية بطريقة النينهيدرين القياسية،تقنية الكروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC وكروماتوكرافيا السائل ذي الكفاءة العالية HPLC. بينت النتائج أن جميع جراثيم *Corynebacterium* تمكنت من النمو وانتاج حامض الكلوتاميك بنسبة عالية في الوسط التخمري المضاف اليه الدبس إذ بلغت ٣٧,٤١% تلاها الوسط التخمري المضاف اليه قشور التفاح الاحمر بنسبة ٢٨,٤٥%ومن ثم الوسط التخمري المضاف اليه الشرش بنسبة ١٧,٢٥%بينما سجل الوسط التخمري المضاف اليه درنات البطاطا المتحللة اقل نسبة إذ بلغت ١٦,٨٦% . بينت الدراسة أنّ النوع *C.callunae* كان افضل الانواع الجرثومية المنتجة لحامض الكلوتاميك في الاوساط التخمرية المضاف اليها المواد الخام.

Isolation and Diagnosis of Some Species of Corynebacterium from Soil Samples

Proof. Dr. Subhi H. Khalf
Department of Nursing
College of Nursing

Asst. Proof. Osama M.S.
Department of Biology
College of Science
Mosul University

Asst. Lect. Dalya A. M.
Department of Biology
College of Education For Girls

Abstract:

The study included isolation and diagnosis of some species of Corynebacterium from soil samples which were taken from different areas. The isolated bacteria were tested according to their ability to produce glutamic acid infermentative media which were suppliedbyraw material like(apple peels ,whey ,decomposed potato and date syrup)separately.

Theproductivity was estimated by standard ninhydrin method, and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Thin Layer Chromatography (TLC) techniques. The results showed that all species of Corynebacterium have the ability to grow and produce glutamic acid with high rate in fermentative media supplemented with date syrup 37.41%, thenfermentative media supplemented with apple peels 28.45%, and fermentative media supplemented with whey17.25%,whilefermentative media supplemented withdecomposed potato was recorded less rate in productivity16.86%. Finally, the study showed that *C. callunae* was the best isolated bacteria in producing glutamic acid in the fermentative medium supplemented with raw material.

المقدمة:

تعد بعض الأنواع الرمية التابعة لجنسCorynebacteriumمن الاحياء المجهرية المهمة صناعيا والمستخدمة على نطاق واسع في تطبيقات التقنيات الحيوية،اذ تميزت هذه الجراثيم بفقدانها المعقد الانزيمي (ODHC) 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Complex المسؤول عن تحويل α-Ketoglutarate إلى SuccinylCo-A مما ادى إلى تحويل المسار باتجاه تكوين حامض الكلوتاميك بعملية إضافة الامين الاختزالية بفعل انزيم (GDH) GlutamateDehydrogenase (Kimura, 2003; Abe & Takayama, 1972)،تعد جراثيم*C.glutamicum*أهم السلالات المستخدمة صناعيا لإنتاج الأحماض الأمينية بالأخص حامض الكلوتاميك، فقد تم استخدامه بصورة كلوتامات أحادية الصوديوم Mono Sodium Glutamate(MSG) كمادة محسنة لنكهة بعض الأغذية المصنعة فهي تضفي النكهة الشبيهة بنكهة اللحم وتغطي على النكهات غير المرغوب فيها كالنكهة البصلية والترابية والبقولية (Leuchtenberger, 1996; Feanema, 1984)، فهو أكثر الأحماض الأمينية المنتجة صناعيا، إذ وصلت انتاجيته في الوقت الحاضر اكثر من ١,٥ مليون طن سنويا (Hermann, 2003; Kinoshita, 1985). تم انتاج حامض الكلوتاميك بطريقة التخمر الميكروبي بعد اكتشاف الجراثيم المنتجة له من قبل الباحث Kinoshita وجماعته عام ١٩٥٧، إذ كان النوع الجرثومي *C.glutamicum* اكثرها انتاجية لهذا الحامض مقارنة بالأنواع المعزولة حينذاك (Yushiharu *et al*., 1978). تعد طريقة التخمر الميكروبي افضل الطرائق المعتمدة لإنتاج الاحماض الأمينية لكونها سهلة وغير مكلفة وتنتج كميات كبيرة من الحامض الامينيذي الشكلL-Formاماالاحماض الأمينية المنتجة من البناء الكيميائي والاستخلاص فتكون خليطاً من الشكلين L, D-Form(Su and Yamada, 1960).

المواد وطرائق العمل:

جمع العينات

جمِعَتْ ١٠٠ عينة تربة من مناطق مختلفة من محافظة نينوى متضمنة تربة زراعية، تربة منزلية، تربة ملوثةبمخلفات صناعية مثل مصانع البلاستك وترب من مناطق عامة.

وسط العزل الاولي

استخدم وسط Bouillon المحور كما ذكر في (Mahmood,1996) لعزل جراثيم *Corynebacteriumspp.* المكون من المواد الآتية (ببتون ١٠غم،خلاصة اللحم ٥غم،خلاصة الخميرة ٢ غم،كلوريد الصوديوم ٢,٥ غم،اكار٢٠ غم)،أُذيبَتْ المكونات في ١٠٠٠ سم^{٣} من الماء المقطر وتم ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط عند 7.0 وعقم الوسط بالموصدة .

وسط تحضير اللقاح الجرثومي

حُضِرَ الوسط وفق ما جاء في(Nasab *et al.*, 2010)من اذابة المكونات المبينة ادناه في ١٠٠٠سم^{٣} من الماء المقطر.

(كلوكوز٢٠غم،كبريتات المغنيسيوم المائية٠,٢٥ غم،فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين١ غم،ببتون ١٠ غم،فوسفات البوتاسيوم أُحادية الهيدروجين ١غم،كلوريد الصوديوم ٢,٥ غم،كبريتات المنغنيز المائية٠,١غم،خلاصة الخميرة ١٠ غم).

ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط عند 7.0 ثم وزع الوسط السائل في أنابيب وعقمت بالموصدة ،بعد انتهاء التعقيم أُضيفَ الكلوكوز المعقم بالبسترة بدرجة ٦٣ م° لمدة ٣٠ دقيقة إلى الأنابيب المعقمة(Prescott *et al.*,2005).

الوسط التخمري المحضرمن المواد الخام

حُضِرَ الوسط التخمري طبقا لما ذكر في(Tavakoli*et al.*, 2009) من إذابة المكونات المبينة أدناه في ١٠٠٠سم^{٣} من الماء المقطر.

(يوريا ٣ غم،كبريتات المنغنيز المائية٠,٠١غم،كبريتات الحديديك المائية٠,٠١ غم،كبريتات المغنيسيوم المائية٢,٠ غم،فوسفات البوتاسيوم أُحادية الهيدروجين٠,٠٨ غم،فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين٠,٠٨غم،بايوتين ١ مايكروغرام).

من اجل اغناء الوسط بمصدر كاربونيفقد أُضيفَ الدبس والشرس كل على حدهبعد ان تمبسترتهما بدرجة حرارة ٦٣ م° لمدة ٣٠ دقيقة إلى الوسط التخمري المعقم بمقدار ١٠%.

