Mesopotamia J. of Agric. ISSN: 2224 - 9796 (Online) مـجلــة زراعــة الـرافـديـن
Vol. (45) No. (2) 2017 ISSN: 1815 - 316 X (Print) المجلد (45) العدد (2) 2017

إنتاج سكر الجيلان الميكروبي بوساطة البكتريا *Sphingomonas paucimobilis*
1- الظروف المزرعية الفيزيائية المثلى

نهـان بهـاء الديـن جعفـر موفـق محمـود أحمـد
قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل – العراق
E-mail: nihanbayati@yahoo.com

الخلاصة

هدف البحث إلى إيجاد الظروف المزرعية الفيزيائية المثلى لإنتاج السكر الميكروبي الخارجي المتعدد الجيلان من قبل العزلة البكتيرية *Sphingomonas paucimobilis* بإستخدام طريقة مزارع الدفعة في البيئات المختبرية. حددت بعض الظروف المزرعية الفيزيائية لإنتاج الجيلان والتي تضمنت مدة الحضن وحجم اللقاح المستخدم لتلقيح وسط التخمر والأس الهيدروجيني الأولي ودرجة حرارة التحضين وسرعة الرج وذلك باستخدام الوسط الزرعي الأساسي لإنتاج الجيلان. دلت النتائج على أن المدة المثلى للتحضين كانت 48 ساعة وحجم اللقاح هو 10% والأس الهيدروجيني الملائم للإنتاج كان 7.0 بينما كانت درجة الحرارة المثلى للتحضين هي 30 مْ وسرعة رج الوسط بالحاضنة الهزازة الدوارة فكان 250 دورة/دقيقة. كما دلت النتائج على أن إنتاج سكر الجيلان لم يعتمد بصورة كبيرة على النمو الخلوي متمثلاً بالكتلة الحيوية الجافة.

الكلمات الدالة: الجيلان، السكريات المتعددة الميكروبية، *Sphingomonas paucimobilis*.

تاريخ تسلم البحث: 2013/1/30 ، وقبوله: 2013/5/6.

المقدمة

صمغ الجيلان من السكريات المتعددة الخارجية الميكروبية ذي وزن جزيئي عالي نسبياً وذائب في الماء ينتج من قبل المزارع النقية للبكتريا *Sphingomonas paucimobilis* (سميت سابقاً *Pseudomonas elodea*). إن هذه البكتريا هوائية إجبارياً ومستعمراتها صفراء اللون ناعمة ولزجة. تنتشر أنواع هذا الجنس في الطبيعة بشكل واسع حيث عزلت من الترب ومياه الأنهار ومياه الشرب ومن أسطح النباتات المائية (Pollock، 1993 و Sutherland، 1994 و Crescenzi، 1995). يتكون الجيلان بشكل أساسي من وحدات تكرار لأربعة سكريات، وهي وحدة واحدة من سكر الرامنوز ووحدتان من سكر الكلوكوز ووحدة واحدة من حامض الكلوكويورونك (Bajaj وآخرون، 2007). الجيلان سكر متعدد ذائب بالماء البارد والحار يكون محلولاً لزجاً ويستخدم بتراكيز واطئة. تم قبول استعمال الجيلان في الولايات المتحدة والاتحاد الأوربي في صناعة الأغذية كمادة مهلمة (Gelling agent) ومثبتة (Stabilizing) ومعلقة (Suspending) (Giavasis وآخرون، 2000). بالمقارنة مع غيره من السكريات المتعددة فإن الجيلان يمتلك الكثير من المزايا كثباتيته في درجات الحرارة العالية وفي قيم الأس الهيدروجيني المختلفة، ويكوّن هلاماً مطاطياً وقوياً قابل للتغير وذي شفافية عالية ومحرر للنكهة. يتوفر بثلاث أشكال تجارية عالي الأستيل وواطئ الأستيل وعالي الترويق. وله أسماء تجارية متعددة مثل Gelrite و Kelcogel F و LT100 و Phytagel و Gel-Gro (Fialho وآخرون، 2008). أشارت بعض الدراسات إلى أن للظروف المزرعية تأثيراً بالغاً في كمية ونوعية الجيلان المنتج من قبل البكتريا.

من العوامل التي وجد بأنها تؤثر في إنتاج الجيلان هي مدة التخمر الذي له علاقة بالنمو الخلوي وتصنيع الجيلان من قبل البكتريا المنتجة له ولابد من تثبيت مدة التخمر المناسبة لإنتاج أكبر كمية من الجيلان (Lobas وآخرون، 1992 و Giavasis وآخرون، 2000 و Kanari وآخرون، 2002 و Nampoothiri وآخرون، 2003 و Wang وآخرون، 2006). كما أن حجم اللقاح المستخدم لتلقيح وسط التخمر المستخدم في إنتاج الجيلان يؤثر على الكتلة الحيوية وكمية الجيلان المنتجة فضلاً عن لزوجة وسط التخمر. أستخدمت في بعض البحوث نسباً مختلفة من حجم اللقاح في إنتاج الجيلان (Manna وآخرون، 1996 و Nampoothiri وآخرون، 2003 و Wang وآخرون، 2006). يلعب الأس الهيدروجيني دوراً مهماً في إنتاج السكريات الميكروبية لكونه يؤثر على كل من النمو الخلوي والناتج المتكون من السكر. إن قيم الأس الهيدروجيني التي ينصح بها عادة لإنتاج الجيلان متفاوتة إلاّ أن أغلبها تراوحت بين 6.5- 7.0 (Kang وآخرون، 1982

البحث مستل من أطروحة الدكتوراه للباحث الأول.

