إنتاج وتنقية حامض اللاكتيك من خلايا مقيّدة لبكتريا *Lactobacillus* المعزولة محلياً

رسالة مقدمة

الى مجلس كلية العلوم – جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة ماجستير علوم في علوم الحياة

من قبل

سهاد رضا متعب الطائي

بكالوريوس علوم حياة – جامعة كربلاء

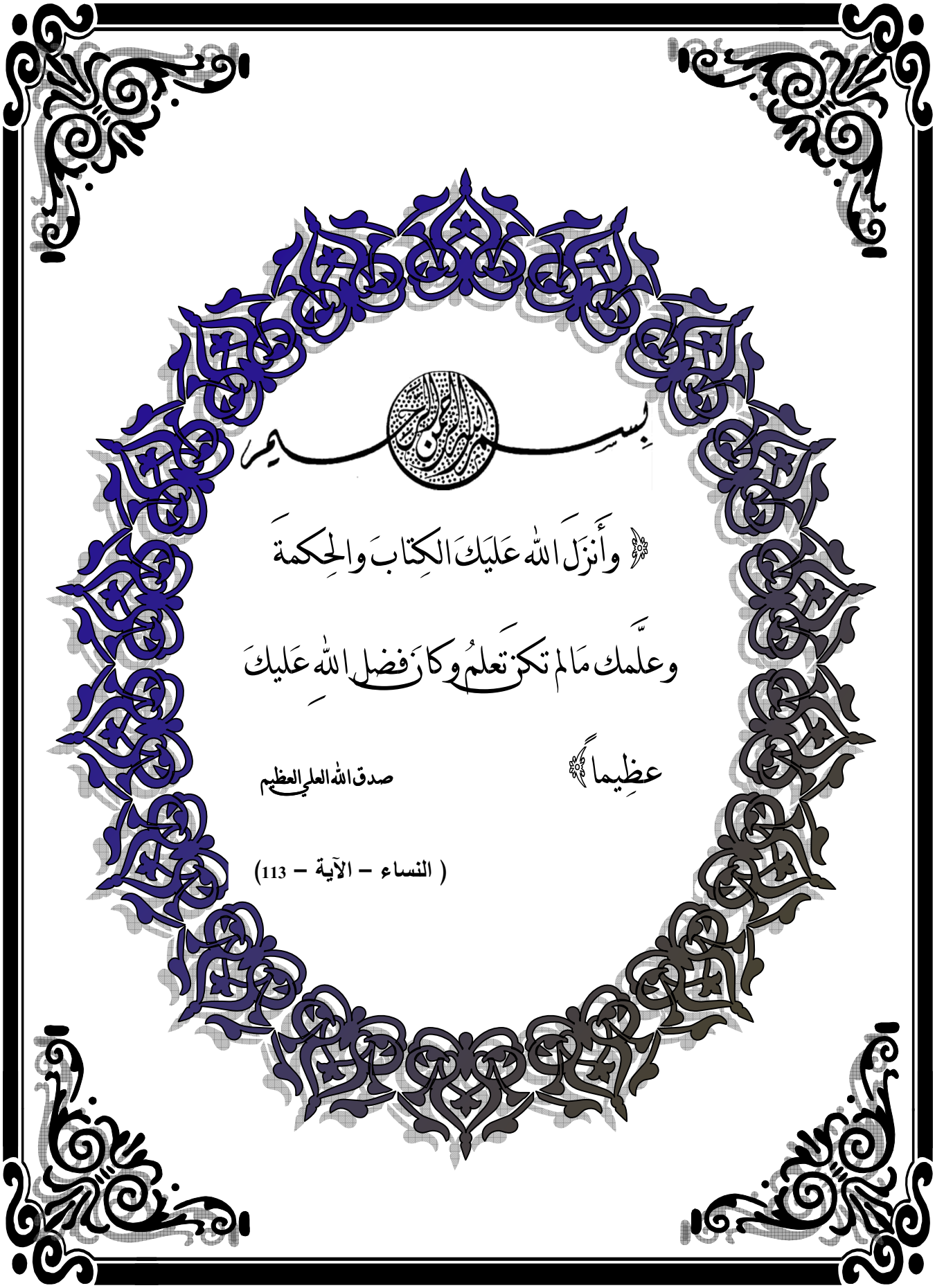
2008

إشراف

أ.م.د. علي عبد الكاظم الغانمي

جمادي الثاني 1432 هـ

نيسان 2011م



بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ وأنزل الله عليك الكتاب والحكمة

وعلمك ما لم تكن تعلم وكان فضل الله عليك

عظيما ﴾ صدق الله العلي العظيم

(النساء – الآية – 113)

إقرار المشرف

اشهد بأن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في جامعة كربلاء كجزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة .

التوقيــع :

الاســم: د . علي عبد الكاظم الغانمي

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريــخ: / /

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءاً على التوصيات اعلاه، أحيل هذه الدراسة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيــع :

الاســم: د . زهير حميد عبود

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنــوان : رئيس قسم علوم الحياة

التاريــخ: / /

إقرار المقوم العلمي

اقر بأني قومت رسالة الماجستير الموسوم عنوانها (إنتاج وتنقية حامض اللاكتيك من خلايا مقيدة لبكتريا *Lactobacillus* المعزولة محلياً) بوصفها جزءاً من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة تقويماً علمياً .

التوقيع :

الاسم :

المرتبة العلمية :

التاريخ :

إقرار المقوم اللغوي

اقر بأني قومت رسالة الماجستير الموسوم عنوانها (إنتاج وتنقية حامض اللاكتيك من خلايا مقيدة لبكتريا *Lactobacillus* المعزولة محلياً) بوصفها جزءاً من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة إذ تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير .

التوقيع :

الاسم :

المرتبة العلمية :

التاريخ :

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة، نشهد أننا اطلعنا على هذه الرسالة وقد ناقشنا الطالبة سهاد رضا متعب في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونرى إنها جديرة بالقبول لنيل شهادة الماجستير في علوم الحياة وبتقدير إمتياز .

رئيس اللجنة

التوقيع :
الاسم : د. عبد الواحد باقر عبد الرضا
المرتبة العلمية : أستاذ
العنوان : جامعة النهرين / كلية العلوم
التاريخ : / / 2011

عضواً

التوقيع :
الاسم : د. حميد مجيد جاسم
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
العنوان : جامعة النهرين /كلية العلوم
التاريخ : / / 2011

عضواً

التوقيع :
الاسم : د. وفاء صادق محسن
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
العنوان : جامعة كربلاء / كلية العلوم
التاريخ : / / 2011

عضواً ومشرفاً

التوقيع:
الاسم : د. علي عبد الكاظم جاسم
المرتبة العلمية : استاذ مساعد
العنوان : جامعة كربلاء /كلية العلوم
التاريخ : / / 2011

مصادقة عميد كلية العلوم / جامعة كربلاء

التوقيع :
الاسم : د. عامر عبد الأمير محمد علي
المرتبة العلمية : أستاذ مساعد
العنوان : جامعة كربلاء / كلية العلوم
التاريخ : / / 2011

الاهداء

الى... قدوتي الأولى

ونبـــراسي الذي ينيـــر دربي ... والدي الكريم

الى... شجرتي التي لاتذبل

والضل الذي الجأ اليه في كل حين... والدتي العزيزة

الى... من غمروني بالحب والعطاء

الى سنـــدي في الحيـــاة ... أخوتي وأخواتي

الى كـــل المحبيـــــــــن...

أهدي جهدي المتواضع

سلام

شكر وتقدير

الحمد لله الذي جعل الحمد مفتاحاً لذكره ، وخلق الأشياء ناطقة لحمده وشكره والصلاة والسلام على نبيه محمد وعلى اله الطيبين الطاهرين ...

يسرني وقد انتهيت من اعداد رسالتي ان اسجل في اولى صفحاتها جزيل شكري وعظيم تقديري الى الأستاذ المشرف الدكتور علي عبد الكاظم الغانمي لما بذله من جهدٍ وتوجيهات علمية قيمّة ساعدت في بلورة وانضاج الرسالة ، فجزاه الله خير الجزاء.

كما ويطيب لي ان اتوجه بالشكر الى عمادة كلية العلوم والى رئاسة قسم علوم الحياة لأتاحة الفرصة لي لأكمال دراستي . وأتقدم بجزيل شكري وامتناني إلى السيد رئيس وأعضاء لجنة المناقشة لتفضلهم بقراءة الرسالة وإبداء ملاحظاتهم القيمّة.

وتقف الكلمات عاجزة عن الشكر والتقدير الى من غرس في نفسي الطموح والدي العزيز داعية الله سبحانه وتعالى ان يمده بالصحة والعافية .

كما اتقدم بالشكر والأمتنان لجميع اساتذة ومنتسبي قسم علوم الحياة واخص منهم بالذكر الأستاذ حامد جهاد ، كما واشكر الدكتور مهند محسن من كلية الطب /جامعة كربلاء لما ابدوه من مساعدة في اتمام هذا العمل.

وعرفاناً مني بالجميل اقدم شكري الجزيل الى منتسبي مختبر الصحة العامة في كربلاء للمساعدة القيمّة خلال مرحلة العزل والتشخيص .

ومن دواعي الوفاء ان اقدم شكري وامتناني الى اخوتي واخواتي طلبة الدراسات العليا لما ابدوه من تعاون كبير .

واخيراً اهدي شكري وتقديري الى كل من غاب اسمه وحضر فضله وكل من ساهم في اخراج الرسالة بهذه الصورة. ... ومن الله التوفيق...

الباحثة

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	المقدمة	**1**
1	**إستعراض المراجع**	**3**
1-1	حامض اللاكتيك (Lactic acid)	**3**
2-1	طرق إنتاج حامض اللاكتيك	**4**
	1-التصنيع الكيميائي (Chemical synthesis)	**4**
	2-التخمر (Fermentation)	**5**
3-1	بكتريا حامض اللاكتيك (Lactic acid bacteria, LAB)	**6**
1-3-1	جنس *Lactobacillus*	**7**
1-1-3-1	بكتريا *Lactobacillus acidophilus*	**9**
	أ- اكتشاف وتصنيف بكتريا *L. acidophilus*	**9**
	ب- الصفات الفسلجية لبكتريا *L. acidophilus*	**10**
	ج- الأهمية العلاجية لبكتريا *L. acidophilus*	**10**
4-1	الأحياء المجهرية المنتجة لحامض اللاكتيك	**11**
5-1	إستخدامات حامض اللاكتيك	**13**
6-1	إختيار سلالات الأحياء المجهرية لأنتاج حامض اللاكتيك	**13**
7-1	تأثير الظروف البيئية والمزرعية في إنتاج حامض اللاكتيك من الأحياء المجهرية	**15**
	1- تأثير طريقة النمو	**15**
	2- تأثير المصدر الكربوني	**16**
	3- تأثير المصدر النيتروجيني	**17**
	4- تأثير الرقم الهيدروجيني الأبتدائي	**18**
	5- تأثير درجة حرارة الحضن	**18**
	6-حجم اللقاح	**19**

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	7-مدة الحضن	20
8-1	تقييد الخلايا (Cell Immobilization)	20
1-8-1	ملائمة الخلايا كمحفزات حيوية	21
2-8-1	فوائد عملية تقييد المحفز الحيوي (Biocatalyst)	21
3-8-1	المواد المستخدمة في التقييد	22
4-8-1	متطلبات المسند المثالي للمزرعة الخلوية	23
5-8-1	طرق تقييد الخلايا	23
	1-الحجز (Entrapment)	23
	2-الأدمصاص (Adsorption)	24
	3-التغليف (Encapsulation)	24
	4-التكتيل (Flocculation)	25
6-8-1	الأمور الواجب مراعاتها للحصول على تقييد كفوء	25
9-1	إستخلاص وتنقية حامض اللاكتيك	26
10-1	وراثة بكتريا *Lactobacillus*	27
2	**المواد وطرائق العمل**	30
1-2	الأجهزة والمواد المستخدمة	30
1-1-2	الأجهزة والأدوات المستخدمة	30
2-1-2	الأوساط الزرعية والمواد الكيميائية	31
2-2	طرائق العمل	34
1-2-2	جمع العينات	34
2-2-2	عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus*	34
1-2-2-2	الأوساط الزرعية المستخدمة	34
2-2-2-2	الكواشف والمحاليل المستخدمة	36
3-2-2-2	طريقة العزل والتشخيص	38
4-2-2-2	تشخيص بكتريا *Lactobacillus*	39

التسلسل	الموضوع	الصفحة
1-4-2-2-2	الفحوصات المجهرية	39
	1- تصبيغ البكتريا	39
	2- اختبار الحركة	39
2-4-2-2-2	الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical test)	39
	1- اختبار الكاتليز (Catalase test)	39
	2-اختبار الأوكسديز (Oxidase test)	39
	3-اختبار الجيلاتينيز (Gelatinase test)	40
	4- إستهلاك السترات (Citrate utilization)	40
	5- إختبار الأندول (Indole test)	40
	6- إختبار تخمير السكريات (Sugar fermentation test)	40
	7- إختبار قابلية البكتريا على النمو بتراكيز ملحية مختلفة	41
	8-إ ختبار الحساسية للمضادات الحيوية	41
5-2-2-2	حفظ عزلات بكتريا *Lactobacillus*	41
3-2-2	غربلة عزلات بكتريا *Latobacillus* لأنتاج حامض اللاكتيك	41
1-3-2-2	العزلات المستخدمة في الدراسة	42
2-3-2-2	تحضير اللقاح	42
3-3-2-2	تحضير وسط الأنتاج	42
4-3-2-2	تلقيح وسط الأنتاج	42
4-2-2	تقدير حامض اللاكتيك	43
5-2-2	تحديد الظروف المثلى لأنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين المنتخبتين	46
	1- تأثير نوع الوسط	46
	2- تأثير تركيز عصير التمر	49
	3- تأثير المصدر النيتروجيني	49
	4- تأثير الرقم الهيدروجيني الأبتدائي	50

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	5- تأثير درجة حرارة الحضن	50
	6- تأثير حجم اللقاح	50
6-2-2	تقييد الخلايا (Cell Immobilization)	50
1-6-2-2	دراسة العوامل المؤثرة في عملية التقييد	50
	1- تحديد نوع المادة الساندة	50
	أ- تقييد الخلايا بأستخدام مادة الألجينات	51
	ب- تقييد الخلايا بأستخدام مادة الأكار- اكار	52
	2- تركيز المادة الساندة	53
	3- تحديد عدد الخلايا الأمثل في عملية التقييد	53
2-6-2-2	تحديد الظروف المثلى لأنتاج حامض اللاكتيك من الخلايا المقيدة	53
	1-تركيز عصير التمر	54
	2- تركيز مستخلص الخميرة	54
	3- مدة الحضن	54
	4- ثبوتية الخلايا المقيدة	54
7-2-2	حساب كفاءة التحويل	55
8-2-2	تنقية حامض اللاكتيك (Purification of lactic acid)	55
	1- الترويق (Clarification)	55
	2- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني الأول بأستخدام المبادل Amberlite IR -400	56

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	3- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني الثاني بأستخدام المبادل Amberlite IR-120(H)	57
9-2-2	فصل حامض اللاكتيك المنقى من العزلتين المقيدتين بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)	58
10-2-2	التحري عن وجود البلازميدات في العزلتين المنتخبتين	59
11-2-2	الترحيل الكهربائي	62
3	**النتائج والمناقشة**	64
1-3	عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus*	64
1-1-3	عزل بكتريا *Lactobacillus*	64
2-1-3	تشخيص بكتريا *Lactobacillus*	66
1-2-1-3	الصفات الزرعية والمجهرية	66
2-2-1-3	الصفات الكيموحيوية	66
3-2-1-3	إختبار قابلية عزلات بكتريا *Lactobacillus* على تخمير السكريات	66
4-2-1-3	قابلية عزلات بكتريا *Lactobacillus* على النمو في ملح كلوريد الصوديوم	69
5-2-1-3	إختبار حساسية عزلات بكتريا *Lactobacillus* للمضادات الحيوية	71
2-3	غربلة عزلات بكتريا *Lactobacillus* لأنتاج حامض اللاكتيك	75
3-3	تحديد الظروف المثلى لأنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp. (25)	79
	1- تأثير نوع الوسط	79

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	2- تأثير تركيز عصير التمر	82
	3- تأثير المصدر النيتروجيني وتركيزه	85
	4- تأثير الرقم الهيدروجيني الأبتدائي	89
	5- تأثير درجة حرارة الحضن	92
	6- تأثير حجم اللقاح	94
4-3	انتاج حامض اللاكتيك بأستخدام المزارع المختلطة	96
5-3	تقييد خلايا العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp. (25)	98
	1- نوع المادة الساندة	98
	2- تركيز المادة الساندة	100
	3- إستخدام العدد الأمثل من الخلايا في التقييد	103
6-3	تحديد الظروف المزرعية المثلى لأنتاج حامض اللاكتيك من الخلايا المقيدة	106
	1- تأثير تركيز عصير التمر	106
	2- تأثير تركيز المصدر النيتروجيني	109
	3- تأثير مدة الحضن	111
	4- دراسة ثبوتية الخلايا المقيدة	115
7-3	كفاءة بكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp. (25) في تحويل السكر الى حامض اللاكتيك	117
8-3	تنقية حامض اللاكتيك	118
	1- خطوة الترويق (Clarification step)	118
	2- التبادل الأيوني الأول	118

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	3- التبادل الأيوني الثاني	121
9-3	فصل حامض اللاكتيك بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)	124
10-3	التحري عن وجود البلاميدات في بكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp. (25)	126
	الأستنتاجات والتوصيات	128
	المصادر	129
	المصادر العربية	129
	المصادر الأجنبية	130

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1	المنحنى القياسي لتقدير حامض اللاكتيك	45
2	المنحنى القياسي لتقدير الكلوكوز (السكريات المختزلة) بطريقة (3,5 Dinitro salicylic acid , DNSA)	48
3	النسب المئوية لبكتريا *Lactobacillus* موزعة حسب مصادر عزلها .	65
4	تأثير نوع الوسط في إنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) بأستخدام وسط (MRS) السائل ووسط عصير التمر بتركيز (2)%	80
5	تأثير تركيز عصير التمر في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L .acidopbilus*	83
6	تأثير تركيز عصير التمر في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *Lactobacillus* sp.(25)	84
7	تأثير نوع المصدر النيتروجيني في إنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp.(25)	86
8	تأثير تركيز المصدر النيتروجيني في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا: A- *L. acidophilus* B- *Lactobacillus* sp. (25)	88
9	تأثير الرقم الهيدروجيني الأبتدائي في إنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp.(25)	90
10	تأثير درجة الحرارة في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا : A- *L. acidophilus* B- *Lactobacillus* sp.(25)	93
11	تأثير حجم اللقاح في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا: A- *L. acidophilus* B- *Lactobacillus* sp.(25)	95

12	إنتاج حامض اللاكتيك من المزرعة المفردة والمرزعة المختلطة (Mixed culture) لبكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp. (25)	97
13	انتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) الحرة (F.C.) والمقيدة في كل من مادة الأكار–اكار (AG- AG) والجينات الكالسيوم (AL) بتركيز % (2)	99
14	تأثير تركيز الجينات الصوديوم في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا: A- *L. acidophilus* B- *Lactobacillus* sp. (25)	101
15	تأثير تركيز الأكار–اكار في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا: A- *L. acidophilus* B- *Lactobacillus* sp. (25)	102
16	تأثير عدد الخلايا المستخدم في التقييد في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا: A- *L. acidophilus* B- *Lactobacillus* sp. (25)	104
17	تأثيرتركيز عصير التمر في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. acidophilus* المقيدة	107
18	تأثير تركيزعصير التمر في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *Lactobacillus* sp.(25) المقيدة	108
19	تأثير تركيز المصدر النيتروجيني في إنتاج حامض اللاكتيك من البكتريا المقيدة: A– *L. acidophilus* B– *Lactobacillus* sp. (25)	110
20	تأثير مدة الحضن في إنتاج حامض اللاكتيك من البكتريا الحرة : A- *L. acidophilus* B- *Lactobacillus* sp. (25)	112
21	تأثير مدة الحضن في إنتاج حامض اللاكتيك من البكتريا المقيدة: A- *L. acidophilus* B- *Lactobacillus* sp. (25)	114

22	ثبوتية الخلايا المقيدة لأنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا: A- *L. acidophilus* B– *Lactobacillus* sp. (25)	116
23	فصل حامض اللاكتيك بأستخدام المبادل الأيوني (Amberlite IR -400) من بكتريا: A- *L. acidophilus* B- *Lactobacillus* sp.(25)	120
24	فصل حامض اللاكتيك بأستخدام المبادل الأيوني [Amberlite IR -120 (H)] من بكتريا: A- *L. acidophilus* B– *Lactobacillus* sp.(25)	122
25	كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة لحامض اللاكتيك : المسار 1 : حامض اللاكتيك القياسي المسار 2 : حامض اللاكتيك المنتج من العزلة *Lactobacillus* sp. (25) المساران 3 و 4 : حامض اللاكتيك المنتج من العزلة *L. acidophilus*	125
26	الترحيل الكهربائي في (0.8)% اكاروز في دارئ الترس – أسيتيت وبفرق جهد كهربائي مقداره 70 فولت : المسارات 1 و2 و3 : الدنا الكلي للعزلة *Lactobacillus* sp. (25) المسارات 4 و5 و6 : الدنا الكلي للعزلة *L. acidophilus*	127

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1	الأحياء المجهرية المستخدمة في انتاج حامض اللاكتيك من المواد الأولية الرخيصة	12
2	التطبيقات والاستخدامات التجارية لحامض اللاكتيك	14
3	تحليل جينوم بعض السلالات العائدة لبكتريا *Lactobacillus*	28
4	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *Lactobacillus*	67
5	اختبار قابلية بكتريا *Lactobacillus* على تخمير السكريات	68
6	**تحمل عزلات بكتريا *Lactobacillus* للتراكيز الملحية**	70
7	اختبار حساسية عزلات بكتريا *Lactobacillus* تجاه المضادات الحيوية	73
8	غربلة عزلات بكتريا *Lactobacillus* لأنتاج حامض اللاكتيك تحت ظروف هوائية مختلفة	76
9	تنقية حامض اللاكتيك من العزلة *L. acidophilus*	123
10	تنقية حامض اللاكتيك من العزلة *Lactobacillus* sp. (25)	123

قائمة المخططات

رقم المخطط	العنوان	الصفحة
1	مسارات الأيض الهدمي لبكتريا حامض اللاكتيك	8
2	عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus*	38
3	تنقية حامض اللاكتيك من بكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp. (25)	121

قائمة المختصرات

ADP	**Adenosine Diphosphate**
ATP	**Adenosine Triphosphate**
CIP	**Ciprofloxacin**
CTX	**Cefotaxime**
C	**Chloramphenicol**
DA	**Clindamycin**
DNSA	**Dinitro Salicylic Acid**
EDTA	**Ethylene Diamine Tetracetic Acid**
FDA	**Food and Drug Administration**
GRAS	**Generaly Recognized as Safe**
LAB	**Lactic Acid Bacteria**
MRS	**De Man Rogosa and Sharpe**
NA	**Nalidixic Acid**
N	**Neomycin**
NAD	**Nicotinamide Adenine Dinucleotide**
OX	**Oxacillin**
R_f	**Relative Front**
SCA	**Simmons Citrate Agar**
SDS	**Sodium Dodecyl Sulfate**
SMZ	**Sulphamethoxazole**
TE	**Tetracycline**
TLC	**Thin Layer Chromatography**

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus* من مصادر مختلفة وتحديد كفاءتها في انتاج حامض اللاكتيك وتطبيق تقنية تقييد الخلايا على العزلات الكفوءة في انتاج الحامض كما شملت الدراسة تنقية الحامض من الخلايا المقيدة ، واظهرت النتائج مايلي :

1- امكن الحصول على 20 عزلة بكتيرية عائدة لجنس *Lactobacillus* من مصادر مختلفة اشتملت على الحليب الخام والمخللات واللبن الريفي والشرش والألبان الرائبة المعملية وإن العزلات العشرين المتحصل عليها (إضافة الى ثلاث عزلات عائدة لنفس الجنس تم الحصول عليها من كلية الطب البيطري /جامعة بغداد فضلاً عن عزلة واحدة من *L. acidophilus* تم الحصول عليها من كلية الزراعة / جامعة بغداد). خضعت لعملية غربلة لتحديد الأكفأ منها في إنتاج حامض اللاكتيك تحت ظروف حضن مختلفة واتضح أن العزلتين *L.acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) هما الأغزر إنتاجاً للحامض حيث تم إستخدامهما في مراحل الدراسة اللاحقة .

2- تم تحديد الظروف المزرعية المثلى لأنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) حيث أمكن الحصول على أعلى إنتاج من الحامض بأستخدام وسط عصير التمر المحضر بتركيزي (6 و8) %(سكريات مختزلة) للعزلتين أعلاه على التوالي. المدعم بـ 0.7 % من مستخلص الخميرة و1% كربونات الكالسيوم برقم هيدروجيني إبتدائي 6.5 وحجم لقاح مقداره 4 % من حجم الوسط والحضن تحت ظروف هوائية ساكنة عند درجة حرارة 37 مئوية لمدة (60 و48) ساعة للعزلتين قيد الدراسة على التوالي .

3- تم تقييد (Immobilization) خلايا بكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) بطريقة الحجز(Entrapment) بأستخدام مادتين ساندتين مختلفتين . واعطى استخدام مادة الأكار –اكار (Agar – agar) في تقييد الخلايا انتاجاً أعلى من حامض اللاكتيك مقارنة بأستخدام الجينات الصوديوم . ولدى دراسة العوامل المؤثرة في التقييد تبين أن استخدام تركيز 3 % من الأكار– أكار كمادة ساندة بعدد خلايا مقدارة (1×10^9) خلية/ مل أدى الى الحصول على أعلى إنتاج من الحامض.

4- درست بعض الظروف المؤثرة في انتاج حامض اللاكتيك من خلايا بكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) المقيدتين وأظهرت النتائج مايلي :

أ- إن افضل تركيز من عصير التمر ومستخلص الخميرة لأنتاج الحامض كان (4 و0.3)% لكلا العزلتين على التوالي .

ب- إن افضل مدة حضن لأنتاج الحامض كانت (60 و72) ساعة للعزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) على التوالي.

ج- تميزت الخلايا المقيدة لكلا العزلتين بثبوتيتها في انتاج الحامض لخمس دورات تخمرية إذ لم يلاحظ اي انخفاض في الأنتاج خلال المدة المدروسة .

5- أمكن تنقية حامض اللاكتيك من راشح المزرعة لبكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) المقيدتين، وقد اشتملت خطوات التنقية على خطوة الترويق (Clarification) والتبادل الأيوني الأول بأستخدام المبادل الانأيوني (Amberlite IR-400) ، والتبادل الأيوني الثاني بأستخدام المبادل الكاتأيوني **[**Amberlite IR -120 (H)**]** . وأسفرت عملية الفصل عن الحصول على حامض اللاكتيك النقي بحصيلة (88.75 و 91.56)% للعزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) على التوالي .

6- أعطى حامض اللاكتيك المنقى من العزلتين المستخدمتين في هذه الدراسة ، بقعة واحدة عند فصله بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) بقيم(R_f) مقدارها (0.535 و 0.541) للحامض المنقى من بكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) على التوالي.

7- خلو عزلتي *Lactobacillus* قيد الدراسة من البلازميدات مما يشير الى أن الجينات المسؤولة عن انتاج حامض اللاكتيك في هاتين العزلتين هي كروموسومية الموقع .

المقدمة

Introduction

المقدمة

يتزايد الأحتياج العالمي من حامض اللاكتيك سنوياً ومن المتوقع أن يقفز هذا الأحتياج ليصل الى (200 000) طن بحلول عام 2011 (Altaf *et al*.,2005) . ويمكن أن يعكس الطلب المتنامي هذا أهمية الحامض الكبيرة والتي تتجلى من خلال إستخداماته الواسعة خاصة في المجالات الصيدلانية والغذائية والكيميائية ومواد التجميل فضلاً عن إستخداماته الجديدة كمواد اولية لصناعة البوليمرات القابلة للتحلل(Biodegradable polymer industry).

يوجد نظيران ضوئيان من حامض اللاكتيك L(+)Lactic acid و D(-)Lactic acid ولكل منهما استخداماته المختلفة (Wee *et al*.,2006) وينتج هذا الحامض بطريقتين :الأولى التصنيع الكيميائي (Chemical synthesis) والثانية التخمر المايكروبي (Microbial fermentation) . وتتميز الأخيرة بأمكانية إستخدامها لأنتاج النظير الضوئي المطلوب من حامض اللاكتيك L(+) أو D(-) بعد إختيار الكائن المجهري المناسب ، وهي الميزة التي تفتقر اليها الطريقة الكيميائية والتي تنتج مزيجاً راسيمياً(Racemic Mixture) من الحامض (DL) غير المرغوب من الناحية الصناعية .

يتوزع إنتاج حامض اللاكتيك من الأحياء المجهرية بين البكتريا والفطريات ، وتشكل بكتريا *Lactobacillus* رافداً مهماً لأنتاج هذا الحامض على المستوى التجاري .

ويتحدد إختيار السلالة الملائمة للانتاج بنوعية المادة الأولية المتوفرة (الخفاجي،1990). ولتحقيق إنتاج مناسب من الحامض فأن المادة الأولية المستخدمة يجب أن تفي بعدد من المتطلبات لعل في مقدمتها رخصها واحتواءها على أقل قدر ممكن من الملوثات وذات معدل إنتاج سريع بحصيلة عالية وبدون أو بنواتج عرضية قليلة فضلاً عن توفرها على مدار السنة (Wee *et al*.,2006) .

وحظيت تقنية تقييد الخلايا (Cell Immobilization) بأهتمام الباحثين فنالت النصيب الأوفر من الدراسات نظراً لما تحققه هذه التقنية من فوائد جمة لعل في مقدمتها زيادة ثبوتية الخلايا واطالة مدة استخدامها فضلاً عن تقليل استهلاك الطاقة وتقليل التكاليف .

وتعد عملية إستخلاص وتنقية حامض اللاكتيك أهم مشكلة تجابه إنتاجه بوساطة التخمرات المايكروبية(الحيدري والمصلح ،1989) إذ تصل كلفتها أحياناً الى 80% من كلفة الأنتاج مما يحتم القيام بدراسات عاجلة لأيجاد تقنيات استخلاص وتنقية جديدة إقتصادية وذات كفاءة عالية (Habova *et al*.,2004) .

ونظراً لما يمتلكه حامض اللاكتيك من أهمية تطبيقية كبيرة فقد هدفت هذه الدراسة الى:

1- عزل بكتريا *Lactobacillus* المنتجة لحامض اللاكتيك .

2- غربلة العزلات البكتيرية لتحديد الأكفأ منها لأنتاج الحامض .

3- تحديد الظروف المثلى لأنتاج الحامض من العزلة المنتخبة .

4- استخدام تقنية تقييد الخلايا (Cell Immobilization) وإنتاج الحامض من الخلايا المقيدة .

5- تنقية الحامض .

6- تحديد صفة إنتاج الحامض بلازميدية او كروموسومية الموقع من العزلات المنتخبة .

الفصل الأول

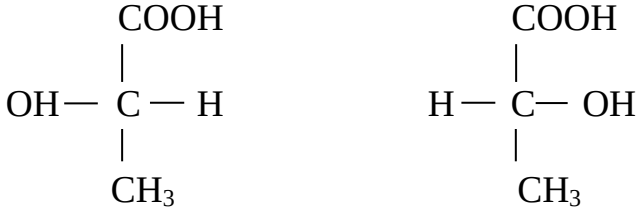
استعراض المراجع

Literature Review

1- إستعراض المراجع

1-1 حامض اللاكتيك (Lactic acid)

يعد حامض اللاكتيك 2- هيدروكسي حامض البروبيونيك (2-Hydroxy propionic acid) الحامض الكاربوكسيلي الأكثر تواجداً في الطبيعة .اكتشفه لأول مرة العالم الكيميائي السويدي Scheele عام 1780 لكنه انتج لأول مرة في الولايات المتحدة عام 1881 . وحامض اللاكتيك حامض عضوي يمتلك الصيغة الكيميائية (CH_3 CHOH COOH) إذ يحوي ثلاث ذرات كربون، ذرة كربون طرفية تمثل جزءاً من حامض أومجموعة كربوكسيل وذرة كربون طرفية أخرى تمثل جزءاً من مجموعة مثيل أو هيدروكربون، بينما تمتلك ذرة الكربون الوسطية مجموعة كربون كحولية (Narayanan *et al.*, 2004). توجد لحامض اللاكتيك صورتان فعالتان ضوئياً هما L (+) Lactic acid والنظير الضوئي D(-) Lactic acid . (Vijayakumar *et al* .,2008)



L (+) Lactic acid **D(-) Lactic acid**

وعلى الرغم من ان حامض اللاكتيك يمتلك الصيغة الجزيئية ($C_3H_60_3$) التي تمثل الصيغة الجزيئية للسكريات ثلاثية ذرات الكربون (Trioses) الاّ أن هذا الحامض لايعد مادة كربوهيدراتية (المظفر،2009) .

يذوب حامض اللاكتيك في الماء وبعض المذيبات العضوية القابلة للأمتزاج بالماء لكنه عديم الذوبان في المذيبات العضوية الأخرى، وهو قليل التطاير وله ثباتية عالية ويبلغ وزنه الجزيئي (90.08) ودرجة أنصهار واطئة تبلغ 16.8 مئوية أما درجة غليانه عند الضغط 0.5 ملم زئبق فتبلغ 82 مئوية بينما تبلغ (122) عند الضغط 14 ملم زئبق. ولحامض اللاكتيك ثابت تفكك مقداره (1.37×10^{-4}) عند درجة حرارة 25 مئوية وحرارته النوعية 190 جول/مول/مئوية عند درجة حرارة (20) مئوية (Narayanan *et al*. 2004). ويوصف حامض اللاكتيك بأنه من المركبات المميزة عموماً بأنها مأمونة (Generally Recognized as Safe,GRAS) . (Wee *et al*.,2006)

2-1 طرق إنتاج حامض اللاكتيك

1- التصنيع الكيميائي (Chemical synthesis)

أوضح (Narayanan *et al* .2004) أن العمليات التجارية لتصنيع حامض اللاكتيك صناعياً تعتمد بشكل أساسي على مادة لاكتونيترايل (Lactonitrile) ويمكن الحصول على هذه المادة عن طريق معاملة الأستلديهايد مع سيانيد الهيدروجين لتنتج اللاكتونيترايل التي تنقى بعملية التقطير. تعاني مادة اللاكتونيترايل الخام تحللاً بأستخدام بعض الأحماض القوية مثل حامض الهيدروكلوريك والكبريتيك لينتج حامض اللاكتيك وأملاح الأمونيوم ثم يعامل حامض اللاكتيك المتكون مع الميثانول لينتج لاكتات المثيل التي تتحلل مائياً بعد تنقيتها بعملية التقطير الى حامض اللاكتيك وميثانول مرة أخرى. يكون حامض اللاكتيك المنتج تجارياً من النوع الراسيمي (Racemic Lactic acid) ومن الشركات المستخدمة لهذه التقنية هي شركة (Musashino) اليابانية وشركة (Sterling Chemicals Inc) الأمريكية ويمكن توضيح خطوات الأنتاج بالمعادلات الآتية :-

أ- اضافة سيانيد الهيدروجين (Addition of Hydrogen Cyanide)

$$CH_3CHO + HCN \xrightarrow{\textbf{catalyst}} CH_3CHOHCN$$

acetaldehyde hydrogen cyanide Lactonitrile

ب- التحلل بواسطة حامض الكبريتيك (Hydrolysis by H_2SO_4)

$$CH_3CHOHCN + H_2O + {}^1/_2H_2SO_4 \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + {}^1/_2 (NH_4)_2SO_4$$

Lactonitrile Lactic acid ammonium salt

ج- الأسترة (Esterification)

$$CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \longrightarrow CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O$$

Lactic acid Methanol Methyl lactate

د- التحلل المائي (Hydrolysis by H_2O)

$$CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH$$

Methyl lactate Lactic acid Methanol

2- التخمر (Fermentation)

ينتج حامض اللاكتيك عن طريق تخمر الكربوهيدرات بأستخدام الأحياء المجهرية المنتجة لحامض اللاكتيك بصورة L (+) Lactic acid أوD (-) Lactic acid وتتلخص عملية الأنتاج بالمعادلات الآتية :

أ- التخمر و التعادل (Fermentation and neutralization)

$$C_6H_{12}O_6 + Ca(OH)_2 \xrightarrow{\textbf{fermentation}} 2(CH_3CHOHCOO^-)\,Ca^{2+} + 2H_20$$

Carbohydrate calcium hydroxide calcium lactate

ب- التحلل بواسطة حامض الكبريتيك (Hydrolysis by H_2SO_4)

$$2(CH_3CHOHCOO^-)Ca^{2+} + H_2SO_4 \longrightarrow 2CH_3CHOHCOOH + CaSO_4$$

Calcium lactate Lactic acid

ج- الأسترة (Esterification)

$$CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \longrightarrow CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O$$

Lactic acid Methanol Methyl lactate

د- التحلل المائي (Hydrolysis by H_2O)

$$CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH$$

Methyl lactate Lactic acid Methanol

يتم التخلص من الخلايا بعملية الترشيح ويكون وسط التخمر حاوياً على لاكتات الكالسيوم التي تعامل بحامض الكبريتيك للحصول على حامض اللاكتيك وكبريتات الكالسيوم وبعملية الترشيح يتم التخلص من كبريتات الكالسيوم غير الذائبة بعمليات متعاقبة تشمل التحلل والأسترة والتقطير والتحلل المائي يتم الحصول على حامض اللاكتيك (Narayanan *et al.*,2004) .