بالنسبة للبطاطا فقد حضرت وفق ما جاء في (Nasab *et al.*, 2010)،من أخذ درنات البطاطا وسلقها لمدة ساعة واحدة،ثم أُخِذَg50من البطاطا المسلوقة ومزجت مع حجم ٥٠سم^{٣} من الماء المقطر بنسبة ١:١ باستخدام الخلاط الكهربائي للحصول على محلول متجانس، رشح المحلول من خلالطبقات من الشاش ثم عدل الرقم الهيدروجيني لمحلول درنات البطاطا عندpH:2 لتحليل النشا

باستخدام حامض الهيدروكلوريك بتركيز واحد عياري،ترك المحلوللمدة ساعة واحدة في حمام مائي بدرجة ١٠٠م°واضيف الى الوسط التخمري بنسبة ١٠%،كما حضر محلول قشور التفاح من إذابة ٤٠g من قشور التفاح في دورق زجاجي حاوي على ٣٠٠ سم^{3} من الماء المقطر وحرك المزيج بسرعة ١٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٥ دقيقة، ثم رشح المحلول من خلال طبقات الشاش للتخلص من المواد غير الذائبة فيه واضيف الى الوسط التخمري بنسبة ١٠%، تم ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط عند 7.0ثم وزع الوسط بمقدار ١٠٠ سم^{3} في دوارق زجاجية سعة ٢٥٠ سم^{3}،أما اليوريا والبايوتين فقد عقما بالبسترة وأُضيفَا إلى الدوارق الحاوية على الوسط التخمري المعقم.

العزل والتشخيص:

أُضيفَ ١g من التربة إلى ٩ سم^{3} من المحلول الفسلجي المعقم للحصول على تخفيف 10^{-1} واستمر عمل التخافيف إلى حد تخفيف 10^{-7} ثم نقل ١سم^{3} من التخفيفين10^{-6} و 10^{-7} كل على حده إلى أطباق بتري المعقمة بمعدل مكررين من كل تخفيف وأُضيفَ الى الاطباق وسط العزل الأولي المعقم وللأخرى وسط تليوريتأگار الدم المحضر حسب ماجاء في (Frei *et al.*, 1995)،حُضِنَتْ الأطباق بدرجة حرارة ٣٠م° لمدة ٢٤-٧٢ساعة .

شُخِصَتْ العزلات الجرثومية أولا بملاحظة صفاتها المظهرية على وسط العزل الأولي من ناحية شكل المستعمرات والوانها وارتفاعها وكذلك ملاحظة قدرة اختزالها لمادة تليوريت البوتاسيوموتحليل الدم على وسط تليوريت أگار الدم، كماحُضِرَت مسحات من العزلات الجرثومية وصُبِغَتْ بصبغة گرام لملاحظة أشكال الخلايا الجرثومية وتفاعلها مع الصبغة،واجريت بعض الاختبارات الكيموحيوية منها:

اختبار فعالية إنزيم الكتاليز، فعالية إنزيم محلل اليوريا، تحلل النشا،اختزال النترات،تميع الجيلاتين، تحلل الكازائين،المثيل الأحمر،تحمل الملوحة، النمو عند الرقم الهيدروجيني6،النمو عند درجة حرارة ٤٥م°،اختبار الحركة عند درجة حرارة ٣٢م° و ٢٥م°، تحلل الاسكولين،اختبار إنتاج إنزيمات الضراوة، استهلاك السكريات منها:

Arabinose, Maltose, Mannose, Fructose, Glucose, Manitol, SucroseRribose, Galactose, Lactose, Inulin, Dextrin, Salicin, Rhamnos, Trehalose, Xylose.

اعتمادا على المصادر التالية:(Koneman *et al.*, 1997; Collee *et al.*, 1996; Lennette *et al.*, 1985; Macfaddin, 1981).

اختبار التحري عن قدرة جراثيم *Corynebacterium spp* المعزولة لإنتاجحامض الكلوتاميك من مواد خام المتمثلة بـ (الدبس، الشرش،قشور التفاح ودرنات البطاطا المتحللة)

لُقحت العزلات الجرثومية كلٌ على حده في الأنابيب الحاوية على وسط الزرع الأولي وحُضِنَتْ بدرجة حرارة ٣٠ م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة، ثم نُقل ٤% من اللقاح الجرثومي الحاوي ٦×10^8خلية /سم^3 من خلال مقارنتها مع الأنبوب الثاني لأنابيب ماكفرلاند المحضر حسب ماجاء في (Macfaddin, 1981) إلى دوارق زجاجية سعة ٢٥٠ سم^{3}والحاوية على ١٠٠ سم^3 من الأوساط التخمرية، حُضِنَتْ الدوارق في حاضنة هزازة نوع (Shaker Incubator-Labnet) بدرجة ٣٠ م° لمدة٢٤- ٩٦ ساعة عند سرعة دوران ١٨٠ دورة/دقيقة، تم قياس الامتصاصية الضوئية للاوساط التخمرية بعد كل ٢٤ ساعة باستخدام جهاز المطياف الضوئي نوع (Spectronic 21-Gallenkamp) عند الطول الموجي 600nm، تم تصفير الجهاز باستخدام Blank الحاوي على الوسط التخمري غير الملقح.

الكشف عن الحامض الأميني Glutamic acid

فصل الراشح من الاوساط التخمرية بجهاز الطرد المركزي نوع (Spectra Fuge-Labnet) عند سرعة دوران 8000دورة/دقيقةلمدة ١٥ دقيقة وفق ما جاء في (Nasab *et al.*, 2010)، بعد ذلك أُخِذَ الراشح وأجريت عليه عمليات الكشف الكمي والنوعي لحامض الكلوتاميك باستخدام الطرائق المذكورة في أدناه.

الكشف الكمي عن حامض الكلوتاميك بطريقة النينهيدرين.

أُتبِعَتْ هذه الطريقة وفق ما جاء في (Lawal *et al.*, 2010) للتقدير الكمي لحامض الكلوتاميك في رواشح مزارع الإنتاج، من خلالمزج 500 µL من راشح المزرعةمع حجم مساو له من كاشف النينهيدرين المحضر وفقا لما ذكر في(Spies,1957) في أنابيب زجاجية وتُرِكَتْ الأنابيب في حمام مائي نوع (Waterbath, Julbo-Sw23) بدرجة ١٠٠ م° لمدة ٥ دقائق، ثم قُرِئَتْ الامتصاصية الضوئية للمحاليل بجهاز المطياف الضوئي نوع (Spectronic–Gallenkamp) عند طول موجي 570nm، بالرجوع إلى المنحني القياسي المحُضَّرْ من تراكيزمختلفة تراوحت من g/L (٠,٠٢٠-٠,٣٨) من حامض الكلوتاميك القياسي بتركيز 0.4g/L،تم تقدير كمية حامض الكلوتاميك في راشح مزارع الإنتاج مقدراً بكمية (g/L).