و Manna وآخرون، 1996 و Bajaj وآخرون، 2006). إن درجة حرارة التحضين تلعب دوراً مهماً ومباشراً في نمو الكائن المجهري وفعالية الأنزيمات المشتركة في عملية تصنيع السكر المتعدد. وجد Kanari وآخرون (2002) أن درجة الحرارة الملائمة لإنتاج الجيلان كانت 30 مْ والتي أعطت أعلى إنتاجية وأن زيادة درجة الحرارة أكثر من ذلك أدى إلى تناقص الجيلان المنتج. من العوامل الأخرى التي تؤثر في إنتاج الجيلان هي سرعة الرج وحيث أن بكتريا الـ *S. paucimobilis* هي هوائية وأن إنتاج الجيلان هي عملية هوائية أيضاً لذا فمن الضروري توفير الأوكسجين من خلال رج الوسط وإن إنتاج الجيلان عادة يزداد في معدلات رج التي تراوحت ما بين 250 و500 دورة/دقيقة بسبب الإنتقال الجيد للمغذيات والأوكسجين (Banik وSanthiagu، 2007).

هدفت الدراسة إلى إيجاد الظروف المزرعية الفيزيائية المثالية لإنتاج السكر الميكروبي المتعدد الجيلان من قبل البكتريا *S. paucimobilis* في البيئة المختبرية. شملت الظروف المزرعية المدروسة مدة التحضين وحجم اللقاح وسط التخمر والأس الهيدروجيني الأولي للوسط الزرعي ودرجة الحرارة التحضين وسرعة رج الوسط بالحاضنة الهزازة الدوارة.

مواد البحث وطرائقه

الكائن المجهري: تم الحصول على البكتريا *S. paucimobilis* من مركز تجميع المزارع في جامعة غازي/أنقرة، تركيا (Gazi culture collection, Ankara, Turkey). وتم تنشيطها على وسط الآكار المغذي وحفظت على الآكار المائل عند درجة حرارة 4 مْ.

تحضير المزروع الخزين للبكتريا: حضر المزروع الخزين (Stock culture) وذلك بزرع البكتريا *S. paucimobilis* على وسط الآكار المغذي والتحضين لمدة 2 يوم عند درجة حرارة 30 مْ. تم نقل لقاح من المستعمرات النامية إلى وسط المرق المغذي وحضنت لمدة يوم واحد في حاضنة هزازة دوارة (Orbital shaker incubator) موديل Wise Cube WCC (مجهزة من شركة Digital Fuzzy control system اليابانية) عند 250 دورة/دقيقة ودرجة حرارة 30 مْ. حضر 1% (10^6 خلية/مل) من هذه المزرعة وأستعمل كلقاح في تلقيح 100 مل من وسط المرق المغذي في دورق مخروطي وتم ضبط الكثافة الضوئية إلى 0.8-1.0 للحصول على معلق لخلايا البكتريا بشكل متجانس بإستخدام جهاز قياس الكثافة (McFarland densitometer) موديل DEN-1 شركة .BioSan LTd الإنكليزية.

إنتاج الجيلان: تضمنت عملية إنتاج الجيلان تحضير وسط إنتاج الجيلان الأساسي (Richau وآخرون، 1997) الحاوي على غم/لترمن الماء المقطر: 20 غم كلوكوز و 10غم فوسفات الصوديوم الهيدروجينية و1 غم كلوريد الصوديوم و1غم كبريتات البوتاسيوم و0.15غم كبريتات الأمونيوم و0.01غم كلوريد البوتاسيوم المائية و0.001 غم كبريتات الحديد المائية و0.2غم كبريتات المغنيسيوم المائية و0.5غم مستخلص الخميرة وضبط الأس الهيدروجيني عند 7.0. وزع 50 مل من وسط الإنتاج في دوارق مخروطية سعة 250 مل وبعد التعقيم (121 مْ لمدة 15 دقيقة) والتبريد على درجة حرارة الغرفة لقح كل دورق بإضافة 10% من المزروع الخزين ثم حضنت الدوراق في الحاضنة الهزازة الدوارة على درجة حرارة 30 مْ لمدة 48 ساعة (Kang وآخرون، 1982).

إستخلاص الجيلان وتقدير الكتلة الحيوية الجافة: بعد إنتهاء مدة التخمر تم غمر الدوارق في حمام مائي (شركة Memmert الألمانية موديل WNE14) مغلي لمدة 15 دقيقة ثم تبريدها إلى درجة حرارة الغرفة. لتقدير الكتلة الحيوية الجافة جمع راسب الخلايا البكتيرية بالنبذ المركزي باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد موديل 3-30K المجهز من شركة Sigma الألمانية على g20.379 لمدة 30 دقيقة. غسلت الخلايا المترسبة بالماء المقطر البارد لإزالة بقايا الجيلان الملتصق ثم جفف الراسب في فرن عند حرارة 80 مْ لمدة 3 ساعات ثم وزنت. لترسيب الجيلان أضيف لحجم واحد من الراشح حجمان من كحول الأيزوبروبايل (99%) ورج المزيج بشكل جيد وترك لمدة 24 ساعة على 4 مْ لتحسين ترسب الجيلان ثم جمع الراسب بالطرد المركزي بالطريقة أعلاه وجفف في فرن على حرارة 60 مْ لمدة 12 ساعة ثم وزن الناتج (Manna وآخرون، 1996).

تقدير السكر المتبقي في المزرعة: قدر سكر الكلوكوز المتبقي في المزرعة البكتيرية بطريقة Allen (2002). تم إضافة 2 مل من 4% (و/ح) من محلول الفينول و5 مل من حامض الكبريتيك المركز إلى 1 مل من المزرعة، رجت الأنابيب وتركت على درجة حرارة الغرفة لمدة 20 دقيقة وبعدها تم قراءة الامتصاص

(Absorbance) بجهـاز المطيـاف موديـل spectrophotometer UV-Vis T80 المجهـز مـن شـركة PG Inst. LTd الإنكليزية على طول موجي 488 نانومتر. وبالإعتماد على المنحنى القياسي للكلوكوز حسبت كمية السكر المتبقي.