3-1 بكتريا حامض اللاكتيك (Lactic acid bacteria ,LAB)

تشمل بكتريا حامض اللاكتيك الأجناس البكتيرية التي تنتج حامض اللاكتيك ناتجاً نهائياً من عملية تخمر الكربوهيدرات . وتستخدم أيضاً في انتاج المنتجات الغذائية المتخمرة .وتمتاز بكونها متباينة في الشكل بين الأسطوانية الطويلة والعصيات القصيرة والكروية الشكل . بعض أنواعها هوائية ولها القابلية على استهلاك الأوكسجين من خلال أنزيم فلافوبروتين أوكسديز (Flavoprotein oxidase) بينما تكون أنواع أخرى لاهوائية (Condon ,2006) .

اما الظروف المثلى لنمو(LAB) فتكون عند الرقم الهيدروجيني (5.5-5.8) ودرجة حرارة (32-35) مئوية (Mukhopadhyay ,2009) . ولكونها تمتلك انظمة انزيمية بسيطة فهي تحتاج الى متطلبات غذائية معقدة (Kandler and Weiss,1986) .

يمكن تصنيف بكتريا حامض اللاكتيك بالأعتماد على مسارات أيض الكربوهيدرات الى مجموعتين:

1- متجانسة التخمر (Homofermentative LAB)

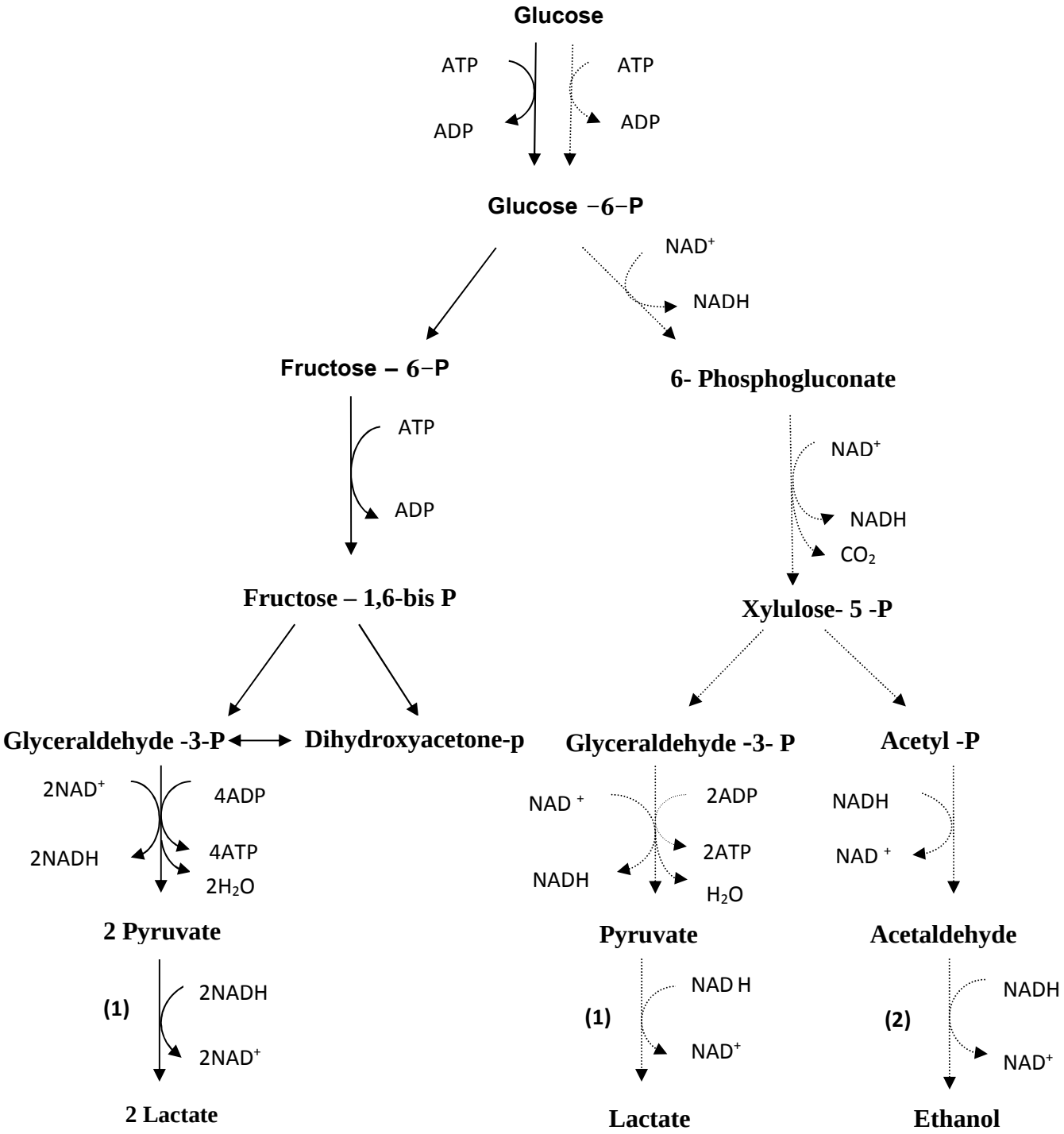
يكون حامض اللاكتيك فقط هو الناتج النهائي لأيض الكلوكوز في هذا الصنف من البكتريا، حيث أن استهلاك جزيئة واحدة من الكلوكوز عبر مسار أمبدن مايرهوف (Glycolysis) ينتج جزيئتين من حامض اللاكتيك.

2- غير متجانسة التخمر (Heterofermentative LAB)

ينتج هذا الصنف حامض اللاكتيك والأيثانول وغاز ثنائي أوكسيد الكربون من استهلاك جزيئة واحدة من الكلوكوز عبرمسار فوسفات البنتوز (Pentose phosphate pathway) (Wee *et al* .,2006). ويوضح المخطط (1) مسارات الأيض الهدمي لبكتريا حامض اللاكتيك.

1-3-1 جنس *Lactobacillus*

يعد العالم Orla -Jensen أول من اهتم بتصنيف جنس *Lactobacillus* عام (1919) وذلك عن طريق تشخيصها بوصفها بكتريا مفيدة في صناعة الألبان(Cowan and Steel,1965) . كما صنف Holt *et al.*(1994) هذا الجنس ضمن المجموعة التاسعة عشرة وتحت عنوان العصيات المنتظمة غير مكونة للأبواغ موجبة التفاعل لصبغة غرام. وتختلف أشكالها بين الأسطوانية الطويلة والعصوية القصيرة وقد تكون عصوية كروية، وتتواجد هذه البكتريا بصورة مفردة أوثنائية أو سلاسل قصيرة، غير متحركة، قلما تكون متحركة بأسواط محيطية (Peritrichous) .ينتج حامض اللاكتيك بصورة رئيسية من تخمر الكربوهيدرات بواسطة هذه البكتريا وأحياناً تنتج مواد اضافية أخرى مثل الأيثانول وثنائي أوكسيد الكربون والأسيتيت .



مخطط (1) : مسارات الأيض الهدمي لبكتريا حامض اللاكتيك

———— متجانسة التخمر

..... غير متجانسة التخمر

وهي لاهوائية أو تكون الفتها للهواء قليلة (Microaerophilic)، لاتختزل النترات ولاتسيل الجيلاتين ولاتنتج الأندول وغاز كبريتيد الهيدروجين (H_2S) لاتنتج الكاتليز ونادراً ماتنتج صبغات تتراوح بين الأصفر والبرتقالي الى الأحمر. اما متطلباتها الغذائية فتكون معقدة إذ تحتاج الى أحماض أمينية وكربوهيدرات ونيوكليوتيدات وفيتامينات. تنمو في درجات حرارة تتراوح بين (2-53) مئوية ودرجة الحرارة المثلى للنمو (30-40) مئوية ، اما الرقم الهيدروجيني الأمثل للنمو فيتراوح بين (5.5-6.2) .

تتواجد بكتريا *Lactobacillus* بصورة واسعة في الطبيعة فهي موجودة في منتجات الألبان واللحوم والأسماك والفواكه والخضروات وعصير الفواكه والمخللات والحليب فضلاً عن تواجدها بشكل طبيعي في الفم والقناة المعوية .اما صفات مستعمرات *Lactobacillus* النامية على الأوساط الصلبة (Agar) فتكون صغيرة تتراوح ابعادها(2-5) ملم ومحدبة الشكل وناعمة ولماعة ذات حافات متكاملة وتكون غير شفافة وغير ملونة وفي حالات نادرة تتخذ المستعمرات الواناً مائلة الى اللون الأصفر اوالأحمر(Krieg and Holt ,1984).

1-1-3-1 بكتريا *Lactobacillus acidophilus*

أ- إكتشاف وتصنيف بكتريا *L. acidophilus*

بكتريا *Lactobacillus acidophilus* هي مختصر لكل من (Lacto) تعني الحليب و(bacillus) تعني عصيات و(acidophilus) تعني محبة للحموضة. أكتشف هذه البكتريا العالم الأمريكي Moro عام 1900 في فضلات الأطفال حديثي الولادة. و سميت *Bacillus acidophilus* وبعد سنة من نظرية (Mitchenkoff theory,1907) غيرت تسميتها الى *Lactobacillus acidophilus* (AL- Sheik,1999) .

تعود هذه البكتريا الى المملكة بدائية النواة (Procaryota)، والقسم(Firmacutes)، والصنف (Lactobacilleae) ، والرتبة (Lactobacillales)، والعائلة (Lactobacillaceae)، والجنس (*Lactobacillus*)، والنوع (*acidophilus*) . (Hilton *et al.*,1992)

ب- ألصفات الفسلجية لبكتريا *L. acidophilus*

تمتاز هذه البكتريا بكونها عصوية ذات نهايات مستديرة تتراوح ابعادها (6- 1.5× 0.6-0.9) مايكروميتر، تترتب بشكل مفرد أو مزدوج أو بشكل سلاسل قصيرة وهي بكتريا غيرمتحركة ولا تنتج الصبغات. ولبعض سلالاتها القابلية على تخمير الكلايكوجين بصورة ضعيفة، ولبعض السلالات القابلية ايضاً على تخمير سكر المليبايوز وسكر الرافينوز أو كليهما .

تنتمي بكتريا *L. acidophilus* الى مجموعة متجانسة التخمر (Homofermentative) يكون حامض اللاكتيك هو الناتج الرئيسي من عملية التخمر إذ تنتج النظير الضوئي D(-) Lactic acid تتراوح درجة الحرارة المثلى لنمو هذه البكتريا بين (35-38) مئوية بأستثناء بعض السلالات التي تنمو بدرجة حرارة 48 مئوية. اما الرقم الهيدروجيني الامثل لنمو *L.acidophilus* فيتراوح بين (5.5-6.0) وهي محبة للتهوية القليلة ويعزز نموها بغاز CO_2 بنسبة 5 % (Buchana and Gibbons,1974).

ج- الأهمية العلاجية لبكتريا *L. acidophilus*

لقد أشار Tenney (1996) الى الأهمية العلاجية لبكتريا *L.acidophilus* حيث ان وجودها في القناة المعوية للأنسان تحمي الجسم من البكتريا والفطريات الممرضة ،اضافة الى ان التصاقها على جدران الأمعاء لايترك حيزاً لأجتياح البكتريا الممرضة . فضلاً عن إنتاجها للأحماض العضوية التي تعمل على خفض قيمة الرقم الهيدروجيني وبالتالي تجعل البيئة في الأمعاء حامضية وتثبط من نمو الأحياء المجهرية الممرضة . وتساهم بكتريا *L. acidophilus* في ازالة السمية (Detoxification) لبعض المواد المضرة للقناة الهضمية وتساعد ايضاً في

تكوين الفيتامينات مثل فيتامين (B_1 وB_2 وB_3 وB_{12}) وحامض الفوليك، فضلاً عن استخدامها في علاج مرض عدم التحمل لسكر اللاكتوز(Lactose Intolerance) .

وجد Desai (2008) أن بكتريا *L. acidophilus* المستخدمة في منتجات الألبان تلعب دوراً أساسياً في تعزيز الجهاز المناعي وزيادة الأستجابة المناعية للجسم ، ولها القابلية على تقليل مستوى الكوليسترول في الدم ، فضلاً عن دورها في منع سرطان القولون (colon cancer) وقابليتها في إنتاج المضادات الحيوية مثل (Acidolin وAcidophiline وLactocidin) التي تثبط ممرضات القناة الهضمية .

4-1 الأحياء المجهرية المنتجة لحامض اللاكتيك

ينتج حامض اللاكتيك من قبل نوعين من الأحياء المجهرية هما البكتريا والفطريات ، وإن معظم الدراسات الحاصلة في انتاج حامض اللاكتيك تجرى على (LAB) والفطريات الخيطية مثل جنس *Rhizopus* التي تستهلك الكلوكوز هوائياً في انتاج حامض اللاكتيك . وان عدداً من أنواع *Rhizopus* مثل *R.oryzae* و*R.arrizus* تنتج النظير الضوئي L (+) Lactic acid بفعل انزيماتها المحللة للنشا التي تمكنها من تحويل النشا الى L (+) Lactic acid . ومن مميزات التخمر الفطري هي متطلباته لأوساط تخمرية بسيطة بالأضافة الى إنتاج النظير الضوئي L(+)Lactic acid . إن الأنخفاض في حصيلة حامض اللاكتيك ينسب جزئياً الى تشكيل نواتج عرضية أخرى مثل حامض الفيوماريك والأيثانول . ويبين الجدول (1) اهم الأحياء المجهرية المستخدمة في إنتاج حامض اللاكتيك من المواد الأولية الرخيصة (Wee *et al*.,2006) .

جدول (1) : الأحياء المجهرية المستخدمة في انتاج حامض اللاكتيك من المواد الأولية الرخيصة

الكائن المجهري المنتج	كمية حامض اللاكتيك غم /لتر	الأنتاجية غم/لتر .ساعة
***L.rhamnosus* ATCC 10863**	67.0	2.5
***L.helviticus* ATCC 15009**	65.5	2.7
***L.bulgaricus* NRRL B-548**	38.7	3.5
***L.casei* NRRL B-441**	82.0	5.6
***L.plantarum* ATCC 21028**	41.0	1.0
***L. pentosus* ATCC 8014**	21.8	0.8
***L. delbrueckii* NCIMB 8130**	90.0	3.8
***L. lactis* ssp. *Lactis* IFO 12007**	90.0	1.6
***L. amylophilus* GV6**	76.2	0.8
***Enterococcus faecalis* RKY1**	144.0	5.1
***R. oryzae* ATCC 52311**	83.0	2.6
***R. oryzea* NRRL 395**	104.6	1.8

1- 5 استخدامات حامض اللاكتيك

يلعب حامض اللاكتيك دوراً مهماً في العديد من المجالات مثل الصناعات الغذائية والصيدلانية والكيميائية ومواد التجميل . ويعد أول منتوج أدخل ضمن مواصفات (GRAS و FDA) للمضافات الغذائية المستخدمة بشكل واسع في الصناعات الغذائية ولأغراض متنوعة مثل اضافة النكهة للأغذية وتنظيم الحموضة فضلاً عن استخدامه في حفظ الأغذية كاللحوم والاسماك والخضروات . أما في التطبيقات الصيدلانية فيدخل حامض اللاكتيك في تركيب العديد من الادوية والعقاقير الطبية مثل المحاليل المستخدمة في غسل الكلى وصناعة الخيوط الجراحية . يدخل حامض اللاكتيك ايضاً في صناعة المواد التجميلية حيث يدخل في تركيب المواد المرطبة للجلد والمقشرة للبشرة ومعالجة حب الشباب لأنه يعد من المضادات الجرثومية واسعة الطيف. وفضلاً عما سبق يدخل هذا الحامض كمادة أولية في صناعات كيميائية متعددة مثل (poly lactic acid) المستخدم في صناعة البلاستيك القابل للتحلل (Biodegradable plastic) (Wee *et al*.,2006)، ويوضح الجدول (2) اهم التطبيقات والأستخدامات التجارية لحامض اللاكتيك .

1-6 إختيار سلالات الأحياء المجهرية لأنتاج حامض اللاكتيك

إن اختيار السلالات والأنواع من بكتريا حامض اللبن يتحدد بنوعية الماده الاولية المتوفرة.ويفضل أن تنتخب السلالات بناءً على المواصفات الآتية (الخفاجي ،1990):

1 -تستطيع أن تستخدم مواد أولية رخيصة .

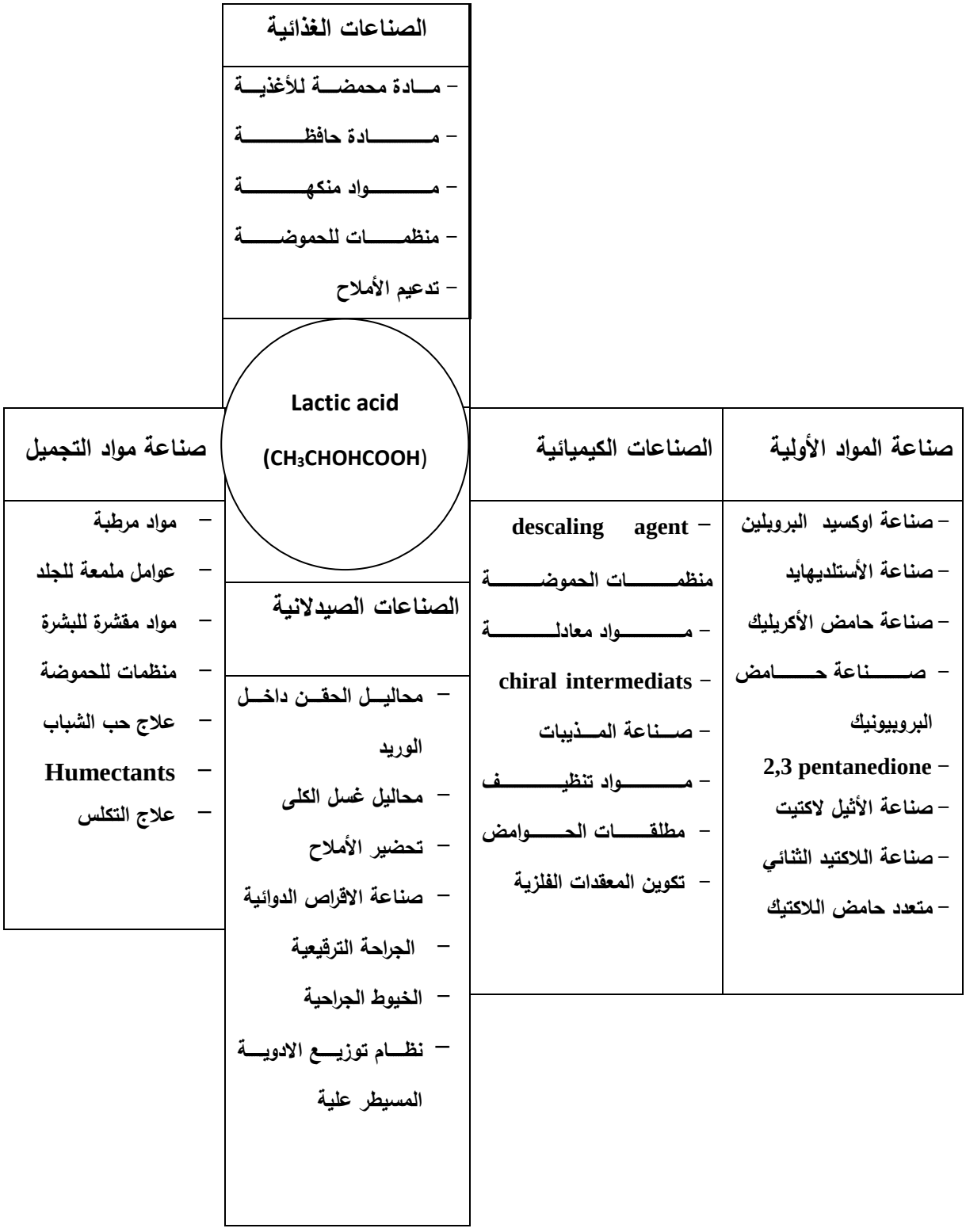
2 -أن تكون متحملة لأرقام هيدروجينية واطئة لتلافي التلوث الذي يحصل نظراً لكونها تنمو في أوساط غذائية غنية .

3 - يفضل استعمال السلالات التي تتحمل درجات حرارية عالية للتقليل من تكاليف التبريد .

4 - أن تكون من نوع متجانسة التخمر كي تكون المواد العرضية الناتجة قليلة.

5 - يفضل أن تستعمل السلالات التي تنتج النظير البصري المطلوب .

جدول (2): التطبيقات والأستخدامات التجارية لحامض اللاكتيك



توجد عدة سلالات بكتيرية وفطرية معروفة بأنتاجها لحامض اللاكتيك ، فقد وجد (Cock and deStouvenel(2006) أن السلالة *Lactococcus lactis* subs *lactis* هي أعلى إنتاجاً للحامض من بين 20 سلالة عائدة لنفس الجنس معزولة من نبات قصب السكر ،بينما وجد Adnan and Tan (2003) من عملية غربلة ثلاث عزلات بكتيرية اشتملت على (*L.casei* TapLac و *L.casei* TapSuc و *Lactococcus lactis* FM) أن كمية الحامض المنتج من العزلة الأولى أعلى من كميته من العزلتين الثانية والثالثة .وأختيرت العزلة *L.plantarum* PTCC 1058 بكونها الأعلى انتاجاً للحامض من بين سبع عزلات بكتيرية، وكذلك أختيرت العزله الفطرية *R.oryzae* PTCC 5263 بكونها الأعلى انتاجاً للحامض أيضاً من بين اربع عزلات فطرية عائدة لنفس النوع (Mirdamadi *et al*.,2002).

1-7 تأثير الظروف البيئية والمزرعية في انتاج حامض اللاكتيك من الأحياء المجهرية

إن التحكم في ظروف العملية التخمرية يفضي الى انتاج وفير من حامض اللاكتيك ، وعموماً فأن اختيار الكائن المجهري المناسب ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والتهوية ونوع وكمية المصدر الكربوني والنيتروجيني وبعض الأملاح الأضافية تعد كلها عوامل اساسية لتحقيق انتاجية مثلى من الحامض (Polat,2002) .

1- تأثير طريقة النمو

استخدمت ظروف هوائية مختلفة لأنتاج حامض اللاكتيك ، حيث تم استخدام الحاضنة الهزازة لتوفير سرع رج مختلفة لأنتاج الحامض، فقد تم إنتاجه من بكتريا *L. rhamnosus* بأستخدام سرعة رج مقدارها (150 دورة/دقيقة) (Abdulkarim *et al*.2006) بينما استخدم Cock and deStouvenel (2006) سرعة رج مقدارها (120 دورة/دقيقة) لأنتاج الحامض من بكتريا *Lactococcus lactis* subs *lactis* . و استخدم Naranony and

Poocharoen(2001) سرعة رج مقدارها (200 دورة/دقيقة) لأنتاج الحامض من الفطر *R.oryzae* NRRL 395 .

واستخدمت المزارع الساكنة ايضاً في الأنتاج فقد اشار Shindo and Tachibana (2004) الى انتاج الحامض من بكتريا *L. rhamnosus* NBRC 3532 تحت ظروف ساكنة . بينما اشارت دراسات اخرى الى انتاج الحامض تحت ظروف لاهوائية، حيث استخدمت اسطوانة النمو اللاهوائي (Anaerobic Jar) في انتاجه من بكتريا *Bifidobacterium longum* و *L.acidophilus* (Hadaji and Bensoltane, 2006) ،فضلاًعن انتاج الحامض بالظروف ذاتها من بكتريا *Enterococcus flavescens* (Agarwal *et al*.,2008).

2- تأثير المصدر الكربوني

يعتمد إختيار مصدر الكربون على المنتوج الرئيسي لعملية التخمر (الحيدري والمصلح ،1989) ويستلزم أحياناً إستخدام مواد أولية لأنتاج حامض اللاكتيك إذ تقوم هذه المواد بتجهيز المصدر الكربوني المناسب ، لذا يجب أن تتصف المواد الأولية بالآتي (الخفاجي ،1990) :

أ- أن تكون رخيصة.

ب-أن تكون حاوية على اقل قدر ممكن من الملوثات.

ت-أن تكون حاوية على نسبة عالية من المواد القابلة للتخمر.

ث-أن تؤدي للحصول على أقصى مايمكن من الحاصل.

ج- أن تؤدي للحصول على اقل مايمكن من النواتج العرضية او بدون نواتج عرضية .

ح- أن تكون متوفرة على مدار السنة وسهلة النقل والخزن.

خ- يفضل أن تكون من النوع الذي لايحتاج الى معاملات اولية ،وذلك لتقليل كلفة الأنتاج .

استخدمت مصادر كربونية مختلفة في انتاج حامض اللاكتيك من الأحياء المجهرية، حيث استخدم Nancib *et al*.(2001) عصير التمر الحاوي على 6 % كلوكوز لأنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L.casei* subsp.*rhamnosus* . واجرى Mirdamadi *et al*.(2002)

مقارنة بين مصادر كربونية مختلفة شملت (الكلوكوز والسكروز واللاكتوز والنشا والكلاكتوز والنشا المتحلل والشرش) ولوحظ تفوق الكلوكوز في انتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L.bulgaricus* و *L. plantarum* ، بينما كان اوطأ انتاج للحامض عند إستخدام النشا . وأشار Rangaswamy and Ramakrishna (2008) الى استخدام مصادر كربونية مختلفة بتركيز 2 % من كل من (متحلل البكاز والسكروز وعصير قصب السكر والكلوكوز والمولاس) لأنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. delbrueckii* وتم تحقيق أعلى إنتاج للحامض عند إستخدام السكروز كمصدر كربوني إذ بلغ انتاجه 20 غم/لتر .

3- تأثير المصدر النيتروجيني

يعد النيتروجين مصدراً ضرورياً لبناء الأحماض الأمينية والبيورينات والبيريميدينات وبعض الكربوهيدرات والدهون والمرافقات الأنزيمية وبعض التراكيب الأخرى وتكون المصادر النيتروجينية في الطبيعة على نوعين : لاعضوية مثل املاح الأمونيوم(كبريتات الأمونيوم – نترات الأمونيوم). أو عضوية تشمل الببتون ومستخلص الخميرة وماء نقيع الذرة (Zhang *et al*.,2007) .

استخدمت عدة مصادر نيتروجينية لأنتاج حامض اللاكتيك من الأحياء المجهرية ، ففي دراسة أجراها Altaf *et al*.,(2007) لأنتاج النظير الضوئي L(+) Lactic acid من بكتريا *L.amylophilus* GV6 في وسط MRS السائل المدعم بـ1% نشا ذائب كان طحين العدس الأحمر وخميرة الخبز أفضل بدائل نيتروجينية من الببتون ومستخلص الخميرة. كما أستخدم ماء نقيع الذرة بتركيز 5 % لأنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *Enterococcus flavescens* (Agarwal *et al*.,2008) . وفي دراسة قام بها Dumbrepatil *et al.* (2007) استخدمت عدة تراكيز للمصدر النيتروجيني ولوحظ ازدياد كمية الحامض المنتج من قبل بكتريا *L.delbrueckii* subs . *delbrueckii* بأزدياد تركيز المصدر النيتروجيني وبلغ أعلى إنتاج للحامض بأستخدام 10 غم/لتر من مستخلص الخميرة.

4- تأثير الرقم الهيدروجيني الأبتدائي

يعد الرقم الهيدروجيني أحد أهم العوامل المؤثرة في عملية إنتاج حامض اللاكتيك. وتبلغ القيمة المثلى لأنتاج الحامض من الأحياء المجهرية (5.0-6.0) (Huang *et al*.,2003) .

يعدل الرقم الهيدروجيني لوسط التخمر الى الوسط المثالي لنمو بكتريا حامض اللاكتيك وعندما يحصل إنخفاض في هذا الرقم بسبب تراكم الحامض يعدل الـ (pH) أثناء التخمير بأضافة مواد معدلة للحموضة مثل هيدروكسيد الصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم والأمونيوم وكربونات الكالسيوم (Prescott and Dunn,1959) .

أشارت العديد من الدراسات الى استخدام الرقم الهيدروجيني 6.5 في إنتاج حامض اللاكتيك ، فقد استخدم هذا الرقم في إنتاج الحامض من بكتريا *L.amylophilus* GV6 (Naveena *et al*.,2004)، وكذلك كان هذا الرقم هو الأمثل لأنتاجه من بكتريا *L. plantarum* MTCC 1407 (Ray *et al*.,2009) . بينما تم إنتاج الحامض من بكتريا *S.bovis* بتعديل الرقم الهيدروجيني للوسط الى 5.5 (Yuwono and Hadi,2008) . في حين استخدم الرقم الهيدروجيني 6.7 في إنتاج النظير الضوئي L (+)Lactic acid من بكتريا *L. rhamnosus* B 103 (deLima *et al*.,2010) .

5- تأثير درجة حرارة الحضن

تلعب درجة الحرارة دوراً مباشراً في التأثير على عملية إنتاج حامض اللاكتيك . وتتباين درجات الحرارة المستخدمة في إنتاج الحامض من الأحياء المجهرية ،فقد ذكر Miyamoto *et al*.(1996) أن درجة الحرارة المثلى لأنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L.casei* 34143 كانت (34.5) مئوية . بينما وجد Huang *et al*.(2003) أن درجة الحرارة المثلى لأنتاج الحامض من الفطر *R. arrhizus* DAR 36017 كانت 30 مئوية . في حين كانت الدرجة الحرارية 27 مئوية هي المثلى لأنتاجة من الفطر *R.oryzae* NRRL 395 (Liu *et al*.,2005).

أشارت دراسات عديدة الى أن درجة الحرارة المثلى لأنتاج الحامض هي 37 مئوية ، حيث استخدمت هذه الدرجة في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *Bifidobacterium longum* (Hadadji and Bensoltane ,2006). ودرس Ostlie *et al*.(2005) قابلية خمس سلالات عائدة لجنس *Lactobacillus* إضافة لبكتريا *Bifidobacterium animalis* BB 12 في انتاج حامض اللاكتيك تحت درجات حرارية مختلفة (20 و30 و37 و45) مئوية ، ولوحظ أن أعلى انتاج للحامض تحقق عند درجة حرارة 37 مئوية . فضلاً عن إنتاجه من السلالة *L.delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ATCC 9649 عند درجة حرارة 40 مئوية . (Busairi ,2010)

6- حجم اللقاح

يعد إنتاج اللقاح أو البادئ من المراحل المهمة جداً في عمليات التخمر الصناعي وفي جميع خطوات تخمر اللقاح ينبغي أن ينمو الكائن الحي المجهري بسرعة وبأعداد كبيرة بحيث تكون المدة اللازمة للتحضين قصيرة نسبياً . وينبغي أن تتراكم نواتج التخمر بقلة وذلك لضرورة نقل الخلايا الى كميات أكبر من البيئة وهي لاتزال في أطوار نموها اللوغارتمية وعادةً ماتكون بيئة اللقاح موزونة من أجل أعطاء نمو خلوي سريع وليس من أجل تكوين الناتج (ساجدي وعلي ،1987) .

لقد استخدمت حجوم لقاح مختلفة في إنتاج حامض اللاكتيك من الأحياء المجهرية ، حيث استخدم King *et al* .(2006) حجم لقاح مقداره 2 % من حجم الوسط في إنتاج الحامض من بكتريا *L. acidophilus*. واستخدم Naveena *et al*.(2004) حجم اللقاح ذاته لأنتاج الحامض من بكتريا *L. amylophilus* GV6. وفي دراسة اخرى لأنتاج الحامض تمت إضافة حجم لقاح مقدارة 10 % من بكتريا *Lactococcus lactis* subs. *lactis* الى وسط الأنتاج المستخدم (Cock and deStouvenel ,(2006) .

7- مدة الحضن

تباينت أوقات الحضن اللازمة للوصول الى اقصى إنتاج لحامض اللاكتيك من الأحياء المجهرية المختلفة، حيث أشارت أغلب الدراسات الى أن اقصى إنتاج للحامض يصل بعد مدة حضن مقدارها 48 ساعة إذ استخدمت مدة الحضن المذكورة في إنتاجه من ست عزلات عائدة لبكتريا حامض اللاكتيك (Ostlie *et al*.,2005) ، بينما أشار Dumbrepatil *et al*.(2008) الى أن أفضل مدة حضن كانت 40 ساعة لأنتاج الحامض من السلالة الطافرة *L.delbrueckii* subsp. *delbrueckii* UC-3 ،على التوالي. واستخدم Agarwal *et al*.(2008) مدة حضن مقدارها 36 ساعة لأنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *Enterococcus flavscens* . وتم الحصول على اقصى إنتاج للحامض من العزلتين البكتيريتين *L. delbrueckii* و *L.gasseri* بأستخدام مدتي حضن 96 و72 ساعة على التوالي (EL-Hawary *et al*.,2009).

ويستغرق الوصول الى أعلى إنتاج لحامض اللاكتيك من الفطريات مدة أطول مقارنةً بالبكتريا ففي دراسة قام بها (Naranong and Poocharoen ,2001) استخدمت مدة حضن مقدارها 5 أيام لأنتاج الحامض من فطر *R.oryzae*.

8-1 تقييد الخلايا (Cell Immobilization)

يقصد بالتقييد (Immobilization) عموماً العملية التي بواسطتها تحدد حركة العوامل المساعدة الحيوية مثل الخلايا أو مشتقاتها أو الأنزيمات (الخفاجي ، 1990). ويشير مصطلح تقييد الخلية الى حفظ الخلية في مكان واحد ، إذ تقتنص الخلايا أو ربما تلصق الى اسطح لزجة وتبقى عائمة في اوساط مغذية سائلة (Mahmoud and Helmy ,2009). وأشار المصدر نفسة الى أن هناك أنواع مختلفة من الخلايا يمكن تقييدها واستعمالها على المستوى التطبيقي تشمل الخلايا الحيوانية (Animal cells) وخلايا الحشرات (Insect cells) والخلايا النباتية (Plant cells) وخلايا الطحالب (Algal cells) والخلايا المايكروبية (Microbial cells).

1-8-1 ملائمة الخلايا كمحفزات حيوية

وجد Jogdand (1993) أن ملائمة الخلية للمحفزات الخلوية تعود للأسباب الآتية :

1- تحوي الخلايا على انزيمات محمية بداخلها.

2- تكون الخلايا أكثر ملائمة من الأنزيمات لأنجاز التفاعلات ذات الخطوات المتعددة وذلك لصعوبة توفير أنظمة مختلفة لأنزيمات مختلفة.

3- يكون استخدام الانظمة الأنزيمية المختلفة مكلفاً.

4- صعوبة عملية عزل أوتنقية الأنزيم دون حصول مسخ (denaturation) له فضلاً عن ارتفاع كلفة هذة العملية .

5- توجد بعض الأنزيمات كأنزيمات مستحثة (Induced enzymes) ويكون من السهل إستغلال هذه الأنزيمات عند إستخدام الخلايا المقيدة .

6- ان معدلات التحويل لمواد التفاعل وكذلك المقاومة للمواد السامة من قبل الخلايا تكون عالية.

1-8-2 فوائد عملية تقييد المحفز الحيوي (Biocatalyst)

أوضح Jogdand (1993) أن فوائد تقييد المحفز الحيوي تتلخص بالآتي :

1- إمكانية إعادة إستخدام المحفز الحيوي أو استمرار استخدامه.

2- عدم تلوث الناتج بالمحفز الحيوي.

3- زيادة ثبوتية الأنزيم او الخلية بعملية التقييد.

4- تؤدي عملية التقييد الى زيادة تركيز المحفز الحيوي مما يتطلب الحاجة الى مفاعل صغير الحجم لتحقيق نفس الأنتاجية .

5- تمكن عملية التقييد من إستغلال أنواع مختلفة من المفاعلات المخمرة.

6- يكون توزيع الأنزيمات اوالخلايا المقيدة منتظماً في كافة أنحاء المفاعل.

1-8-3 المواد المستخدمة في التقييد

إن المواد المستعملة في هذا المجال كثيرة ويعتمد اختيار أفضلها للتقييد على العامل المساعد المراد تقييدة والغرض من التقييد (الخفاجي ،1990).

أوضح Junyan *et al*.(2006) أن المواد شائعة الأستخدام بوصفها مساند في عملية التقييد تتضمن المساند العضوية (Organic carriers) ومساند الجزيئات الكبيرة (Macromolecule carriers) والمساند اللاعضوية (Inorganic carriers).

وتصنف مساند الجزيئات الكبيره الى :

أ- مواد غير صناعية (Inartificial Materials)

تتضمن الكاراجينان(Carrageenan) والكلوتين (glutin) والأكار (Agar) والكايتين (Chitin) والكيتوزان (Chitosan) والجينات الكالسيوم (Calcium alginate) وخلات السيليلوز (Cellulose acetate) والفايبرين (Fibrin) ...الخ.

ب - مواد مخلقة صناعياً (Artificial Synthesized Materials)

تتضمن بشكل رئيسي البولي اكريلأمايد (Poly acrylamide ,PAM) وكحول متعدد الفاينيل (Poly vinyl alcohol,PVA) وراتنج البولي يوريثان (Poly urethane resin) والراتنج الحساس للضوء(Photosensitive resin) وأوكسيد البولي ايثلين (Polyethylene oxide,PEO) ...الخ.

1-8-4 متطلبات المسند المثالي للمزرعة الخلوية

أوضح Mahmoud and Helmy(2009) أن المسند المثالي للمزرعة الخلوية يجب أن يلبي المتطلبات الآتية قدر الأمكان :

1 - ان يكون ذا سعة تحمل عالية للكتلة الخلوية .

2- سهولة وصولها الى الوسط الغذائي .

3 - ان تكون طريقة تقييد بسيطة وغير سامة .

4 – ان تكون هناك مسافة إنتشار مثلى من الوسط الغذائي الى مركز المسند .

5- التعقيم .

6- ذو ثبات ميكانيكي .

7-امكانية إعادة استخدامه .

8- سهولة فصل الخلايا والمسند من الوسط .

9- ملائمته لأنظمة المفاعل التقليدية .

10- ملائمته لتعليق ورسو الخلايا.