الكشف النوعي بطريقة تقنية الكروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة

ThinLayer Gromatography Techinique (TLC)

استخدمتْ هذه التقنية للكشف النوعي عن الحامض الأميني المنتجمن خلال تحديد مواقع البقع المفصولة ومقارنتها مع البقعة المفصولة من الحامض الأميني القياسي المراد الكشف عنهحسب طريقة (Shaik *et al.*, 2011)، باستخدام صفائح كروماتوكرافيا من نوع

Silica Gel ذات الأبعاد 20×20 سم (Merck, Germany)، إذ تم تنشيطها في الفرن عند درجة حرارة ١٠٠م لمدة ٣٠ دقيقة،حُملت عينات رواشح مزارع الانتاج مع العينة القياسية لحامض الكلوتاميك على الصفائحباستخدام أنابيب شعرية إذ كانت المسافة بين مواقع تحميل العينات ١سم مع ترك مسافة ١سم على جانبي الصفيحة،أُعيد تحميلها على الصفيحة بواقع ١٠ مرات لكل عينة،تُركت الصفيحة لحين جفاف العينات،بعد ذلك نُقلت الصفيحة بعناية إلى حوض الفصل الحاوي على محلولالفصلالمكون من(N-butanol: Acetic acid: D.W.) بنسبة٢٠:٣٠:٥٠على التوالي والمضاف اليه النينهيدرين بمقدار٠,٤% كما ذكر في(Yusheng*et al*., 2010) مع مراعاة أن يكون مستوى المحلول ملامساً لخط البداية الذي حملت عليه العينات، بعد ذلك وضع غطاء الحاوية وتركت الصفيحة بدرجة حرارة الغرفة لحين اكتمال جريان محلول الفصل إلى الطرف الاخر والذي استغرق ١٠ ساعات، رفعت الصفيحة من الحاوية وتركت لحين جفافها وظهور مواقع البقع المفصولةبشكل واضح ثم حددت مواقع البقع المفصولة من عينات رواشح مزارع الانتاج والبقعة المفصولة من العينة القياسية وتم حساب معدل مسافة الجريان(flowRate(R_f لجميع البقع المفصولة وفق المعادلة الآتية:

$$R_f = \frac{\text{المسافة التي يقطعها الحامض الاميني}}{\text{المسافة التي يقطعها المذيب}}$$

التشخيص والتنقية باستخدام تقنية كروماتوكرافيا السائل العالي الكفاءة.

High -Performance Liquid Chromatography (HPLC)

استخدمت تقنية HPLC في التشخيص والتنقية،المُجَهَزْ من شركة(LC-2010-HT-Liquid-Chromatography-Shimadzu) وباستخدام عمود الفصل من نوع (C-18)،بالاعتماد على الطريقة المذكورة من قبل (Graser *et al*., 1985) ، تم ترسيب البروتين في رواشح مزارع الانتاج بإضافة١سم^{3}من حامض Trichloro acitic acid بتركيز ١٢% إلى ١ سم^3 من الراشح ثم أُجري الطرد المركزي للمحلول عند سرعة ٨٠٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة. حُضِرَتْ مشتقات الاحماض الأمينية باضافة ٥ سم^3 من رائق المزرعةإلى٢٠٠ مايكروليتر من الميثانول ثم أُضيفَ للمزيج ٢٠٠ مايكروليتر من دارئ بورات الصوديوم بتركيز ١ عياري وبرقم هيدروجيني ٩,٥ المحضروفق ماذكر في (Perrin, 1974)وأضيفَ ٥٠ مايكروليتر من كاشف OPA وترك المحلول لمدة ٢,٥ دقيقة بعدها أُضيفَ ٢٠٠ مايكروليتر من دارئ فوسفات الصوديومبتركيزmM ١٢,٥ وبرقم هيدروجيني ٧,٢ المحضر حسب ماجاء في(Perrin, 1974)، حُقنَ ١٠ مايكروليتر من المحاليل المحُضَرَة في اعلاه كل على حده في جهاز HPLC،وأستُعمِلَ الطور المتحرك Mobile phase في الفصل بهذه التقنية والمكون من دارئ فوسفات الصوديومبتركيز ١٢,٥ mM

وبرقم هيدروجيني ٧,٢واسيتونايتريل بنسبة حجمية (٣:٩٧) ، بعد أنْ تم ترشيحه وطرد الغـــازات منه باستخدام جهاز الدورات فوق الصـــوتية (Sonicato) واعتمـــد علـــى معـــدل الجريـــان 0.9 سم^{٣}/دقيقة وطول موجي (٢٠٨)، تمت مقارنة زمن الاحتبـــاس Retention time (Rt) للعينـــات المعاملة مسبقا مع زمن الاحتباس لحامض الكلوتاميك القياسي، أُجريَتْ القياسات في مختبر الكيمياء الفيزياوية/قسم الكيمياء/كلية العلوم /جامعة لموصل.

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص:

شُخِصَتْ انواع جراثيم *Corynebacterium spp*المعزولةمن التربة والنامية على وسط العزل الأولي بالاعتماد على صفاتها المظهرية من ناحية الشكل المستعمرات وألوانها وقدرتها على اختزال تليوريت البوتاسيوم وتحليل الدم، فضلا عن ذلك الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول (1)، اعتماداً على(Koneman *et al*., 1997; Holt *et al*, 1994; Macfaddin, 1981Leibl, 2006;). اظهرت جراثيم *spp.Corynebacterium* أعلى نسبة عزل من المجموع الكلي للعزلات الجرثومية ،لتواجدها بشكل طبيعي في بيئات مختلفة (Liebl, 1992)، تبين أنّ أعلى نسبة لعزلها كانت من الترب الملوثة بمخلفات مصانع البلاستيك إذ بلغت ٦١,٩% من مجموع جراثيم Corynebacterium المعزولة كما موضح في الجدول (2)، لقدرتها على استهلاك مركبات عديدة منها بعض المركبات الاروماتية والاحماض العضوية والمذيبات كمصدر للطاقة والكاربون، يعود التنوع في المغذيات المتوفرة لهذه الجراثيم لامتلاكها مجموعة من البروتينات المنظمة ما يقارب ١٢٧ بروتيناً والتي تكون مسيطرة على العمليات الايضية (Sung *et al*., 2006)،في حين كانت نسبة عزلها من الترب المزروعة بالبطاطا والبصل ٢٣% وخاصة من الترب المحيطة بدرنات البطاطا و جذور البصل، من الجديربالذكر أن المنطقة المحيطة بالجذور المسماة بالرايزوسفير غنية بافرازات الجذور المتمثلة بالكاربوهيدرات منها الكلوكوز والفركتوز والسكروز فضلا عنذلك الانزيمات والاحماض الامينية والاملاح المعدنية ومركبات أخرى متمثلة بالبايوتين والثيامين وهي من العوامل المشجعة لنمو الجراثيم كما أنّ هذه المنطقة غنية بخلايا الانسجة الميتة والمنسلخة من الجذور التي تعد مصدراً كبيراً للمواد العضوية التي تتغذى عليها الاحياء المجهرية المتباينة التغذية (قاسم و علي، ١٩٨٩) ،كما بينت النتائج أنّ أقل نسبة لعزل جراثيم*Corynebacteriumspp* كانت من الترب المتواجدة في المناطق العامة إذ بلغت ١٤%من مجموع جراثيم Corynebacterium وامكن عزل النوع الجرثومي*C. Kutscheri* من هذه الترب فهي تتواجد بشكل طبيعي في التربة أذ يمكنها إصابة الفئران والجرذان(Amao *et al*., 1995).