تعيـين الظـروف المثلـى لإنتـاج الجـيلان: لتعيـين الظـروف المثلـى لإنتـاج الجـيلان مـن قبـل العزلـة البكتيريـة *S. paucimobilis* تم تثبيت جميع الظروف باستثناء تغيير العامل المطلوب دراسة تأثيره.

مدة الحضن: تم تحضير لتر واحد من وسط الإنتاج الأساسي ولقح بإضافة 10% من المزروع الخزين للعزلة البكتيرية. حضن الوسط في الحاضنة الهزازة الدوارة على درجة حرارة 30 مْ و250 دورة/دقيقة وأخذت عينات بكمية 50 مل من المزرعة البكتيرية بعد كل 24 ساعة ولغاية 96 ساعة من بداية التلقيح.

حجم اللقاح: أضيف إلى 50 مل من وسط الإنتاج الأساسي لقاح بعمر 20 ساعة بتراكيز 1 و 3 و 5 و 10 و 15% في دوارق سعة 250 مل وحضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة على درجة حرارة 30 مْ لمدة 48 ساعة و250 دورة/دقيقة.

الأس الهيدروجيني الأولي للوسط: تم تعديل الأس الهيدروجيني لوسط الإنتاج الأساسي (2% سكر الكلوكوز و0.05% مستخلص الخميرة و 0.1% كلوريد الأمونيوم) إلى 5 و 6 و 7 و 8 و 9 باستخدام حامض الهيدروكلوريك (1ع) أو هيدروكسيد الصوديوم (1ع) ثم لقحت الأوساط الزرعية بإضافة 10% من اللقاح وحضنت على درجة حرارة 30 مْ لمدة 48 ساعة و250 دورة/دقيقة.

درجة حرارة الحضن: تم تحضير وسط الإنتاج الأساسي ووزع بكميات 50 مل في دوارق سعة 250 مل ثم لقحت الأوساط الزرعية بإضافة 10% من اللقاح وحضنت على درجات حرارة 25 و30 و 35 و 40 مْ لمدة 48 ساعة و250 دورة/دقيقة.

سرعة الرج: تم تحضير وسط الإنتاج الأساسي ووزع بكميات 50 مل في دوارق سعة 250 مل ثم لقحت الأوساط الزرعية بإضافة 10% من اللقاح وحضنت في الحاضنة الهزازة على درجات حرارة 30 مْ لمدة 48 ساعة وبسرع رج صفر و 50 و 100 و150 و 200 و 250 و 300 دورة/دقيقة.

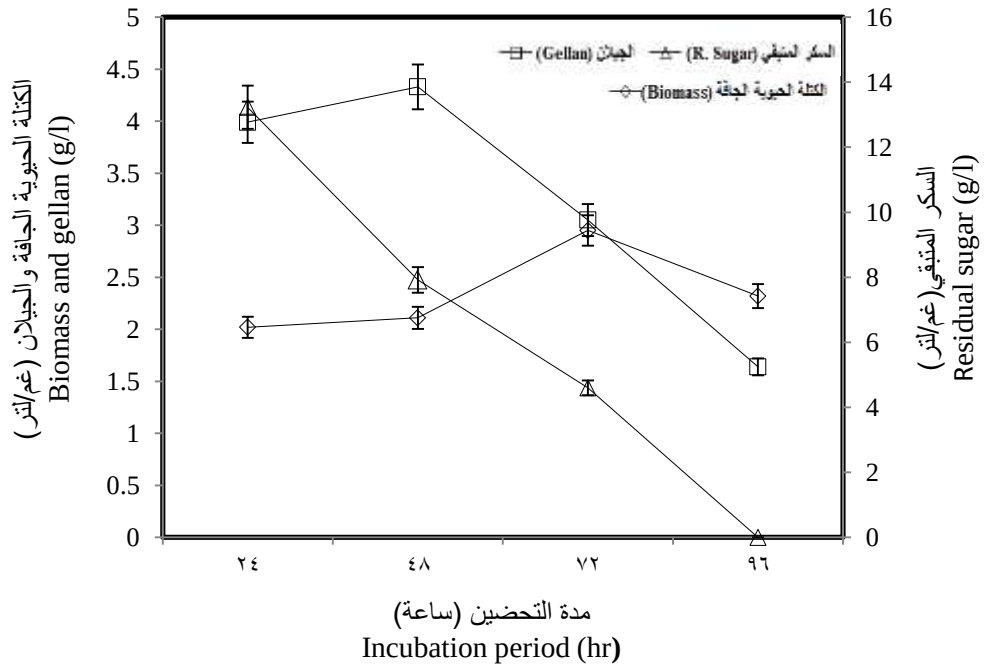
التحليل الإحصائي: تم تحليل البيانات وفق نظام التجارب العاملية والبسيطة باستخدام التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (CRD) ضمن البرنامج الإحصائي الجاهز (Anonymous، 2001). في حالة وجود فروقات معنوية استخدم اختبار دنكن المتعدد المدى (1955) لتحديد معنوية الفروقات مابين المتوسطات المختلفة عند مستوى إحتمالية 0.05.