1-8-5 طرق تقييد الخلايا

على الرغم من وجود طرق عديدة لتقييد المحفزات الحيوية عموماً الاّ ان الطرق ذات العلاقة بتقييد الخلايا (Jogdand ,1993) تكاد تنحصر بالآتي :

1- الحجز (Entrapment)

لاترتبط الأنزيمات أو الخلايا مباشرة على سطح المادة الساندة لكنها تحتجز أو تحبس داخل بوليمر مثل الجينات الكالسيوم وخلات السيليلوز والكلولاجين والبولي اكريلأمايد والكاراجينان ...الخ. وتحدث عملية الحجز أو الحبس بواسطة مزج الخلايا أوالأنزيمات مع محلول الوحدة

الأساسية للمادة الساندة (Monomeric solution) لتتم بعد ذلك عملية البلمرة عن طريق التفاعلات الكيميائية أو تغيرات في درجة الحرارة إذ تأخذ البوليمرات في النهاية شكل دقائق أو كتل صغيرة .

تمتاز هذه الطريقة ببساطتها فضلاً عن أن ظروف تحضيرها مناسبة . اما عيوبها فتتلخص بأمكانية استرداد المحفز الحيوي من بعض الهلامات وقشط وانضغاط بعض الهلامات فضلاً عن وجود محددات لأنتشار المواد الأساس الكبيرة .

2- الأدمصاص (Adsorption)

يعد الأدمصاص أنسب طريقة للتقييد ويحدث عن طريق اواصر أيونية وهيدروفوبية وهيدروجينية . ان المزج البسيط بين المحفز الحيوي وراتنج التبادل الأيوني يمكن أن يحقق هذه الطريقة. ويحدث الأدمصاص بعد حصول تغيرات في الرقم الهيدروجيني والقوة الأيونية أو تركيز المادة الأساس .ومن اكثر الراتنجات شيوعاً في الأستخدام هي راتنجات التبادل الأيوني السيليلوزية. وتمتاز هذه الطريقة بالبساطة وتوفر البوليمرات المستخدمة في الأدمصاص وملائمة ظروف التحضير وعدم وجود محددات على وصول المادة الاساس للأنزيم فضلاً عن امكانية استخدامها للخلايا الكاملة والعضيات . اما مساوئ هذه الطريقة فتتمثل بأرتشاح المحفزالحيوي بسهولة عند حصول تغيرات في الرقم الهيدروجيني او القوة الأيونية وكذلك عند استخدام مادة اساس تحمل نفس شحنة المسند.

3- التغليف (Encapsulation)

تغلف الخلايا أو الأنزيمات بغشاء شبه نفاذ يسمح بمرور جزيئات المادة الأساس والناتج دون أن يسمح بمرور الأنزيمات . يتكون الغشاء شبه النفاذ من مواد النايلون (Nylon) والراتنج (Silastic resin) وفوسفوليبيدات نترات السيليلوز (Cellulose nitrate phospholipids) الاّ انها لاتظهر بالقوة الكافية لأستخدامها على المستويات الكبيرة (large scale use).

تعد هذه التقنية بسيطة ورخيصة وتعطي نسبة مساحة سطح /حجم عالية . أما مساوئها فهي توفر حماية وثباتية قليلة للأنزيم المغلف .

4- التكتيل (Flocculation)

تتجمع بعض أنواع الخلايا المايكروبية بشكل طبيعي في حين أن هنالك بعض الخلايا أو الأنزيمات تتجمع بأرتباطات عرضية من خلال مزجها مع بعض الكواشف مثل الكلوترالديهايد الذي يتفاعل مع مجاميع الأمين (β) للايسين في البروتينات وغالباً مايشترك أو يرتبط مع بروتينات خاملة مثل الألبومين . وعلى الرغم من وجود كواشف متنوعة الاّ أن الكلوترالديهايد فقط حظي بأستخدام صناعي واسع نظراً لأمكانية تفاعله تحت ظروف بسيطة .

1-8-6 الأمور الواجب مراعاتها للحصول على تقييد كفوء

لكي تكون تقنية التقييد كفوءة يجب مراعاة النقاط الآتية (Jogdand ,1993) :

1- إختيار سلالة مناسبة من الكائن المجهري أو الأنزيم المناسب .

2- إختيار طريقة التقييد المناسبة .

3- عدم حصول فقد في الخلايا أو الأنزيمات .

4- عدم وجود محددات إنتشار لمادة التفاعل .

5- عدم حصول إنضغاط أو تلف في المفاعل .

6- إختيار الظروف التي تزيد الفعالية والثبوتية .

استخدمت طرق متنوعة لتقييد خلايا بكتريا حامض اللاكتيك وإنتاج الحامض منها ، ففي دراسة قام بها Mirdamadi et al .(2008) تضمنت إستخدام مساند مختلفة لتثبيت بكتريا *L.casei* subs. *casei* ATCC 39392 شملت الجينات الباريوم بتركيز 4 % والأكار-أكار بتركيز 2 % والبولي يوريثان ، وأظهرت الدراسة أن اعلى إنتاج من الحامض تحقق بأستخدام الخلايا المثبتة بمادة الجينات الباريوم إذ بلغت كمية الحامض المنتجة 60 غم/لتر بعد مدة حضن مقدارها 96 ساعة. وكذلك درس Gundus (2005) تأثير تركيز المادة الساندة في انتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L.casei* NRRL B-441 حيث استخدم تراكيز متدرجة من الجينات الصوديوم

(1 و2 و3)% ولوحظ أن أعلى إنتاج للحامض تحقق عند التركيز 1% من المادة الساندة إذ بلغت كمية الحامض المنتجة 127.8 غم/لتر، بينما استخدم Sun *et al.*(1998) مادة (poly urethane foam cubes) لتقييد خلايا الفطر *R. oryzae* لأنتاج النظير الضوئي L Lactic acid (+) حيث بلغت كمية الحامض المنتجة 60 غم/لتر.

1-9 إستخلاص وتنقية حامض اللاكتيك

يعد إستخلاص وتنقية نواتج التخمر من الأمور الصعبة والمكلفة وتستخدم عدة طرق من أجل تحسين عملية إستخلاص وتنقية حامض اللاكتيك، فبعد انتهاء عملية التخمر تضاف كمية إضافية من هيدروكسيد الكالسيوم لتثبيت الـ pH على 10 عندها يسخن وسط التخمير ويرشح حيث يتحول كل حامض اللاكتيك الى لاكتات الكالسيوم .ويستخلص الحامض من السائل بطرائق متعددة ، فأما أن يركز السائل الى أن تتبلور لاكتات الكالسيوم ثم يضاف حامض الكبريتيك لأزالة الكالسيوم ككبريتات الكالسيوم ثم يعاد بلورة حامض اللاكتيك كلاكتات الكالسيوم. واما ان يستخلص حامض اللاكتيك الحر بواسطة (Isopropyl ether) ثم يستخلص من الكحول بالماء الحار. اما الطريقة الثالثة فيستخلص فيها بواسطة (Methyl ester) وتقطيره ثم تحليل الأستر بالماء المغلي ، ثم يستخلص الحامض بالتبخير والميثانول بالتقطير(الحيدري والمصلح ،1989).

كما استخدمت طرائق الترسيب في تنقية الحامض فقد أشار Magnuson and Lasure(2004) الى إمكانية تنقية الحامض من الفطريات بالترسيب من المستخلص الكحولي.

وفي الآونة الأخيرة تركزت الدراسات المتعلقة بطرائق استخلاص وتنقية حامض اللاكتيك من السوائل التخمرية على محاولة إيجاد طريقة بسيطة بتكاليف قليلة وبأقل مقدار من الضائعات فضلاً عن تقليل التأثيرات السلبية على البيئة المحيطة (Timmer *et al.*,1994; Matsumoto *et al.*,1998; Frieling and Schugerl ,1999; Cao *et al.*,2002).

وتعد طرائق الأغشية (Membrane techniques) المتمثلة بالديلزة الكهربائية (Electrodialysis) والترشيح الدقيق (Nanofilteration) طرائقاً واعده لتنقية حامض

اللاكتيك. فقد نجح Habova *et al.*(2004) في تنقية الحامض بأستخدام الديلزه الكهربائية عبر خطوتين إذ بلغ التركيز النهائي للحامض 151 غم/لتر.

اما طرائق التبادل الأيوني فقد أختيرت أخيراً كطرائق بديلة لتنقية الحامض من السوائل التخمرية نظراً لما حققته من نتائج جيدة لاسيما على المستوى المختبري،ففي دراسة قام بها Polat (2002) تم إستخدام المبادل Dowex Marathon WBA في تنقية L(+)Lactic acid من بكتريا *L.casei* NRRL B441 وبلغت الحصيلة النهائية للحامض 95%. وأشار Gonzalez *et al.*(2006) الى أنه بعد ترويق سائل التخمر أمكن تنقية الحامض المنتج من بكتريا *L.helveticus* بخطوتي تبادل أيوني تضمنت الأولى استخدام المبادل الكتأيوني (Lewatile S 2568) في حين تضمنت الخطوة الثانية استخدام المبادل الانأيوني (Lewatile S 3428).

1-10 وراثة بكتريا *Lactobacillus*

نظراً لكون جنس الـ *Lactobacillus* يمثل أكبرمجموعة ضمن عائلة Lactobacteriaceae (يحتوي اكثر من 100 نوع) ونظراً للأستخدامات الواسعة لهذا الجنس فقد كان ذلك حافزاً للقيام بدراسات مايكروبايولوجية وكيموحيوية ووراثية مفصلة عنه Canchaya *et al.*(2006). ومن الدراسات الوراثية عن بكتريا الـ *Lactobacillus* تم تحليل جينوم 15 سلالة من هذا الجنس (Zhu *etal*.2009) وتم الحصول على النتائج الموضحة في الجدول (3).

يتضح من الجدول (3) أن حجم الجينوم لبكتريا *Lactobacillus* المستخدمة في هذه الدراسة يتراوح بين (1.8-3.3) ميكا قاعدة (Mb) ونسبة (GC) تتراوح بين (32.9-51.5)% . في حين امتلكت السلالة *L.salivarius* UCC 118 أصغر كروموسوم و تميزت بأحتوائها على البلازميد الكبير (Megaplasmid Pmp 118) الذي يبلغ حجمه (242) كيلو قاعدة(Kb)، كما وجدت بلازميدات كبيرة بحجم (120- 490) كيلو دالتن في ستة أنواع اخرى

جدول(3): تحليل جينوم بعض السلالات العائدة لبكتريا *Lactobacillus*

السلالة	المحتوى من كوانين– سايتوسين % (GC)	حجم الجينوم (Mb)	عدد الجينات
***L.acidophilus* NCFM[a]**	34.7	1.99	1,936
***L.brevis* ATCC367[b]**	46.2	2.34	2,314
***L. casei* ATCC 334[a]**	46.6	2.92	2,909
***L.casei* BL23[b]**	46.3	3.08	3,044
***L.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC 11842[C]**	49.7	1.86	2,217
***L.delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ATCC-BAA-365[C]**	49.7	1.86	2,040
***L.fermentum* IFO 3956[b]**	51.5	2.10	2,912
***L.gasseri* ATCC 33323[C]**	35.3	1.89	1,898
***L.helveticus* DPC 4571[C]**	37.1	2.08	1,838
***L.johnsonii* NCC 533[C]**	34.6	1.99	1,918
***L.plantarum* WCFS1[b]**	44.5	3.35	3,135
***L. reuteri* F275[b]**	38.9	2.00	2,027
***L. reuteri* JCM 1112[b]**	38.9	2.04	1,901
***L. sakei* ssp. *sakei* 23K[b]**	41.3	1.88	1,963
***L.salivarius* ssp. *salivarius* UCC118[b]**	32.9	2.13	1,864

عائدة لنفس الجنس اشتملت على (*L.hamsteri* و *L.intestinalis* و *L.kalixen* و *L. ingluviei* و *L. acidophilus* و *L. equi*)(Li *et al*.,2007) .

تحتوي السلالة *L. plantarum* WCFS1 على ثلاثة بلازميدات بأحجام (1.9 و2.3 و36) كيلو قاعدة (Vankranenburg *et al*.,2005) ، بينما تحوي السلالة *L. salivarius* UCC 118 بلازميدين بأحجام (20 و44) كيلو قاعدة (Flynn,2001)، في حين لاتحوي السلالات الأخرى أي بلازميد بالرغم من أن قطع (replicons) خارج الكروموسوم شائعة في بكتريا *Lactobacillus* (Wang and Lee ,1997).

وتضمنت دراسة أخرى المقارنة بين حجم الجينوم لسلالتين من بكتريا *Lactobacillus* و تبين أن (2.0 و3.3) ميكاقاعدة هما حجما جينومي بكتريا *L.johnsonii* و *L.plantarum* ، على التوالي (Boekhorst *et al* .,2004) .وقام Dudez *et al*.(2002) بتقدير حجم كروموسوم بكتريا *L.sakei* 23K فأتضح أنه يساوي (80 ±1845) كيلو قاعدة .

وتبين أن كروموسوم بكتريا *L.casei* يحوي كروموسوماً حلقياً بحجم مقدارة(848 861 2) قاعدة فضلاً على إحتوائه على بلازميد بحجم 36 كيلو قاعدة (Zhang *et al*.,2008) . وكذلك أظهرت الدراسة نفسها أن محتوى الكروموسوم من (G+C) بلغ 46.5 % بينما امتلك البلازميد اوطأ محتوى منها .

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

2 -المواد وطرائق العمل

2-1 الأجهزة والمواد المستخدمة

2-1-1 الأجهزة والأدوات المستخدمة : يبين الجدول الآتي الأجهزة والأدوات المستخدمة في هذه الدراسة والشركات المصنعة لها .

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة والمنشأ
-1	ميزان حساس (Sensitive balance)	Sartorious – Germany
-2	مقياس الرقم الهيدروجيني(pH- meter)	Mauritius – Germany
-3	حاضنة (Incubator)	Fisher Scientific – Germany
-4	حاضنة هزازة (Shaking incubator)	Labtech – Korea
-5	حمام مائي (Waterbath)	Tafesa – Germany
-6	مجهر ضوئي (Microscope)	Motic – Germany
-7	جهازطرد مركزي (Centrifuge)	Hettich – Germany
-8	جهازطرد مركزي مبرد(Cooling centrifuge)	Hettich
-9	مؤصدة(Autoclave)	YX – 280 B –China
-10	حجيرة تلقيح (Laminar flow cabinet)	Jeiotech – Korea
-11	مطياف ضوئي (Spectrophotometer)	Tudor – Korea
-12	فرن (Oven)	Memmert – Germany
-13	اسطوانة النمو اللاهوائي (Anaerobic Jar)	HIMEDIA-India
-14	ماصات دقيقة (Micropipettes)	Human – German
-15	جهاز مزج ذو الصفيحة الساخنة(Magnetic Stirrer With Hot Plate)	Labtech- Korea
-16	مطياف ضوئي بالاشعة الفوق البنفسجية (Ultraviolet spectrophotometer)	Chrom Tech-Taiwan
-17	مضخة تفريغ (Vaccum pump)	Japan
-18	جهاز تقطير (Distiller)	GFL - Germany

-19	مازج (Vortex)	ROMA- Italy
-20	جهاز الترحيل الكهربائي (Gel electrophoresis)	Cleaver
-21	كاميرا رقمية (Digital camera)	Sony- Japan

2-1-2 الأوساط الزرعية والمواد الكيميائية :

يبين الجدول الآتي الأوساط الزرعية والمواد الكيميائية المستخدمة في هذه الدراسة والشركات المصنعة لها.

ت	المادة	الشركة المصنعة
-1	وسط (MRS) الصلب (MRS agar)	HIMEDIA/India
-2	وسط (MRS) السائل (MRS broth)	HIMEDIA
-3	أكار-أكار (Agar –Agar)	HIMEDIA
-4	أكار سايمون السترات(Simmon Citrate Agar)	HIMEDIA
-5	وسط المرق المغذي(Nutrient Broth)	HIMEDIA
-6	ببتون (Peptone Bacteriological)	HIMEDIA
-7	وسط (Muller Hinton Agar)	HIMEDIA
-8	مستخلص الخميرة(Yeast Extract)	HIMEDIA
-9	الأكاروز(Agarose)	HIMEDIA
-10	حامض اللاكتيك القياسي L(+)Lactic acid	HIMEDIA
-11	كاشف(p-phenyl – phenol)	HIMEDIA
-12	جيلاتين(Gelatin)	MERCK/Germany
-13	صبغة البروموفينول الأزرق (Bromo phenol blue)	MERCK
-14	كاربونات الكالسيوم ($CaCO_3$,Calcium Carbonate)	MERCK
-15	كبريتات المغنيسيوم المائية($MgSO_4 .7H_2O$,Magnesium sulphate)	Carloerba
-16	نترات الصوديوم($NaNO_3$, Sodium Nitrate)	Carloerba

ت	المادة	الشركة المصنعة
17-	فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين (Potassium Monohydrogen Phosphate, K_2HPO_4)	Analar/England
18-	ثنائي نترو حامض السالسليك(3,5 Dinitro Salecylic Acid)	Sigma/USA
19-	كلوريد الأمونيوم (Ammonium Chloride, NH_4Cl)	Carloerba
20-	يوريا (Urea)	Carloerba
21-	كلوريد الكالسيوم(Calcium Cloride , $CaCl_2$)	Carloerba
22-	الفينول ألأحمر (Phenol Red)	BDH/ England
23-	كبريتات النحاس المائية (Copper Sulfate , $CuSO_4.5H_2O$)	BDH
24-	الدايوكسان(Dioxane)	BDH
25-	الأيزوبروبانول(Isoprobanol)	BDH
26-	كبريتات الأمونيوم ($(NH_4)_2SO_4$,Ammonium sulfate)	BDH
27-	كحول اثيلي مطلق (Absolute Ethanol)	GCC/ U.K
28-	كحول اثيلي 70% (Ethanol)	GCC
29-	اسيتون (Aceton)	GCC
30-	هيدروكسيد الصوديوم (Sodium Hydroxide , NaOH)	THOMAS BAKER
31-	كلوروفورم (Chloroform)	BDH
32-	حامض الخليك الثلجي (Glacial acetic acid , CH_3COOH)	BIOSOLVE
33-	حامض الهيدروكلوريك (Hydrochloric Acid , HCL)	Analytical Rasayan
34-	صبغة البروموكريسول الخضراء(Bromocresol green)	MUMBAI 400-030
35-	حامض الكبريتيك (Sulfuric Acid , H_2SO_4)	SEARLE
36-	كلوريد الصوديوم (Sodium Chloride , NaCl)	THOMAS BAKER
37-	كبريتات المنغنيز المائية (Manganese Sulphate . $4H_2O$)	Riedel –De -Haen AGseelze Hannover – W.Germany
38-	بيروكسيد الهيدروجين (Hydrogen peroxide , H_2O_2)	Manufacture
39-	كاشف كوفاكس (Kovac's reagent)	Bio Mer'ieux - W. Germany
40-	(Sodium dodycyl Sulphate) SDS	BDH

ت	المادة	الشركة المصنعة
41-	سترات ثنائية الأمونيوم , (diAmmonium hydrogen Citrate $(NH_4)_2\ C_6H_6O_7$)	Riedel-De-Haen AGseelze Hannover-W. Germany
42-	صفائح السليكا	MERCK
43-	(diSodium. Ethylene diamine Tetra acetic Acide , Na_2EDTA)	Carloerba
44-	صبغة غرام (Gram stain)	معهد المصول واللقاح العراقية (VSI)
45-	رباعي مثيل بارافينيلين ثنائي امين ثنائي هيدروكلورايد (Tetra methyl P-Phenylen diamine dihydrochloride)	BDH
46-	بروميد الأثيديوم (Ethidium bromide)	Sigma
47-	اللاكتوز (Lactose)	Sigma
48-	السكروز (Sucrose)	BDH
49-	الكلوكوز(Glucose)	AFCO/India
50-	مانيتول (Mannitol)	HIMEDIA
51-	سوربيتول (Sorbitol)	HIMEDIA
52-	اينوسيتول(Inositol)	HIMEDIA
53-	رامينوز(Rhamnose)	HIMEDIA
54-	ارابينوز (Arabinose)	HIMEDIA
55-	مليبايوز(Melibiose)	HIMEDIA
56-	توين 80 (Tween 80)	HIMEDIA
57-	الترس القاعدي (Tris base)	HIMEDIA
58-	المبادل الأيوني (Amberlite IR-400)	HIMEDIA
69-	المبادل الأيوني Amberlite IR-120 (H)	HIMEDIA
60-	بلازما الأرنب (Rabbit blasma)	BD BBL
61-	اللايسوزايم (Lysozyme)	HIMEDIA
62-	صبغة (Malachite green)	HIMEDIA
63-	اقراص المضادات الحيوية (Antibiotec disks)	Bioanalyse

2–2 طرائق العمل :

2-2-1 جمع العينات

تم جمع 30عينة من مصادر مختلفة لعزل بكتريا *Lactobacillus* اشتملت هذه العينات على الحليب الخام والمخللات والألبان الريفية والشرش والألبان الرائبة المعملية، حيث تم جلبها الى المختبر بأنابيب بلاستيكية معقمة محكمة الغلق.

2-2-2 عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus*

2-2-2-1 – الأوساط الزرعية المستخدمة

أ – وسط (MRS) الصلب (DeMan Rogosa and Sharpe Agar)

استخدم هذا الوسط لعزل وتنقيه بكتريا *Lactobacillus* وحفظها، وحضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بأذابة 67.15 غم من الوسط في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 1 لتر. وعقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مئوية لمدة 15 دقيقة ، وتم صبه في اطباق بتري وانابيب مائلة لعمل (slant) .

ب – وسط (MRS) السائل

استخدم هذاالوسط لتنمية وتنشيط بكتريا *Lactobacillus* وحضر بحسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بأذابة 55.15 غم في كمية من الماء المقطر ، وبعد اتمام عملية الأذابة أكمل الحجم الى 1 لتر ، ثم وزع في انابيب اختبار وعقم بالمؤصدة .

ت – وسط إختبار الحركة (Motality test medium)

حضر هذا الوسط بأضافة 4 غم من مسحوق الأكار – اكار الى 20 غم من مسحوق (Nutrient broth) وأذيبت المحتويات في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الاذابة أكمل الحجم

الى1 لتر ، ثم وزع الوسط في أنابيب وعقمت بجهاز المؤصدة . استعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على الحركة (Collee *et al*., 1996) .

ث – وسط إختبار الأندول (Indol test medium)

حضر هذا الوسط بأذابة 20 غم ببتون و 5 غم من كلوريد الصوديوم في كمية من الماء المقطر وبعد ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.4 أكمل الحجم الى 1 لتر بالماء المقطر

ثم وزع الوسط في أنابيب وعقمت بالمؤصدة (وحيد ،2008) .

ج – وسط استهلاك السترات (Simmons Citrate Agar, SCA)

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بأذابة 24.28 غم من الوسط في كمية من الماء المقطر ، وبعد إتمام عملية الاذابة أكمل الحجم الى 1 لتر ووزع في انابيب اختبار وعقم بالمؤصدة .

ح – وسط تحلل الجيلاتين (Gelatin Liquification Medium)

حضر بأذابة 10 غم من الجيلاتين في 100 مل من الوسط الغذائي السائل (Nutrient broth) ثم ضبط الرقم الهيدروجيني الى 6.5 وعقم في المؤصدة . استخدم هذا الوسط لأختبار قابلية البكتريا على إنتاج انزيم الجيلاتينيز .

خ – وسط تخمير الكربوهيدرات (Carbohydrate fermentation medium)

استخدم الوسط الموصوف من قبل (1996). Collee *et al* مع بعض التحويرفي اختبار قابلية بكتريا *Lactobacillus* على تخمير السكريات .حيث حضرت مكونات وسط (MRS) السائل الخالية من الكلوكوز ومستخلص اللحم، لذا فأن الوسط المذكور يتكون من 10 غم ببتون و 5 غم مستخلص الخميرة و 2 غم فوسفات البوتاسيوم الثنائية [K_2HPO_4] و 2 غم سترات ثنائية الأمونيوم [$(NH_4)_2\ C_6\ H_6\ 0_7$] و 0.05 غم كبريتات المنغنيزالمائية و 0.2 غم

كبريتات المغنيسيوم المائية و 1مل Tween 80 .وضبط الرقم الهيدروجيني الى 6.5 ثم اضيفت السكريات بنسبة 1 % واضيف دليل الفينول الاحمر بتركيز 0.05 % ثم وزع في انابيب وعقمت في المؤصدة.

د – وسط Muller Hinton Agar

استخدم هذا الوسط للكشف عن حساسية البكتريا للمضادات الحيوية .وحضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بأذابة 38 غم في كمية من الماء المقطر ، وبعد اتمام عملية الأذابة اكمل الحجم الى 1 لتر وعقم بالمؤصدة.

2-2-2-2 الكواشف والمحاليل المستخدمة

أ- كاشف الكاتليز (Catalase reagent)

استخدمت مادة بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3 % للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الكاتليز (وحيد ، 2008) .

ب- كاشف الأوكسديز (Oxidase reagent)

حضر 1% من مادة رباعي مثيل بارافنيلين ثنائي امين ثنائي هيدروكلورايد (Tetramethyl p-phenylen-diamine dihydrochloride) المجهزة من شركة (BDH) (وحيد، 2008) .

ج- كاشف كوفاكس (Kovacs reagent)

المجهز من شركة Bio –merieux الفرنسية .

د- صبغة غرام (Gram stain)

المجهزة من معهد المصول واللقاح العراقية (VSI)

هـ- محلول الملح الفسلجي (Normal saline)

حضر هذا المحلول بأذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الأذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

و- صبغة Malachite green

حضرت هذه الصبغة بأذابة 5 غم من مادة Malachite green في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الأذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر (Garg , 2003).

ز- المضادات الحيوية

استخدمت اقراص المضادات الحيوية المجهزة من شركة Bio- analyse وقد شملت:

- Ciprofloxacin (CIP) (5mcg)
- Clindamycin (DA) (2mcg)
- Tetracycline (TE) (30mcg)
- Nalidixic acid (NA) (30 mcg)
- Cefotaxime (CTX) (30mcg)
- Neomycin (N) (30mcg)
- Cloramphenicol (C) (30mcg)
- Sulphamethoxazole (SMZ) (100mcg)
- Oxacillin (OX) (1mcg)

ح- محاليل كلوريد الصوديوم بالتراكيز (1.5 و4.5 و7.5 و10) %

حضرت هذه المحاليل بأذابة الكميات الآتية(1.5 و4.5 و7.5 و10) غم من كلوريد الصوديوم كل على انفراد في 100 مل من وسط MRS السائل .

3-2-2-2 طريقة العزل والتشخيص

يمكن تلخيص عملية العزل والتشخيص بالمخطط الآتي :-

مخطط (2): عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus*

2-2-2-4 تشخيص بكتريا *Lactobacillus*

شخصت عزلات بكتريا *Lactobacillus* على وفق ماجاء في (Krieg and Holt 1984), حيث تم الأعتمادعلى الصفات المظهرية والفحوصات الكيموحيوية في التشخيص.

2-2-2-4-1 الفحوصات المجهرية:

1- تصبيغ البكتريا

تم انتقاءالمستعمرات النامية على وسط MRS الصلب وتم تصبيغ الخلايا بصبغة غرام للتعرف على شكل الخلايا وتجمعاتها.

2- اختبار الحركة :

لقحت الأنابيب الخاصة بأختبار الحركة بطريقة الطعنة وحضنت بدرجة 37 مئوية لمدة تتراوح بين(24-48) ساعة .ان انتشار النمو خارج حدود الطعنه دلالة على ايجابية الأختبار .

2-2-2-4-2 الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)

1- إختبار الكاتاليز (Catalase test)

اجري هذا الأختبار بمزج مستعمرة بكتيرية بعمر (18-24) ساعة مع قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين 3% المحضر في الفقرة (2-2-2-2- أ) على شريحة زجاجية نظيفة. ان ظهور الفقاعات دليل على ايجابية الأختبار (وحيد،2008).

2- إختبار الأوكسديز (Oxidase test)

تم نقل مستعمرة بكتيرية بعمر يتراوح بين(18-24) ساعة بواسطة عود خشبي معقم (stick) الى ورقة ترشيح وأضيف لها قطرة من كاشف الأوكسديز. فتحول لون المستعمرة الى اللون البنفسجي الغامق دليل على ايجابية الأختبار (وحيد ،2008).

3- إختبار الجيلاتينيز(Gelatinase test)

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط الجيلاتين المحضر في الفقرة (2-2-2-1- ح) من مزروع العزلات المنشطة على وسط MRS الصلب بطريقة الطعن وحضنت بدرجة 37 مئوية لمدة 48 ساعة .وبعد انتهاء مدة الحضن وضعت في حمام ثلجي. ان بقاء الوسط في حالته السائلة دون تصلبه دليل على ايجابية الأختبار (Malathi and Jyostna ,2009).

4- إستهلاك السترات (Citrate utilization)

زرعت العزلات بعمر 24 ساعة على الوسط الزرعي (SCA) المحضر في الفقرة (2-2-2-1- ج) ثم حضنت بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 7 أيام .تغير لون الوسط الى الأزرق يعد نتيجة موجبة (وحيد،2008).

5- إختبار الأندول (Indol test)

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط الأندول بمزروع بكتيري بعمر (18-24) ساعة . وحضنت بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة (24-48) ساعة وبعد اكمال مدة الحضن أضيف اليها بضع قطرات من كاشف كوفاكس، ظهور اللون الأحمر يعد نتيجة موجبة (وحيد ، 2008).

6- إختبار تخمير السكريات (Sugar fermentation test)

لقحت الانابيب الحاوية على وسط تخمير السكريات بمزارع عمرها 24 ساعة وحضنت بدرجة 37 مئوية لمدة5 ايام مع فحص النتائج يوميا . تغير لون الوسط الى اللون الاصفر يعد نتيجة موجبة (Collee *et al.* , 1996) .

7- إختبار قابلية البكتريا على النمو بتراكيز ملحية مختلفة

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط MRS السائل والحاوي على تراكيز ملحية مختلفة المحضرة في الفقرة (2-2-2-2- ح) بمزروع بكتيري نشط بعمر 24 ساعة ثم حضنت بدرجة 37 مئوية لمدة 24 ساعة. ان قابلية البكتريا على النمو في تلك التراكيز الملحية دليل على ايجابية الأختبار (Reuter *et al*.,2002).

8- اختبار الحساسية للمضادات الحيوية

تم نشر 0.1 مل من مزروع بكتيري منشط على وسط MRS السائل بعمر 24 ساعة على وسط Muller Hinton الصلب ، ثم وضعت اقراص المضادات الحيوية على سطح الوسط وحضنت بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 24 ساعة . وبعد اكتمال مدة الحضن تم قياس اقطار تثبيط نموالبكتريا (ملم) .

2-2-2-5 حفظ عزلات بكتريا *Lactobacillus*

لقحت أنابيب حاوية على وسط MRS الصلب بشكل مائل بالعزلات البكتيرية وحضنت في درجة حرارة 37 مئوية لمدة 48 ساعة ثم حفظت في الثلاجة حيث تم تجديد المزارع شهرياً.

2-2-3 غربلة عزلات بكتريا *Lactobacillus* لأنتاج حامض اللاكتيك

2-2-3-1 العزلات المستخدمة في الدراسة

استخدمت 24 عزلة من بكتريا *Lactobacillus* منها 20 عزلة عزلت في هذه الدراسة اضافة الى ثلاث عزلات تم الحصول عليها من كلية الطب البيطري /جامعة بغداد.أما العزلة الأخيرة فكانت بكتريا *L. acidophilus* وقد تم الحصول عليها من كلية الزراعة /جامعة بغداد.

2-3-2-2 تحضير اللقاح

استخدم وسط MRS السائل المحضر في الفقرة (2-2-2-1- ب) لغرض تحضير اللقاح، حيث وزع الوسط المذكور في انابيب بواقع 5 مل لكل أنبوبة ثم عقم بالمؤصدة .وحضر اللقاح لكل عزلة من عزلات بكتريا *Lactobacillus* المستخدمة في هذه الدراسة بنقل عروة كاملة (Loopfull) من العزلة المنماة على وسط (MRS) الصلب (2-2-2-1- أ) (كلاً على انفراد) الى الأنبوبة المخصصة لها الحاوية على وسط MRS السائل المحضر أعلاه وحضنت الأنابيب في الحاضنة على درجة حرارة 37 مئوية لمدة 18 ساعة للحصول على اللقاح.

2-3-2-3 تحضير وسط الأنتاج

استخدم وسط MRS السائل أيضاً كوسط انتاجي لغربلة عزلات بكتريا *Lactobacillus* إذ تم توزيعه في عبوات زجاجية (Vials) محكمة الغلق سعة 20 مل وبواقع 10مل لكل عبوة وتم تعقيمها بجهاز المؤصدة وبعد ان بردت الفيالات الى درجة حرارة الغرفة أصبحت جاهزة لعملية التلقيح.

2-3-2-4 تلقيح وسط الأنتاج

تم تلقيح وسط الأنتاج بحجم لقاح مقداره 2% من حجم الوسط لكل من العزلات الاربع والعشرين التي شملتها الغربلة وتمت التنمية بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 48 ساعة وبأستخدام ظروف نمو مختلفة اشتملت على الحاضنة الساكنة (Static) والحاضنة الهزازة (Shaker incubator) بسرعة رج 100 دورة/دقيقة واسطوانة النمو اللاهوائي (Anaerobic jar) وبعد انتهاء مدة الحضن فصلت الخلايا عن وسط التخمر بأستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق حيث اهملت الخلايا في حين استخدم الراشح لتقدير كمية حامض اللاكتيك فضلاً عن قياس الرقم الهيدروجيني لوسط التخمر.

4-2-2 تقدير حامض اللاكتيك

قدرت كمية حامض اللاكتيك خلال جميع مراحل الدراسة بأتباع الطريقة الموصوفة من قبل (Hadzja ,1974) مع بعض التحوير واعتماداً على المنحنى القياسي لحامض اللاكتيك.

1-4-2-2 عمل المنحنى القياسي لحامض اللاكتيك

1-المحاليل المستخدمة

- محلول حامض اللاكتيك القياسي (100) مايكروغرام/مليلتر

حضر هذا المحلول بأذابة 10 ملغم من حامض اللاكتيك في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الأذابة أكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر.

- محلول هيدروكسيد الصوديوم (1ع)

حضر هذا المحلول بأذابة 4 غم من هيدروكسيد الصوديوم في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الأذابة أكمل الحجم الى 100 مل بالماءالمقطر.

- محلول كبريتات النحاس 4%

حضر بأذابة 4 غم من كبريتات النحاس المائية($CuSO_4 .5H_2O$) في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الأذابة أكمل الحجم الى 100مل بالماء المقطر.

- كاشف p-phenyl phenol 1.5 %

حضر بأذابة 1.5 % غم من الكاشف في 100 مل من 95%ايثانول.

حضرت تراكيز متدرجة من حامض اللاكتيك [محلول رقم (1)] بحسب الجدول الآتي:-

رقم الأنبوبة	حجم حامض اللاكتيك (مليلتر)	حجم الماء المقطر (مليلتر)	الحجم النهائي (مليلتر)	تركيز حامض اللاكتيك (مايكروغرام/مليلتر)
1	0.0	1.0	1.0	0.0
2	0.05	0.95	1.0	5.0
3	0.10	0.90	1.0	10
4	0.15	0.85	1.0	15
5	0.20	0.80	1.0	20
6	0.25	0.75	1.0	25
7	0.30	0.70	1.0	30

2- طريقة التقدير

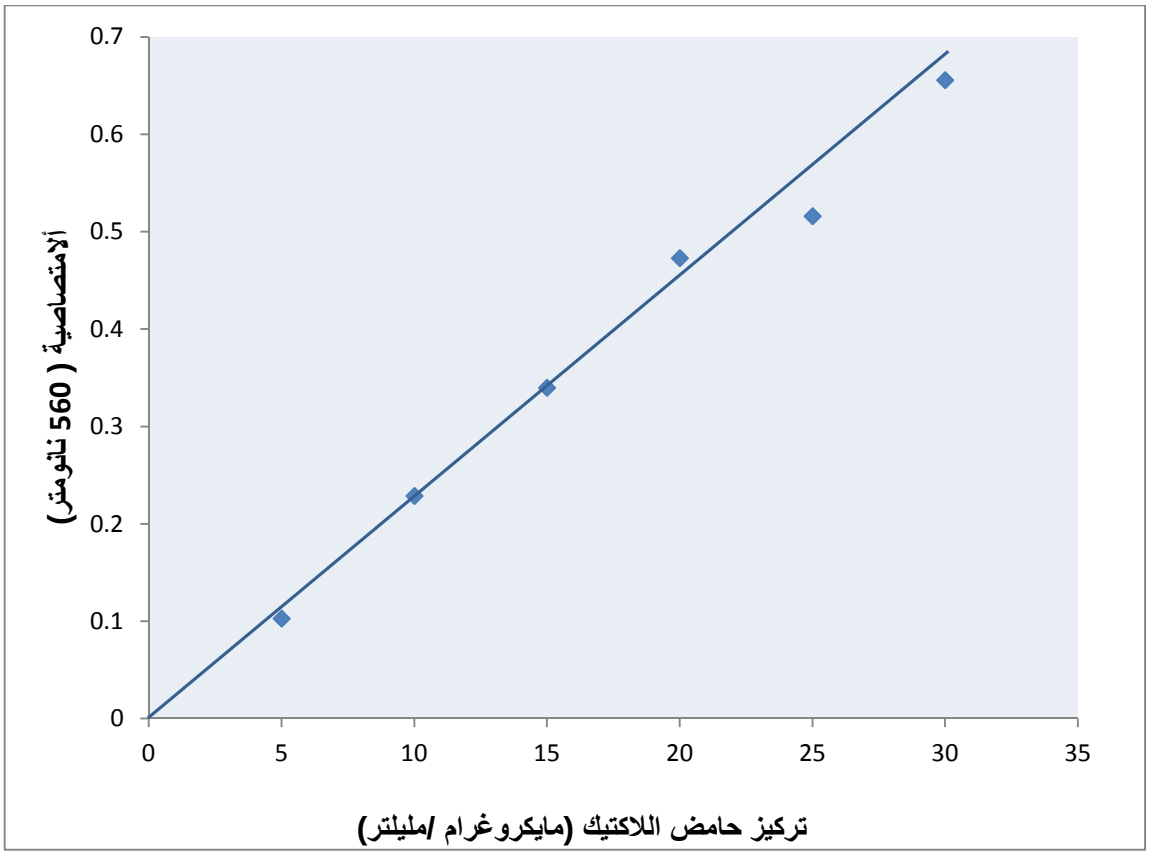
1- أضيف 200 مايكروليترمن محلول هيدروكسيد الصوديوم (1ع) الى 400 مايكروليتر من كل تركيز من التراكيز المحضرة المذكورة في أعلاه الموضوعة في أنابيب ذات سدادات وحضنت على درجة حرارة 38 مئوية لمدة 30 دقيقة.