الجدول (١) الخصوصات الكيموحيوية لجراثيم *Corynebacterium spp* المعزولة من التربة

الاختبارات / العزلات	*C.xerosis*	*C.callunae*	*C.kutscheri*	*C.vitarumen*	*C.flavescens*	*C.casei*
الحركة	-	-	-	-	-	-
الكتاليز	+	+	+	+	+	+
اختزال النترات	+	-	+	+	-	+
تحلل النشا	-	-	+	-	-	-
اليوريز	-	+	+	+	-	-
اسالة الجيلاتين	-	-	-	-	-	-
المثيل الاحمر	-	-	-	-	-	-
تحلل الكازائين	-	-	-	-	-	-
تحلل الاسكولين	-	-	-	-	-	-
استهلاك السكريات: الكلوكوز	+	+	+	+	+	+
استهلاك السكريات: الفركتوز	+	+	+	+	+	+
استهلاك السكريات: السكروز	+	+	+	+	-	-
استهلاك السكريات: المانوز	-	+	-	-	-	-
استهلاك السكريات: المالتوز	+	+	+	-	-	-
استهلاك السكريات: ارابنوز	-	-	-	-	-	-
استهلاك السكريات: لاكتوز	-	-	-	-	-	-
استهلاك السكريات: مانتول	-	-	-	-	-	-
استهلاك السكريات: كلاكتوز	-	-	-	-	+	-
استهلاك السكريات: زايلوز	-	-	-	-	-	-
استهلاك السكريات: سالسين	+	+	+	+	-	-
استهلاك السكريات: دكسترين	-	-	-	-	-	-
استهلاك السكريات: تريهالوز	-	+	-	+	-	-
استهلاك السكريات: رايبوز	-	-	-	-	-	-
استهلاك السكريات: رامنوز	-	-	-	-	-	-
استهلاك السكريات: inuline	-	-	-	-	-	-
الدورة العصوية-الكروية	-	-	-	-	-	-
النمو عند pH :٦	+	+	+	+	+	+
النمو بدرجة حرارة 45°م	+	-	+	+	-	+
تحمل الملوحة بتركيز ٥%	+	+	+	+	+	+
Protease	-	-	-	-	-	-
Lipase	-	-	-	-	-	-
Listhinase	-	-	-	-	-	-
تحلل الدم	-	-	-	-	-	-

(+) نتيجة موجبة ، (-) نتيجة سالبة

الجدول (٢) النسب المئوية لأنواع *Corynebacterium spp.* المعزولة من الترب المختلفة.

نوع التربة	النوع الجرثومي	عدد العزلات	النسبة المئوية
تربة عامة	*C. kutscheri*	١	٪١٤
	C. casei	٢	
تربة زراعية	*C. xerosis*	٢	٪٢٣
	C. casei	٣	
تربة ملوثة بمخلفات مصانع البلاستك	*C. callunae*	٤	٪٦١,٩
	C. kutscheri	٢	
	C. vitarumen	٣	
	C. flavescens	٤	

التحري عن قابلية جراثيم Corynebacterium لاستهلاك المواد الخام كبدائل عن المصدر الكاربوني في انتاج حامض الكلوتاميك.

تم في هذا الاختبار قياس الامتصاصية الضوئية Optical Density للوسط وكمية الحامض الأميني المنتج كل ٢٤ ساعة من وقت اجراء التجربة في الاوساط التخمرية الحاوية على احدى مواد الخام المتمثلة بـ(الدبس،قشور التفاح ،درنات البطاطا المتحللة والشرش) من قبل جراثيم Corynebacterium. تبين أنّ معظم العزلات الجرثومية تمكنت من النمو وانتاج حامض الكلوتاميك نتيجة لقدرتها في استهلاك المواد الخام المستخدمة كمصدر للكاربون والطاقة، كما لوحظ زيادة كمية الحامض الاميني في جميع الاوساط التخمرية تدريجيا مع مرور الفترة التحضينية،اذ كانت مترافقة مع زيادة الكثافة الخلوية للجراثيم وبلغت الانتاجية حدها الاقصى بعد مرور ٧٢ ساعة أو ٩٦ ساعة، فقد سجلت جراثيم *Corynebacteriumspp* النامية في الوسط التخمري المضاف اليه قشور التفاح بنسبة ١٠% اعلى امتصاصية ضوئية بعد مرور ٧٢ ساعة اذ بلغ معدلها ٠,٧٥ ،واعطت غالبيتها اعلىكمية من الحامض الاميني بعد مرور ٩٦ ساعة من بدء الفترة التحضينية ماعدا الانواع الجرثومية *C.xerosisC.casei,C.kutscheri*,اذ بلغت انتاجيتهاg/L(2.84,1.32,1.80)على التوالي كما موضح في الجدول (٣)،يمكن تعليل ذلك إلى اختلاف الفترة الزمنية المثلى للإنتاج الاقصى من الحامض الاميني بين الجراثيم المنتجة له، إذ أنّ الانتاجية القصوى لحامض الكلوتاميك تتحقق بعد بلوغ الكتلة الحيوية طور الثبات العددي (Jyothi *et al.*, 2005; Bona and Moser, 1997) بينما سجلت غالبية جراثيم *Corynebacteriumspp*النامية في الوسط التخمري المضاف اليه الشرش بنسبة ١٠% اعلى امتصاصية ضوئية بعد مرور72 ساعة،ماعدا الانواعالجرثومية *C.callunae,C. xerosis,C. flavescens* اذ سجلت اعلى امتصاصية ضوئية لها بعد مرور ٤٨ ساعة اذ بلغت ٠,٨٩،٠,٥٩،٠,٤٥ على التوالي وأعطتأعلى انتاجية لها بعد مرور٧٢ ساعة من وقت اجراء التجربة، بينما حققت الانواع الجرثومية الاخرى اعلى انتاجية من الحامض الأميني في اليوم الرابع كما موضح في الجدول (٤). حققت بعضجراثيم *Corynebacterium spp*النامية في الوسط التخمري المضاف اليه درنات البطاطا المتحللة بنسبة ١٠%،اعلى امتصاصية ضوئية بعد مرور ٤٨ ساعةمن الفترة التحضينية منها*C. kutscheriC. casei , C.flavescens*,إذ بلغت 0.48,0.74,0.56على التوالي كما موضح في الجدول (٥)،بينما بقية العزلات الجرثومية سجلت اعلى امتصاصية بعد مرور٧٢ساعة،وأعطت معظمها أعلى كمية من الحامض الأميني في اليوم الرابع إذ بلغ معدل كميته g/L 1.28. فضلا عن ذلك سجلت غالبية جراثيم *Corynebacteriumspp* النامية في الوسط التخمري المضاف اليه الدبس بنسبة ١٠% اعلى امتصاصية ضوئية بعد مرور ٧٢ ساعة،كما حققت اعلى انتاجية بعد مرور ٩٦ ساعة من بدء