النتائج والمناقشة

تأثير مدة التحضين: تم متابعة إنتاج سكر الجيلان المنتج من بكتريا *S. paucimobilis* لمدة أربعة أيام وذلك بسحب عينات بكمية 50 مل من المزرعة البكتيرية بعد كل 24 ساعة ولغاية 96 ساعة من بداية التلقيح. يلاحظ من الشكل (1) إن إنتاج الجيلان وصل أعلى مستوى له خلال 48 ساعة من الحضن إذْ بلغت كمية الجيلان المنتجة 4.33غم/لتر. كما يلاحظ وجود إنخفاض معنوي في كمية الجيلان المنتجة بعد 48 ساعة حيث إنخفض إنتاج الجيلان إلى 3.05 و 1.64غم/لتر عند 72 و 96 ساعة من التحضين، على التوالي، في حين ازداد إنتاج الكتلة الحيوية بزيادة مدة الحضن ولغاية 72 ساعة فبلغت 2.95غم/لتر. كما يلاحظ من الشكل أيضاً أن إستهلاك سكر الكلوكوز يستمر بصورة مستمرة طيلة مدة الحضن ليصل إلى أدنى مستوى له عند 96 ساعة من التخمر. إن الإنخفاض الحاصل في كمية الجيلان بزيادة مدة التخمر قد يعزى إلى دخول البكتريا في فضلاً طور الثبات (stationary phase) ونفاذ المغذيات من الوسط وتراكم مواد الأيض في أثناء التخمر، عن إفراز البكتريا بعض الإنزيمات المحللة للجيلان (Gellan lyases) والتي بدورها تهدم السكر المنتج مما يؤدي إلى إنخفاض السكر المتعدد (Bajaj وآخرون، 2006). يتبين من الشكل أيضاً إنه بالرغم من إنتاج الجيلان كان أعلى عند مدة التحضين 48 ساعة مع زيادة في كمية السكر المستهلك إلا إن مدة التحضين 72 ساعة دعمت إنتاج الكتلة الحيوية على حساب الجيلان بالرغم من ازدياد استهلاك السكر حيث إن إستهلاك السكر إزداد بزيادة مدة التحضين إلا أن زيادة الإستهلاك لم يدعم إنتاج الجيلان والكتلة الحيوية لأن أقصى إنتاج للجيلان كان عند دخول البكتريا إلى طور النمو اللوغارتمي (Log phase) لكون التصنيع الحيوي للجيلان من النوع المعتمد جزئياً على

النمو (Growth dependent)، فبالرغم من أن إنتاج الجيلان يستمر حتى طور الثبات إلا إن نسبة الإنتاج إنخفضت مقارنة بطور النمو اللوغارتمي (Kanari وآخرون، 2002)، وهذا ما يؤكد بأن سكر الجيلان هو أحد مكونات الأيض الأولية للبكتريا (Primary metabolite) (Rajasekaran وآخرون، 2008).

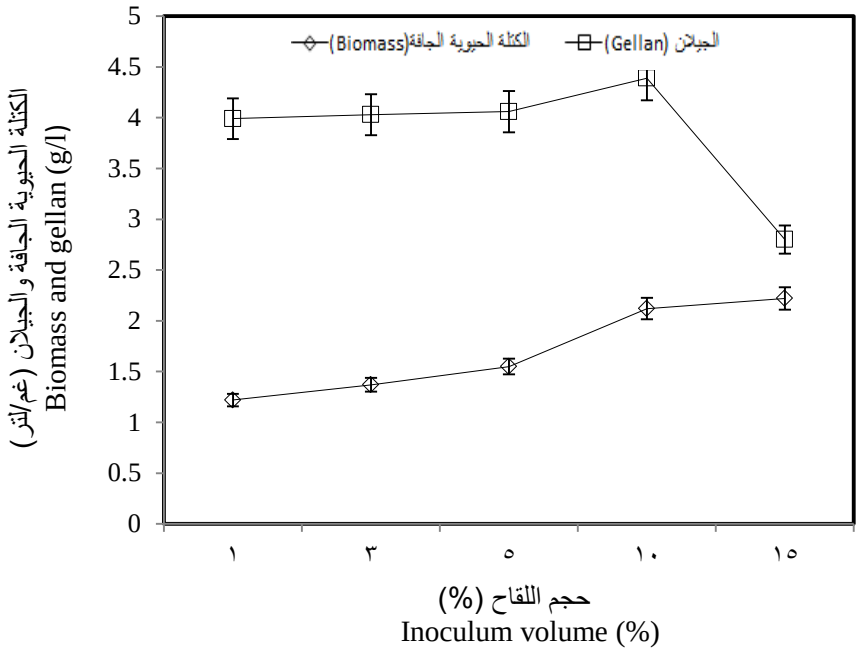
تأثير حجم اللقاح: يعد حجم اللقاح مهماً في أية عملية حيوية ولذلك يجب إضافته بالمستوى المطلوب الأمثل. لغرض معرفة تأثير حجم اللقاح في إنتاج الجيلان فقد تم تلقيح وسط الإنتاج الأساسي بحجوم متدرجة من اللقاح البكتيري وبنسب 1 و 3 و 5 و 10 و 15% من الوسط. تشير النتائج في الشكل (2) إلى أن أقصى إنتاج للجيلان وكذلك الكتلة الحيوية الجافة كانتا عند إستخدام حجم لقاح 10% فقد بلغت كمية الجيلان المنتج 4.39غم/لتر بينما بلغت الكتلة الحيوية الجافة 2.12غم/لتر. توافقت هذه النتيجة مع نتائج كل من Lobas وآخرون (1992) و Manna وآخرون (1996) و Nampoothiri وآخرون (2003). في حين لم يلاحظ أية فروقات معنوية في كميات الجيلان المنتجة عند إستخدام حجم لقاح بتراكيز 1 و 3 و 5 %، بينما إنخفض إنتاج الجيلان إلى 2.80غم/لتر عند إستخدام حجم لقاح بتركيز 15%. كما يتبين من الشكل ان إنتاج الكتلة الحيوية ازدادت مع زيادة حجم اللقاح إذ تدرجت الكمية من 1.22غم/لتر عند حجم لقاح 1% إلى 2.22غم/لتر عند حجم لقاح 15% إلا إن هذا لم يؤثر بدرجة كبيرة على إنتاج الجيلان. إن إنخفاض الإنتاج عند إستخدام الحجوم الكبيرة من اللقاح ربما يعزى إلى إنخفاض مستوى المغذيات في الوسط الزرعي بسبب إستخدامها في إنتاج الكتلة الحيوية والنمو السريع وإلى اختلاف نوع السلالة البكتيرية (Nampoothiri وآخرون، 2003).