2- أضيف 4 مل من حامض الكبريتيك المركز لكل أنبوبة من الأنابيب وبعد احكام غلق الأنابيب وضعت في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق .

3- بردت الأنابيب بوضعها في حمام مائي ثلجي ثم أضيف لها40 مايكروليترمن محلول كبريتات النحاس ومزجت جيداً .

4- أضيف 80 مايكروليترمن كاشف (p-phenyl phenol) لكل انبوبة وبعد احكام غلق الأنابيب وضعت في حاضنة هزازة وبسرعة رج 100دورة/ دقيقة لمدة 30 دقيقة .

5- تمت قراءة الأمتصاص لكل تركيز (ثلاث مكررات) في جهاز المطياف الضوئي عند طول موجي 560 نانوميتر. ورسم المنحنى القياسي لأمتصاص الضوء مقابل تركيز حامض اللاكتيك (شكل 1) .



الشكل (1): المنحنى القياسي لحامض اللاكتيك .

قدر حامض اللاكتيك في وسط التخمر خلال جميع مراحل الدراسة بنفس الخطوات المتبعة في عمل المنحنى القياسي عدا استبدال محلول حامض اللاكتيك القياسي بوسط التخمر بعد تخفيفه الى التخفيف المناسب .

5-2-2 تحديد الظروف المثلى لأنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين المنتخبتين .

تمت دراسة عدد من العوامل المؤثرة في إنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين المنتخبتين اشتملت هذه العوامل على: نوع الوسط الأنتاجي وتركيز عصير التمر ونوع المصدر النيتروجيني وتركيزه والرقم الهيدروجيني الأبتدائي للوسط ودرجة حرارة الحضن وحجم اللقاح .

1- تأثير نوع الوسط

أ. تحضير عصير التمر

حضر عصير التمر الزهدي على وفق الطريقة الموصوفة من قبل AL-Obaidi *et al.*(1987) وذلك بأضافة لتر من الماء المغلي الى 500 غم من تمر الزهدي (بعد ازالة النوى والأ قماع) وتركه لمدة ليلة كاملة للحصول على العصير الذي اجريت له عملية ترشيح بأستخدام قماش الململ أعقبها عملية نبذ مركزي بسرعة(5000) دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق للحصول عليه بشكل رائق .ثم خفف العصير المتحصل عليه الى النسبة المطلوبة من السكريات المختزلة .

ب. تقدير السكريات المختزلة

قدرت السكريات المختزلة في وسط عصير التمر بطريقة Miller (1959) (1959) واعتماداً على المنحنى القياسي للكلوكوز كسكر مختزل .

ج . عمل المنحنى القياسي للكلوكوز

- المحاليل المستخدمة

- محلول الكلوكوز الخزين (1mg /ml):

حضر هذا المحلول بأذابة 0.1 غم من الكلوكوز في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام عملية الأذابة أكمل الحجم الى 100مل بالماء المقطر.

- محلول 5,3 ثنائي نيتروحامض السالسيليك

(3,5,Dinitrosalicylic acid ,DNSA)

حضر هذا المحلول بأذابة 1 غم من المادة في 50 مل من الماء المقطر وبعد اتمام عملية الأذابة أضيف 20 مل من هيدروكسيد الصوديوم (2 مولر) ثم أضيف 30 غم من ترترات الصوديوم البوتاسيوم($CuH_4KNaO_6.4H_2O$) وبعد اتمام الأذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر.

تم عمل المنحنى القياسي للكلوكوز بحسب الخطوات الآتية :-

1- خفف محلول الكلوكوز القياسي بالماء المقطر للحصول على التراكيز (0.1 و0.3 و0.5 و0.7 و0.9 و1.0) ملغم/مل بحسب الجدول الآتي :

رقم الأنبوبة	حجم محلول الكلوكوز الخزين (مل)	حجم الماء المقطر (مل)	كمية الكلوكوز (ملغم/مل)
1	0.0	1.0	0.0
2	0.1	0.9	0.1
3	0.3	0.7	0.3
4	0.5	0.5	0.5
5	0.7	0.3	0.7
6	0.9	0.1	0.9
7	1.0	0.0	1.0

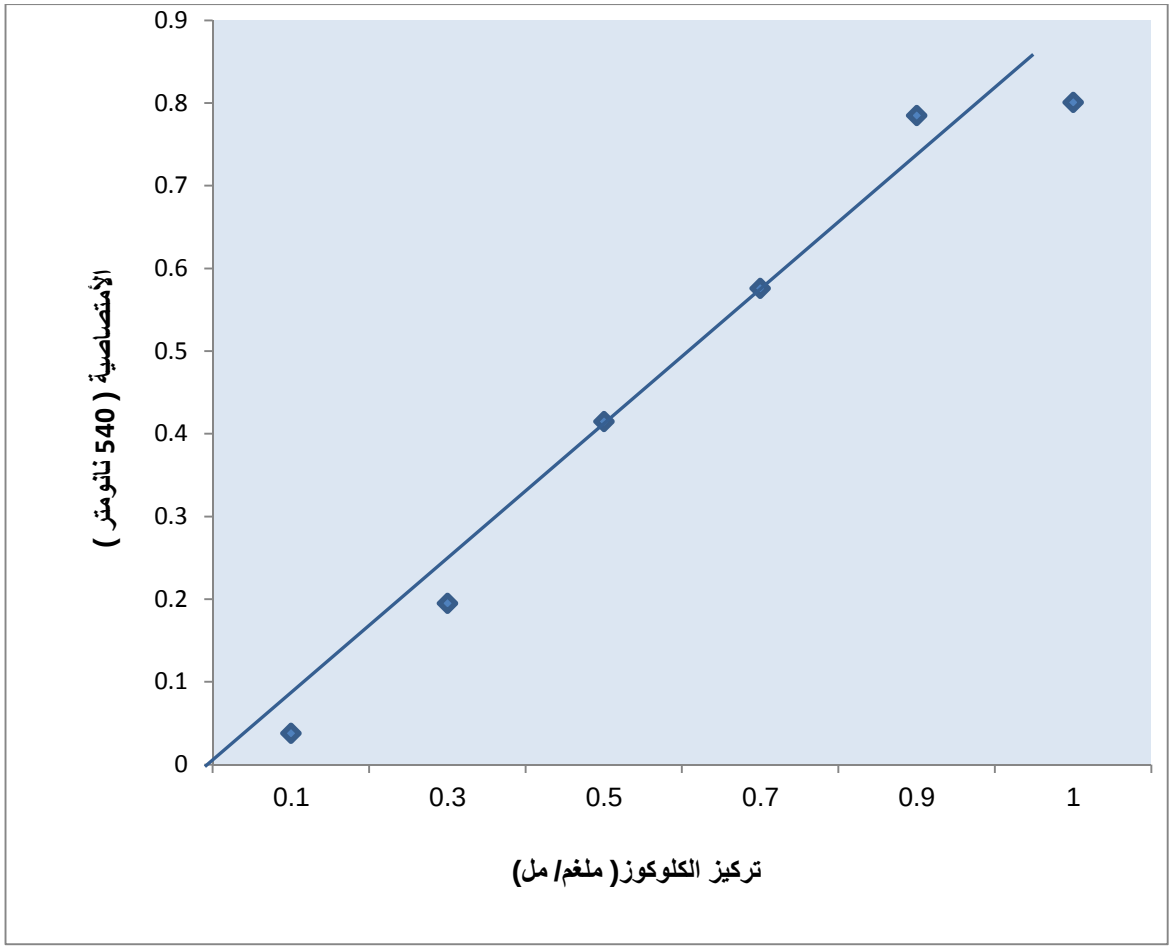
2- أضيف 1 مل من كاشف (3,5 DNSA) لكل أنبوبة ووضعت في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق.

3- بردت الأنابيب في حمام مائي ثلجي بعد انتهاء مدة الغليان مباشرة .

4- أضيف 5 مل ماء مقطر لكل أنبوبة وتم رجها جيداً .

5- تمت قراءة الأمتصاص في جهاز المطياف الضوئي على طول موجي 540 نانوميتر واستعمل الأنبوب الأول في تصفير الجهاز (Blank) .

واستحصل المنحنى القياسي برسم العلاقة البيانية بين الأمتصاص على الطول الموجي 540 نانوميتر وكمية الكلوكوز (ملغم) وكما موضح في الشكل (2) .



الشكل (2) : المنحنى القياسي لتقدير الكلوكوز (السكريات المختزلة) بطريقة (3,5 Dinitro salicylic acid,DNSA).

ولبيان تأثير نوع الوسط في إنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين المنتخبتين استخدم نوعان من الأوساط :

الأول : صناعي يتمثل بوسط MRS السائل .

الثاني : طبيعي يتمثل بوسط عصير التمر الذي تم تخفيفة الى 2 %سكريات مختزلة وتم تدعيمه بمستخلص الخميرة 0.5 % وكربونات الكالسيوم 1 % . وزع الوسط في دوارق حجمية سعة 250 مل بواقع 50 مل لكل دورق . وبعد تعقيمها تمت تنمية العزلتين في حاضنة ساكنة بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 48 ساعة.

2- تأثير تركيز عصير التمر

خفف عصير التمر ليعطي تراكيز متدرجة من السكريات المختزلة (2 و4 و6 و8 و10)% فضلاً عن المعاملة الخالية من العصير لتحديد التركيز الأمثل من عصير التمر لأنتاج الحامض من العزلتين قيد الدراسة .

3- تأثير المصدر النيتروجيني

- نوع المصدر النيتروجيني

استخدمت اليوريا ومستخلص الخميرة وكبريتات وكلوريد الأمونيوم ونترات الصوديوم كمصادر نيتروجينية حيث اذيبت هذة المواد في وسط عصير التمر الحاوي على كربونات الكالسيوم لتحديد المصدر النيتروجيني الأفضل لأنتاج حامض اللاكتيك .

- تركيز المصدر النيتروجيني

استخدمت تراكيز متدرجة من مستخلص الخميرة بلغت (0.1 و0.3 و0.5 و0.7 و1.0)% وتمت اذابة هذه المادة في وسط عصير التمر الحاوي على كربونات الكالسيوم وذلك لتحديد التركيز الأمثل من مستخلص الخميرة لأنتاج الحامض .

4- تأثير الرقم الهيدروجيني الأبتدائي

حضر وسط عصير التمر المدعم بمستخلص الخميرة 0.7% وكربونات الكالسيوم ثم وزع في دوارق وعدل الرقم الهيدروجيني في هذه الدوارق الى (5.0 و5.5 و6.0 و6.5 و7.0 و7.5) بأستخدام (1ع) من كل من هيدروكسيد الصوديوم وحامض الهيدروكلوريك .

5- تأثير درجة حرارة الحضن

تمت تنمية عزلتي بكتريا *Lactobacillus* المستخدمتين في هذه الدراسة في وسط الأنتاج لمدة 48 ساعة على الدرجات الحرارية (30 و37 و44 و50) مئوية وذلك لتحديد درجة الحرارة المثلى لأنتاج حامض اللاكتيك .

6- تأثير حجم اللقاح :

لقح وسط إنتاج حامض اللاكتيك بحجوم لقاح مقدارها (1 و2 و4 و6 و8)% من حجم الوسط. وحضنت النماذج في الحاضنة الساكنة بدرجة حرارة 37 مئوية لبيان تأثير حجم اللقاح في إنتاج الحامض من العزلتين قيد الدراسة .

6-2-2 تقييد الخلايا (Cell Immobilization)

أجريت عملية تقييد خلايا العزلتين المنتخبتين بأستخدام طريقة الحجز (Entrapment) للخلايا داخل المواد الهلامية .

1-6-2-2 دراسة العوامل المؤثرة في عملية التقييد

1- تحديد نوع المادة الساندة

قيدت خلايا العزلتين المستخدمتين في هذه الدراسة بأستخدام نوعين من المواد الهلامية هما الألجينات (Alginate) والأكار –اكار (Agar-agar).

أ- تقييد الخلايا بأستخدام مادة الألجينات

- الأوساط والمحاليل المستخدمة

- وسط MRS الصلب

حضر بطريقة التحضير نفسها في الفقرة (2-2-2-1- أ)

- وسط MRS السائل

حضر بطريقة التحضير نفسها في الفقرة (2-2-2-1- ب)

- محلول الجينات الصوديوم 4 %

حضر هذا المحلول بأذابة 4 غم من الجينات الصوديوم في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام عملية الأذابة أكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر،ثم وزع في عبوات زجاجية (Vials) محكمة الغلق سعة 20 مل وبواقع 10 مل لكل عبوة ثم عقم بالمؤصدة .

- محلول كلوريد الكالسيوم 2%

حضر هذا المحلول بأذابة 2 غم من كلوريد الكالسيوم في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الأذابة أكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطرثم عقم بالمؤصدة .

- محلول الملح الفسلجي (Normal Saline)

حضر بطريقة التحضير نفسها في الفقرة (2-2-2-2- هـ)

- محلول الببتون 0.1 %

حضر هذا المحلول بأذابة 0.1 غم من الببتون في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الأذابة أكمل الحجم الى100 مل ثم عقم بالمؤصدة .

- تحضير اللقاح

لقح 7 مل من وسط MRS السائل بعروة كاملة من خلايا العزلتين المنتخبتين (كلاً على انفراد) وحضن الوسطان الملقحان بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 18 ساعة . وبعد إنتهاء مدة الحضن رسبت الخلايا بجهاز الطرد المركزي بسرعة (5000) دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق وغسل الراسب مرتين بـ7 مل من محلول الملح الفسلجي ثم علق الراسب بـ 5 مل من نفس المحلول

وحضرت منه تخافيف متسلسلة تراوحت بين(10^{-1} – 10^{-10}) وسحب 0.1 مل من كل تخفيف ونشر على طبق يحوي وسط MRS الصلب (بواقع مكررين لكل تخفيف) وحضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة (24-48) ساعة وبعد انتهاء فترة الحضن تم حساب عدد الخلايا وحدد التخفيف الذي يعطي عدد خلايا (2×10^8)خلية /مل لغرض تقييد هذا العدد من الخلايا.

– **طريقة التقييد**

أتبعت طريقة (Champagne and Gardner,2001) في تقييد الخلايا وذلك بمزج (10) مل من محلول 4% الجينات الصوديوم مع حجم مكافيء من المزروع البكتيري الحاوي على عدد خلايا(2×10^8) خلية/مل لتعطي تركيزاً مقداره (2)%من الجينات الصوديوم بعدد خلايا(1×10^8) خلية/مل وتم مزج المحلول جيداً بأستخدام المازج (Vortex). ثم سحب مزيج الألجينات والخلايا بأستخدام محقنة معقمة وأضيف بشكل قطرات الى محلول (2)% كلوريد الكالسيوم المعقم لتكوين الكرات وبقطر 3 ملم تقريباً التي تركت داخل هذا المحلول لمدة ساعة لكي تتصلب ثم غسلت الكرات بمحلول الملح الفسلجي المعقم مرتين لغرض التخلص من كلوريد الكالسيوم وأخيراً حفظت الكرات المذكورة في محلول 0.1 % ببتون معقم ، لحين استخدامها في إنتاج حامض اللاكتيك .

ب– تقييد الخلايا بأستخدام مادة الأكار–أكار

– **المحاليل المستخدمة**

- محلول 4 % أكار–أكار(agar-agar)

حضر هذاالمحلول بأذابة 4غم من مادة الأكار –أكار في 100مل من الماء المقطر وبعد اتمام الأذابة عقم المحلول بالمؤصدة.

- **طريقة التقييد**

استخدمت الطريقه الموصوفه من قبل (EL-Hawary *et al*,2009) في تقييد خلايا العزلتين المنتخبتين مع بعض التحوير. حيث مزج 10 مل من محلول4% أكار- أكار قبل أن يتصلب مع حجم مكافئ من الخلايا المشار اليها (كلاً على انفراد) ومزجت جيداً بالمازج ليعطي تركيزاً مقداره 2% أكار-أكار بعدد خلايا(1×10^8) خلية /مل .وتم صب المزيج في أطباق بتري معقمة وتركت لتتصلب في ظروف مبردة .وتم حفظها في الثلاجة وقبل استخدامها في انتاج حامض اللاكتيك ثم تقطيعها الى مكعبات بأبعاد ($4 \times 4 \times 4$) ملم.

2- تركيز الماده الساندة

حضرت تراكيز متدرجة من كل من الجينات الصوديوم ومادة الأكار -أكار ومزجت بخلايا *Lactobacillus* لتعطي تراكيز متدرجة (2 و4 و6)% لألجينات الصوديوم (2 و3 و4)%لمادة الأكار -أكار.

3- تحديد عدد الخلايا الأمثل في عملية التقييد

تم تقييد أعداد الخلايا(1×10^7و 1×10^8و1×10^9 و1×10^{10}) خلية/مل بأستخدام مادة الأكار-أكار ودراسة تأثير عدد الخلايا المقيدة في إنتاج حامض اللاكتيك .

2-2-6-2 تحديد الظروف المثلى لأنتاج حامض اللاكتيك من الخلايا المقيدة

تمت دراسة عدد من العوامل المؤثره في انتاج حامض اللاكتيك من الخلايا المقيدة للعزلتين المنتخبتين اشتملت هذه العوامل على تركيز عصير التمر ومستخلص الخميرة ومدة الحضن وثبوتية الخلايا المقيدة .

1- تركيز عصير التمر

تم تحضير تراكيز متدرجة من وسط عصير التمر هي (2 و3 و4 و6 و8 و10)% سكريات مختزلة في وسط الأنتاج المدعم بمستخلص الخميرة وكربونات الكالسيوم ولقح الوسط بأعداد خلايا مقيدة مقدارها (1×10^9) خلية/مل وذلك لتحديد تركيز العصير الأمثل لأنتاج حامض اللاكتيك من عزلتي *Lactobacillus* المقيدتين المستخدمتين في هذه الدراسة .

2- تركيز مستخلص الخميرة

أضيفت تراكيز متدرجة من مستخلص الخميرة اشتملت على (0.1 و0.3 و0.5 و0.7 و1.0)% الى وسط إنتاج حامض اللاكتيك الحاوي على عصير التمر بتركيز4% سكريات مختزلة مع كربونات الكالسيوم ثم لقح الوسط بالخلايا المقيدة .

3- مدة الحضن

تمت متابعة إنتاج حامض اللاكتيك من الخلايا الحرة والمقيدة لمدة 96 ساعة وذلك بسحب مكررين كل 12 ساعة لتقدير حامض اللاكتيك وقياس الرقم الهيدروجيني لوسط التخمر .

4- ثبوتية الخلايا المقيدة

لغرض دراسة ثبوتية الخلايا المقيدة تمت متابعة انتاج حامض اللاكتيك من الخلايا المذكورة لمدة 15 يوم إذ تم استبدال الوسط الأنتاجي كل 72 ساعة مع تكرار استخدام نفس مكعبات الأكار–أكار الحاوية على خلايا بكتريا *Lactobacillus* قيد الدراسة وتم تقدير حامض اللاكتيك لوسط التخمر بعد كل دورة تخمرية .

2-2-7 حساب كفاءة التحويل

تم حساب النسبة المئوية لكفاءة تحويل العزلتين المنتخبتين للسكر الموجود في عصير التمر الى حامض اللاكتيك طبقاً لما ورد في (Cock and de Stouvenel,2007) وحسب المعادلة الآتية:-

$$\text{نسبة التحويل} = \frac{(\text{تركيز السكريات قبل التخمر} - \text{تركيز السكريات بعد التخمر})}{\text{تركيز السكريات قبل التخمر}} \times 100$$

2-2-8 تنقية حامض اللاكتيك (Purification of lactic acid)

بعد تثبيت الظروف المثلى لأنتاج حامض اللاكتيك من الخلايا المقيدة للعزلتين المنتخبتين. تم انتاج كمية من حامض اللاكتيك بتنمية هاتين العزلتين تحت الظروف المثلى للأنتاج، وبعد انتهاء مدة الحضن رشحت نواتج التخمر بأستخدام الطرد المركزي بسرعة (5000) دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق إذ اهمل الراسب في حين احتفظ بالراشح الحاوي على حامض اللاكتيك الذي جرت عملية تنقيته بحسب الخطوات الآتية :-

1- الترويق (Clarification)

- **المحاليل المستخدمة**

- محلول هيدروكسيد الكالسيوم (1ع) :

حضر هذا المحلول بأذابة 3.7غم من هيدروكسيد الكالسيوم في كمية من الماء المقطر المزال منه الأيونات (deionized water) وبعد اتمام عملية الأذابة أكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر المزال منه الأيونات ايضاً.

ضبط الرقم الهيدروجيني للراشح الى 10 بأستخدام هيدروكسيد الكالسيوم (1ع) ثم سخن الراشح الى درجة حرارة 80 مئوية لمدة 15 دقيقة ،اعقبته عملية نبذ مركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق ، وبعد أن اهمل الراسب عدل الرقم الهيدروجيني في الراشح الى(6.5-7.0) ،يمثل الراشح الموصوف أعلاه (المستخلص المروّق) الذي تم تقدير كمية حامض اللاكتيك فيه وفق طريقة التقدير الموصوفة سابقاً.

2- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني الأول بأستخدام المبادل Amberlite IR-400

- المحاليل المستخدمة

- هيدروكسيد الصوديوم (0.75) مولر

حضر هذا المحلول بأذابة 3 غم من هيدروكسيد الصوديوم في كمية من الماء المقطر المزال منه الأيونات وبعد اتمام الأذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر المزال منه الأيونات ايضاً .

- محلول كربونات الأمونيوم (2) مولر

حضر بأذابة 19.2 غم من كربونات الأمونيوم في كمية من الماء المقطر المزال منه الأيونات وبعد اتمام الأذابة أكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر المزال منة الأيونات ايضاً .

- تحضير عمود التبادل الأيوني Amberlite IR-400

حضر المبادل الانأيوني Amberlite IR-400 حسب الطريقة الموصوفة من قبل (Whitaker ,1972) مع بعض التحوير ،وذلك بأضافة 200 مل من الماء المقطر المزال منه الأيونات الى 10غم من المبادل في دورق زجاجي وترك ليركد لمدة نصف ساعة ثم سكب السائل العلوي وغسل المبادل عدة مرات بالماء المقطر المزال منه الأيونات ورشح على قمع بخنر تحت التفريغ بأستخدام ورق ترشيح من نوع واتمان رقم (1) ثم علق المبادل الانأيوني في 250 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم ثم رشح تحت التفريغ وغسل عدة مرات بالماء المقطر المزال منه الأيونات لحين موازنته.

تمت تعبئة المبادل في عمود زجاجي ليعطي أبعاداً (1.3 × 15) سم واستخدم الماء المقطر المزال منه الأيونات في موازنة المبادل حتى اليوم التالي وبسرعة جريان 1 مليلتر/دقيقة.

- إضافة الأنموذج

أضيف 30 مل من الراشح الخارج من خطوة الترويق الى سطح المبادل بهدوء وغسل المبادل بـ 100 مل من الماء المقطر المزال منه الأيونات لأنزال المواد التي لم ترتبط بالمبادل وجمعت الأجزاء المفصولة من العمود بواقع 5 مليلتر/جزء وبسرعة جريان 1مل/دقيقة . وتم تقدير حامض اللاكتيك في الأجزاء المفصولة للتأكد من عدم نزول حامض اللاكتيك في هذه الخطوة .

- استرداد حامض اللاكتيك

استرد الحامض بواسطة 100 مل من محلول كربونات الأمونيوم 2 مولر وبعد أن جمعت الأجزاء المستردة بواقع 5 مليلتر/جزء قدر حامض اللاكتيك في الأجزاء المستردة ورسمت العلاقة البيانية بين تركيز حامض اللاكتيك وعدد الأجزاء ثم جمعت الأجزاء المستردة وتم قياس حجمها وتقدير حامض اللاكتيك فيها .

3- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني الثاني بأستخدام المبادل Amberlite IR-120 (H)

- المحاليل المستخدمة

- محلول حامض الهيدروكلوريك (1) مولر

حضر هذا المحلول بتخفيف 3 مليلتر من حامض الهيدروكلوريك المركز واكمال الحجم الى 100 مل بالماء المقطر المزال منه الأيونات.

- **تحضير عمود التبادل الأيوني Amberlite IR-120(H)**

حضر هذا المبادل بنفس طريقة وظروف تحضير المبادل الأيوني (Amberlite IR-400) عدا عملية تنشيطه التي تمت بأستخدام 1 مولر من حامض الهيدروكلوريك، وتمت تعبئة المبادل في عمود زجاجي ليعطي أبعاداً (1.3 × 14) سم واستخدم الماء المقطر المزال منه الأيونات في موازنة المبادل حتى اليوم التالي وبسرعة جريان 1 مل /دقيقة . مرر حامض اللاكتيك الخارج من خطوة التبادل الأيوني الأول على عمود المبادل Amberlite IR-120(H) وغسل المبادل بـ 100 مل من الماء المقطر المزال منه الأيونات وتم تقدير حامض اللاكتيك في الأجزاء المفصولة ،ثم جمعت هذة الأجزاء وتم قياس حجمها وتقدير حامض اللاكتيك فيها .

9-2-2 فصل حامض اللاكتيك المنقى من العزلتين المقيدتين بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)

- **المواد والمحاليل المستخدمة**

- 90% دايوكسان (Dioxane)

حضر هذا المحلول بأضافة 10 مل من الماء المقطر الى 90 مل من الدايوكسان.

- محلول الأظهار

حضر هذا المحلول بأذابة 0.1 غم من كاشف (Bromocresol green) في 500 مل من الأيثانول وبعد اتمام الأذابة أضيف 5 مل من محلول (0.1)ع هيدروكسيد الصوديوم .

- صفيحة سليكا بأبعاد (20 ×20) سم
- حوض ترحيل (Tank)

حملت الصفيحة بـ3 مايكروليتر من حامض اللاكتيك المنقى من العزلتين المستخدمتين في هذه الدراسة (كلاً على انفراد) فضلاً عن أنموذج حامض اللاكتيك القياسي (L- lactic acid) إذ تم تحميل النماذج المذكورة على خط موازٍ للحافة السفلى للصفيحة ويبعد عنها مسافة 2 سم، اما المسافة بين النماذج والحواف الجانبية للصفيحة وكذلك بين انموذج وآخر فكانت 2 سم ايضاً . وضعت الصفيحة بعد ذلك في حوض الترحيل الحاوي على محلول 90% دايوكسان ، وتمت مراقبة سريان المذيب واوقفت عملية الفصل عند وصول المذيب الى مسافة تبعد 1 سم عن الحافة العليا للصفيحة حيث اخرجت الصفيحة وتركت لتجف في جو الغرفة . وتم رش الصفيحة برذاذ من الكاشف وبعد جفافها تماماً حددت مواقع البقع (spots) المفصولة وتم قياس المسافة التي قطعتها البقعة وكذلك المسافة التي تحركها المذيب لحساب قيمة الحركة النسبية (R_f) وكما يأتي :

$$R_f = \frac{\text{المسافة التي قطعتها البقعة}}{\text{المسافة التي قطعها المذيب}}$$

2-2-10 التحري عن وجود البلازميدات في العزلتين المنتخبتين

تم التحري عن وجود البلازميدات في العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) المنتجة لحامض اللاكتيك وذلك بعزل الدنا الكلي لهذه البكتريا وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل (Pospiech and Neumann ,1995) مع بعض التحوير .

أ . المحاليل المطلوبة :

1- المحلول الدارئ (SET Buffer) :

يتكون هذا المحلول من 75 ملي مولار كلوريد الصوديوم و 25 ملي مولار EDTA-Na و 20 ملي مولار Tris base .عدل الرقم الهيدروجيني لهذا المحلول الى(pH8.0) . وعقم بالمؤصدة ثم حفظ بدرجة 4 مئوية لحين الأستعمال .

2- محلول الأنزيم الحال (Lysozyme solution)

حضر هذا المحلول بتركيز 50 ملغم/مليلتر من الماء المقطر المعقم.

3- المحلول المرسب للبروتين (Protein precipitation solution)

المجهز من شركة Promega الأمريكية .

4- المحلول المحلل للأغشيه (Nuclei Lysis Solution)

المجهز من شركة Promega الأمريكية .

5- محلول SDS

حضر هذا المحلول بتركيز 10% في الماء المقطر .

6- محلول كلوريد الصوديوم (NaCl)

حضر هذا المحلول بتركيز 5 مولر في الماء المقطر وعقم بالمؤصدة .

7- المحلول الدارئ TE buffer :

يتكون هذا المحلول من 1 ملى مولار EDTA-Na و 10 ملى مولار Tris ضبط الرقم الهيدروجيني لهذا المحلول الى (pH 8.0) وعقم بالمؤصدة ثم حفظ بدرجة حرارة 4 مئوية لحين الاستعمال .

ب. تهيئة البكتريا

لقح 50 مليلتر من وسط MRS السائل بعروة كاملة (loopfull) من العزلتين المنتخبتين . (كلاً على انفراد) وحضنت عند درجة 37 مئوية لمدة18 ساعة .وبعد انتهاء مدة الحضن اخرجت النماذج ونبذت مركزياً بسرعة (5000) دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق حيث اهمل الرائق في حين جمعت الخلايا ووضعت في التجميد لليوم التالي .

– طريقة العمل

1- علقت الخلايا في 5 مل من المحلول الدارئ (SET Buffer) ثم أضيف 300 مايكروليتر من محلول الأنزيم الحال وحضنت الأنابيب بدرجة37 مئوية لمدة ساعة .

2- أضيف 1200 مايكروليتر من المحلول المحلل للأغشية وخلط برفق الى ان أصبحت الخلايا معلقة .

3- حضنت الخلايا بدرجة حرارة 80 مئوية لمدة خمس دقائق لتحليل الخلايا ثم بردت لدرجة حرارة الغرفة .

4- أضيف 400 مايكروليتر من المحلول المرسب للبروتين ودورت الأنبوبة بأستعمال المازج (Vortex) لمدة 20 ثانية .

5- حضن النموذج في الثلج لمدة 5 دقائق .

6- أضيف 600 مايكروليتر من محلول 10% SDS ومزجت المحتويات جيداً بالتقليب يدوياً، ثم حضنت الأنابيب لمدة ساعتين بدرجة 37مئوية مع التقليب بين آونة وأخرى .

7- أضيف 2 مل من محلول كلوريد الصوديوم 5 مولر ومزجت المحتويات جيداً بالتقليب يدوياً.

8- أضيف 5 مل من الكلوروفورم ومزجت المحتويات بالتقليب لمدة 30 دقيقة بدرجة 20 مئوية.

9- نبذت الأنابيب مركزياً بسرعة (6500xg) لمدة 30 دقيقة .

10- نقل الرائق الى أنابيب بلاستيكية جديدة معقمة وأضيف اليها (0.6) حجم من الأيزوبروبانول ومزجت المحتويات بالتقليب لمدة 3 دقائق وتركت في التجميد لليوم التالي .

11- أجري نبذ مركزي بسرعة (9700xg) لمدة 15 دقيقة حيث جمع الراسب وأذيب في 0.5 مل من المحلول المنظم (TE) .

12- أضيف 2.5 مل من الكحول الأثيلي المطلق الى الدنا المذاب في المحلول المنظم (TE) وأجريت له عملية طرد مركزي بسرعة (9000xg) لمدة 12 دقيقة حيث جمع الراسب الذي تمت اذابته في 0.5 مل من المحلول المنظم (TE) .

13- غسل محلول الدنا المتحصل عليه من الخطوة السابقة بـ(2.5) مل من محلول 70% كحول اثيلي وأجريت له عملية نبذ مركزي بسرعة (9000xg) لمدة 12 دقيقة ، حيث جمع الراسب الذي تمت اذابته في (60) مايكروليتر من المحلول المنظم (TE).

11-2-2 الترحيل الكهربائي

- **المحاليل المستخدمة**

1- دارئ الترس– أستيت (TAE) Tris- acetate EDTA(2X)

يتكون هذا المحلول بأذابة 9.68 غم Tris base و 2.28 مل حامض الخليك الثلجي 4 مل من محلول EDTA-Na (5 مولر)،اذيبت جميع هذه المكونات في 600 مل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى (pH8.0) وأكمل الحجم الى 1 لتر بالماء المقطر ثم عقم بالمؤصدة.

2- صبغة بروميد الأثيديوم (Ethidium bromide)

حضرت هذه الصبغة في الماء المقطر بتركيز (100) مايكروغرام/مليلتر وتم استخدامها بتركيز (0.5) مايكروغرام/مليلتر.

3- دارئ التحميل (Loading buffer)

يتكون من40% سكروز و 0.25 % أزرق البروموفينول في دارئ الترس– أستيت .

- هلام الأكاروز (Agarose gel)

تم تحضيره بتركيز 0.8% وذلك بأذابة 0.4 % غم من الأكاروز في 50 مليلتر من دارئ الترس–أسيتيت في حمام مائي مغلي (Boiling water bath) حيث برد بعدها الى 50 مئوية وأضيف اليه بروميد الأثيديوم بتركيز 0.5 مايكروغرام/مليلتر، ثم صب الأكاروز في الصفيحة (Tray) الخاصة به بعد أن ثبت المشط (Comb) قرب أحدى نهايتي الصفيحة لعمل الحفر (Wells) وترك الأكاروز ليتصلب لمدة 40 دقيقة ثم رفع المشط من الهلام المتصلب بحذر وثبتت الصفيحة على مساندها في حوض وحدة الترحيل الكهربائي (Electrophoresis).غمر الهلام

المتصلب بدارئ الترس–أستيت(2x) في حوض الترحيل بحيث غطى الهلام بأرتفاع لايقل عن مليمتر واحد وتم بعد ذلك تحميل الدنا داخل الحفر المتكونة.

- **ترحيل الدنا الكروموسومي للعزلتين المنتخبتين .**

مزج 15 مايكروليتر من محلول الدنا المتحصل علية في الفقرة(2-2-10) مع 7 مايكروليتر من دارئ التحميل ورحل الأنموذج بفرق جهد مقداره 07 فولت لعدة ساعات ثم فحص الهلام بواسطة الأشعة فوق البنفسجية بأستخدام جهاز باعث الأشعة فوق البنفسجية (UV-Transilluminator).

- **تقدير تركيز الدنا الكروموسومي ونقاوته**

خفف الدنا الكروموسومي الى التخفيف المناسب بأستخدام دارئ TE ثم قيست الكثافة الضوئية عند طول موجي 260 و 280 نانوميتر مقابل دارئ TE كمحلول كفء (Blank) عند درجة حرارة الغرفة وحسب تركيز الدنا على وفق المعادلة :–

260 OD 1 = 50 مايكروغرام دنا /مليلتر

كما تم تقدير نقاوة محلول الدنا في المعادلة الآتية (Stephenson ,2003).

$$\text{النقاوة} = \frac{\text{OD } 260}{\text{OD } 280}$$

لفصل الثالث

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

3 - النتائج والمناقشة

3-1 عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus*

3-1-1 عزل بكتريا *Lactobacillus*

أسفرت نتائج عزل بكتريا *Lactobacillus* عن الحصول على 20 عزلة عائدة لهذا الجنس. وقد تباين عدد العزلات المتحصل عليها بأختلاف مصادر العزل المستخدمة في هذه الدراسة إذ بلغت أعدادها (5 و2 و5 و3 و5) عزلات من عينات الحليب الخام والمخللات والألبان الريفية والشرش والألبان الرائبة المعملية على التوالي بنسب (25 و10 و25 و15 و25)% من مجموع العزلات المتحصل عليهاعلى التوالي ايضاً (شكل 3) .

أشارت العديد من الدراسات إلى عزل بكتريا *Lactobacillus* من مصادر متعددة واستخدامها في دراسات مختلفة ، فقد تم عزل21 عزلة عائدة لجنس *Lactobacillus* من منتجات البان مختلفة (Erdogrul and Erbilir , 2006). كذلك عزلت 13عزلة بكتيرية عائدة لنفس الجنس من السمك والروبيان (Nair and Surendran , 2005). وقد تمكن Ahmed and Kanwal (2004) من عزل بكتريا *L. acidophilus* من حليب الجمل ودراسة قابلية هذا النوع من البكتريا في تحويل سكر اللاكتوز إلى حامض اللاكتيك.

إن الأوساط الغذائية المستعملة للعزل يجب إن تكون ملائمة وحاوية على العوامل التي تسلط الضغط الأنتخابي فمثلاً البكتريا ذات المتطلبات المعقدة مثل بكتريا الألبان يجب أن يضاف الى الأوساط المستعملة لعزلها مركبات معقدة لذا فأن استخدام وسط MRS في عزل هذه البكتريا مناسب جداً (الخفاجي ،1990) إذ يعد هذا الوسط إنتقائياً (Selective)

شكل(3): النسب المئوية لبكتريا *Lactobacillus* موزعة حسب مصادر عزلها .

للبكتريا المذكورة فضلاً عن كونه وسطاً اغنائياً (Enrichment medium) لها.إن طريقة المزرعة المغذاة من الطرائق الشائعة في عزل الأحياء المجهرية حيث يمكن استخدام هذه المزرعة لزيادة اعداد كائن حي مجهري معين على حساب الكائنات المجهرية الأخرى الموجودة في العينة المراد العزل منها (الحيدري ،1991).