التجربة كماموضح في الجدول (٦)،ماعدا النوع الجرثومي*C. flavescens* إذ كانت انتاجيتها أعلى بقليل في اليوم الثالث وبلغت 1.84 g/L مقارنة باليوم الرابع التي بلغت 1.78 g/L، قد يعود سبب ذلك إلى دخول الخلايا الجرثومية طور الثبات العددي بعد مرور ٤٨ ساعة من بدء الفترة التحضينية بدلالة امتصاصيتها الضوئية بلغت حدها الاقصى عند هذه الفترة التحضينية وحققت الانتاجية القصوى بعد مرور ٧٢ ساعة من بدء التجربة، يمكن تعليل سبب الانتاجية العالية في الوسط التخمري الحاوي على الدبس لاحتوائه على نسبة عالية من السكريات ومنها الكلوكوز والفركتوز إذ بلغت نسبتها ٣٦,٥%، ٢٧,٩% على التوالي بالإضافة إلى احتوائه الاملاح المعدنية ومنها البوتاسيوم والكالسيوم والمغنيسيوم بنسبة ٢٢%، جميع هذه المكونات شجعت نمو وتكاثر الجراثيم وانتاجها للحامض الاميني. كانت هذه النتائج مقاربة لما توصل إليه الباحث Vijayalakshmi and Savamangala عام ٢٠١١ عند استخدام نوع من الفاكهة كمادة خام لإنتاج حامض الكلوتاميك إذ سُجِلَ أعلى انتاجية بعد مرور ٧٢ ساعة من الفترة الزمنية لتلقيح الوسط التخمري بجراثيم*Arthrobacter globiformis*،فضلا عن ذلك كانت النتائج متفقة مع ما توصل إليه الباحث Jyothi وجماعته عام ٢٠٠٥ من خلال دراسة الظروف المثلى لإنتاج حامض الكلوتاميك من المواد الخام المتبقية من جذور نبات الكاسافا المستخدم في صناعة النشا باستخدام النوع الجرثومي*Brevibacterium divaricatum*إذ بلغت الانتاجية القصوى من حامض الكلوتاميك بعد مرور ٧٢ ساعة من الفترة التحضينية التي كانت 4mg/ml في حين كان نموها الامثل عند ٤٨ ساعة، كذلككانت النتائج مطابقة لما توصل إليه الباحث Yugandhar وجماعته عام ٢٠١٠بأنالفترة الزمنية المثلى للإنتاج الاقصى من حامض الكلوتاميك كانت بعد مرور ٩٦ ساعة.

الجدول رقم (٣)حامض الكلوماتيك بمقدار (g/L) والامتصاصية الضوئية للوسط التخمري المضاف إليه قشور التفاح الاحمر.

الفترة التحضينية / العزلات الجرثومية	٢٤ساعة		٤٨ ساعة		٧٢ ساعة		٩٦ ساعة	
	الامتصاصية الضوئية nm	كمية الحامض الاميني g/ L	الامتصاصية الضوئية nm	كمية الحامض الاميني g/ L	الامتصاصية الضوئية nm	كمية الحامض الاميني g/ L	الامتصاصية الضوئية nm	كمية الحامض الاميني g/ L
C. callunae	٠,٢٤	٠,٢٤	٠,٦٥	١,٤٠	٠,٦٤	١,٨٠	٠,٤٠	٣,٥٠
C. vitarumen	٠,٢٩	٠,٣٢	٠,٥٩	١,٥٨	١,٠٩	٢,٠٠	١,٠١	٢,٣٨
C. casei	٠,٣٠	٠,٣٦	٠,٦٨	١,٣٤	٠,٥٢	٢,٨٤	٠,٤٤	١,٧٠
C. kutscheri	٠,١٧	٠,١٨	٠,٨٢	٠,١٧	٠,٨٧	١,٣٢	٠,٨٨	١,٢٦
C. xerosis	٠,٣٣	٠,٦٣	٠,٧٣	٠,٩٤	0.84	١,٨٠	٠,٦٩	١,٦٤
C. flavescens	٠,٢٦	٠,٢٧	٠,٥٥	٠,٧٤	٠,٥٩	٢,٠٨	٠,٤٦	٢,٥٠
المعدل	0.29	0.33	0.67	1.02	0.75	1.97	0.64	2.16

الجدول رقم (٤) كمية حامض الكلوماتيك بمقدار (g/L) والامتصاصية الضوئية للوسط التخمري المضاف إليه الشرش

الفترة التحضينية / العزلات الجرثومية	٢٤ ساعة		٤٨ ساعة		٧٢ ساعة		٩٦ ساعة	
	الامتصاصية الضوئية nm	كمية الحامض الاميني g/ L	الامتصاصية الضوئية nm	كمية الحامض الاميني g/ L	الامتصاصية الضوئية nm	كمية الحامض الاميني g/ L	الامتصاصية الضوئية nm	كمية الحامض الاميني g/ L
C. callunae	٠,٢١	٠,٣٢	٠,٤٥	٠,٩٠	٠,٣٨	١,٦٢	٠,٣٨	١,٥٨
C. vitarumen	٠,٣٥	٠,٣٠	٠,٤٧	٠,٧٦	٠,٧٧	١,١٠	٠,٤٥	١,٥٧
C. casei	٠,٣٣	٠,٣٢	٠,٦٢	٠,٩٤	٠,٧٠	٠,٨٠	٠,٦٥	١,١٩
C. kutscheri	٠,٢٤	٠,٢٦	٠,٥٣	١,٢٤	٠,٥٥	١,٣٤	٠,٨٩	١,٣٤
C. xerosis	٠,٣٦	٠,٣٨	٠,٥٩	١,٣٢	٠,٢٧	١,٩٨	٠,٢٣	١,١٨
C. flavescens	٠,٤١	٠,٢٥	٠,٨٩	١,٠٦	٠,٨٤	١,٢٠	٠,٧٩	١,٠٤
المعدل	0.31	0.30	0.59	0.60	0.58	1.34	0.56	1.31

الجدول رقم (٥)كمية حامض الكلوماتيك بمقدار (g/L) والامتصاصية الضوئية للوسط التخمري المضاف إليه درنات البطاطا المتحللة.

الفترةالتحضينية / العزلات الجرثومية	٢٤ ساعة		٤٨ ساعة		٧٢ ساعة		٩٦ ساعة	
	الامتصاصية الضوئية nm	كمية الحامض الاميني g/L	الامتصاصية الضوئية nm	كمية الحامض الاميني g/L	الامتصاصية الضوئية nm	كمية الحامض الاميني g/L	الامتصاصية الضوئية nm	كمية الحامض الاميني g/L
C. callunae	٠,٣٥	٠,١٦	٠,٤٧	٠,٤٨	٠,٦٤	٠,٨٠	٠,٤٠	٢,٣٢
C. vitarumen	٠,٣٩	٠,١٦	٠,٧٥	٠,١٠	٠,٨٤	٠,٢٨	٠,٨٤	٠,٧٨
C. casei	٠,٢٧	٠,١٥	٠,٤٨	٠,١٢	٠,٤٥	٠,١٧	٠,٢٦	٠,٧٢
C. kutscheri	٠,٣٦	٠,١٦	٠,٥٦	٠,٦٨	٠,٥٠	٠,٧٦	٠,٣٨	١,٤٠
C. xerosis	٠,٢٢	٠,٠٨	٠,٤١	٠,٢٦	٠,٤٢	٠,٥٨	٠,٢١	١,٠٠
C. flavescens	٠,٢٢	٠,١٤	٠,٧٤	٠,٤٧	.72	٠,٦٤	٠,٧٩	١,٤٦
المعدل	0.30	0.14	0.56	0.35	0.59	0.53	0.48	1.28

الجدول رقم (٦)كمية حامض الكلوتاميك بمقدار (g/L) والامتصاصية الضوئية للوسط التخمري المضاف إليه الدبس.