الشكل (1): تأثير مدة التحضين في إنتاج الجيلان من العزلة البكتيرية *S. paucimobilis*.

Figure (1): Effect of incubation period on gellan production by *S. paucimobilis*.

تأثير الأس الهيدروجيني الأولي: تمت في هذه التجربة دراسة تأثير الأس الهيدروجيني الأولي للوسط في إنتاج الجيلان والنمو الخلوي للبكتريا. أظهرت النتائج في الشكل (3) إن أقصى إنتاج للجيلان والكتلة الحيوية الجافة كان عند أس هيدروجيني 7.0 وإنخفض كل منهما عند إستخدام قيم أعلى أو أدنى من ذلك. وهذا يدل على إن إنتاج الجيلان في هذه التجربة إعتمد على الكتلة الحيوية فقد بلغت أعلى قيمة لإنتاج الجيلان 4.88غم/لتر أما بالنسبة للكتلة الحيوية فإن أقصى إنتاج بلغ 3.77غم/لتر عند ذلك الأس الهيدروجيني. لم يلاحظ فروقات معنوية للكتلة الحيوية عند قيم أس هيدروجيني 5.0 و 6.0 و 8.0 في حين حصل إنخفاض معنوي 0.86غم/لتر عند الأس الهيدروجيني 9.0 وربما يعود سبب ذلك إلى التغير في فعالية الإنزيمات والجينات المتضمنة في تصنيع

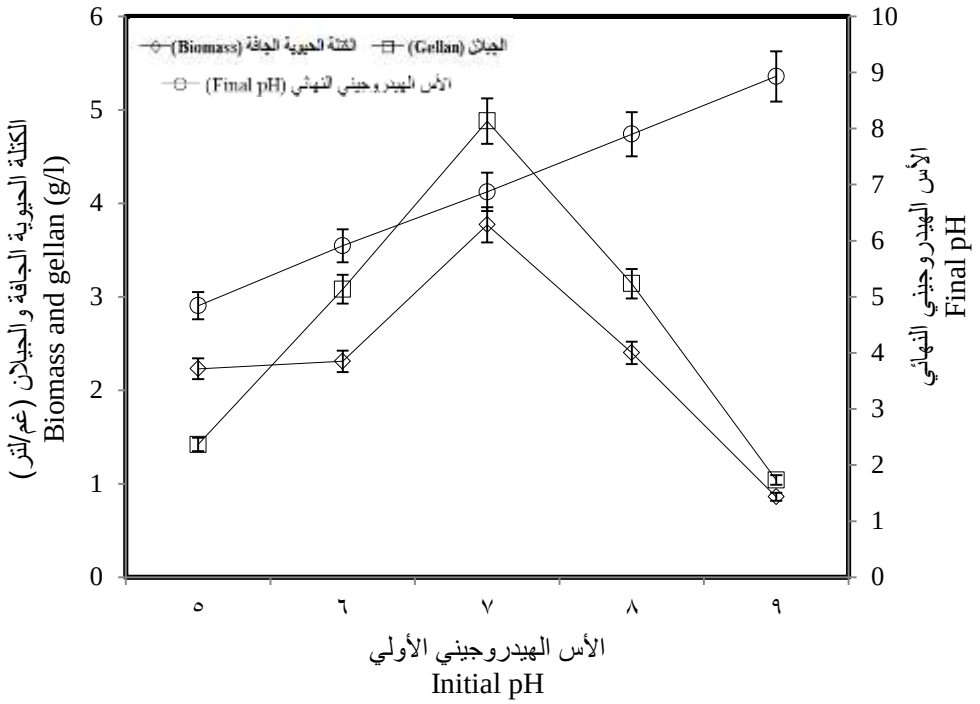


الشكل (2): تأثير حجم لقاح في إنتاج الجيلان

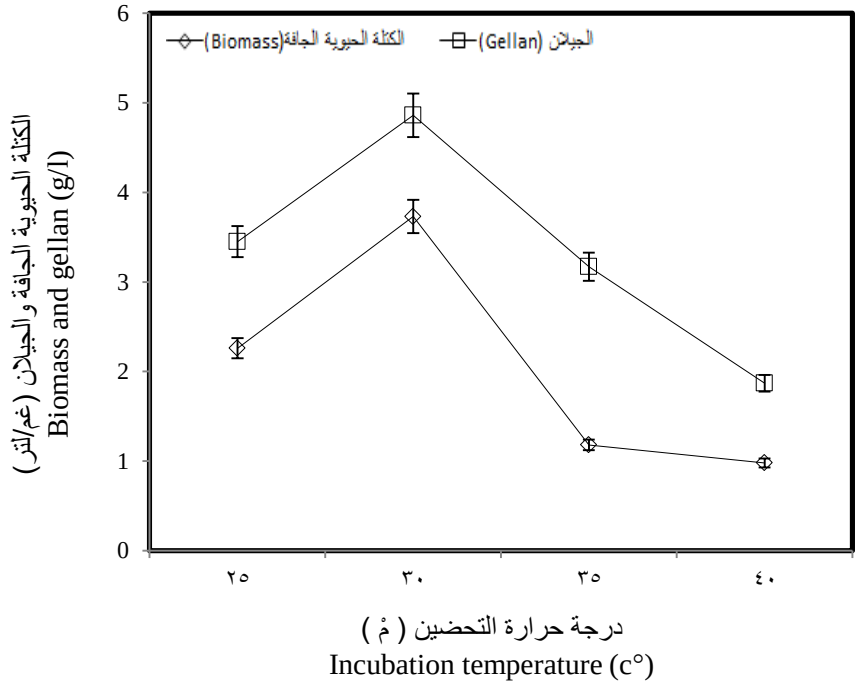
Figure (2): Effect of inoculum volume on gellan production