3-1-2 تشخيص بكتريا *Lactobacillus*

3-1-2-1 الصفات الزرعية والمجهرية

إمتازت مستعمرات بكتريا *Lactobacillus* على وسط MRS الصلب بكونها دائرية الشكل صغيرة الحجم ،بعضها محدبة والبعض الآخر مسطحة ، ملساء ناعمة ولماعة . اما لونها فكانت بعض المستعمرات بيضاء فيما كانت المستعمرات الاخرى كريمية اللون. واظهر الفحص المجهري بانها خلايا متباينة في الشكل ،إذ كان بعضها عصوياً بينما كان البعض الآخر عصوي كروي، بعضها مفرد وبعضها ثنائية فيما كان البعض الآخر بشكل سلاسل طويلة اوقصيرة وذلك طبقاً لما ورد في (Krieg and Holt ,1984). فضلاً على انها موجبة لصبغة غرام غير مكونة للسبورات وغير متحركة ويتطابق هذا مع ماذكره (Desai ,2008).

3-1-2-2 الصفات الكيموحيوية

عند إجراء الفحوصات الكيموحيوية على عزلات بكتريا *Lactobacillus* وجد أن جميع العزلات غير منتجة للكاتليز والأوكسديز وغير محللة للجيلاتين ولاتستهلك السترات وغير منتجة للأندول ولها القابلية على تخمير الكلوكوز (جدول4) وهذا يتفق مع ما جاء في (Krieg and Holt ,1984) .

3-1-2-3 إختبار قابلية عزلات بكتريا *Lactobacillus* على تخمير السكريات

تم اختبار قابلية بكتريا *Lactobacillus* على تخمير بعض أنواع السكريات (الكلوكوز واللاكتوز والمانيتول والسوربيتول والرامينوز و السكروز والميليبايوز والأميكدالين والأرابينوز والأينوسيتول). أظهرت النتائج في الجدول (5) أن لعزلات بكتريا *Lactobacillus* قابلية مختلفة على تخمير السكريات، إذ كانت لجميعها القابلية على تخمير سكري الكلوكوز واللاكتوز ، بينماكانت (56.5 و4.3 و 13 و73.9 و43.5 و 78.3و 56.5 و8.7)% من العزلات لها

القابلية على تخمير سكريات المانيتول والسوربيتول والرامينوز والسكروز والمليبايوز والأميكدالين والأرابينوز والأينوسيتول على التوالي .

جدول (4): الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *Lactobacillus*

ت	الأختبار	النتيجة
-1	صبغة غرام	+
-2	المظهر	مفردة او ازواج اوبشكل سلاسل قصيرة
-3	ظروف النمو	لاهوائي اختياري
-4	إختبار الحركة	–
-5	إختبار الكاتليز	–
-6	إختبار الاوكسديز	–
-7	إختبار الاندول	–
-8	إستهلاك السترات	–
-9	تحلل الجيلاتين	–
-10	تخمر الكلوكوز	+

(+): نتيجة موجبة ، (–): نتيجة سالبة

جدول (5): إختبار قابلية بكتريا *Lactobacillus* على تخمير السكريات

ت	السكـــــر	عدد العزلات		النسبة المئوية للعزلات الموجبة (%)
		الموجبة للتخمير	السالبة للتخمير	
-1	الكلوكوز	23	0	100
-2	اللاكتوز	23	0	100
-3	المانيتول	13	10	56.5
-4	السوربيتول	1	22	4.3
-5	الرامينوز	3	20	13
-6	السكروز	17	6	73.9
-7	الميليبايوز	10	13	43.5
-8	الأميكدالين	18	5	78.3
-9	الأرابينوز	13	10	56.5
-10	الأينوسيتول	2	21	8.7

4-2-1-3 قابلية عزلات بكتريا *Lactobacillus* على النمو في ملح كلوريد الصوديوم

تمت دراسة قابلية بكتريا *Lactobacillus* على التحمل للتراكيز الملحية باستخدام تراكيز متدرجة من ملح كلوريد الصوديوم (1.5 و4.5 و7.5 و10) % ، واظهرت النتائج الموضحة في الجدول (6) أن جميع العزلات قيد الدراسة لها القابلية على النمو في تراكيز ملحية (1.5 و4.5) % . وإن 21.7 % من العزلات لها القابلية على النمو بشكل ضعيف عند التركيز 7.5 % ، بينما كان التركيز الملحي 10% مثبطاً لنمو جميع العزلات المشار اليها في الدراسة . وتعد هذه النتائج مقاربة لما وجده Adnan and Tan (2003) عند استخدامه لتراكيز من كلوريد الصوديوم (1.5 و 2.5 و5 و7.5 و10) % لأختبار قابلية التحمل للتراكيز الملحية لستة أنواع بكتيرية عائدة لجنس *Lactobacillus* ووجد قابلية نمو جميع العزلات لغاية التركيز 5 % بينما تمكنت عزلة واحدة من النمو عند التركيز 7.5 % ، في حين كان التركيز 10 % مثبطاً لنمو جميع العزلات المشار اليها . وفي دراسة أخرى أجريت من قبل(2009) Pelinescu *et al.* لوحظ قابلية بعض سلالات بكتريا *Lactobacillus* على النمو عند التراكيز الملحية (0.5 و5) % وانعدام نمو هذه البكتريا عند التراكيز الملحية (8 و10 و12) % . ووجد Olaoye and Onilude (2009) أن عدداً من انواع بكتريا *Lactobacillus* لها القابلية على النمو بشكل جيد عند التركيز الملحي 4 % وعدم قابليتها على النمو عند التركيز 6.5 % .

إن اختبار قابلية بكتريا حامض اللاكتيك على التحمل للتراكيز الملحية يعطي مؤشراً على تحمل المستوى الأوزموزي لهذه البكتريا، فعند تنمية الخلية البكتيرية في تراكيز ملحية عالية يؤدي إلى فقدان الضغط الأنتفاخي للخلية والذي بدوره يؤثر فسلجياً على الخلية والفعالية الأنزيمية والنشاط المائي (water activity) والعمليات الأيضية للخلية البكتيرية (Liu *et al.*,1998).

جدول (6): تحمل عزلات بكتريا *Lactobacillus* للتراكيز الملحية

ت	العــزلــة	تركيز ملح كلوريد الصوديوم(%)			
		1.5	4.5	7.5	10
1−	***Lactobacillus*** **sp.(3)**	+	+	−	−
2−	***Lactobacillus*** **sp .(4)**	+	+	W	−
3−	***Lactobacillus*** **sp .(6)**	+	+	−	−
4−	***Lactobacillus*** **sp .(9)**	+	+	−	−
5−	***Lactobacillus*** **sp .(10)**	+	+	−	−
6−	***Lactobacillus*** **sp .(11)**	+	+	−	−
7−	***Lactobacillus*** **sp.(12)**	+	+	−	−
8−	***Lactobacillus*** **sp .(13)**	+	+	−	−
9−	***Lactobacillus*** **sp.(16)**	+	+	−	−
10−	***Lactobacillus*** **sp.(17)**	+	+	−	−
11−	***Lactobacillus*** **sp .(18)**	+	+	−	−
-12	***Lactobacillus*** **sp.(20)**	+	+	−	−
13−	***Lactobacillus*** **sp.(22)**	+	+	W	−
14−	***Lactobacillus*** **sp .(23)**	+	+	−	−

−15	***Lactobacillus* sp. (24)**	+	+	−	−
−16	***Lactobacillus* sp .(25)**	+	+	W	−
−17	***Lactobacillus* sp .(26)**	+	+	−	−
−18	***Lactobacillus* sp .(27)**	+	+	W	−
−19	***Lactobacillus* sp .(30)**	+	+	−	−
-20	***Lactobacillus* sp .(31)**	+	+	−	−
−21	***Lactobacillus* sp.(32)**	+	+	−	−
−22	***Lactobacillus* sp .(35)**	+	+	W	−
−23	***Lactobacillus* sp .(36)**	+	+	−	−

(+): نتيجة موجبة ، (−): نتيجة سالبة ، (w): نمو ضعيف .

5-2-1-3 إختبار حساسيةعزلات بكتريا *Lactobacillus* للمضادات الحيوية

تم إختبار حساسية بكتريا *Lactobacillus* تجاه عدد من المضادات الحيوية اشتملت على (clindamycin وoxacillin وcefotaxime و sulphanethoxazole و neomycin وchloramphenicol وnalidixic acid و tetracycline و ciprofloxacin). وأظهرت النتائج الموضحة في الجدول (7) أن جميع العزلات قيد الدراسة كانت مقاومة للمضادات الحيوية (clindamycin و oxacillin و cefotaxime و sulphanethoxazote) . و 47.8% منها كانت مقاومة للمضاد (nalidixic acid). و 8.7% مقاومة للمضاد الحيوي chloramphenicol . و اظهرت النتائج في الجدول نفسه ان جميع عزلات *Lactobacillus*

كانت حساسة للمضادات الحيوية tetracycline و ciprofloxacin . و 43.5% حساسة للمضاد الحيوي neomycin و 47.8 % حساسة للمضاد chloramphenicol . و34.8% حساسة للمضاد nalidixic acid .

ورد تأثير المضادات الحيوية على بكتريا *Lactobacillus* في العديد من الدراسات، فقد قام Verdenelli *et al.* (2009) بأختبار حساسية العزلتين *L . rhamnosus* و *L. paracasei* تجاه المضادين neomycin و tetracycline ولاحظ التاثير المثبط للمضاد الحيوي tetracycline للعزلتين المشار اليهما، بينما كان تاثير المضاد neomycin مثبطاً للعزلة *L. paracasei* وغير مثبط لنمو *L. rhmnosus*، وقام Lias *et al*. (2009) بدراسة تأثير المضادات الحيوية على ثلاثة أنواع من بكتريا *Lactobacillus* ولاحظ ان جميع العزلات كانت حساسة للمضادين tetracycline و chloramphenicol ومقاومة للمضادين neomycin و sulphanethoxazole وأظهرت دراسة أخرى أن 70% من بكتريا *Lactobacillus* المستخدمة في تلك الدراسة كانت حساسة للمضاد الحيوي nalidixic acid (Maniruzzaman *et al*. ,2010) . واشار Coppola *et al*. (2005) و Klare *et al* . (2007) الى حساسية بعض انواع بكتريا *Lactobacillus* تجاه المضادات الحيوية clindamycin و chloramphenicol التي تعمل على تثبيط بناء البروتين في الخلية البكتيرية . وذكر Korhonen *et al*.(2008) مقاومة عدد من انواع بكتريا *Lactobacillus* للمضاد tetracycline . ومقاومتها ايضاً للمضادات من نوع aminoglycosides مثل neomycin و kanamycin (Danielsen and Wind ,2003) .

جدول (7): اختبار حساسية عزلات بكتريا *Lactobacillus* تجاه المضادات الحيوية

ت	العـزلـة	DA	OX	CTX	SMZ	N	C	NA	TE	CIP
-1	***Lactobacillus* sp.(3)**	R	R	R	R	M	M	M	S	S
-2	***Lactobacillus* sp.(4)**	R	R	R	R	M	M	R	S	S
-3	***Lactobacillus* sp.(6)**	R	R	R	R	M	M	R	S	S
-4	***Lactobacillus* sp.(9)**	R	R	R	R	S	M	R	S	S
-5	***Lactobacillus* sp.(10)**	R	R	R	R	M	S	S	S	S
-6	***Lactobacillus* sp.(11)**	R	R	R	R	M	S	S	S	S
-7	***Lactobacillus* sp.(12)**	R	R	R	R	M	S	R	S	S
-8	***Lactobacillus* sp.(13)**	R	R	R	R	S	M	M	S	S
-9	***Lactobacillus* sp.(16)**	R	R	R	R	S	R	R	S	S
-10	***Lactobacillus* sp.(17)**	R	R	R	R	S	M	M	S	S
-11	***Lactobacillus* sp.(18)**	R	R	R	R	M	M	S	S	S
-12	***Lactobacillus* sp.(20)**	R	R	R	R	M	M	R	S	S
-13	***Lactobacillus* sp.(22)**	R	R	R	R	S	S	R	S	S

S	S	S	S	S	R	R	R	R	***Lactobacillus* sp.(23)**	**-14**
S	S	R	S	M	R	R	R	R	***Lactobacillus* sp.(24)**	**−15**
S	S	S	S	M	R	R	R	R	***Lactobacillus* sp.(25)**	**-16**
S	S	S	S	S	R	R	R	R	***Lactobacillus* sp.(26)**	**-17**
S	S	S	M	S	R	R	R	R	***Lactobacillus* sp.(27)**	**-18**
S	S	R	M	S	R	R	R	R	***Lactobacillus* sp.(30)**	**-19**
S	S	M	R	M	R	R	R	R	***Lactobacillus* sp.(31)**	**-20**
S	S	S	S	M	R	R	R	R	***Lactobacillus* sp.(32)**	**−21**
S	S	R	S	S	R	R	R	R	***Lactobacillus* sp.(35)**	**−22**
S	S	R	S	M	R	R	R	R	***Lactobacillus* sp.(36)**	**-23**

(R) : مقاومة ، (S) : حساسة ، (M) : متوسطة .

(DA): Clindamycin

(CTX):Cefotaxime

(N) : Neomycin

(NA): Nalidixic-acid

(CIP): Ciprofloxacin

(OX): Oxacillin

(SMZ):Sulphanethoxazole

(C): Chloramphenicol

(TE): Tetracycline

2-3 غربلة عزلات بكتريا *Lactobacillus* لأنتاج حامض اللاكتيك

تم استخدام 24 عزلة بكتيرية عائدة لجنس *Lactobacillus* لأختبار قابليتها في انتاج حامض اللاكتيك ، وتمت تنمية هذه العزلات على وسط MRS السائل وتحت ظروف مختلفة شملت ظروفاًهوائية ساكنة وأخرى هزازة بسرعة رج (100 دورة / دقيقة) وظروفاً لاهوائية بأستخدام اسطوانة النمو اللاهوائي (Anaerobic jar) .وقد أظهرت النتائج المبينة في الجدول (8) أن لجميع العزلات البكتيرية القابلية على انتاج الحامض ولكن بدرجات متفاوتة ، وبمقارنة قيم الانتاج في الجدول نفسه يلاحظ أن أعلى إنتاج من الحامض تحقق من العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp. (25) إذ بلغ (57.86 و59.76) غم / لتر على التوالي . وذلك بتنميتهما تحت ظروف ساكنة . و تبين ايضاً انعدام انتاج الحامض من العزلة *Lactobacillus* sp. (4) تحت ظروف النمو الساكنة واللاهوائية ، بينما بلغ 5.12 غم / لتر تحت الظروف الهوائية الهزازة. وإعتماداً على هذه النتائج فقد أختيرت العزلتان أعلاه للدراسات اللاحقة وتم إنتاج الحامض منهما تحت الظروف الساكنة في جميع مراحل الدراسة .

إن الحصول على أعلى إنتاج من حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus* .sp (25) تحت ظروف ساكنة ربما يعزى الى الطبيعة المحبة لكميات قليلة من الهواء (Micoaerophilic nature) لهاتين العزلتين . وفضلاً عن ذلك فأن دورق المزرعة الساكنة يوفر عدداً غير محدد تقريباً من ظروف التخمر المتغيرة تتفاوت بين غزارة المواد المغذية الى النقص في المواد المغذية وبين تجهيز وفير للأوكسجين الى تعايش لاهوائي (Anaerobiosis) جزئي (ساجدي وعلي ،1987) .

تعد عملية الغربلة مهمة جداً نظراً لكونها تسمح بفرز إضافي لتلك الأحياء المجهرية التي لها قيمة حقيقية في العمليات الصناعية ونبذ تلك التي تنقصها هذه الأمكانية (ساجدي وعلي ،1987).

جدول (8):غربلة عزلات بكتريا *Lactobacillus* لأنتاج حامض اللاكتيك تحت ظروف هوائية مختلفة.

ت	العـــزلـة	ظروف هوائية هزازة		ظروف هوائية ساكنة		ظروف لاهوائية	
		L A (g/l)	pH	L A (g/l)	pH	L A (g/l)	pH
-1	*Lactobacillus* sp.(3)	0.00	4.16	06.43	4.16	01.67	4.16
−2	*Lactobacillus* sp.(4)	05.12	4.20	0.00	4.19	0.00	4.18
−3	*Lactobacillus* sp.(6)	06.31	5.06	32.98	4.72	44.40	4.71
−4	*Lactobacillus* sp.(9)	26.19	4.39	04.52	5.30	10.71	5.15
-5	*Lactobacillus* sp.(10)	29.76	4.54	21.67	4.53	19.29	4.52
−6	*Lactobacillus* sp.(11)	0.00	6.78	01.43	6.76	03.45	6.67
-7	*Lactobacillus* sp.(12)	22.62	4.18	33.10	4.18	43.33	4.19
−8	*Lactobacillus* sp.(13)	10.18	5.14	08.04	5.35	06.19	5.47
-9	*Lactobacillus* sp.(16)	07.62	5.35	0.24	5.40	04.17	5.42
−10	*Lactobacillus* sp.(17)	43.45	4.24	45.60	4.26	38.81	4.22
-11	*Lactobacillus* sp.(18)	30.48	4.14	47.38	4.14	35.36	4.14
-12	*Lactobacillus* sp.(20)	36.31	4.18	34.64	4.18	40.83	4.19
-13	*Lactobacillus* sp.(22)	13.93	4.17	55	4.16	46.19	4.16

4.74	35.71	4.59	33.81	4.60	17.86	***Lactobacillus* sp.(23)**	**-14**
4.20	40.95	4.20	50.95	4.19	44.76	***Lactobacillus* sp.(24)**	**−15**
4.10	54.76	4.11	59.76	4.12	57.62	***Lactobacillus* sp.(25)**	**-16**
4.20	41.43	4.20	48.57	4.21	39.76	***Lactobacillus* sp.(26)**	**-17**
4.23	52.86	4.18	33.93	4.25	32.74	***Lactobacillus* sp.(27)**	**-18**
4.19	46.19	4.22	49.17	4.26	35.95	***Lactobacillus* sp.(30)**	**-19**
4.16	44.05	4.17	34.76	4.15	30.48	***Lactobacillus* sp.(31)**	**-20**
4.14	30.48	4.15	27.14	4.15	25.00	***Lactobacillus* sp.(32)**	**−21**
6.83	05.12	6.99	12.32	7.08	0.00	***Lactobacillus* sp.(35)**	**−22**
4.14	32.02	4.14	40.00	4.15	33.33	***Lactobacillus* sp.(36)**	**-23**
4.22	39.88	4.23	57.86	4.34	44.17	***L. acidophilus***	**−24**

هنالك عدة دراسات اشارت الى غربلة الاحياء المجهرية واختيار الاكفأ منها لانتاج الحامض حيث وجد Yuwono and Hadi , (2008) ان بكتريا *Streptococcus bovis* هي الاكفأ في انتاج حامض اللاكتيك من عملية غربلة لثلاث عزلات عائدة لبكتريا حامض اللاكتيك اذ بلغت حصيلته (85)% عند تنميتها في وسط Onggok –tofu liqid كما قام Ahmed and Kanwal (2004) بعملية غربلة لثلاث عزلات عائدة لبكتريا حامض اللاكتيك معزولة من حليب الجمل شملت *L. acidophilus* و *S. cremoris* و *S. lactis* وتبين أن العزلة *L. acidophilus* هي الأكفأ في تحويل اللاكتوز الى حامض اللاكتيك إذ بلغت نسبة تحويل السكر 74% بينما كانت (66 و56)% للعزلتين *S. lactis* و*S. cremoris* على التوالي. وفي دراسه اخرى اسفرت عملية غربلة سبع سلالات فطرية عائده لجنس *Amylomyces rouxii* عن اختيارالسلالة CBS 438. 76^T *A. rouxii* كأفضل عزلة في انتاجها لحامض اللاكتيك إذبلغت كمية إنتاجه (4.64± 0.22 و3.09±0.15 و3.06±0.63) ملغم/مل عند استخدام الكلوكوز والنشا الذائب والبكتين كمصدر كاربوني في الوسط إلانتاجي على التوالي. (Saito *et al.*, 2004) .

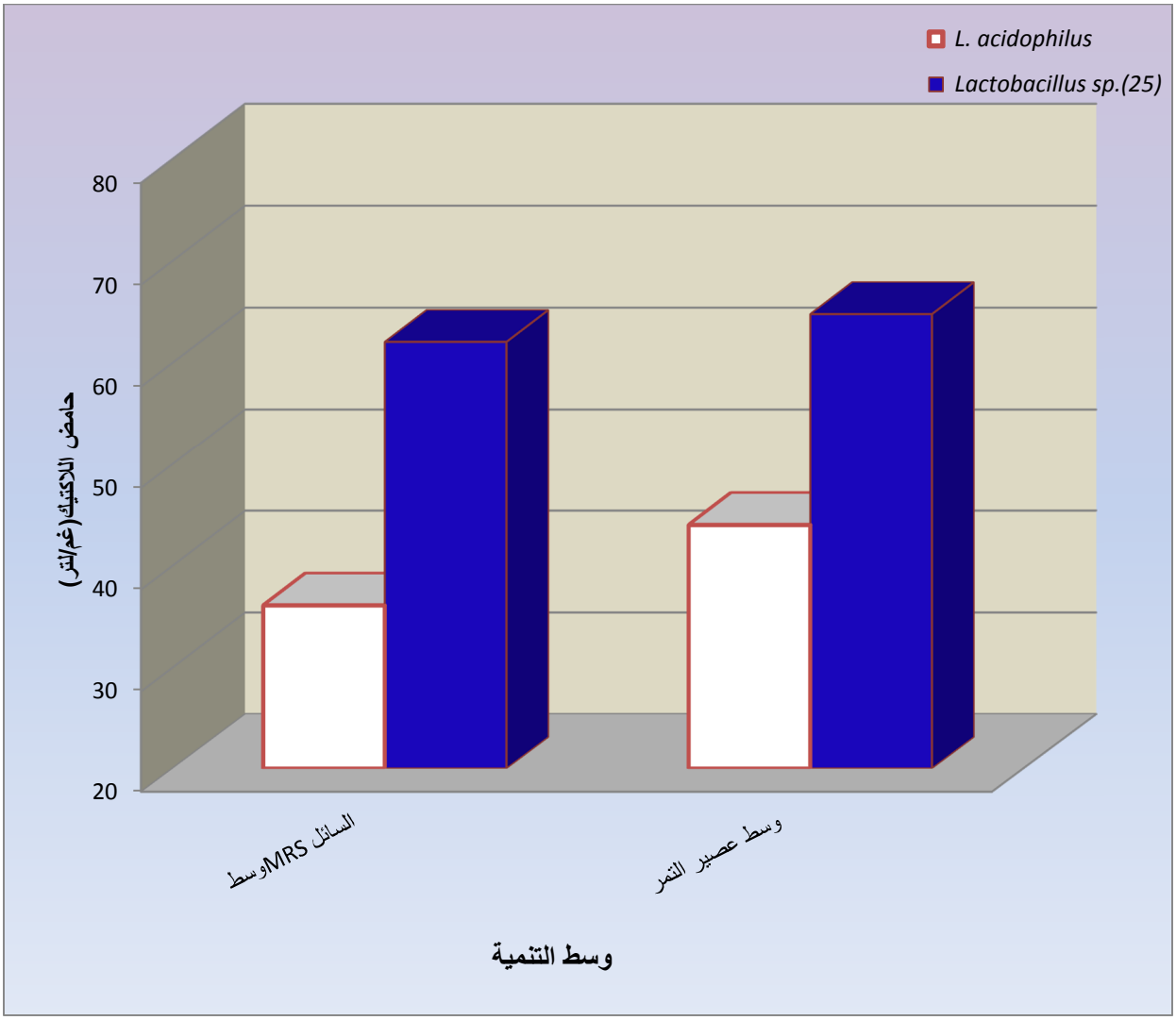
تباينت الظروف المستخدمة في انتاج حامض اللاكتيك فقد اشار deLima *et al* .(2010) الى انتاج الحامض من بكتريا *L. rhamnosus* B 103 تحت ظروف هوائيه بأستخدام الحاضنة الهزازة وبسرعة رج (200 دورة/ دقيقة)، واستخدم Adthalungrong and Temviriyanukul (2010) الحاضنة الساكنة في انتاج الحامض من بكتريا *L.casei* TISTR 453 ، واجرى Ray *et al* .(2009) مقارنة بين انتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. plantarum* MTC 1407 تحت ظروف هوائية ساكنة وأخرى هزازة ولاحظ أن أعلى انتاج للحامض تحقق تحت الظروف الهوائية الساكنة ،بينما تمكن Altaf *et al*.(2005) من انتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. amylophilus* GV6 تحت ظروف لاهوائية.

3-3 تحديد الظروف المثلى لأنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp .(25)

1- تأثير نوع الوسط

قورن انتاج حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) بأستخدام نوعين من الاوساط ،الاول وسط MRS الصناعي السائل والآخر عصير التمر المدعم بمستخلص الخميرة وكاربونات الكالسيوم .وأظهرت النتائج المبينة في الشكل (4) أن اعلى انتاج للحامض كان بأستخدام وسط عصير التمر المدعم بالمغذيات المشار اليها اذ بلغ (44.02 و64.8) غم/لتر للعزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp.25 على التوالي ، مقارنة بقيم الأنتاج المستحصلة عند استخدام وسط MRS السائل والتي بلغت (36.12 و62.076) غم/لتر للعزلتين على التوالي ايضاً. واعتماداًعلى هذه النتائج تم إختيار وسط عصير التمر بوصفه مصدراً كاربونياً وتم إستخدامه في جميع مراحل الدراسة اللاحقة .

يتضح من النتائج اعلاه ملاءمة وسط عصير التمر لأنتاج حامض اللاكتيك ويمكن أن يعزى ذلك الى إحتوائه على مكونات تدعم نمو البكتريا وإنتاج الحامض حيث يحتوي التمر على سكر مختزل بنسبة 55.8 % وبروتين 1.2 % فضلاًعن الكثير من الاملاح المعدنية وبعض الفيتامينات (البكر،1972) . وفي دراسة قام بها Yousif *et al.* (1982) تبين أن تمور الزهدي تحوي على سكريات كلية بنسبة 86.8% وسكريات مختزلة بنسبة 73.4 % منها 32.77 % سكر كلوكوز و 39.15 % سكر فركتوز على أساس الوزن الجاف وكذلك أشارت نفس الدراسة الى إحتواء هذا الصنف من التمور أيضاً على فيتامين B1 و B2 والبايوتين وحامض الفوليك بنسب (80 و167 و 5.74 و 6.3) مايكروغرام/100غم من الوزن الجاف على التوالي . فضلاً عن احتوائها على حامض الأسكوربيك بنسبة 2.41 ملغم/100غم من الوزن الجاف ايضاً.



الشكل (4) : تأثير نوع الوسط في إنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp. (25) بأستخدام وسط (MRS) السائل ووسط عصير التمر بتركيز (2)%.

و تميزت بأحتوائها على نسب مختلفة من أيونات الكالسيوم والفسفور والبوتاسيوم والكبريت والصوديوم والكلور والمغنيسيوم والحديد والمنغنيز والنحاس والخارصين والكوبلت والفلورين .

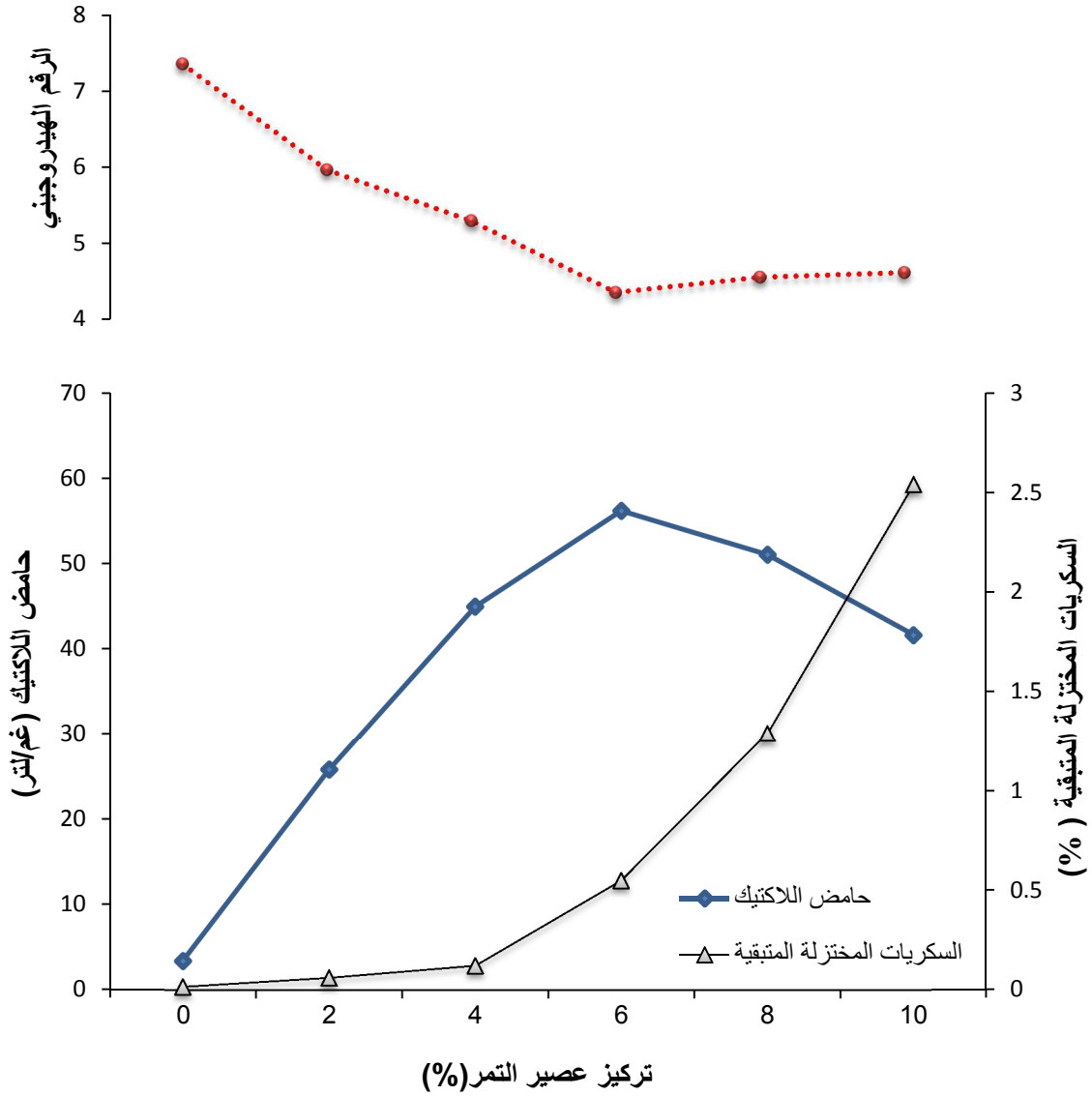
استخدم عدد كبير من المواد الكربوهيدراتية والنيتروجينية لأنتاج حامض اللاكتيك إذ تم إختيارها إعتماداً على اعطائها أكبر حصيلة من الحامض وأفضل إنتاج من الكتلة الحيوية وقلة النواتج العرضية ومعدلات تخمر سريعة بأقل مايمكن من المعاملات التمهيدية فضلاً عن سهولة عمليات الفصل والتنقية وقلة الكلفة وتوفرها ، وإن إختيار المادة الخام يعتمد على الكائن المجهري المدروس والناتج المرغوب (Narayanan *et al*.,2004) .وأشارت دراسات عديدة الى إنتاج حامض اللاكتيك بأستخدام المواد الخام فقد أستخدم Kotzanmanidis *et al*. (2002) المولاس في إنتاج الحامض من بكتريا *L.delbrueckii* NCIMP 8130 وبلغت كمية الحامض المنتجة 90.0 غم /لتر . واستخدم Dumbrepatil *et al*.(2008) نفس الوسط في إنتاج الحامض من البكتريا الطافرة *L.delbrueckii* Subsp.*delbrueckii* UC-3 وتحقق أعلى إنتاج للحامض بأستخدام المولاس بتركيز 190 غم/ لتر حيث بلغت كمية الحامض المنتجة 166غم/لتر. وأشارت دراسات أخرى الى استخدام الشرش في إنتاج حامض اللاكتيك إذ تم إستخدام الوسط المذكور في إنتاج الحامض من السلالة *L. helveticus* R 211 وبلغت كمية الحامض المنتجة 66.0 غم /لتر (Schepers *et al*.,2002) . بينما بلغت 46.0 غم /لتر عند استخدام السلالة *L.casei* NRRL B-441 في إنتاج الحامض من الوسط المشار اليه (Buyukkilci and Harsa ,2004) . في حين استخدم السليلوز من قبل Yanez *et al* . (2003) كمادة خام في إنتاج الحامض من السلالة *L.coryniformis* ssp.torquens ATCC 25600 . إذ بلغت كمية الحامض المنتجة 24.0 غم/لتر.

لقد حظيت المصادر الخام بأهتمام كبير في دراسات إنتاج حامض اللاكتيك من الأحياء المجهرية نظراً لأن كلفة المادة الأساس المستخدمة في إنتاج حامض اللاكتيك تمثل(30-40) % من الكلفة الكلية لأنتاج الحامض (Akerberg and Zacchi ,2002) .

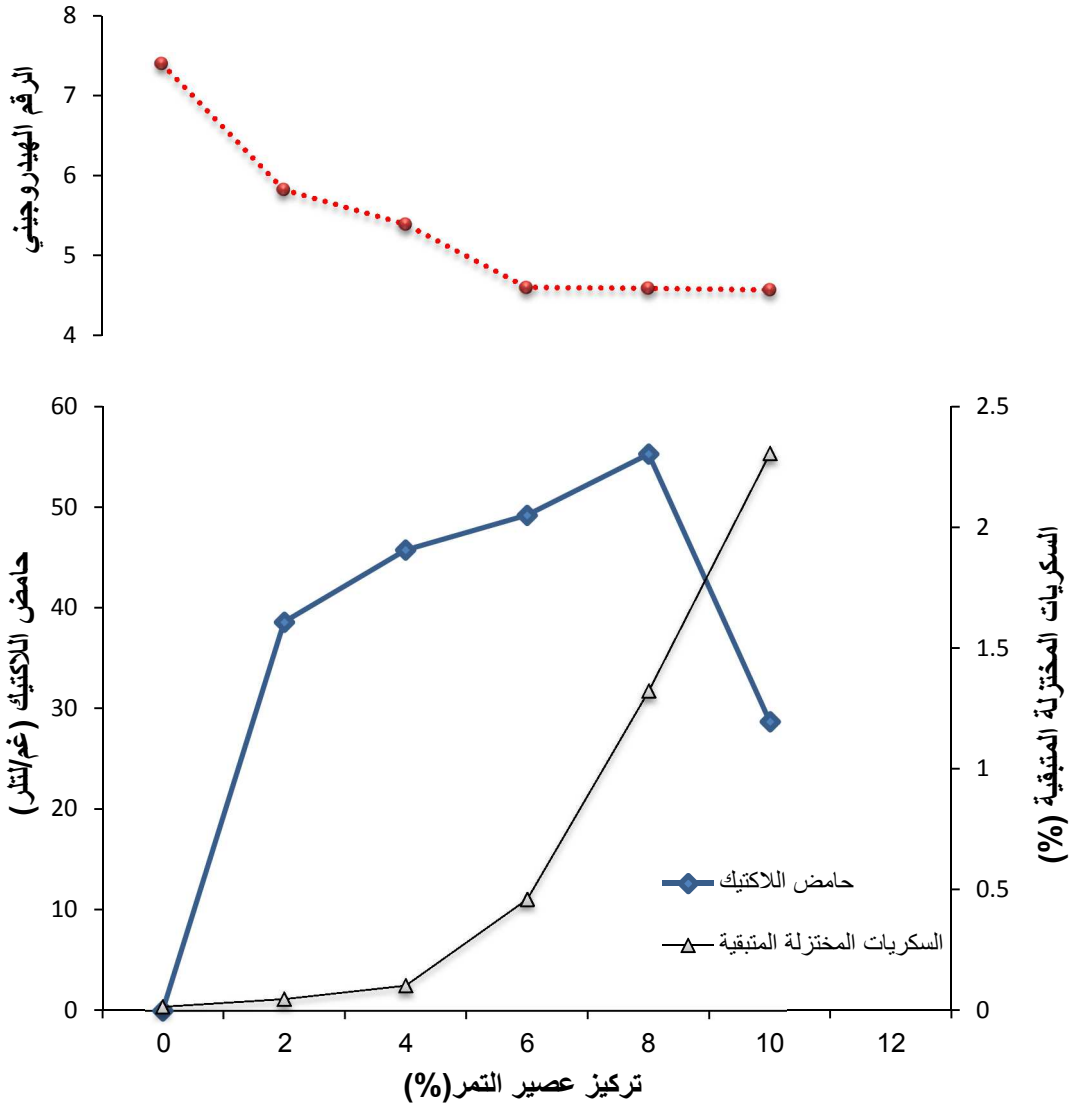
إن استخدام وسط عصير التمر كوسط رئيسي في إنتاج حامض اللاكتيك في هذه الدراسة ساعد على إعداد وسط زرعي مناسب واقتصادي للأنتاج نظراً لكونه مصدر كربوني رخيص ومتوفر على مدار السنة تقريباً ، بينما نجد أن إستخدام المصادرالكربونية النقية كالسكريات يكون مكلفاً من الناحية الاقتصادية ويقتصر إستخدامها على الدراسات المختبرية (الحيدري والمصلح ،1989) .