الفترة التحضينية / العزلات الجرثومية	٢٤ساعة		٤٨ ساعة		٧٢ ساعة		٩٦ ساعة	
	الامتصاصية الضوئية nm	كمية الحامض الاميني g/L	الامتصاصية الضوئية nm	كمية الحامض الاميني g/L	الامتصاصية الضوئية nm	كمية الحامض الاميني g/L	الامتصاصية الضوئية nm	كمية الحامض الاميني g/L
C. callunae	٠,٣٠	٠,٣٧	٠,٥١	٠,٨٨	٠,٦٨	٢,٤٦	٠,٦٨	٣,٨٠

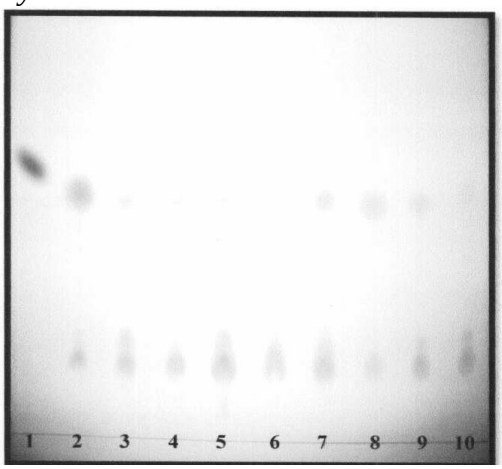
C. vitarumen	٠,٣٩	٠,٣٤	٠,٧٢	٠,٩٢	٠,٧٨	١,٤٢	٠,٦٩	٣,١٦
C. casei	٠,٢٩	٠,٢٥	٠,٥٨	١,٠٨	٠,٧٨	١,٤٢	٠,٧٦	٣,٧٤
C. kutscheri	٠,٢٥	٠,٣٢	٠,٥٦	١,١٩	٠,٧٧	١,١٨	٠,٧٤	٣,٦٠
C. xerosis	٠,٢٨	٠,٣٠	٠,٤٠	٠,٧٤	٠,٤٢	٠,٧٨	٠,٤١	٠,٩٦
C. flavescens	٠,٢٠	٠,٣٢	٠,٣٤	١,٣٦	٠,٣٢	١,٨٤	٠,٢٥	١,٧٨
المعدل	0.28	0.31	0.51	0.72	0.62	1.51	0.58	2.84

الكشف النوعي عن حامض الكلوتاميك المنتج في الاوساط التخمرية المضاف إليها احدى المواد الخام (الدبس، قشور التفاح،درنات البطاطا المتحللة والشرش).

تم الكشف عن الحامض الاميني المنتج في جميع الاوساط التخمرية بالاعتماد على تقنية صفائح الكروماتوكرافيا TLC، من خلال تحديد البقع المفصولة من عينات رواشح مزارع الانتاج ومقارنتها مع البقعة المفصولة من العينة القياسية لحامض الكلوتاميك. تبين أنّ جميع العينات أعطت بقعة رئيسة واضحة قريبة من عينة حامض الكلوتاميك القياسية،وأتضح أنّ معدل مسافة الجريان Rf للبقع المفصولة جميعها من عينات رواشح مزارع الانتاج كانت مقاربة لقيمة الـ Rf للعينة القياسية، فقد كانت قيمة الـ Rf للعينة القياسية (٠,٤١) وبالمقارنة فإنّ جميع العينات أعطت قيمة Rf قريبة من ذلك والتي انحصرت ما بين (٠,٤١-٠,٤٢) كما موضح في الصور(١،٢،٣،٤).

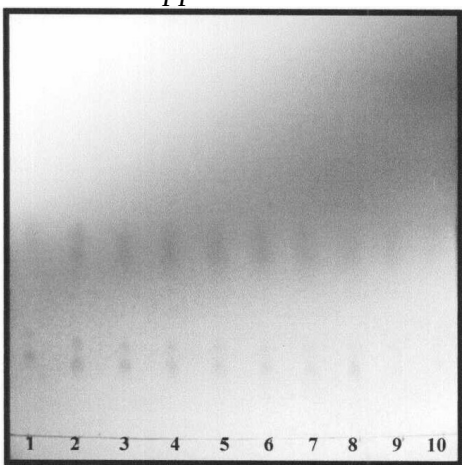
الصورة (١) البقع المفصولة من رواشح مزارع الانتاج للعزلات الجرثومية النامية على الوسط التخمري المضاف إليه قشور التفاح الاحمر بنسبة ١٠%

1-العينة القياسية لحامض الكلوتاميك 2- *Arthrobacter spp.*
3-*Corynebacterium callunae*
4- *Corynebacteriumvitarumen* 5- *Brevibacterium avium* 6- *Brevibacterium linens*
7- *Corynebacteriumflavescens*
8-*Corynebacteriumkutscheri*
9-*Corynebacteriumcasei*
10-*Corynebacterium xerosis*



الصورة(٢) البقع المفصولة من رواشح مزارع الانتاج للعزلات الجرثومية النامية على الوسط التخمري المضاف إليه الشرش بنسبة ١٠%

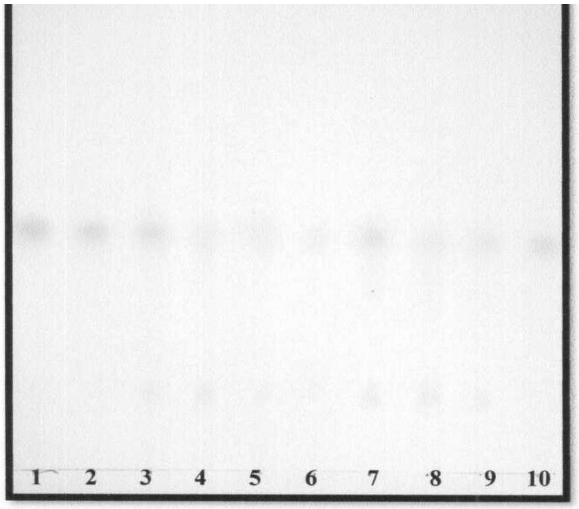
1- *Corynebacterium vitarumen*
2- *Brevibacterium linens* 3-*Corynebacterium kutscheri* 4- *Corynebacterium callunae*
5- *Arthrobacter spp.* 6- *Corynebacterium casei*
7- *Brevibacterium avium*
8- *Corynebacterium flavescens*
9- *Corynebacterium xerosis*
10- *Microbacteriumspp.*



الصورة (٣) البقعة المفصولة من رواشح مزارع الانتاج للعزلات الجرثومية النامية على الوسط التخمري المضاف إليه محلول درنات البطاطا بنسبة ١٠%

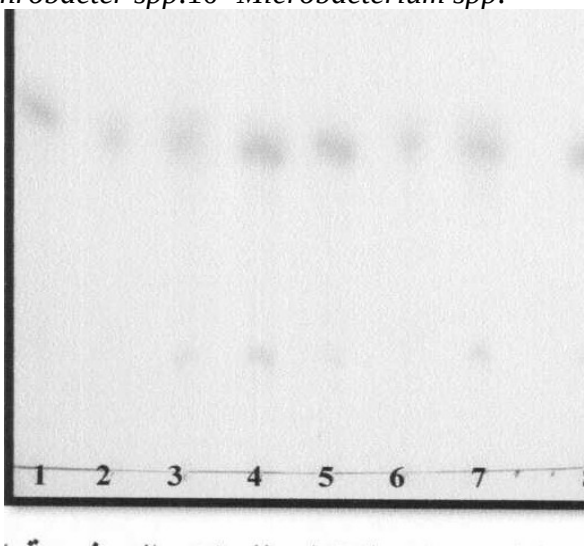
1- *Corynebacterium callunae*
2- *Corynebacterium kutscheri*
3- *Corynebacterium flavescens*4- *Arthrobacter spp.* 5-*Corynebacterium xerosis*6- *Microbacterium spp.*7- *Brevibacterium linens* 8- *Corynebacterium casei* 9- *Brevibacterium avium.*10- *Corynebacterium vitarumen*

.