الجيلان أو أي منتج أيضي آخر. كما تؤثر قيمة الأس الهيدروجيني أيضاً على صفات الوسط الغذائي وذوبانية المغذيات وجاهزيتها للإمتصاص من قبل الكائن المجهري وعلى نفاذية الأغشية والنقل والتأين (Kanari وآخرون، 2002). جاءت نتائج التجربة مطابقة لنتائج Nampoothiri وآخرون (2003) عندما إستخدموا قيم مختلفة للأس الهيدروجيني تراوحت بين 4.0-9.0 لوسط إنتاج الجيلان وكان أفضل إنتاج للجيلان عند الأس الهيدروجيني 7.0. كما أشار West و Fullenkamp (2001) بأن أفضل أس هيدروجيني لإنتاج الجيلان بوساطة البكتريا *Pseudomonas* sp. ATCC 31461 تراوح بين 6.8-7.4 حيث إن قيم pH الوسط الزرعي له تأثير على إنتاج الجيلان والنمو الخلوي. تظهر النتائج في الشكل نفسه بأن قيم الأس الهيدروجيني النهائي لم تتغير بزيادة الأس الهيدروجيني الأولي للوسط مما قد يدل على عدم تصنيع الأحماض العضوية بشكل ملموس في أثناء النمو البكتيري أو عند إنتاج الجيلان.

تأثير درجة حرارة التحضين: لغرض دراسة تأثير درجة حرارة التحضين في إنتاج الجيلان من قبل البكتريا *S. paucimobilis* تم انتخاب درجات حرارة تحضين مختلفة وهي 25 و 30 و 35 و 40 مْ. أظهرت النتائج في الشكل (4) إن أقصى إنتاج للجيلان بلغ 4.86غم/لتر وكان عند درجة حرارة تحضين وسط التخمر 30 مْ، في حين حصل إنخفاض معنوي في تراكيز الجيلان في الوسط الزرعي المحضن في درجات حرارة أعلى و أدنى من ذلك حتى وصل الإنتاج 1.87غم/لتر عند درجة حرارة 40 مْ. إن هذه النتائج تبين أن درجة الحرارة المثلى للعمليات الأيضية للبكتريا وإنتاج الجيلان كمركبات أيض أولية هي 30 مْ. إن هذه النتيجة جاءت متفقة مع نتائج كل من Martins وSa-Correia (1993) و Jin وآخرون (2003) و Bajaj وآخرون (2007) الذين أشاروا إلى تناقص إنتاج الجيلان وبشكل ملحوظ فوق درجة الحرارة 30 مْ. كما أشار West (2003) الى أن درجة حرارة الحضن المثالية لإنتاج الجيلان بوساطة البكتريا *S. paucimobilis* ATCC 31461 كانت عند 30 مْ، وانخفضت كمية الجيلان فوق أو تحت هذه الدرجة الى 50%. فيما يخص النمو الخلوي يلاحظ من الشكل وجود فروقات معنوية في إنتاج الكتلة الحيوية إذ أن أقصى إنتاج بلغ 3.73غم/لتر وكان عند درجة حرارة تحضين 30 مْ وإنخفضت بزيادة درجة الحرارة إلى أن وصلت إلى 0.98غم/لتر عند درجة حرارة 40 مْ، مما يشير الى وجود علاقة بين النمو الخلوي وإنتاج الجيلان في هذه التجربة. إن درجة حرارة التحضين لها تأثير مباشر على نمو الكائن المجهري وعلى فعالية الأنزيمات المشتركة في تصنيع السكر المتعدد (Kanari وآخرون، 2002).

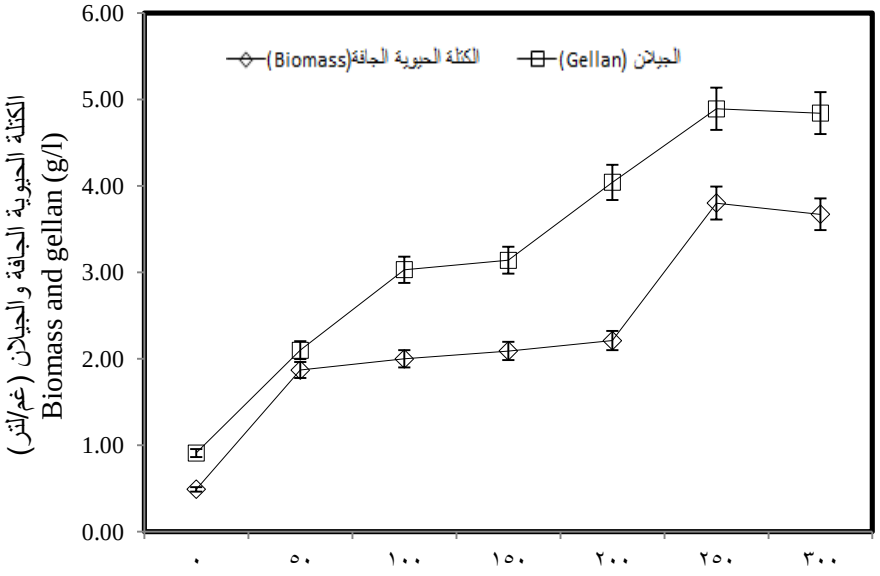


الشكل (3): تأثير الأس الهيدروجيني الأولي في إنتاج الجيلان.
Figure (3): Effect of initial pH on gellan production.