2- تأثير تركيز عصير التمر

تم إستخدام تراكيز متدرجة من وسط عصير التمر(0.0 و2 و4 و6 و8 و10)**%** في إنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp. (25) ويتضح من الشكل (5) أن إنتاج حامض اللاكتيك من العزلة *L.acidophilus* يزداد بزيادة تركيز السكريات المختزلة للعصير المستخدم ولغاية التركيز 6**%** إذ بلغ 56.19 غم/لتر، ثم ينخفض بعد ذلك . وقد حذت العزلة *Lactobacillus* sp. (25) حذو العزلة *L. acidophilus* ،إذ إزداد إنتاج حامض اللاكتيك بزيادة تركيز السكر ولكن لغاية التركيز 8**%** حيث بلغ 55.24 غم/لتر(شكل 6). ويمكن تفسير إنخفاض إنتاج الحامض في التراكيز العالية من السكريات المختزلة الى التثبيط بالمادة الأساس (Substrate Inhibition) وهي الظاهرة التي تحصل في تخمرات الوجبة التقليدية (Dumbrepatil *et al*.,2008). وفي دراسة لأنتاج الحامض من بكتريا *L.lactis* subs.*lactis* فسر Cock and destouvenel (2006) انخفاض الحصيلة ونسبة تحويل الكلوكوز الى حامض اللاكتيك عند زيادة تركيز الكلوكوز الى التثبيط بالمادة الأساس والتثبيط بالناتج أوظهور مادة محددة للأنتاج أو بالتوليف بين تأثير هذه المثبطات . وهذا يتفق مع ماوجده Busairi (2010) في دراسة له لأنتاج الحامض من بكتريا *L.delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ATCC بأستخدام تراكيز متدرجة من عصير الأناناس حيث بلغ أعلى إنتاج للحامض 54.97 غم/لتر عند التركيز 7% ومن ثم يبدأ بالأنخفاض الى 51.53 غم /لترعند التركيز 11% من السكر. وأشار Naranong and Poocharoen (2001) الى إستخدام تراكيز متد رجة من نشأ نبات الكسافة



الشكل (5): تأثير تركيز عصير التمر في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L .acidophilus*.



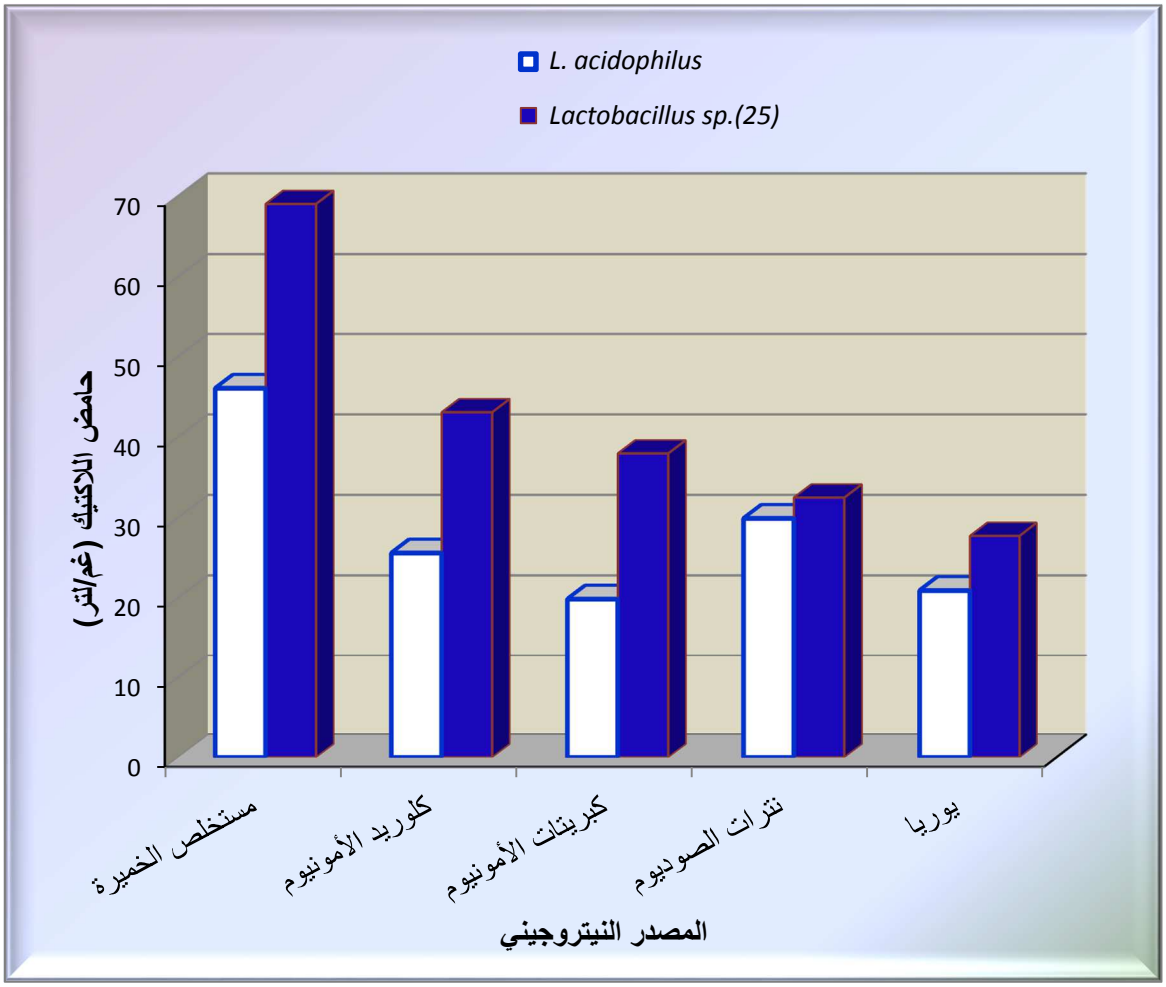
الشكل (6): تأثير تركيز عصير التمر في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا(25).*Lactobacillus* sp.

(5 و10 و12 و15 و18)% لأنتاج حامض اللاكتيك من الفطر *R.oryzae* NRRL 395 ولاحظا زيادة في إنتاج الحامض بأزدياد تركيز السكريات لغاية 12 % إذ بلغ 58.57 غم /لتر ثم يبدأ بالأنخفاض تدريجياً بأزدياد التركيز . وذكر deLima *et al.*(2010) أن أعلى إنتاج لحامض اللاكتيك المنتج من بكتريا *L.rhamnosus* B103 بلغ 84.21 غم /لتر عند إستخدام وسط إنتاجي يتألف من عصير قصب السكر وماء نقيع الذرة بالتركيزين (10 و3)% على التوالي.

3- تأثير المصدر النيتروجيني وتركيزه

درس تأثير نوع المصدر النيتروجيني في انتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) فقداستخدمت خمسة مصادر نيتروجينية شملت مستخلص الخميرة واليوريا وكبريتات وكلوريد الامونيوم ونترات الصوديوم .واوضحت النتائج أن افضل مصدر نيتروجيني لانتاج الحامض هو مستخلص الخميرة (شكل 7) إذ بلغ انتاج الحامض (46.07 و69.05) غم /لتر من العزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillu* sp.(25) على التوالي. بينما سجل أوطأ انتاج من الحامض من العزلة *L. acidophilus* بأستخدام كبريتات الامونيوم بوصفه مصدراً نيتروجينياً إذ بلغت كمية الحامض المنتجة 19.88 غم /لتر ، في حين بلغ أوطأ انتاج من العزلة *Lactobacillus* sp.(25) بأستخدام اليوريا بكمية حامض منتجة مقدارها 27.74 غم/لتر .

في ضوء ماتقدم من نتائج تم اختيار مستخلص الخميرة بوصفه افضل مصدر نيتروجيني لأنتاج الحامض وتم إستخدامها في جميع مراحل الدراسة اللاحقة . وتتفق هذه الدراسة مع ماوجده Nancib *et al*. (2005) الذي أشار الى تفوق مستخلص الخميرة في إنتاج الحامض من بكتريا *L. casie* subsp.*rhamnosus* من بين عدة مصادر نيتروجينية إشتملت على الببتون وكبريتات الأمونيوم ومتحلل الكازين واليوريا ومرق الصويا . و أشار Aeschlimann and Stockar (1990) ايضاً الى أن مستخلص الخميرة يعد مادة غذائية أساسية لبكتريا *Lactobacillus*



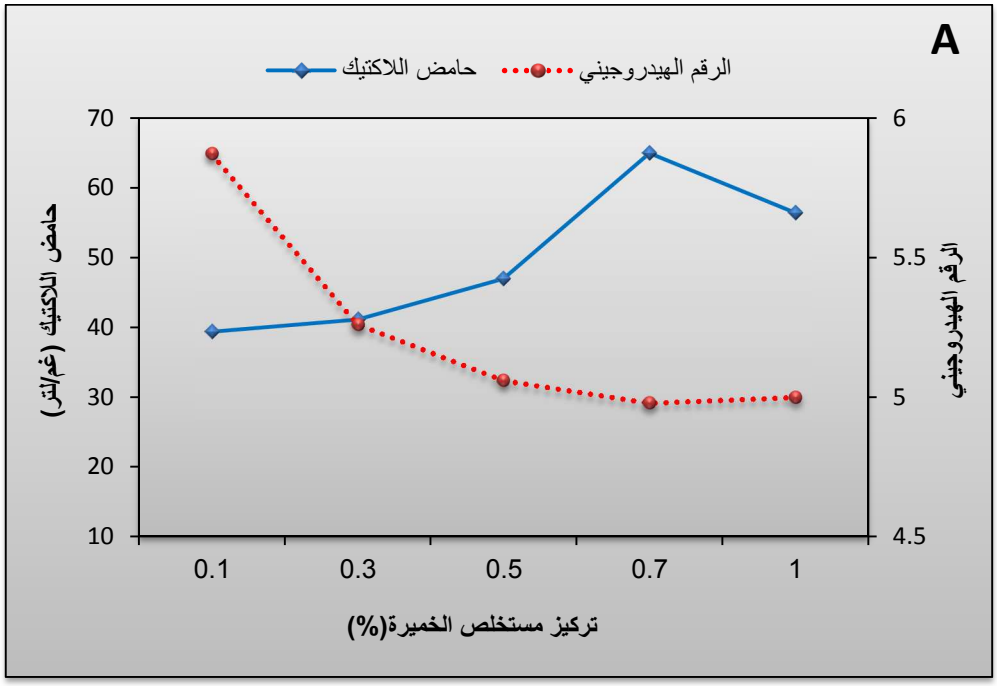
الشكل (7): تأثير نوع المصدر النيتروجيني في إنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp. (25)

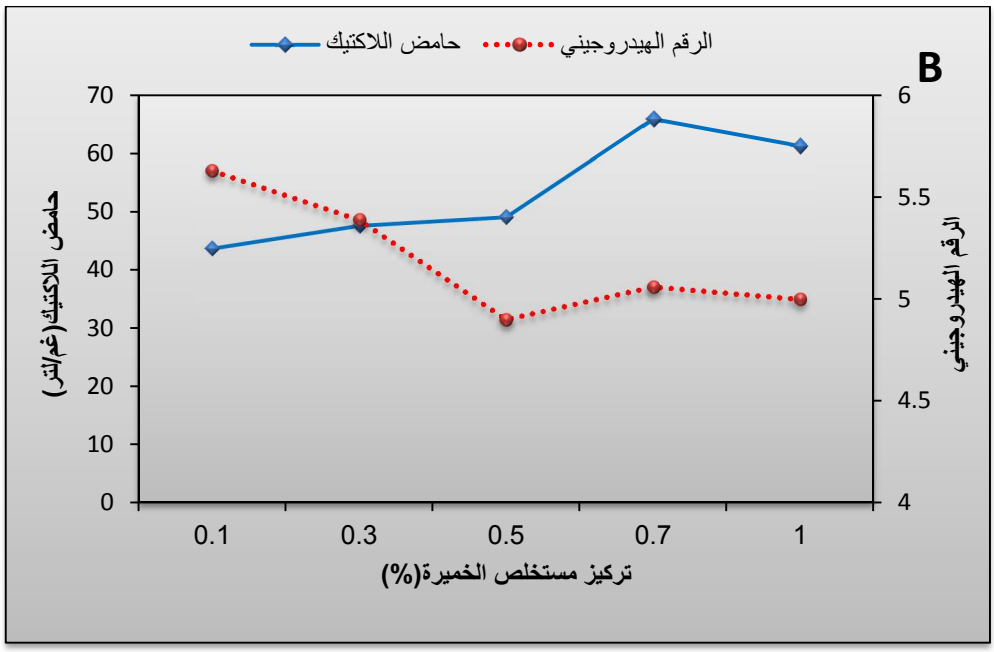
حيث تزيد من كفاءة إنتاج حامض اللاكتيك .

يمكن أن يعزى تفوق مستخلص الخميرة في إنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين المستخدمتين في هذه الدراسة الى إحتواء هذا المستخلص على الكثيرمن المكونات التي تلبي الاحتياجات المعقدة لبكتريا *Lactobacillus* ،اذ يحوي على كربوهيدرات ونيتروجين كلي بنسبتي (82 و90) ملغم/غم على التوالي كما يحوي على العديد من الأيونات التي تشتمل على الكلوريدات والفوسفات والصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم والحديد والمغنيسيوم والنحاس والزنك والمنغنيز والكوبلت (الخفاجي،1990)، فضلاً عن إحتوائها على الاحماض الامينية وببتيدات وفيتامينات وبعض الاحماض العضوية مثل حامض البايروفيك وحامض الكليسريك (Busairi, 2010). وأشارت نفس الدراسة الى تفوق مستخلص الخميرة في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ATCC 9649 من بين مصادر نيتروجينية أخرى شملت اليوريا وماء نقيع الذرة وكبريتات الأمونيوم والشعير المنبّت .

وبعد أن تم تحديد أفضل مصدر نيتروجيني لأنتاج الحامض تم تحديد التركيز الأمثل للمصدر النيتروجيني لأنتاجه، حيث تم إستخدام تراكيز متدرجة من مستخلص الخميرة (0.1 و 0.3 و0.5 و0.7 و1.0)% ،وتشير النتائج الموضحة في الشكل (A و B – 8) الى أن أعلى إنتاج للحامض كان عند التركيز 0.7 % اذ بلغ (64.88 و65.95) غم/لتر للعزلتين *L. acidophilus* و(25) *Lactobacillus* sp. على التوالي .

أشارت العديد من الدراسات الى إستخدام مستخلص الخميرة كمصدر نيتروجيني في إنتاج حامض اللاكتيك ، ففي دراسة قام بها Kotzamanidis *et al.*(2002) لأنتاج الحامض من بكتريا *L.delbrueckii* NCIMB 8130 بلغت كمية الحامض المنتجة 90 غم/لتر بأستخدام 0.5 % من مستخلص الخميرة.





الشكل (8): تأثير تركيز المصدر النيتروجيني في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا:

L. acidophilus **-A**

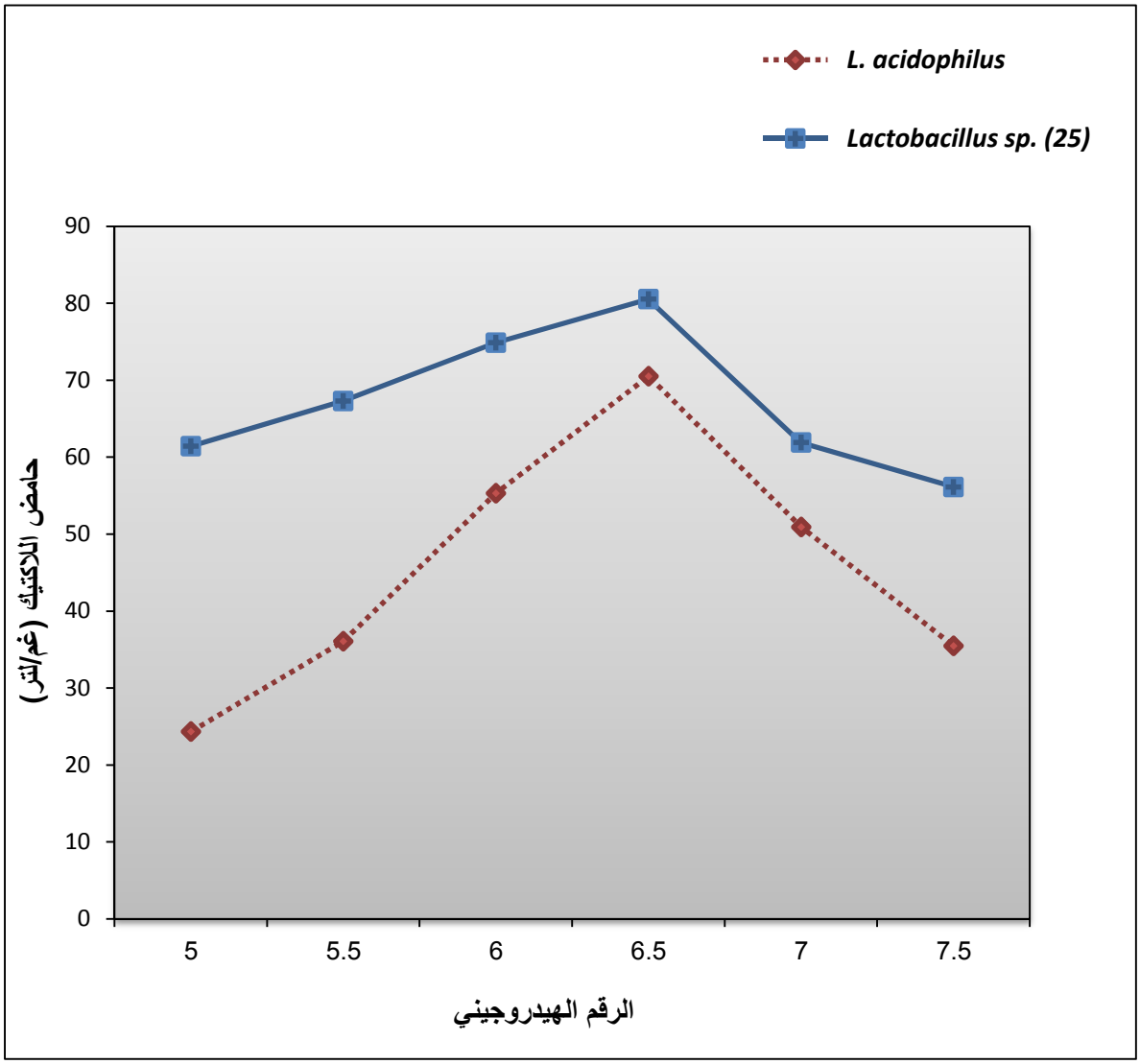
Lactobacillus **sp. (25) -B**

تنوعت المصادر النيتروجينية المستخدمة في إنتاج حامض اللاكتيك من الأحياء المجهرية ، فقد تبين أن 0.3% من كبريتات الأمونيوم أفضل المصادر النيتروجينية لأنتاج الحامض من الفطر *R.oryzae* NRRL 395 إذ بلغ إنتاج الحامض 60.80 غم/لتر (Naranong and Poocharoen,2001) بينما استخدمت اليوريا بتركيز 0.2% بوصفها مصدراً نيتروجينياً لأنتاج الحامض من نفس الفطر المشار اليه في الدراسة السابقة (Zhan *et al*.,2003). فضلاً عن استخدام ماء نقيع الذرة بوصفه مصدراً نيتروجينياً في انتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *Lactobacillus sp*.RKY2 (Wee *et al*.,2006) .

فضلاً عما تقدم فأن التركيز الأمثل من مستخلص الخميرة المتحصل عليه من هذه الدراسة بوجود التركيز الأمثل من المصدر الكربوني المتحصل عليه من هذه الدراسة ايضاً (8 و6)% من عصير التمر للعزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp. (25) على التوالي ربما ساعد في إعداد وسط متوازن من حيث النسبة بين الكربون والنيتروجين (C/N Ratio) بما يحقق زيادة في انتاج حامض اللاكتيك ، فقد ذكر Zhang *et al* .(2007) أن النسب الواطئة من الكربون /النيتروجين (C\N) تسمح بأنتاج كثير من حامض اللاكتيك والأيثانول والكتلة الحيوية وإنتاج قليل من حامض الفيوماريك فضلاً عن تقصير وقت التخمر.

4- تأثير الرقم الهيدروجيني الأبتدائي

درس تأثير الرقم الهيدروجيني في انتاج حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp.25 وكما يلاحظ في الشكل (9) أن أفضل رقم هيدروجيني ابتدائي لأنتاج الحامض هو 6.5 حيث بلغت كمية الحامض المنتجه (70.54 و80.54) غم/لتر للعزلتين *L .acidophilus* و*Lactobacillus* sp.(25) على التوالي .وتتفق النتيجه المتحصل عليها في هذه الدراسة مع ماأشارت اليه بعض الدراسات إذ تم استخدام الرقم الهيدروجيني 6.5 في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L.delbrueckii* NCIMB 8130 .(Dumbrepatil *et al*.,2008)



الشكل (9): تأثير الرقم الهيدروجيني الأبتدائي في إنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25)

ووجد John *et al.* (2006) في دراسة له بأستخدام قيم مختلفة من الارقام الهيدروجينية تتراوح من (4-10) أن أعلى انتاج للحامض من بكتريا *L.delbrueckii* تحقق عند (pH 6.5).

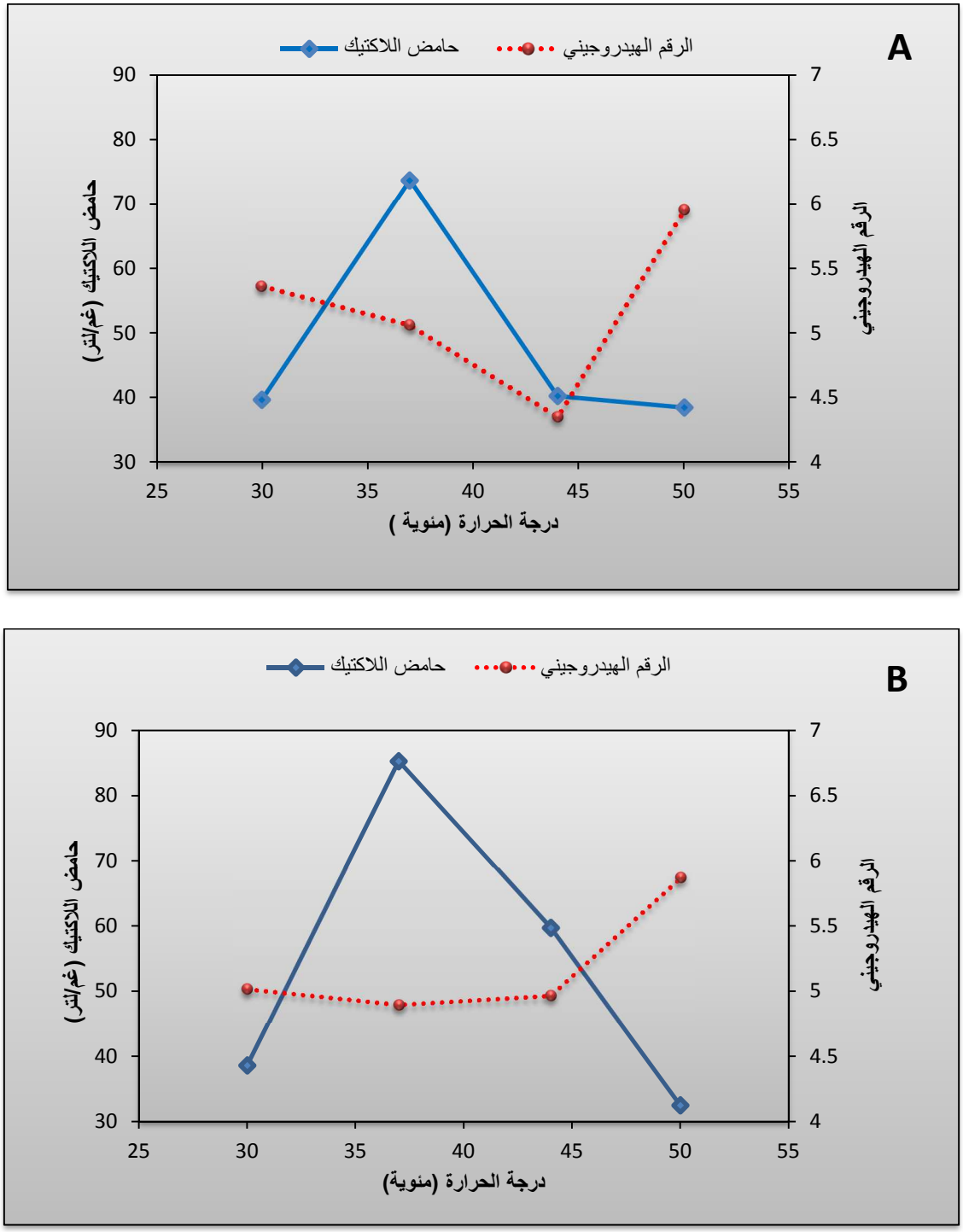
يعد الرقم الهيدروجيني للوسط مهماً جداً لنمو الأحياء المجهرية ولتوجيه ايضها و تعد التغيرات في الرقم الهيدروجيني مهمة جداً لفعالية انزيمات الأحياءالمجهرية والنواتج الوسطية ودرجة تحللها وذائبيتها ،فضلاً عن أن لهذه التغيرات تأثيراً في حصيلة النواتج النهائية لأيض الأحياء المجهرية (Egorov ,1985) ويؤثر الرقم الهيدروجيني عموماً في وظيفة الأنزيمات الأيضية ونقل المغذيات في الخلية (Klovrychev *et al.*,1979) . وقد استخدمت ارقام هيدروجينية أخرى في إنتاج حامض اللاكتيك إذ أمكن انتاجه من بكتريا *L.manihotivorans* LMG 18011 بتعديل الرقم الهيدروجيني للوسط الى pH (5-5.5) (Ohkouchi *et al.*, 2006) . كما تم انتاج الحامض من بكتريا *L.casei* بتعديل الرقم الهيدروجيني للوسط الى 6 (Senthuran *et al.*, 1999) .وذكر Burton (1937) ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لأنتاج الحامض من العزلة *L.bulgaricus* يتراوح بين (6 - 7).

يؤثر الرقم الهيدروجيني في إنتاج أي منتوج ايضي معين، لذا يجب المحافظة على مدى ضّيق من الأرقام الهيدروجينية لأن تحديد الرقم الهيدروجيني للوسط الزرعي يعد من العوامل المهمة جداً في زيادة الأنتاجية ، لذا تضاف الى الأوساط الزرعية مركبات تعمل منظمات للحموضة لغرض المحافظة على الرقم الهيدروجيني فضلاً عن كونها مصادر مغذية للاحياء المجهرية لذا تستخدم كربونات الكالسيوم لغرض المحافظة على الرقم الهيدروجيني المتعادل في الوسط الزرعي فعند انخفاض الرقم الهيدروجيني تتحلل الكربونات وعند زيادة الرقم الهيدروجيني تعمل الاحماض المتحررة الى الوسط الزرعي من خلال الاحياء المجهرية على خفض الرقم الهيدروجيني (الحيدري والمصلح ،1989).

5 - تأثير درجة حرارة الحضن

درس تاثير درجة حرارة الحضن في انتاج حامض اللاكتيك من العزلتين *L.acidophilus* و*Lactobacillus*.sp.(25) وأظهرت النتائج المبينة في الشكل (B و A -10) أن أعلى انتاج للحامض تحقق بأستخدام درجة الحرارة 37 مئوية إذ بلغ (73.66 و85.30) غم/لتر للعزلتين أعلاه على التوالي لذا فقد تم إعتماد هذه النتيجة وتم استخدام درجة الحضن المذكورة في جميع مراحل الدراسة اللاحقة .لقد اشارت العديد من الدراسات الى أن درجة الحرارة 37 مئوية هي المثلى لأنتاج الحامض من بكتريا حامض اللاكتيك فقد استخدم(2000), Kious درجات حرارية مختلفة لأنتاج الحامض من بكتريا *Lactobacillus* وتحقق أعلى إنتاج للحامض عند درجة حرارة 37 مئوية. وأشار Idris *et al.* (2006) و Narita *et al.*(2004) الى استخدام درجة الحرارة ذاتها في انتاج الحامض من بكتريا *L.delbrueckii* وبكتريا *S. bovis* على التوالي إذ بلغت كمية الحامض المنتجة من العزلتين (28.73 و 14.73)غم /لتر على التوالي ايضاً ، بينما اشارت دراسات اخرى الى استخدام درجات حرارية مختلفة في انتاج حامض اللاكتيك، فقد تم انتاجه من بكتريا *Lactococcus lactis subsp. Lactis* عند درجة الحرارة 32 مئوية(Cock and deStouvenel, 2006) ، كما استخدمت درجة الحرارة 42 مئوية في انتاج الحامض من بكتريا *L.helveticus* (Gonzalez *et al*., 2006) في حين ذكر Richter and Trager (1994) أن افضل درجة حرارة لأنتاج الحامض من بكتريا *L.rhamnosus* ATCC 10863كانت عند 45 مئوية.

إن الحصول على اعلى إنتاج من حامض اللاكتيك من العزلتين قيد الدراسة بالحضن على درجة حرارة 37 مئوية يمكن أن يعزى الى أن هذه الدرجة الحرارية هي المثلى لعمل الأنزيمات الضرورية لتحويل المادة الأساس إلى حامض وإن أي درجة حرارة أعلى أو اوطأ من هذه الدرجة تؤثر في الأيض وبالتالي تؤثر في عملية إنتاج الحامض (Panesar *et al*.,2007).



الشكل (10): تأثير درجة الحرارة في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا:

***L. acidophilus* -A**

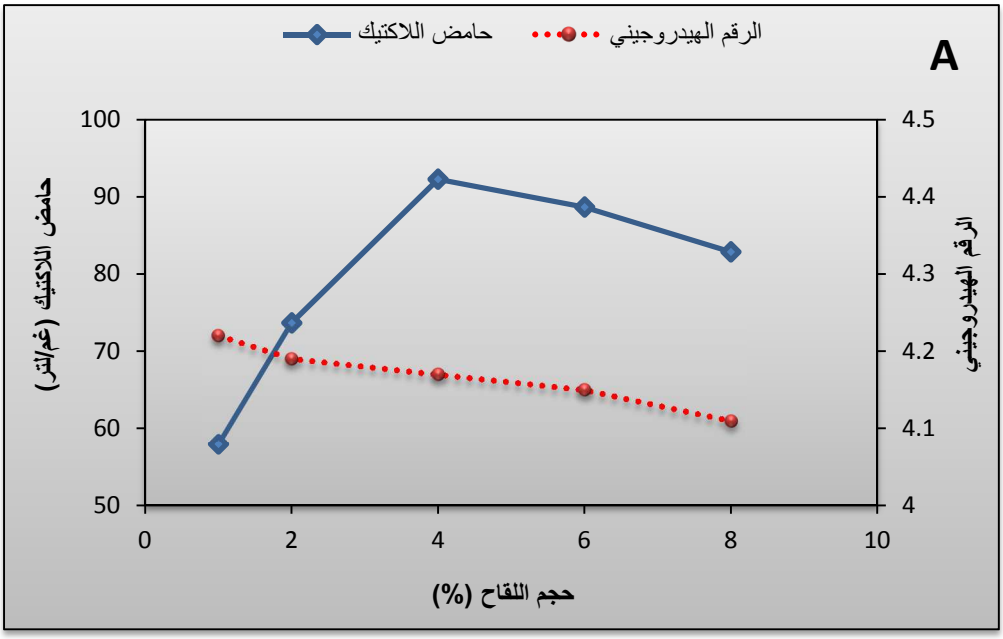
***Lactobacillus* sp.(25) -B**

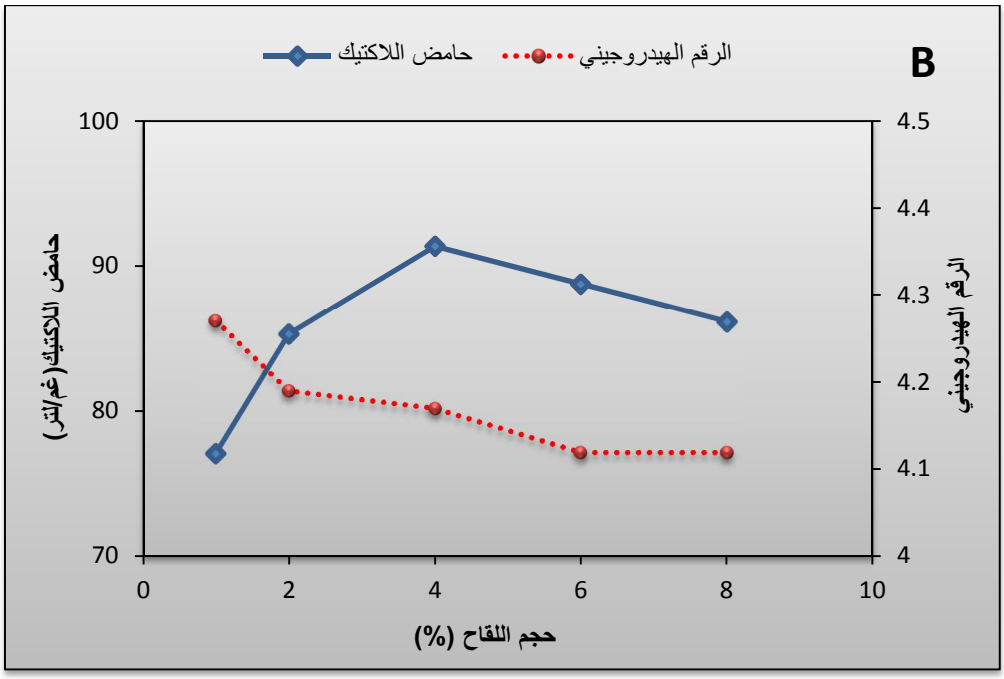
6 - تأثير حجم اللقاح

لغرض معرفة تأثير حجم اللقاح في إنتاج حامض اللاكتيك تم تلقيح وسط الأنتاج بأستخدام حجوم متدرجة من اللقاح(1.0و2.0 و4.0 و6.0 و8.0)% وتشير النتائج الموضحة في الشكل (B و A-11) الى أن إنتاج الحامض يزداد بزيادة حجم اللقاح المستخدم الى أن يصل الى أقصاه بأستخدام حجم لقاح مقداره 4 % حيث بلغ إنتاج الحامض(92.29 و91.37) غم /لتر للعزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp. (25) على التوالي ثم ينخفض بعد ذلك ، لذا فقد تم إعتماد هذه النتيجة وتم إستخدام حجم اللقاح المذكور في جميع مراحل الدراسة اللاحقة.

تباينت حجوم اللقاح المستخدمة في إنتاج حامض اللاكتيك من الأحياء المجهرية ، فقد تم إنتاج الحامض من بكتريا *L. rhamnosus* NBRC3532 بأستخدام حجم لقاح مقداره 1% (Shindo and Tachibana ,2004) ، وتمكن Mukhopadhyay ,(2009) من إنتاج الحامض من بكتريا *L.plantarum* بأستخدام حجم لقاح مقداره 5%. واستخدم Zhan *et al* . (2003) حجم لقاح مقداره 10% لأنتاج الحامض من الفطر *R.oryzae* .

ومما يجدر الأشارة اليه أن النسب العالية من اللقاح تستخدم تحت ظروف تتواجد فيها مثبطات النمو التي لاتسمح بحدوث نمو مفرط للكائن الحي المجهري في وسط التخمر الأنتاجي (ساجدي وعلي ،1987).





الشكل (11): تأثير حجم اللقاح في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا :

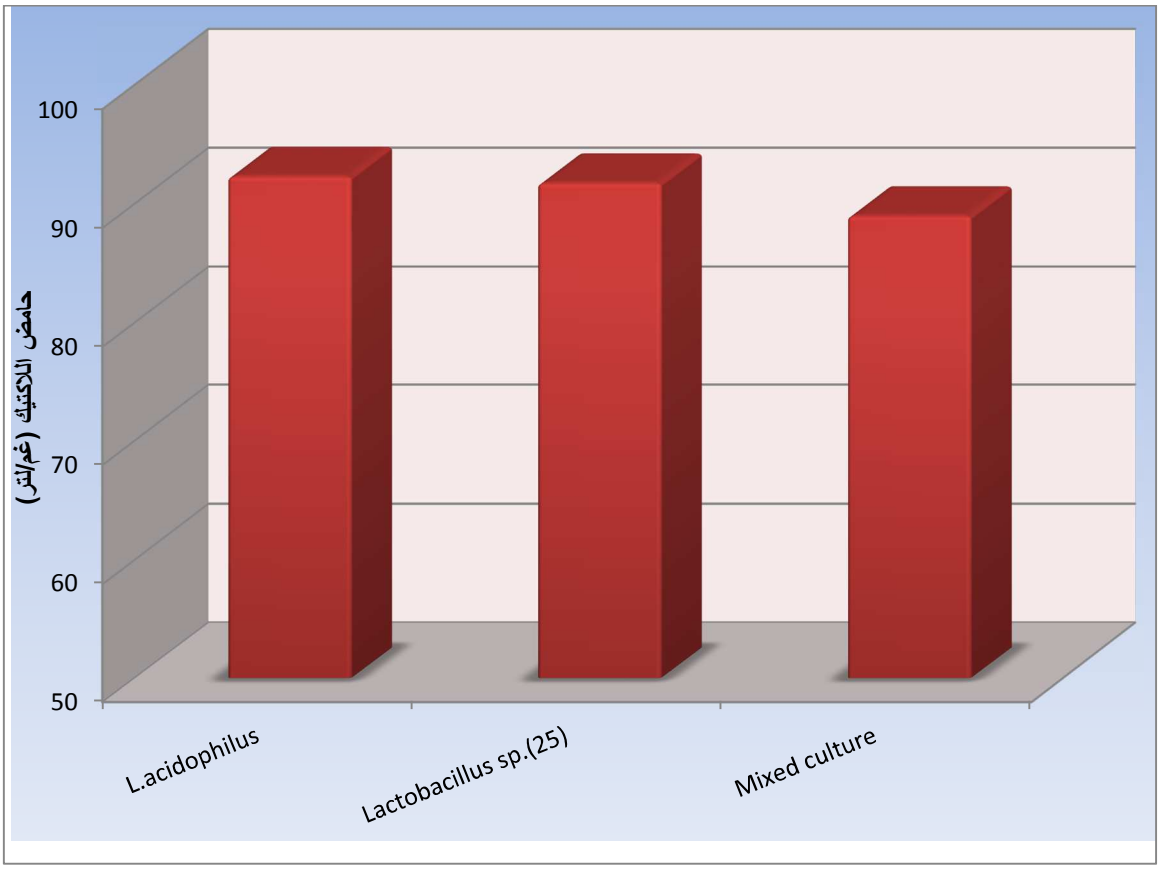
***L. acidophilus* -A**

***Lactobacillus* sp.(25) - B**

4-3 إنتاج حامض اللاكتيك بأستخدام المزارع المختلطة

تم إنتاج حامض اللاكتيك من المزرعة المختلطة المتكونة من العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp. (25) وقورنت إنتاجيتها بالمزارع المفردة للعزلات المشار اليها وذلك بعد تنمية هذه العزلات في وسط عصير التمر المدعم بمستخلص الخميرة وكربونات الكالسيوم . وأظهرت النتائج الموضحة في الشكل (12) عدم وجود فروقات واضحة بين انتاج الحامض بأستخدام المزرعة المختلطة عنه بأستخدام المزارع المفردة إذ بلغت كمية الحامض المنتجة (92.29 و91.73) غم /لتر للمزرعة النقية لبكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) على التوالي بينما بلغت (88.97) غم /لتر من المزرعة المختلطة .