الصورة (٤) البقع المفصولة من رواشح مزارع الانتاج للعزلات الجرثومية النامية على الوسط التخمري المضاف إليه الدبس بنسبة ١٠%

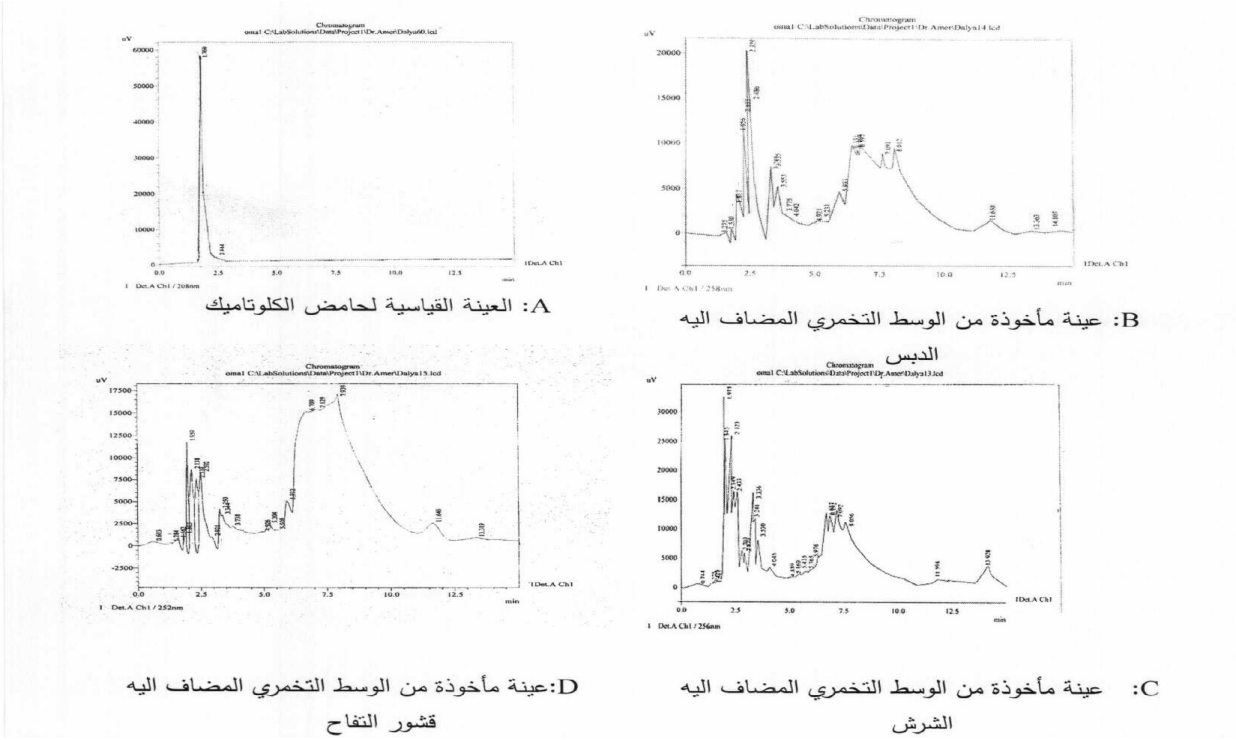
1- *Brevibacterium linens*2-*Corynebacterium kutscheri*3- *Corynebacterium vitarumen*4- *Corynebacterium callunae* 5- *Corynebacterium casei*6- *Corynebacterium xerosis*7- *Brevibacterium avium* 8- *Corynebacterium flavescens*9- *Arthrobacter spp.*10- *Microbacterium spp.*



نتائج قياس نسبة حامض الكلوتاميك باستخدام جهاز (HPLC)

تمت مقارنة زمن احتباس Retention time للعينات المأخوذة من رواشح الوسط التخمري مع زمن احتباس العينة القياسية لحامض الكلوتاميك والتي أعطت قمة امتصاص عظمى عند زمن احتباس (١,٧٦٠) دقيقة وكانت قيمة المساحة تحت المنحني لها (١٧٣٠٨٧٢) والنسبة المئوية للمساحة تحت المنحني (١٦,٢٩٢)%. اما العينات المأخوذة من رواشح الاوساط التخمرية فقد أعطت قمم امتصاص عظمى عند زمن احتباس مقارب لزمن الاحتباس العينة القياسية لحامض الكلوتاميك الا ان المساحة تحت المنحني قد اختلفت وهذا مؤشر على اختلاف التراكيز المنتجة من حامض الكلوتاميك. فقد اعطتالعينة المأخوذة من الوسط التخمري المضاف اليه قشور التفاح قمة امتصاص عظمى عند زمن احتباس (١,٨٠٣) دقيقة وبلغت قيمة مساحة تحت المنحني (١٦٦٤١) والنسبة المئوية للمساحة تحت المنحني (٠,٣٤٢)%،كما اعطت العينة المأخوذة من الوسط التخمري المضاف اليه الدبس بنسبة ١٠% قمة امتصاص عظمى عند زمن احتباس (١,٨١٧) دقيقة وبلغت قيمة مساحة تحت المنحني (٢٨٥١٧) والنسبة المئوية للمساحة تحت المنحني (٠,٨٨٠)%، بينما كانت قمة الامتصاص العظمى عند زمن احتباس (١,٨٤٥) للعينة المأخوذة من الوسط التخمري المضاف اليه الشرش بنسبة ١٠%، وقيمة مساحة تحت المنحني (١٦٤١٦٠) والنسبة المئوية للمساحة تحت المنحني

(٤,١٧٣)%، واعطت العينة التي تعود إلى الوسط التخمري المضاف إليه درنات البطاطا المتحللةقمةامتصاص عظمى عند زمن احتباس (١,٧٣٤) دقيقة وكانت قيمة مساحة تحت المنحني (١٤٥٦٧) والنسبة المئوية للمساحة تحت المنحني (٠,٠٦٦)%. وقد تعود القيم الاخرى للمساحة تحت المنحني للمواد المستخدمة في اشتقاق الاحماض الامينية أو تعود لبعض المركبات والاحماض الامينية المنتجة من قبل الجراثيم في الاوساط التخمرية، فقد لوحظ امكانية انتاج مركبات احماض امينية وبكميات قليلة في الاوساط التخمرية المستخدمة لإنتاج حامض الكلوتاميك (Jyothi *et al.*, 2005)



A: العينة القياسية لحامض الكلوتاميك

B: عينة مأخوذة من الوسط التخمري المضاف اليه الدبس

C: عينة مأخوذة من الوسط التخمري المضاف اليه الشرش

D:عينة مأخوذة من الوسط التخمري المضاف اليه قشور التفاح

الشكل رقم (١)

زمن الاحتباس بالدقيقة المقاس بجهاز الـHPLCللعينات المأخوذة من الاوساط التخمرية

المصادر العربية والانكليزية

قاسم، غياث محمد و علي، مضر عبد الستار. (١٩٨٩). علم احياء التربة المجهرية، دار الكتب للطباعة والنشر، شارع ابن الاثير، الموصل.