الشكل (4): تأثير درجة حرارة التحضين في إنتاج الجيلان
Figure (4): Effect of incubation temperature on gellan production

تـأثير سرعة الرج: تم تحضين الوسط الغذائي الأساسي لإنتاج الجيلان في نوعين من الحاضنات، الحاضنة الساكنة والحاضنة الهزازة الدوارة وبسرع رج بلغت 50 و 100 و 150 و 200 و 250 و 300 دورة/دقيقة. يتضح من النتائج في الشكل (5) حدوث إنخفاض معنوي كبير في تركيز الجيلان 0.91 غم/لتر عند إستخدام الحاضنة الساكنة وربما يعود السبب إلى عدم توفر التهوية اللازمة لنمو البكتريا لكون هذه البكتريا هوائية إجبارية وأن إنتاج الجيلان يتم في ظروف هوائية أيضاً وعند إنخفاض كمية الأوكسجين نتيجة إلى عدم رج الوسط قد يؤدي للوصول إلى الظروف اللاهوائية تقريباً مما يقلل من كمية الجيلان المتكون لذا فإن الرج يعد ضرورياً من اجل زيادة سرعة إنتقال الأوكسجين المذاب إلى الخلايا وبالتالي زيادة في إنتاجية البكتريا من الجيلان وبصورة خاصة في المراحل النهائية عندما ترتفع لزوجة الوسط الزرعي التي قد تسبب إعاقة انتقال الأوكسجين إلى الخلايا (Giavasis وآخرون، 2006) وهذا قد يكون السبب أيضاً في إنخفاض كمية الجيلان عند إستخدام سرع الرج الواطئة 50 و 100 و 150 دورة/دقيقة. إن إنخفاض سرعة إنتقال المغذيات والأوكسجين إلى داخل الخلايا البكتيرية بسبب تكون طبقة لزجة من الجيلان حول الخلايا تحول دون انتقال هذه المواد مسبباً بالتالي إنخفاض النمو الخلوي ومن ثم إنتاجيتها من الجيلان.



الشكل (5): تأثير سرعة الرج في إنتاج الجيلان

Figure (5): Effect of agitation rate on gellan production

يبين الشكل (5) أيضاً أن زيادة سرعة الرج إلى 300 دورة /دقيقة لم يؤدي إلى زيادة كمية الجيلان المنتجة أو زيادة الكتلة الحيوية بل على العكس من ذلك سبب خفضهما وقد يعود السبب في ذلك إلى أن إستعمال سرع الرج العالية ربما تعمل على تحطيم السكر كما قد تكون سامة للخلايا (Toma وآخرون، 1991). أما عند إستخدام سرعة الرج 250 دورة/دقيقة كان هناك أعلى إنتاجية للجيلان لتصل إلى 4.89غم/لتر والتي يظهر بأنها السرعة المثالية لإنتاج الجيلان. أما بالنسبة للكتلة الحيوية فمن الواضح من الشكل أن النمو الخلوي للبكتريا قد إزداد مع زيادة سرعة الرج إلى أن وصلت إلى 3.80غم/لتر عند سرعة 250 دورة/دقيقة، وقد يعود سبب ذلك إلى إن هذه السرعة كانت ملائمة إذْ حفزت النمو البكتيري وإنتاج الجيلان معاً. أشارت المصادر إلى أن إستخدام الحاضنة الهزازة في إنتاج السكريات المتعددة بوساطة الأحياء المجهرية الهوائية يسمح بالإستغلال الأمثل لمكونات البيئة فضلاً عن أن البيئة تكون ذات تهوية جيدة إذْ يسمح الرج أو التحريك بمزج مكونات البيئة بشكل جيد وكفوء بحيث تستطيع الأحياء المجهرية من النمو بشكل أمثل ولكن شدة التهوية تختلف بإختلاف الكائن المجهري وتقع أهمية التهوية والرج في هذا المضمار في حاجة الأحياء المجهرية للأوكسجين الذائب وتوزيع المادة الركيزة في وسط التنمية (AL- Atraqchi و AL- Mosawi، 2011).

Mesopotamia J. of Agric. ISSN: 2224 - 9796 (Online) مـجلــة زراعــة الـرافـديـن
Vol. (45) No. (2) 2017 ISSN: 1815 - 316 X (Print) المجلد (45) العدد (2) 2017

يستنتج من هذا البحث إن أفضل الظروف الفيزيائية لإنتاج سكر الجيلان هي بإستخدام حجم لقاح 10% من الوسط الزرعي وبعمر 18-20 ساعة، وأفضل مدة تحضين هي 48 ساعة وبدرجة حرارة 30 مْ، بينما كان أفضل أس هيدروجيني لوسط الإنتاج هو 7.0 وأفضل سرعة رج هي 250 دورة/دقيقة.

PRODUTION OF THE MICROBIAL GELLAN BY *SPHINGOMONAS PAUCIMOBILIS* BACTERIA. 1. OPTIMIZATION OF THE PHYSICAL CULTURAL CONDITIONS.