وتعد النتيجة المتحصل عليها من هذه الدراسة مماثلة لما توصل اليه EL-Hawary *et al*.(2009) الذي قام بأجراء مقارنة بين قيم إنتاج الحامض عند استخدامه للمزارع المختلطة والمفردة لبكتريا *L. delbrueckii* و *L.gasseri* المنماة في وسط الشرش المدعم بنخالة الحنطة. كما استخدم Garde *et al*.(2002) المزرعة المختلطة المتكونة من بكتريا *L.pentosus* و *L.brevis* في إنتاج حامض اللاكتيك من شبه سليلوز تبن الحنطة ، بينما أشار Francois *et al* (2007). الى استخدام العزلتين *S.thermophilus* و *L .delbrueckii* معاً بوصفهما بادئين في إنتاج اللبن الرائب.



الشكل (12) : إنتاج حامض اللاكتيك من المزرعة المفردة والمرزعة المختلطة (Mixed culture) لبكتريا *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp. (25).

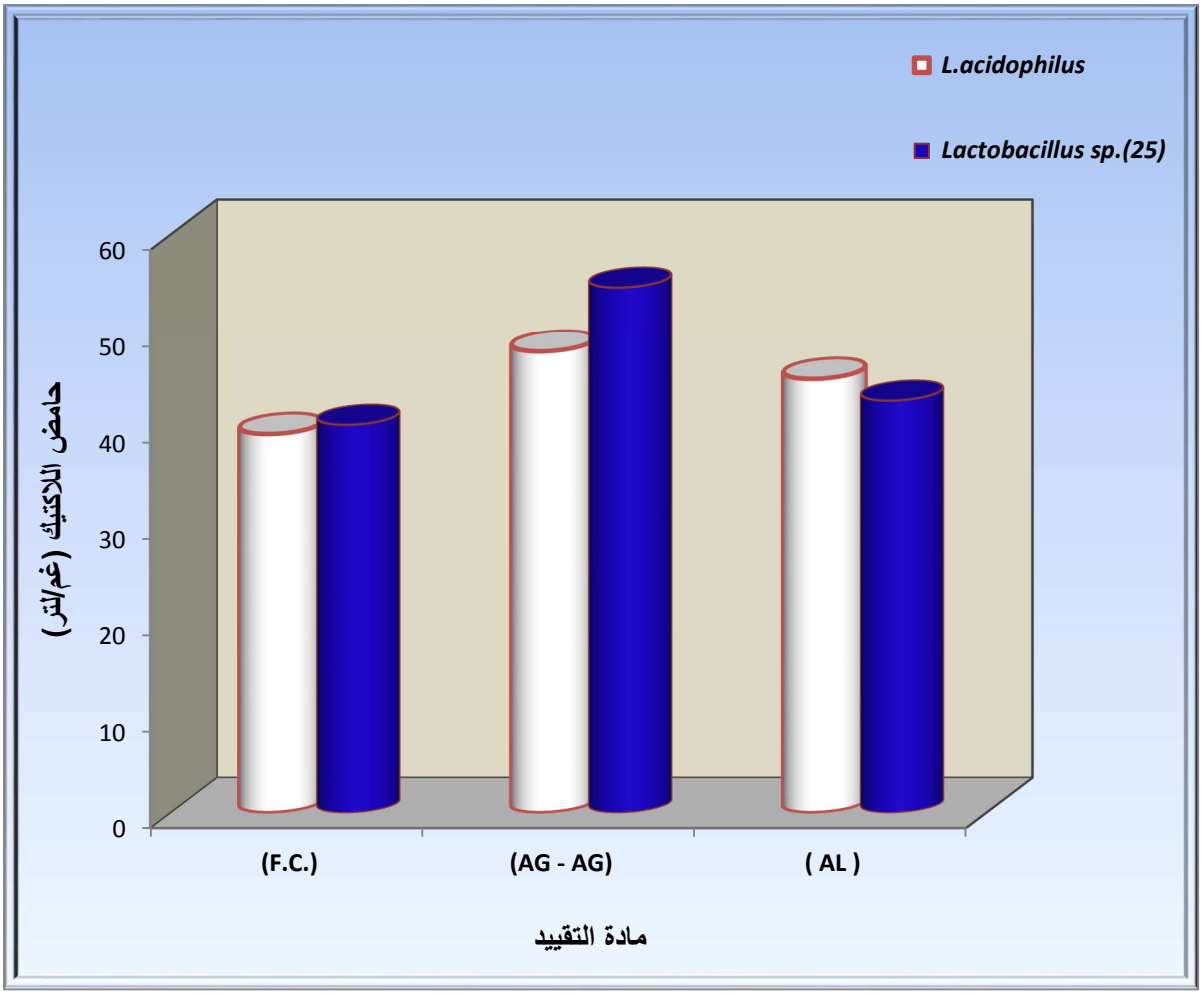
5-3 تقييد خلايا العزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp.(25)

استخدمت تقنية تقييد بكتريا حامض اللاكتيك بشكل ناجح لأجراء عمليات تخمرية مختلفة (Mirdamadi *et al.*,2008) التي تحقق في إستخدامها فوائد عديدة منها إمكانية الأستخدام المتكرر للعوامل المساعدة الخلوية المقيدة لأكثر من مرة وحمايتها من التلوث والحصول على كمية إنتاج عالية وسهولة عمليات الفصل للنواتج (Goksungur and Guvenc ,1999). تم تقييد بكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) ودراسة العوامل المؤثرة في تقييدها والتي إشتملت على نوع المادة الساندة وتركيزها والعدد الأمثل من الخلايا المناسب للتقييد.

1 - نوع المادة الساندة

استخدم نوعان من المواد الساندة في تقييد بكتريا *L.acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) هما الألجينات والأكار– أكار وبتركيز 2% ويتضح من الشكل(13) تفوق مادة الأكار– أكار على الألجينات بوصفها مادة ساندة في تقييد الخلايا المستخدمة في هذه الدراسة إذ بلغ إنتاج حامض اللاكتيك (47.86 و54.52) غم /لتر لكل من بكتريا *L.acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) على التوالي، بينما بلغ إنتاج الحامض عند استخدام مادة الألجينات (45 و42.74) غم /لتر لكلا العزلتين على التوالي ايضاً.

يمكن أن يعزى تفوق الأكار–أكار بوصفها مادة ساندة على الجينات الكالسيوم في تقييد الخلايا وإنتاج حامض اللاكتيك الى كون مادة الألجينات غير ثابتة عند ملامستها لبعض العوامل الخلابة للأيونات (Cation chelating agents) مثل الفوسفيت والستريت واللاكتيت، (Mirdamadi *et al* . 2008) فضلاً عن عدم متانة هلام الجينات الكالسيوم المستخدم في هذه



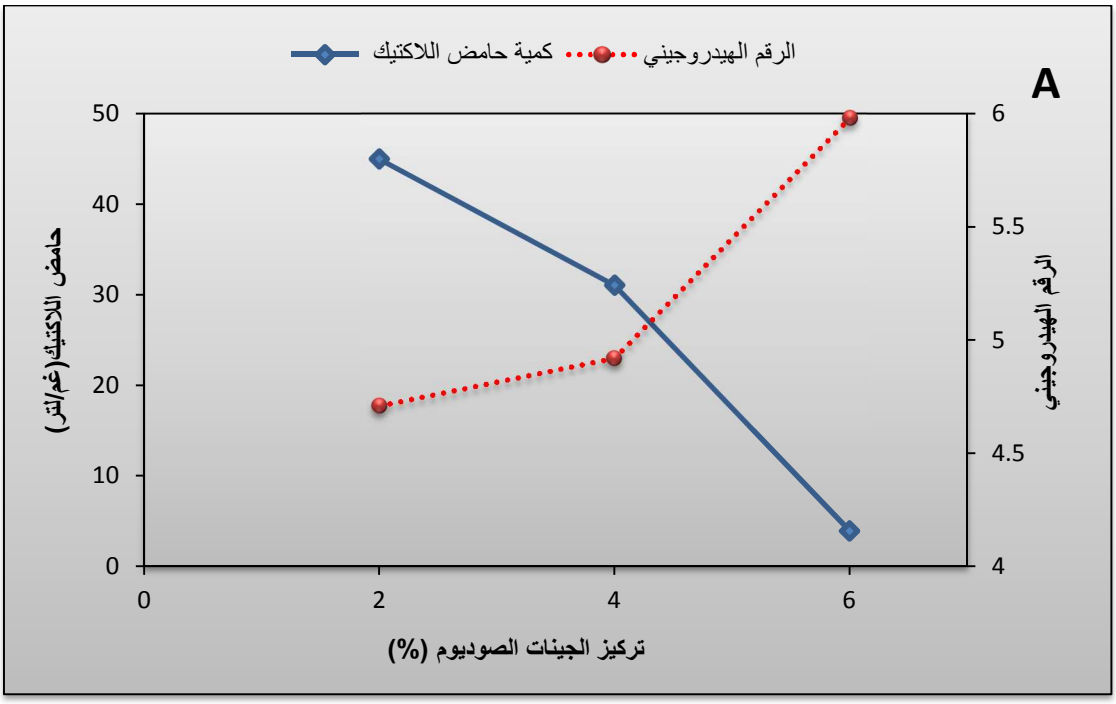
الشكل (13): انتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) الحرة (F.C.) والمقيدة في كل من مادة الأكار-أكار (AG- AG) والجينات الكالسيوم (AL) بتركيز 2%.

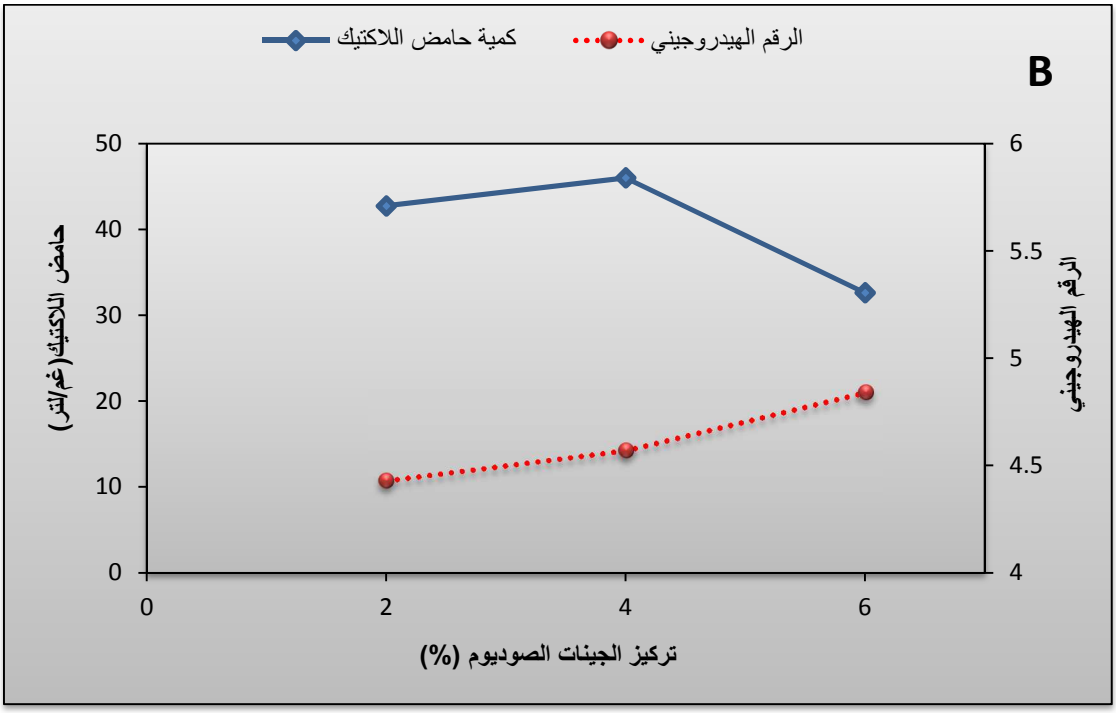
الدراسة عند التركيز 2% والمتصلب في كلوريد الكالسيوم وعلى الرغم من إمكانية إستخدام أيونات عديدة لتحقيق الصلابة (Rigidity) لهلام الألجينات الا أنه تم اختيار أيون الكالسيوم في هذه الدراسة لقلة سميته (Orive *et al.*,2004). إن قابلية الألجينات لتكوين الهلام يعود لمحتواه من حامض الكلويورونيك(Gluuronic acid) اذ ترتبط مجاميع الحامض بشكل ثنائي المحور مكونة تجويفاً يعمل كموقع إرتباط للأيون (Haug *et al.*,1966).

2 - تركيز المادة الساندة

استخدمت الجينات الصوديوم والاكار– أكار بوصفهما مادتين ساندتين وبتراكيز [(3 و4 و 6)و(2 و 3 و4)] % ،على التوالي. وتظهر النتائج الموضحة في الشكل (B و A– 14) أن التركيز الأمثل لمادة الألجينات هو 2% إذ بلغ إنتاج الحامض (45 و42.74) غم/لتر للعزلتين *L. acidophilus* و(25) *Lactobacillus* sp. على التوالي بينما كان التركيز الأمثل لمادة الأكار– أكار هو 3% إذ بلغ إنتاج الحامض (70.36و77.38) غم/لتر للعزلتين المشار اليهما على التوالي (شكل B و A–15) وفي ضوء ماتقدم من النتائج أختيرت مادة الأكار–أكار بتركيز 3% كأنسب مادة ساندة واستخدمت في جميع مراحل الدراسة اللاحقة . لقد استخدمت مادة الأكار– أكار والجينات الكالسيوم في تقييد بكتريا *L.delbrueckii* وتحقق أعلى إنتاج لحامض اللاكتيك عند التقييد بهلام الألجينات بتركيز 3.5 % إذ بلغ إنتاج الحامض 56.78 % غم/لتر بينما بلغ 55.1 غم/لتر عند التقييد بـ 2.5 % من مادة الأكار– أكار (EL-Hawary *et al.*,2009).

أشارت دراسات عديدة الى إستخدام تقنية تقييد الخلايا في العمليات التخمرية بأستخدام مواد ساندة مختلفة، فقد استخدم Panesar *et al.* (2007) تراكيز متدرجة من مادة البكتيت (2-6)% لتقييد بكتريا *L.casei* وكان أفضل إنتاج لحامض اللاكتيك عند التركيز 3 % إذ بلغ

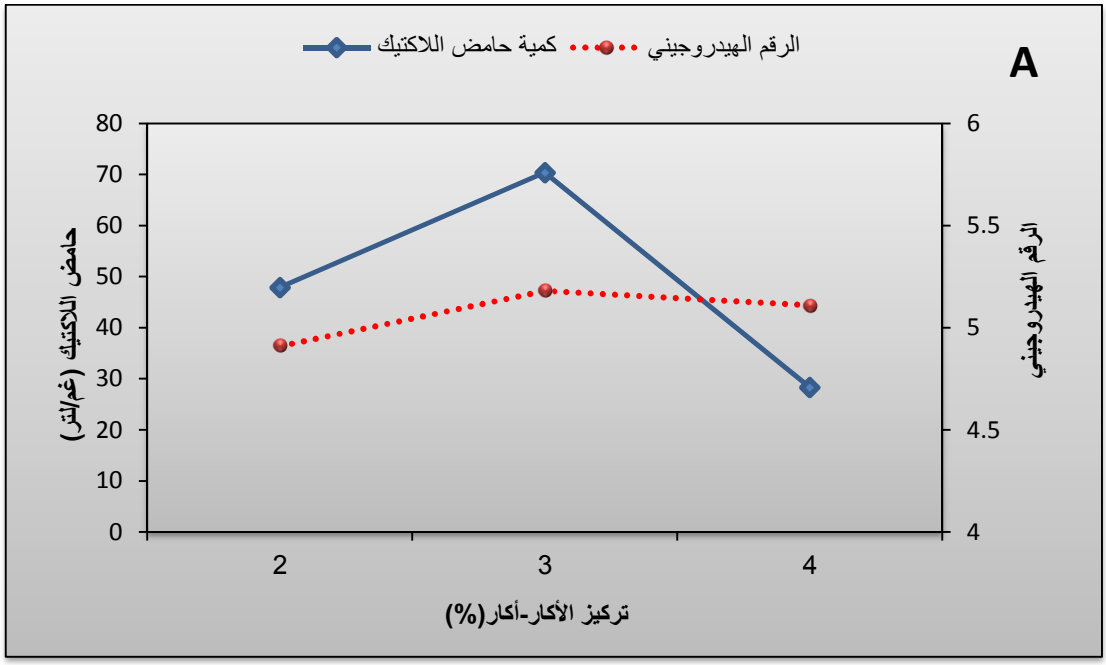


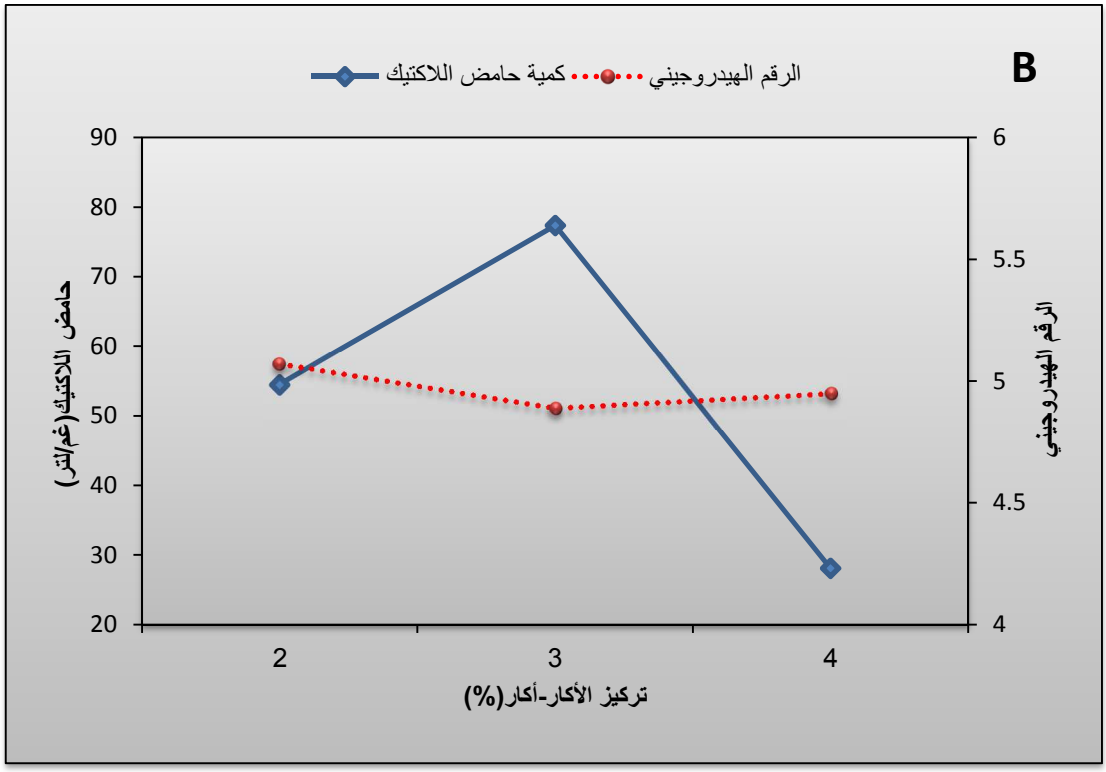


الشكل (14): تأثير تركيز الجينات الصوديوم في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا:

***L. acidophilus* -A**

***Lactobacillus* sp. (25) -B**





الشكل (15): تأثير تركيز الأكار-أكار في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا:

***L. acidophilus* -A**

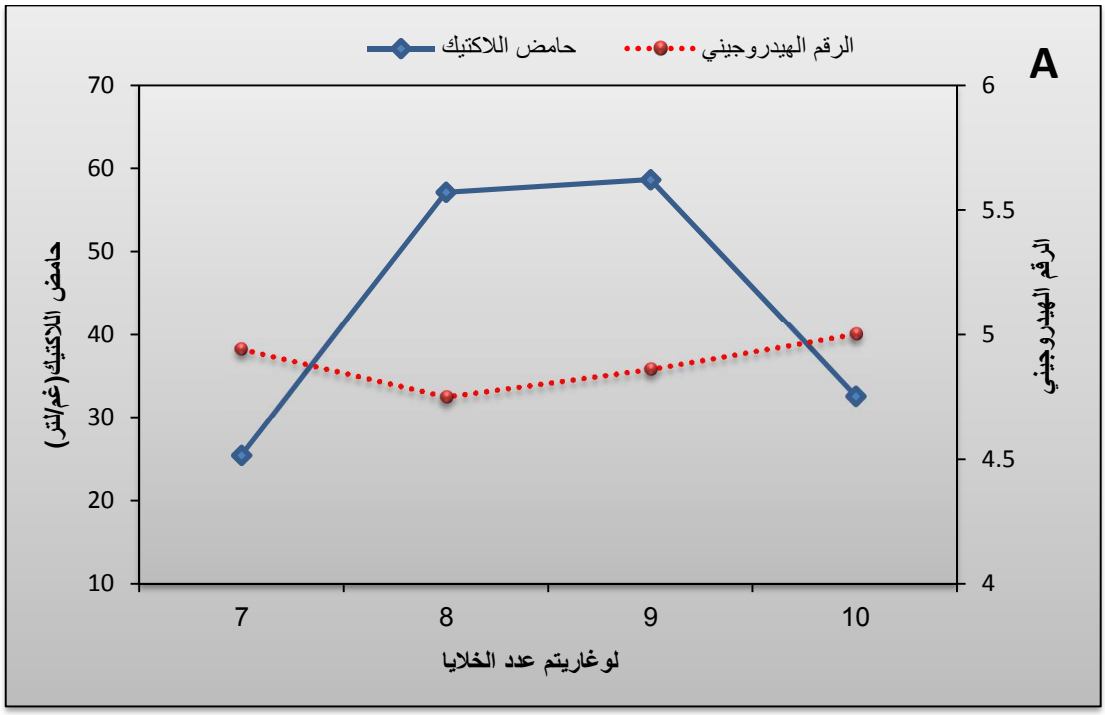
***Lactobacillus* sp. (25) -B**

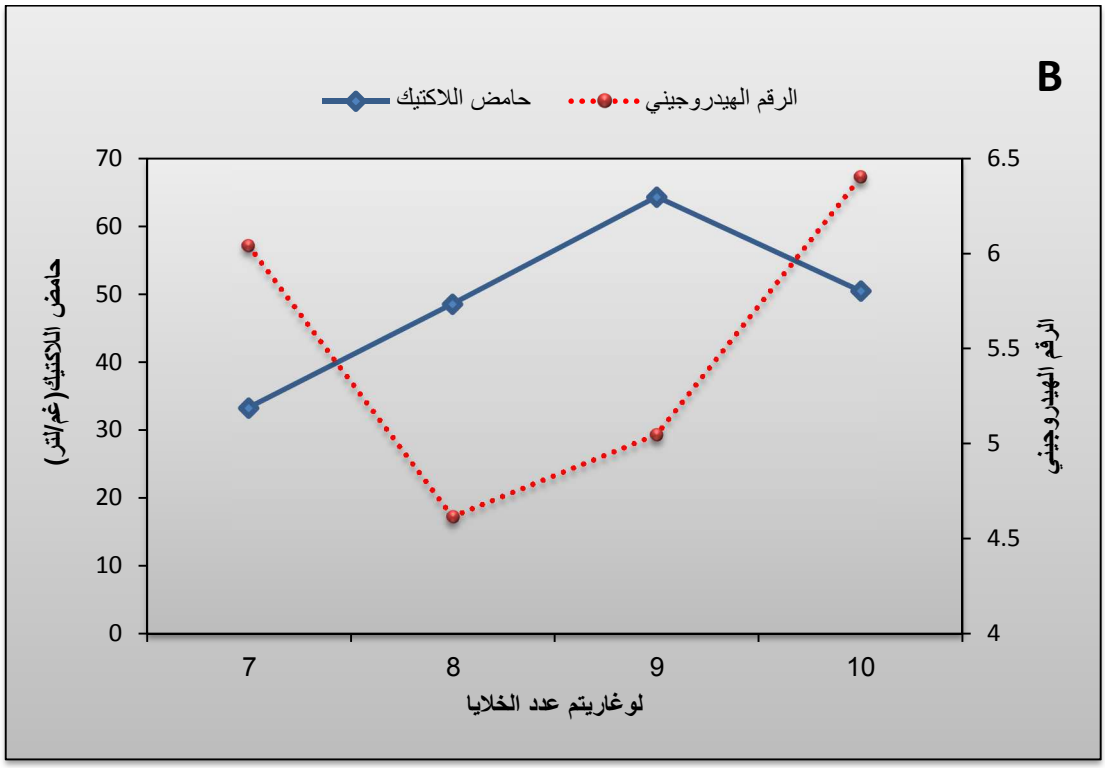
28.34 غم/لتر. ووجد Goksungur and Zorlu (2001) عند إستخدامه لتراكيز متدرجة من الجينات الصوديوم (1 و1.5 و2 و2.5 و3 و3.5)% لأنتاج الأيثانول من الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* أن أفضل إنتاج تحقق عند التركيز 2 % من المادة الساندة، بينما استخدم التركيز 4% في إنتاج البكتريوسين من بكتريا *Enterococcus faecium* A2000 (Ivanova *et al.*,2002).

تمتاز مادة الأكار– أكار بكونها رخيصة الثمن ومقاومة عموماً للتحلل بالأحياء المجهرية إلا أنها ليست ذات متانة عالية (Junyan *et al.*,2006) ورغم عدم متانتها إلا أنها تعد مادة ساندة مناسبة لتقييد الخلايا في هذه الدراسة نظراً لأن ظروف التخمر هي ظروف ساكنة وليس بأستخدام الحاضنة الهزازة إذ قد يؤدي الرج الى تكسير الأكار–أكار. تتكون مادة الأكار–أكار من سكريات متعددة (polysaccharides) مصدرها الأعشاب البحرية اضافة الى أنها مادة شفافة عديمة اللون تذوب في الماء عند درجة الغليان وتستعمل مادة مصلبة في الأوساط الزرعية بتركيز مقداره (1.5–3)% (صالح ،1991).

3 - إستخدام العدد الأمثل من الخلايا في التقييد

تم تحديد العدد الأمثل من الخلايا اللازم للتقييد على مادة الأكار–أكار باستخدام أعداد تراوحت بين (10^7 – 10^{10}) خلية/مل.يتضح من الشكل(16) أن إنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) يزداد بأزدياد عدد الخلايا المستخدمة في التقييد لغاية (1×10^9) خلية /مل إذ بلغ إنتاج الحامض (58.66 و64.28) غم /لتر للعزلتين على التوالي. ثم ينخفض بعد ذلك . إن إنخفاض إنتاج حامض اللاكتيك عند إستخدام عدد خلايا مقيّد مقداره(1×10^{10}) خلية / مل يمكن أن يعزى الى أن هذا العدد من الخلايا يعد كبيراً مقارنة بوحدة المساحة في مادة الأكار–أكار ويؤدي ذلك الى نقص في الأوكسجين وبالتالي عرقلة الفعاليات الحيوية وتغير أنماطها (الخفاجي ،1990). في ضوء هذه النتائج فقد





الشكل (16): تأثير عدد الخلايا المستخدم في التقييد في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا:

***L. acidophilus* -A**

***Lactobacillus* sp. (25) -B**

أعتمد العدد (1×10^9) أنسب عدد يمكن تقييده من الخلايا لأنتاج حامض اللاكتيك واستخدم هذا العدد في جميع مراحل الدراسة اللاحقة.

تعد النتيجة المتحصلة من هذه الدراسة مماثلة لما وصف في دراسات سابقة ،إذ أستخدم عدد خلايا مقداره (1×10^9) خلية /مل من بكتريا *L.gasseri* و *L. delbrueckii* المقيّدة في مادة الأكار – أكار لأنتاج حامض اللاكتيك في وسط الشرش المدعم بطحين فول الصويا حيث بلغ إنتاج الحامض (77.21و50.18) غم /لتر للعزلتين أعلاه على التوالي (EL-Hawary *et al*., 2009).

تباينت أعداد الخلايا المقيدة في إنتاج حامض اللاكتيك من الأحياء المجهرية ، فقد تم إنتاجه من بكتريا *L.casei* ATCC393 المقيدة في مادة الجينات الكالسيوم بعدد خلايا مقداره (1×10^{10}) خلية /مل (Corton *et al.*,2000) . وتمكن Prevost and Divies (1992) من إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *Lactococcus lactis* ssp. المقيدة في هلام الألجينات بأستخدام عدد خلايا مقداره (2×10^{11}) خلية /مل . وأشار Arnaud *et al.* (1992) الى استخدام عدد خلايا مقداره (1.5×10^{11}) من بكتريا *L.casei* المقيدة في هلام K- carrageenan (LBG).

في تخمرات حامض اللاكتيك يجب أن تضاف الخلايا بكميات ملائمة وذلك لأن إضافتها بكميات قليلة أوبحالة فسلجية غير جيدة يؤدي الى خسارة من ناحية اطالة وقت التهيؤ للخلايا كي تبدأ بالأنتاج وكذلك فأنها ستستعمل كميات كبيرة من الطاقة ومواد الأساس لنمو وادامة الخلايا (الخفاجي ، 1990) .

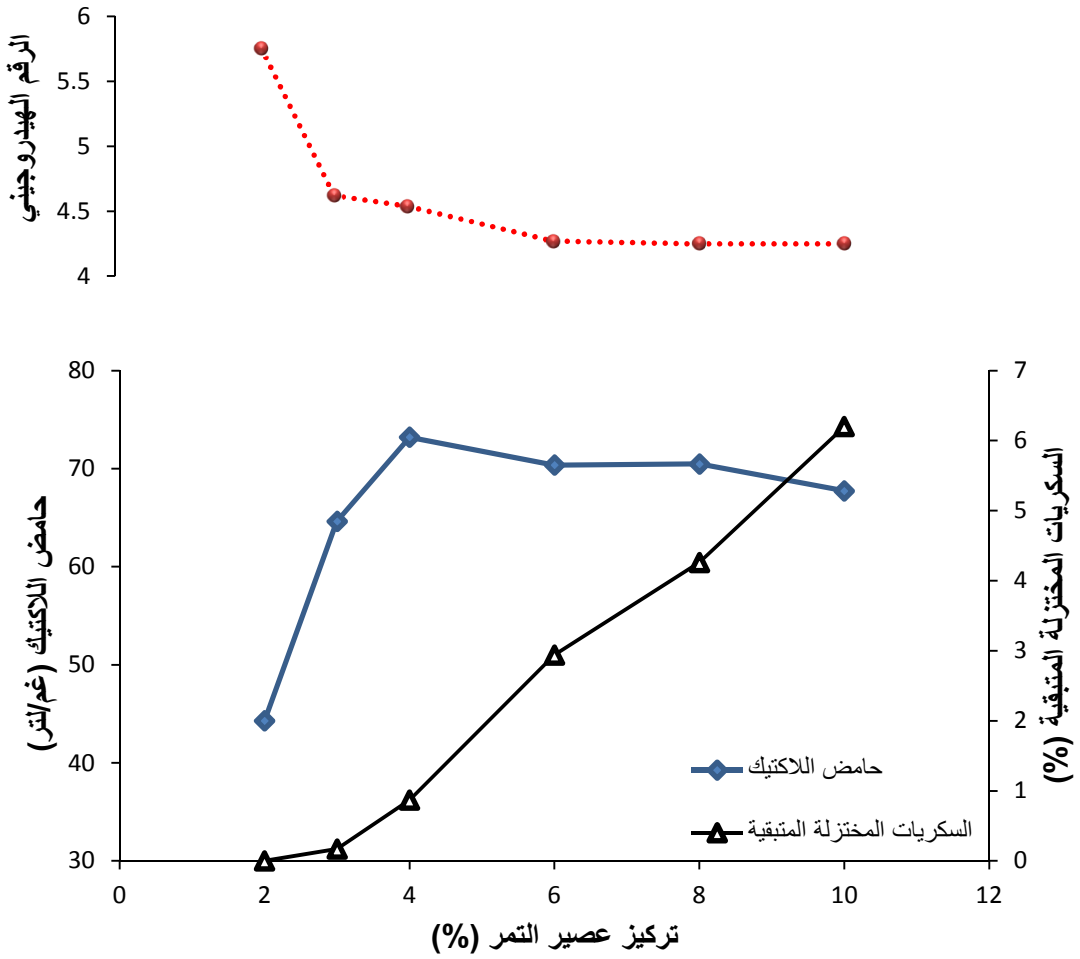
3-6 تحديدالظروف المزرعية المثلى لأنتاج حامض اللاكتيك من الخلايا المقيدة

تمت دراسة عدد من الظروف المؤثره في انتاج حامض اللاكتيك من الخلايا المقيدة التي اشتملت على :

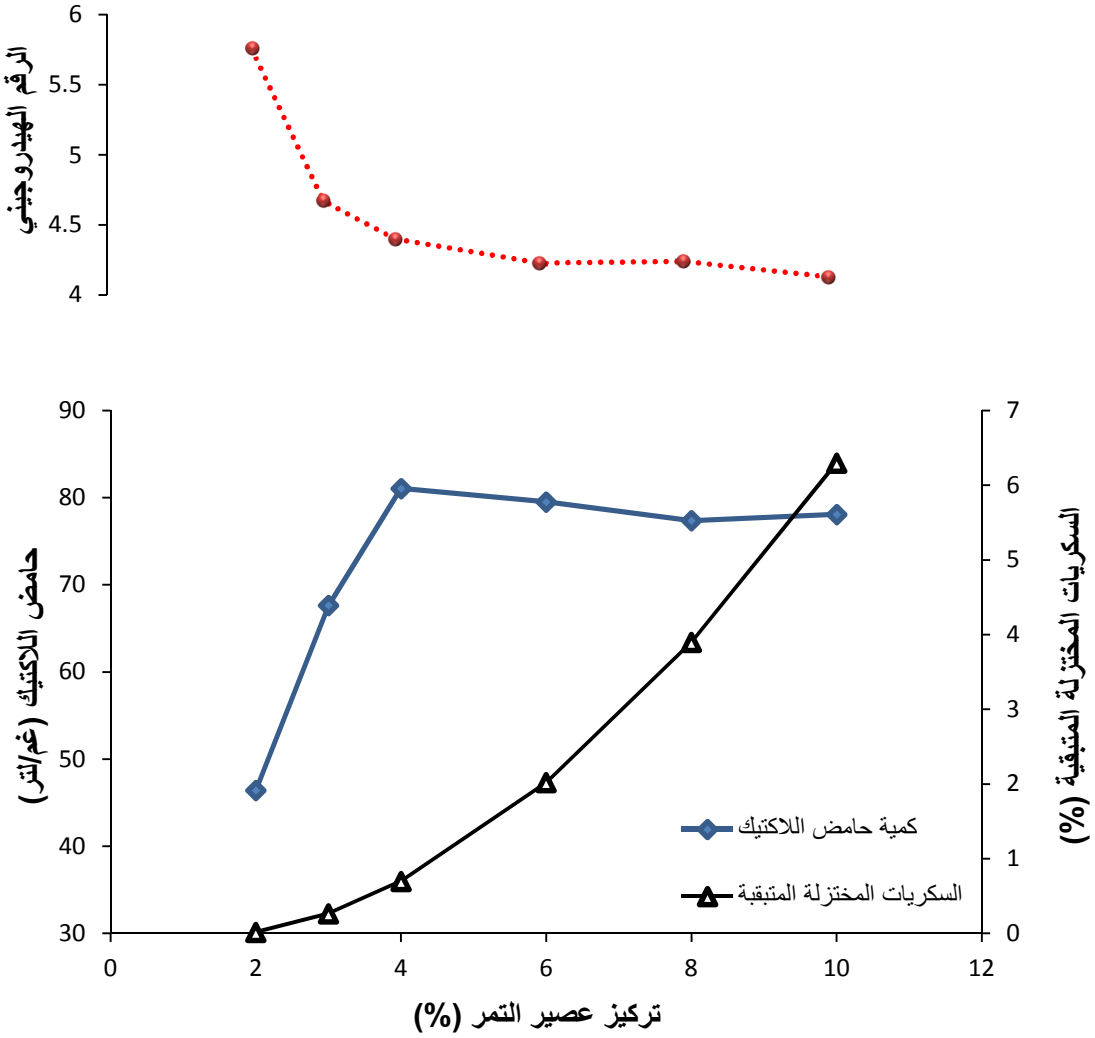
1- تأثير تركيزعصير التمر

تمت دراسة تأثير تركيز عصير التمر في انتاج حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp.(25) المقيدة في مادة الأكار-أكار حيث استخدم عصير التمر بتراكيز متدرجة (2 و3 و4 و6 و8 و10) % وأظهرت النتائج في الشكلين (17 و18) أن أفضل تركيز لعصير التمر لانتاج الحامض من العزلتين قيد الدراسة كان عند 4% إذ بلغ (73.21 و81.07) غم/لتر للعزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp.(25) على التوالي .وإعتماداًعلى هذه النتائج فقد تم استخدام التركيز 4 % كأنسب تركيز من عصير التمر وتم استخدامه في جميع مراحل الدراسة اللاحقة .ويتضح من النتائج أن الخلايا المقيدة تستهلك مصدراً كربونياً بنسبة أقل مقارنة بالخلايا الحرة إذ أنه بالرجوع الى الشكل (5 و 6) يتضح أن التركيزين (6 و 8)% هما التركيزان الأمثلان من السكريات المختزلة لأنتاج الحامض من الخلايا الحرة للعزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) ، على التوالي .ويمكن تفسير ذلك بأن الخلايا الحره تحتاج الى نسبة أعلى من المصدر الكربوني للنمو ولبناء كتلتها الحيوية ، في حين تتميز الخلايا المقيدة بأنقسامات محددة فقط .