Abe, S.and Takayama, K. (1972). Amino Acid Producing Microorganism: Variety and Classification. In:Yamada, K.; Kinoshita, S.; Tsunoda, T. and Aida,K . " The Microbial Production of Amino Acid ", John Wiely & Sons ,Inc.,New York : 3-38.

Amao, H.; Kanamoto, T.; sawada,Y.; Saito, M. and Sugiyama, M. (1995). Pathogenicity of *Corynebactereium kutscheri* in the syrian hamester. J. Vet. Sci., 57:715-719.

Atlas, R. M.(1995a) . " Principle of Microbiology ". 1st ed., Mosby Year book, Inc.: 30- 42.

Bona, R and Moser, A.(1997). Modeling L-glutamic acid production with *Corynebacterium glutamicum* under biotin limitation. Act .Biotechnol ., 17:327-337.

Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmon, A. (1996)."Partial Medical Microbiology".14th ed., Chruchill Livingstone, Inc., New York.

Feanema, L.(1984)." Food Chemistry".Blak well scientific publishers,New York.

Frei, T.; Heuck, C.C.; Riesen, W.; Mang, H.; Hill, P. G.; Nageh, M. M and Poller, L. (1995). "Production of Basic Diagenostic Lablotary Reagent". WHO, Eygept.

Graser, T. A.; Godel, H.G.; Foldi, S.A. P. and Forst, D. (1985). An ultra-rapid and sensitive High-Performance Liquid Chromatographic method for determination of tissue and plasma free amino acids. Analytical Biochemistry., 151: 142-152.

Hermann, T. (2003). Industrial production of amino acid by coryneform bacteria. J. Biotechnol., 104: 155-172.

Holt, J. H.; Krieg, N.R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T. and William, S. T.(1994). "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 9th ed ., Williams and Wilkins, Baltamore, USA.

Jyothi, A. N.; Saskiran, K.; Nambisan, B. and Balagopalan, C.(2005). Optimization of glutamic acid production from cassava starch factory residues using *Brevibacterium divaricatum*. Process biochemistry., 40:3576-3579.

Kimura, E.(2003). Metabolic engineering of glutamate production.J.Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 79: 37-58.

Kinoshita, S. (1985). Glutamic Acid Bacteria. In: Demain, A.L. and Solomon, N.A. " Biology of Industrial Microorganisms". Benjamin/ Cummins, London, UK: 115-142.

Kinoshita, S.; Udaka, S. and Shimmono, M.(1957). Studies on the amino acidfermentation. PartI. Production ofL-glutamic acid by various microorganisms. J. Gen. Appl. Microbiol., 3: 193-205.

Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M .; Schreckenberger, P.C. and Winn,W.C. (1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology".6thed., LippincottRaven Publisher,Philadelphia, USA.

Lawal, A.K.; Oso, B.A.; Sanni, A.I. and Olatunji, O.O. (2010). L-Glutamic acid production by *Bacillus spp* . isolated from vegetable protein .African .J. Biotechnol.,10(27):5337-5345.

Lennette, E.H.; Balow, A.; Hasler, W.J. and Sandom, H.J. (1985). "Manual of Clinical Microbiology ". 4th ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C.

Leuchtenberger, W.(1996). Amino Acid–Technical Production and Use. In: Rehm, H.J.; Reed, G.; Pühler, A and stadler, P."Biotechnology."2nded., Wiley/VCH,Weinheim, Germany: 465–502.

Liebl, W.(1992). The Genus Corynebacterium: non-medical. In: Balows, A.; Trüper, H. G.; Dworkin, M.; Harder, W. and schleifer, K. H. "The Prokaryotes". 2nded., Springer, Verlag, New York :1157- 1171.

Liebl,W.(2006).Corynebacterium- non medical. In: Dworkin, M.; Falkon, S.; Rosenberg,E.;Schleifer, K. and Stackebrandt, E." Prokaryotes" . Handbook on the Biology of Bacteria.3th ed., Springer, New York : 796–818

Macfaddin, J.F.M. (1981). "Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria". William and Wilkins, Inc., Baltimore, USA.

Mahmood, Z. A. (1996). Production of L-lysine through fermentation.Thesis of , Department of Pharmaceutics, University of Karachi, Pakistan:1-192.

Mateos, S.L.M. ;Efren, O.;Michal, L.andJose, A.G (2006). *Corynebacteriumglutamicum* as amodel bacterium for the bioremidation of arsenic. Int. Microbiol., 3: 207-215.

Nasab, M.; Izadi, M. and Hosseinpour, S. (2010). Glutamic acid production from potato by *Brevibacterium linens*. W.A. Sci. Eng.Technol., 86: 1245-1247.

Perrin, D.D.(1974). "Buffer of PH and Metal Ion Control". Manuals in Physical Chemistry and Biochemistry. Great Britain.

Prescott, L.M.; Harely, T.P. and Klein, D.A.(2005). "Microbiology".6th ed., McGraw-Hill Companies, Inc., USA

Prescott, L.M.; Harely, T.P. and Klein, D.A.(2002). "Microbiology". 4th ed., McGraw-Hill Companies, Inc., USA.

Shaik,Y.P.;Ali,M.N.;Tabassum,H.andMohd,M.K.(2011). Camporative studies on production of glutamic acid using wild type , Mutants, Immobilized cells and Immobilized mutants of *Corynebacterium glutamicum*. In. J. Eng.Sci.Technol ., 3(5) :3941-3949.

Spies, J.R. (1957). Colorimetric procedures for amino acid. Methods in Enzymology., 3: 468–471.

Su, Y.C.andYamada, K.(1960).StudiesofL-glutamicacid fermentation. Agr.Chem.Soc. Japan., 24: (1): 69- 74.

Sung, J.; Michichisa,M.;Toshihiko, O. and Taguchi, S. (2006). Polyester polyhdroxybuterate by *Corynebacterium glutamicum* .J. Bio.Sci . Bioengin., 102: 233- 236.

Tavakoli, M.; Esfahani, Z. H. and Azizi, M. H. (2009). Optimization of *Corynebacterium glutamicum* glutamic acid production by response surface methodology.FoodBioprocess.Technol.Springer.,3 (5): 3941–3949.

Vijayalakshmi, P and Sarvamangala, D. (2011b). Production of L-glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum* DSM 20300 and *Arthrobacter globiformis* MTCC 4299 using fruits of muntingia calabura linn. Int Research. J. Microbiol., 2(4): 116 -121.

Yoshiharu, I.; Ichiro, C. and Tamio, I. (1978). Production and utilization of amino acids. Angew.Chem. Int. Ed. Eng., 17: 176–183.

Yugandhar, N.M.; Babu, U.K.; Raju, A.I. and Reddy, S.R. (2010). Optimization of glutamic acid production by *Brevibacterium roseum*. J. Microbiol., 5(11):1150-1154.

Yusheng, C.; Qiu, T.and Li, H.(2010).Pre-staining thin layer chromatography method for amino acid detection. African.J. Biotechnol., 9 (50): 8679–8681.

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.