N. B. Jafar M. M. Ahmad
Food Sci.Dept., College of Agriculture and Forestry, Mosul University. Iraq
E-mail: nihanbayati@yahoo.com

ABSTRACT

The purpose of this study was to find the optimal physical cultural condition to produce the microbial exopolysaccharide, gellan, by the bacteria *Sphingomonas paucimobilis* in laboratory media using batch culture method. The physical cultural conditions included incubation period, inoculums size, initial pH, incubation temperature, as well as, agitation speed using basal cultural medium. Results indicated that the optimum incubation period for gellan production was 48 hrs, inoculums size was 10% of media, the pH optimum was 7.0, and the incubation temperature was 30^{o}c, while the agitation speed was 250 rpm. Results also showed that gellan production was largely cell growth dependant as indicated by dry mass weight.

Keywords: Gellan, microbial exopolysaccharide, *Sphingomonas paucimobilis.*

Received: 30/1/2013, Accepted: 6/5/2013.

المصادر

AL- Atraqchi, S. M. and E. A. AL- Mosawi (2011). Study of optimum conditions for urase enzyme production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Karbala Journal of Pharmaceutical Sciences 2: 264-278.*

Allen, M. S. (2002). Isolation and Characterization Of The Exopolysaccharide Produced By Thauera Strain MZIT and Its Role In Flocculation. A Dissertation Presented for The Doctor of Philosophy Degree. The University of Tennessee, USA.

Anonymous (2001). Statistical Analysis System User′s-Guide. Version 15, Statistical Analysis System Institute. Cary Inc., North Carolina, U.S.A.

Bajaj, I. B.; P. S. Saudagar; R. S. Singhal and A. Pandy (2006). Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. *Journal of Bioscience and Bioengineering 102(3): 150-156.*

Bajaj, I. B.; S. A. Survase; P. S. Saudagar and R. S. Singhal (2007). Gellan Gum: Fermentative production, downstream processing and applications. *Food Technology and Biotechnology 45(4): 341-354.*

Banik, R. M. and A. Santhiagu (2007). Improvement in production and quality of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* under high dissolved oxygen tension levels. *Biotechnology Letters 28: 1347-1350*.

Crescenzi, V. (1995). Microbial exopolysaccharide of applied interest: ongoing research activities in Europe. *Biotechnology Progress 11: 251-259*.

Duncan, D. B. (1955). Multiple range and F. test. *Biometric 11: 42*.

Fialho, A. M.; L. M. Moreia; A. T. Granja; A. O. Popescu; K. Hoffmann and I. Sa-Correia (2008). Occurance, production and applications of gellan: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology 79: 889-900.*

Giavasis, I.; L. M. Harvey and B. McNeil (2000). Gellan gum. *Critical Review in Biotechnology 20(3): 177-211*.

Giavasis, I.; L. M. Harvey and B. McNeil (2006). The effect of agitation and aeration on the synthesis and molecular weight of gellan in batch cultures of *Sphingomonas paucimobilis*. *Enzyme Microbiology and Technology 38: 101-108*.

Jin, H.; N. Lee; M. Shin; S. Kim; D. L. Kaplan and J. Lee (2003). Production of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* NK 2000 with soybean pomace. *Biochemical Engineering Journal 16: 357-360*.

Kanari, B.; R. R. Banik and S. N. Upadhyay (2002). Effect of environmental factors and carbohydrate on gellan gum production. *Applied Biochemistry and Biotechnology 102-103: 129-140*.

Kang, K. S.; G. T. Veeder; P. J. Mirrasoul; T. Kaneko and I. W. Cottrell (1982). Agar-like polysaccharide produced by *Pseudomonas* species: Production and Basic Properties. *Applied and Environmental Microbiology 43(5): 1086-1091*.

Lobas, D.; S. Schumpe and W. D. Deckwer (1992). The production of gellan exopolysaccharide with *Sphingomonas paucimobilis* E2(DSM 6314). *Applied Microbiology and Biotechnology 37: 411-415.*

Manna, B.; A. Gambhir and P. Ghosh (1996). Production and rheological characteristics of the microbial polysaccharide gellan. *Letters in Applied Microbiology 23: 141-145*.

Martins, L. O. and I. Sa-Correia (1993). Temperature profile of gellan gum synthesis and activities of biosynthetic enzymes. *Biotechnology Applied Biochemistry 20: 385- 395*.

Nampoothiri, K. M.; R. R. Singhania; C. Sabarinath and A. Pandey (2003). Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. *Process Biochemistry 38: 1513-1519*.

Pollock, T. J. (1993). Gellan related polysaccharides and the genus *Sphingomonas*. *Journal of General Microbiology 139: 1939-1945*.

Rajasekaran, R.; R. Chandrasekaran and M. Muthuselvan (2008). Microbial biotechnology, Rapid advances in an area of massive impact. Review, *Advanced Biotechnology 4: 19-25*.

Richau, J. A.; D. Choquenet; A. M. Fialho; L. M. Moreira and I. Sa-Correia (1997). The biosynthesis of the exopolysaccharide gellan results in the decrease of *Sphingomonas paucimobilis* tolerance to copper. *Enzyme and Microbial Technology 20: 510-515*.

Sutherland, I. W. (1994). Structure function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances 12: 393-448*.

Toma, M. K.; M. P. Ruklisha; J. J. Vanags; M. O. Zeltina; M. P. Leite; N. I. Galonina; U. E. Viesturs and R. P. Tendergy (1991). Inhibition of microbial growth and metabolism by excess turbulence. *Biotechnology and Bioengineering 38: 552-556*.

Wang, X.; P. Xu; Y. Yuan; C. Liu; D. Zhang; Z. Yang; C. Yang and C. Ma (2006). Modeling for gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 in a simplified medium. *Applied and Environmental Microbiology 72(5): 3367-3374*.

West, T. P. (2003). Effect of temperature on bacterial gellan production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology 19: 649-652*.

West, T. P. and N. A. Fullenkamp (2001). Effect of culture medium pH on bacterial gellan production. *Microbios 105(412): 133-140*.