ومن الدراسات التي أوضحت دور المصدر الكربوني في إنتاج حامض اللاكتيك من الخلايا المقيدة اشار Panesar *et al.* (2007) الى استخدام الشرش الحاوي على تركيز 4 % من اللاكتوز كوسط لانتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. casei* المقيدة في مادة البكتيت ، واجرى Rao *et al.*(2009) دراسة لانتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. delbrueckii* الحرة والمقيدة



الشكل (17): تأثير تركيز عصير التمر في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. acidophilus* المقيدة.



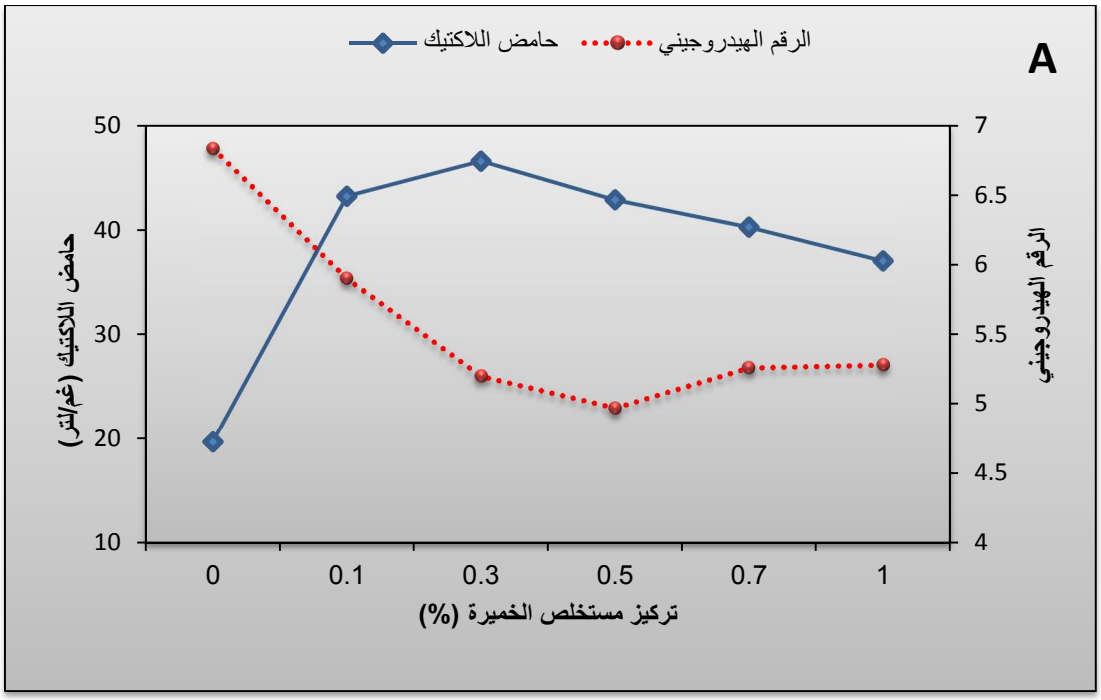
الشكل (18): تأثير تركيز عصير التمر في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *Lactobacillus* sp.(25) المقيدة .

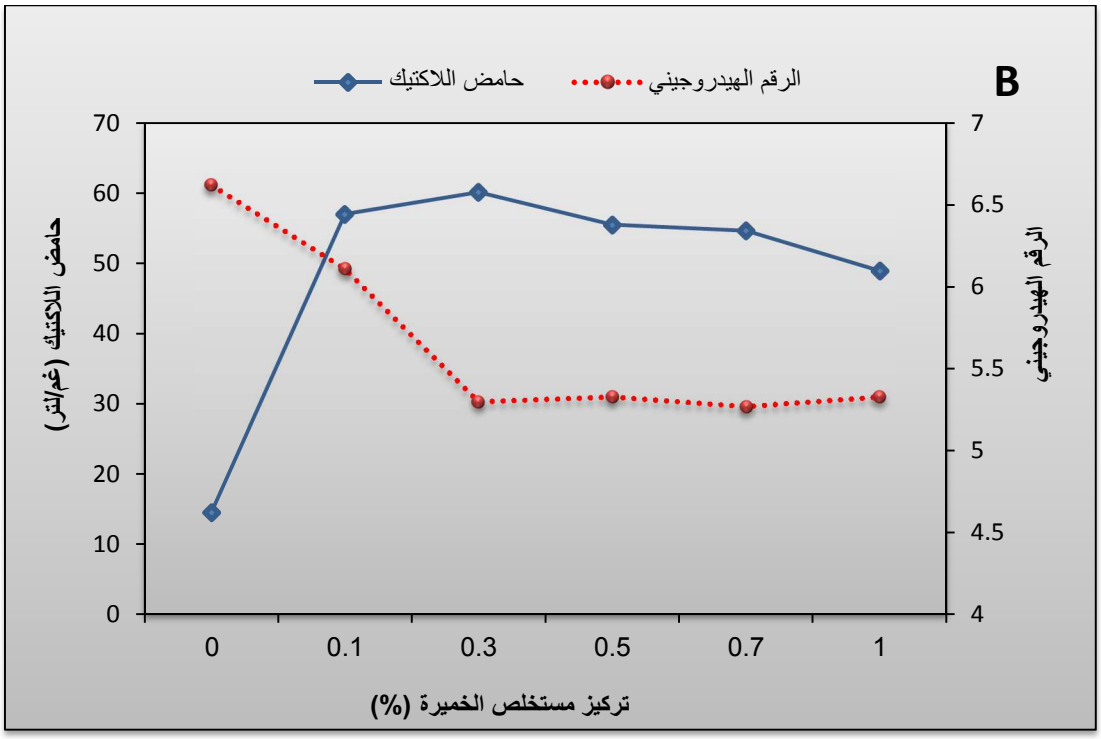
بمشتقات الألجينات بأستخدام 10% من الكلوكوز في الوسط الانتاجي حيث بلغ انتاج الحامض 80.5 غم /لتر للخلايا المقيدة في مادة (Palmitolyted alginate) و 51 غم /لتر للخلايا الحرة .

2 - تأثير تركيز المصدر النيتروجيني

درس تأثير المصدر النيتروجيني في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L. acidophillus* و *Lactobacillus* sp.(25) المقيدة في 3 % من مادة الأكار– أكار حيث استخدمت تراكيز متدرجة من مستخلص الخميرة اشتملت على (0.1 و0.3 و0.5 و0.7 و1) % إضافة الى المعاملة الخالية من المصدر النيتروجيني للمقارنة . اظهرت النتائج الموضحة في الشكل(A و B– 19) أن أفضل تركيز لمستخلص الخميرة الذي حقق أعلى إنتاج للحامض كان عند التركيز 0.3 % إذ بلغت (46.55 و60.12) غم / لتر للعزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp. (25) على التوالي لذا فقد تم اعتماد هذه النتيجة وتم استخدامها في جميع مراحل الدراسة اللاحقة .

لقد أشارت دراسات عديدة الى إستخدام مستخلص الخميرة في إنتاج حامض اللاكتيك من الخلايا المقيدة . فقد استخدم Hongxian and Jainqiang (2008) مستخلص الخميرة بتركيز 0.3 % لأنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L.rhamnosus* إذ بلغ إنتاج الحامض 40.1 غم/لتر. بينما إستخدم Shindo and Tachibana (2004) تركيز 0.85 % من مستخلص الخميرة لأنتاج الحامض من العزلة المشار اليها في الدراسة السابقة . وأشار Yoo *et al.*(1997) الى أن مستخلص الخميرة يعد مصدراً نيتروجينياً شائعاً يجهز بكتريا حامض اللاكتيك بمعقد فيتامين(B) فضلاً عن تجهيزه بالنيتروجين العضوي. واستخدم المصدر النيتروجيني ماء نقيع الذرة بتركيز 6.8 % لأنتاج الحامض من بكتريا *L.delbrueckii* (Rao *et al.*,2009) .





الشكل (19) : تأثير تركيز المصدر النيتروجيني في إنتاج حامض اللاكتيك من البكتريا المقيدة:

***L. acidophilus* - A**

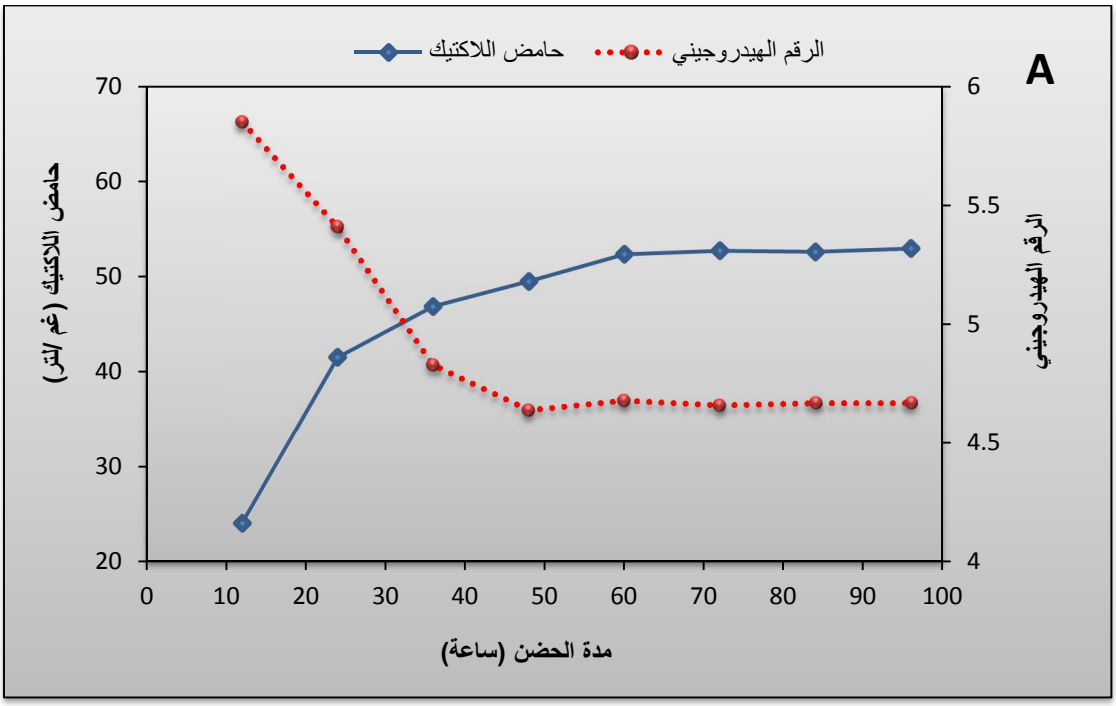
. *Lactobacillus* sp. (25) - B

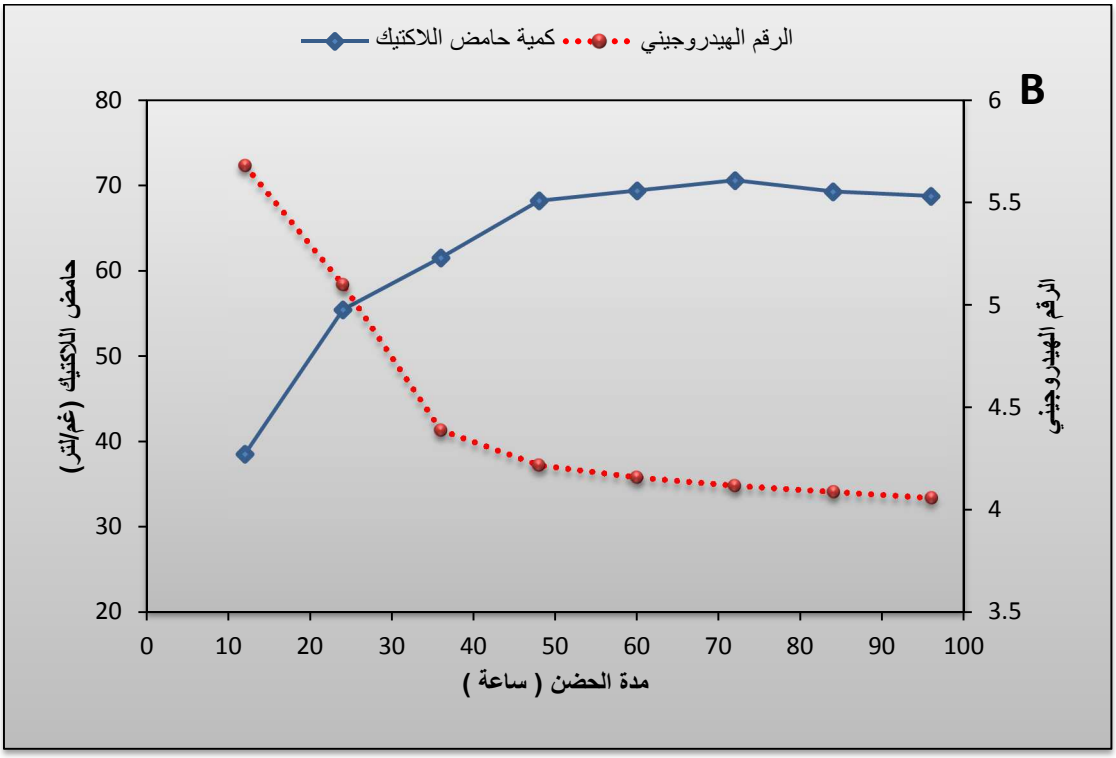
لابد من إضافة مصادر نيتروجينية لأنتاج حامض اللاكتيك ويفضل أن لاتكون معقدة جداً مثل الببتون لأنة يعرقل عمليات التنقية والأستخلاص النهائية ولذلك تضاف بكميات قليلة بحيث تكون كافية لعمليات النمو (الخفاجي ،1990).

3 - تأثير مدة الحضن

تمت متابعة إنتاج حامض اللاكتيك من الخلايا الحرة والمقيدة للعزلتين *L. acidophilus* و(25) *Lactobacillus sp.* لمدة 96 ساعة وذلك بسحب أنموذج كل 12 ساعة لتقدير حامض اللاكتيك المنتج كما تمت متابعة تغيرات الرقم الهيدرجيني خلال المدة المذكورة من التخمر . فعند إستخدام الخلايا الحرة في إنتاج الحامض يلاحظ من الشكل (A و B – 20) أن إنتاج حامض اللاكتيك يبدأ بعد 12 ساعة من التخمر إذ بلغ إنتاج الحامض (24.5 و38.57) غم/لتر للعزلتين المشار اليهما أعلاه على التوالي ثم يرتفع بشكل تدريجي الى أن يصل الى أقصاه بعد 60 ساعة لبكتريا *L. acidophilus* بكمية حامض منتجة 52.38 غم/لتر. و48 ساعة لبكتريا *Lactobacillus* sp. (25) بكمية حامض منتجة 68.21 غم/لتر ليستقر بعد ذلك إنتاج الحامض لكلا العزلتين .

لقد وجد أن مدة الحضن اللازمة للحصول على أقصى إنتاج لحامض اللاكتيك من بكتريا *S.bovis* هي 48 ساعة (Yuwono and Hadi ,2008).كما بلغت مدة الحضن لأنتاج الحامض من مزرعة مختلطة من بكتريا حامض اللاكتيك 72 ساعة (Gardner *et al*.,2001). وأشار (2003). Zhan *et al* الى استخدام مدة الحضن ذاتها في إنتاج حامض اللاكتيك من الفطر *R.oryzae* . وقد أشارت عدد من الدراسات الى إستخدام أوقات حضن قصيرة وأخرى طويلة لأنتاج حامض اللاكتيك من الأحياء المجهرية ،حيث كانت أفضل مدة حضن لأنتاج الحامض من بكتريا *L.plantarum* 28 ساعة (Mukhopadhyay,2009) ، بينما كانت أفضل مدة حضن لأنتاجه من بكتريا *L.delbrueckii* مقدارها 7 أيام عند استخدام وسط المولاس بتركيز 18 %(Farooq , 2006) .





الشكل (20): تأثير مدة الحضن في إنتاج حامض اللاكتيك من البكتريا الحرة:

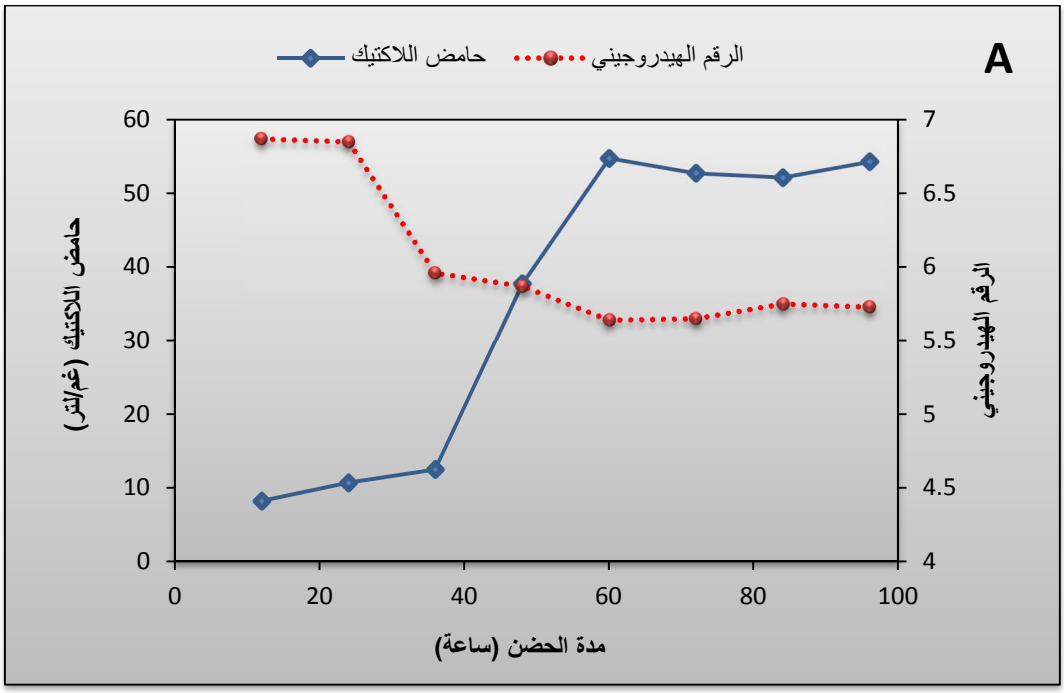
A- *L. acidophilus*

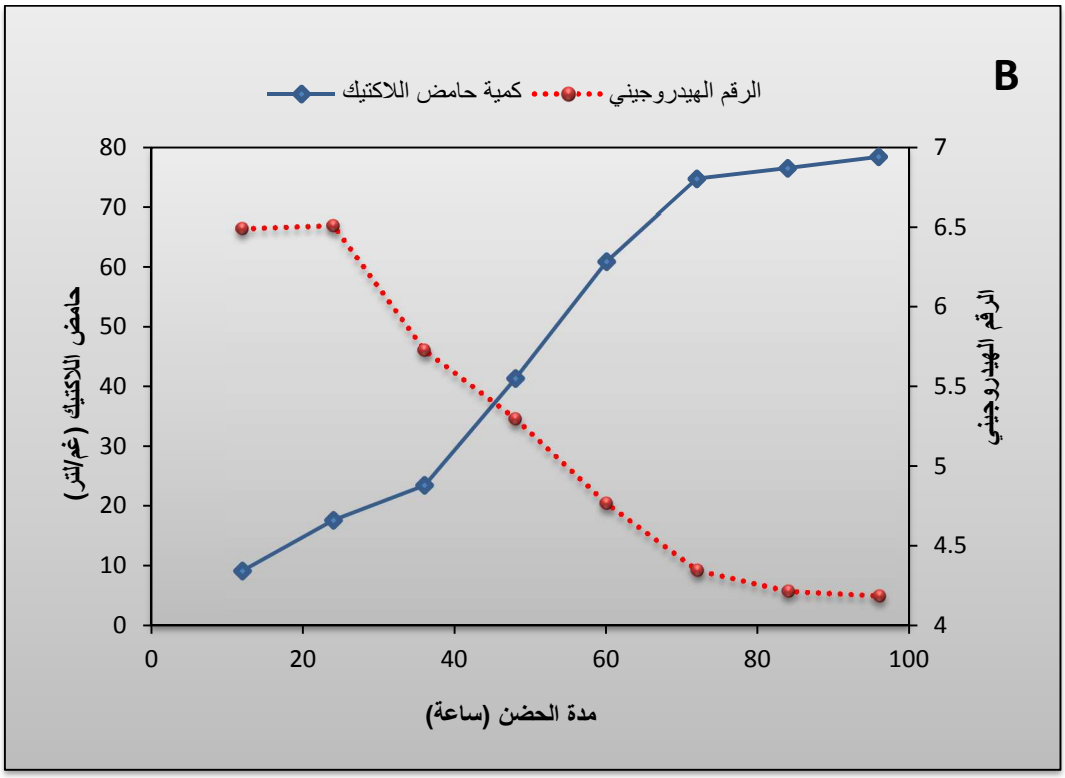
B- *Lactobacillus* sp. (25)

وبالرجوع الى الشكل مرة اخرى يتضح أن الرقم الهيدروجيني لوسط التخمر يبدأ بالأنخفاض بعد 12 ساعة من التخمر ويستمر بالأنخفاض الى أن يصل الى 4.64 بعد 48 ساعة للعزلة *L. acidophilus* و 4.16 بعد 60 ساعة للعزلة (25)*Lactobacillus sp.* ثم يستقر بعد ذلك، ويعزى ذلك الى الأستهلاك السريع للكربوهيدرات حيث يرافقه تكون بعض الأحماض العضوية التي تتسبب احياناً في خفض الرقم الهيدروجيني للوسط (Egorov,1985).

اما عند إستخدام الخلايا المقيدة للعزلتين *L. acidophilus* و(25).*Lactobacillus* sp في إنتاج الحامض فيلاحظ من الشكل (B و A -21) أن إنتاج الحامض يبدأ بعد 12 ساعة من التخمر إذ بلغت كمية الحامض المنتج (8.21 و9.29)غم/لتر للعزلتين *L. acidophilus* و(25).*Lactobacillus sp* على التوالي، ثم يرتفع بشكل تدريجي الى أن يصل الى اقصاه بعد 60 ساعة إذ بلغ 54.76 غم/لتر للعزلة *L.acidophilus* و 72 ساعة للعزلة (25). *Lactobacillus* sp إذ بلغت كمية الحامض المنتجة 74.76 غم/لتر، ثم يستقر بعد ذلك. يتضح من النتائج ان الوصول الى أقصى إنتاج من الحامض في الخلايا المقيدة يستغرق وقتاً أطول مقارنةً بالخلايا الحرة ، ويمكن أن يعزى ذلك الى ان الخلايا المقيدة يمكن ان تتعرض الى بطء في الفعاليات الأيضية نتيجة لقلة التهوية ونتيجة لبطء انتشارمواد الأساس او انتشار النواتج من البيئة المباشرة المحيطة بالخلايا (الخفاجي،1990). في ضوء هذه النتائج تم تثبيت مدة حضن قدرها (60 و72) ساعة لأفضل إنتاج من حامض اللاكتيك من البكتريا المقيدة *L. acidophilus* و(25).*Lactobacillus* sp على التوالي.

لقد وجد أن مدة الحضن اللازمة للحصول على اقصى انتاج لحامض اللاكتيك من بكتريا *Corynebacterium glutamicum* المقيدة في هلام (Carrageenan)كانت 72 ساعة (Amin and Talhi ,2007). كما بلغت مدة الحضن المستخدمة لأنتاج الحامض من بكتريا *L.casei* المقيدة في مادة الجينات الباريوم 32 ساعة (Yoo *et al.*, 1996). و أجرى Mirdamadi *et al*.(2008) مقارنة في إنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا *L.casei* الحرة





الشكل (21): تأثير مدة الحضن في إنتاج حامض اللاكتيك من البكتريا المقيدة:

L. acidophilus **-A**

Lactobacillus **sp. (25) -B**

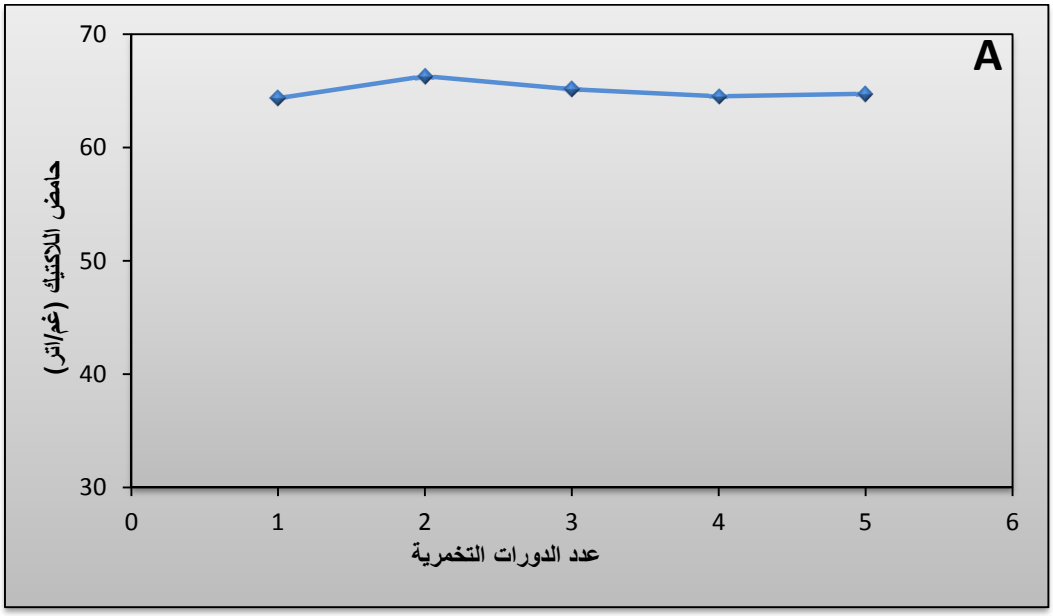
والمقيدة في 2 % من مادة الأكار–أكار ووجد أن أعلى إنتاج للحامض تحقق عند مدة الحضن 96 ساعة إذ بلغ (60 و40) غم/لتر للبكتريا الحرة والمقيدة على التوالي. كما استخدم Shindo and Tachibana (2004) مدة الحضن ذاتها لأنتاج الحامض من بكتريا *L.rhamnosus* المقيدة في الـ (Bead glass).

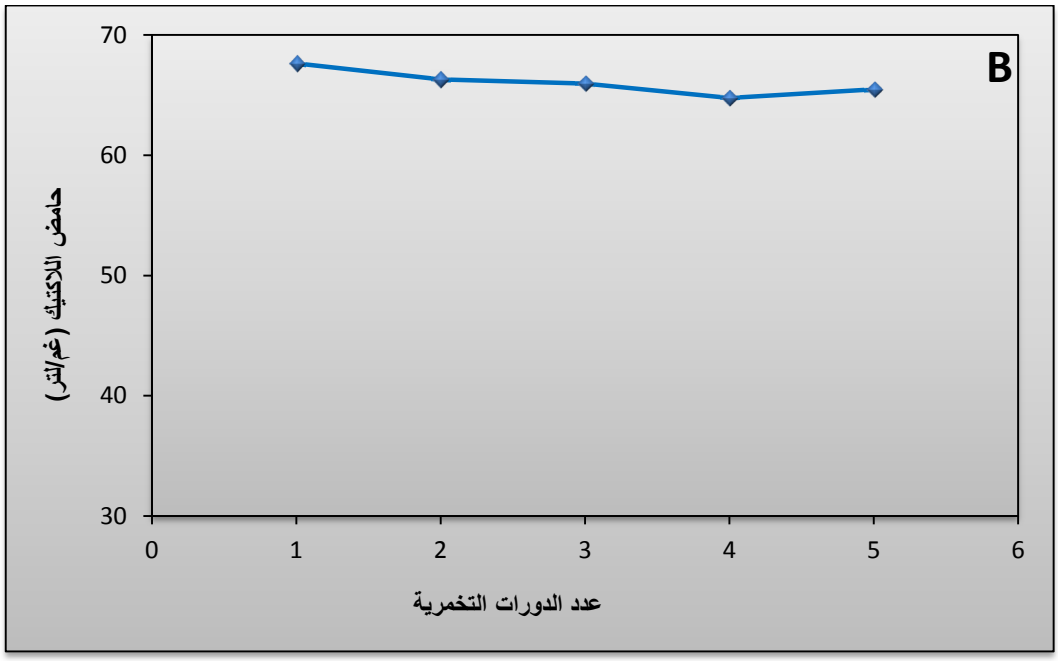
وبالرجوع الى الشكل السابق يتضح أن الرقم الهيدروجيني للوسط يبدأ بالأنخفاض بعد 36 ساعة من التخمر ويستمر بالأنخفاض الى أن يصل الى 5.64 بعد 60 ساعة للعزلة *L .acidophilus* و 4.22 بعد 84 ساعة للعزلة (25) .*Lactobacillus* sp ثم يستقر بعد ذلك ، يمكن ان يعزى إنخفاض الرقم الهيدروجيني الى إنتاج حامض اللاكتيك كما أن لتجمع هذا الحامض تأثيراً تثبيطياً على عملية إنتاجه لتأثيره على الخلايا المنتجة لذا يجب إستخدام مواد لمعادلة تأثيره وهذا يفسر سبب إضافة كربونات الكالسيوم في وسط إنتاج الحامض من العزلتين قيد الدراسة.

4 – دراسة ثبوتية الخلايا المقيدة

تمت دراسة ثبوتية بكتريا *L. acidophilus* و(25) .*Lactobacillus* sp المقيدتين بمادة 3 % أكار–أكار لأستخدامها بشكل متكرر لأنتاج حامض اللاكتيك من عصير التمر. وتضمنت هذه الدراسة استبدال الوسط المتخمر بوسط إنتاجي جديد كل 72 ساعة واستمرت الدراسة لمدة 15 يوماً . يتضح من الشكل (B و A– 22) إمكانية إستخدام البكتريا المقيدة في مادة الأكار–أكار بشكل ناجح لأنتاج حامض اللاكتيك من وسط عصير التمر لمدة 5 دورات تخمرية دون أي إنخفاض في مستوى إنتاج الحامض .

ولكون ثبوتية الخلايا المقيدة تعد معياراً لكفائتها في الأنتاج لذا حظي هذا الموضوع بأهتمام الباحثين فقد أشار Doleyres and Lacroix (2004) في دراسة عن بكتريا *L.helveticus* المقيدة بمادة (k-carrageenan) الى استمرارية ثبوتية الخلايا المقيدة في إنتاج الحامض أكثر من 100 يوم. بينما درس Mirdamadi *et al*. (2008) ثبوتية بكتريا





الشكل (22): ثبوتية الخلايا المقيدة لأنتاج حامض اللاكتيك من بكتريا:

***L. acidophilus* -A**

***Lactobacillus* sp. (25) –B**

المقيدة بمادة الألجينات لمدة 40 يوماً ولاحظ الانخفاض التدريجي للحامض بعد الدورة *L.casei* فقد أستخدم أكثر من مادة ساندة وأشارت الدراسة الى أن بكتريا (2009).*et al* Rao الرابعة . أما يمكن إستخدامها لأكثر من ثماني (palmitoylated alginate) المقيدة في *L. delbrueckii* دورات تخمرية دون ملاحظة اي انخفاض في كمية الحامض المنتج ،بينما كانت ستة دورات تخمرية في حالة إستخدام مادة الألجينات كمادة ساندة.

7-3 كفاءة بكتريا *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp. (25) في تحويل السكر الى حامض اللاكتيك

بعد أن تم تحديد الظروف المزرعية المثلى لأنتاج حامض اللاكتيك من العزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp. (25) المقيدتين بمادة الأكار–أكار، تم حساب النسبة المئوية لكفاءة تحويل العزلتين قيد الدراسة للسكر الموجود في وسط عصير التمر. وأظهرت النتائج أن النسبة المئوية لكفاءة التحويل بلغت (78.25 و82.5)% للعزلتين *L. acidophilus* و*Lactobacillus sp.* (25) على التوالي عند استخدام تركيز 4% من عصير التمر كوسط انتاجي .

إن حساب النسبة المئوية لكفاءة تحويل بكتريا *Lactobacillus* للسكريات الموجودة في الوسط قد ورد في عدة دراسات ، فقد وجد Rangaswamy and Ramakrishna (2008) أن كفاءة تحويل بكتريا *L.delbrueckii* NCIM 2365 للسكريات الموجودة في 2 % من وسط المولاس بلغت (3.6± 75.3)% .بينما كانت نسبة تحويل سكر اللاكتوز من قبل بكتريا *L. acidophilus* عند تركيز% 5 من حليب الجمل 74% (Ahmed and Kanwal ,2004).

8-3 تنقية حامض اللاكتيك

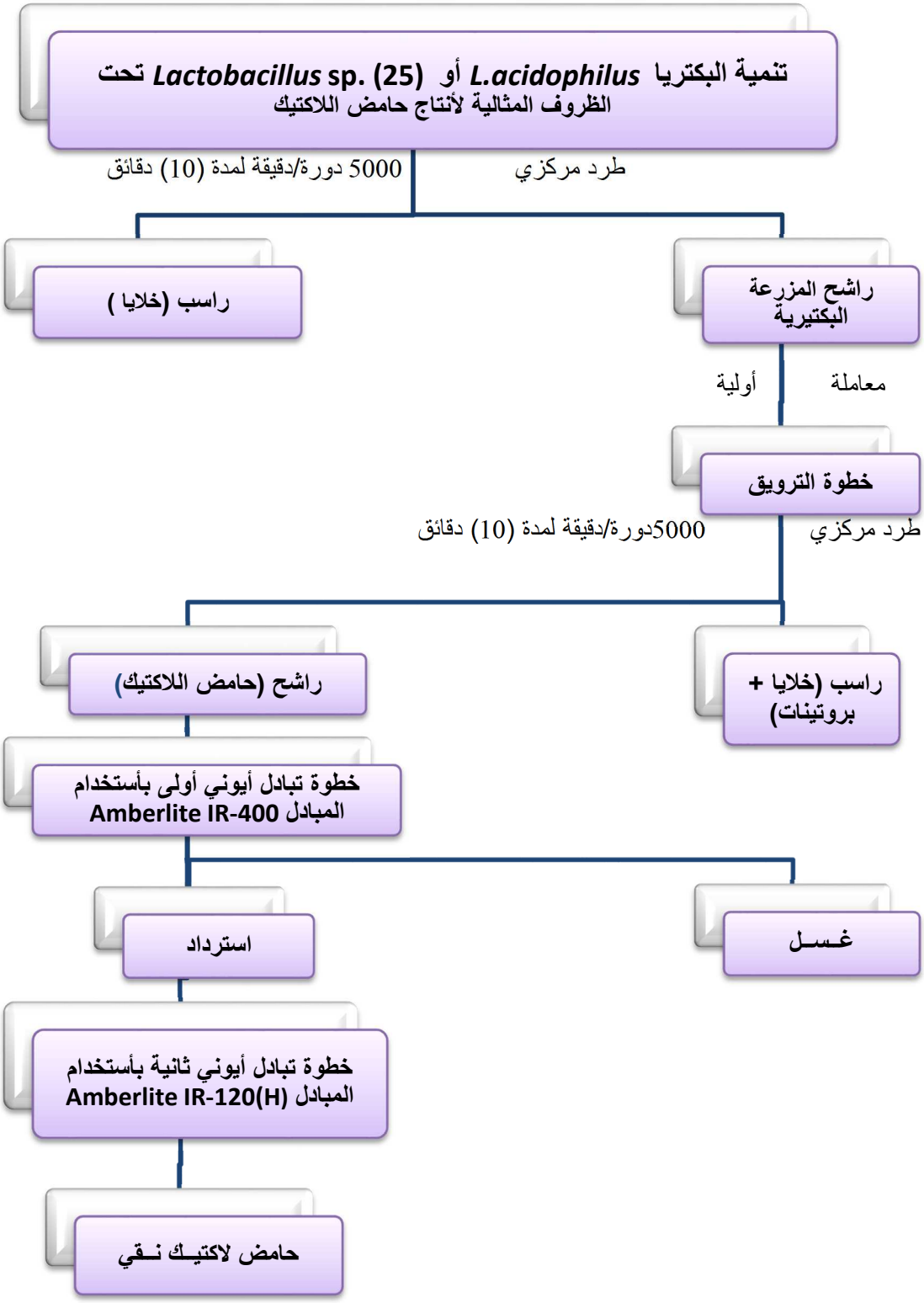
اختيرت الخلايا المقيدة لأنتاج حامض اللاكتيك المراد تنقيته في هذه الدراسة لأن نواتج التخمر تكون خالية عموماً من الخلايا وبعض فضلاتها العرضية مما يؤدي الى تسهيل عمليات الأستخلاص والتنقية النهائية (الخفاجي ،1990) لذا فقد تم إنتاج كمية كافية من الحامض من كل من العزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) المقيدتين على مادة الأكار–أكار بتنميتها على وسط عصير التمرالمدعم بمستخلص الخميرة وكربونات الكالسيوم وتحت الظروف المثلى للأنتاج ويلخص المخطط (3) خطوات التنقية المستحصلة من هذه الدراسة .

1- خطوة الترويق (Clarification step)

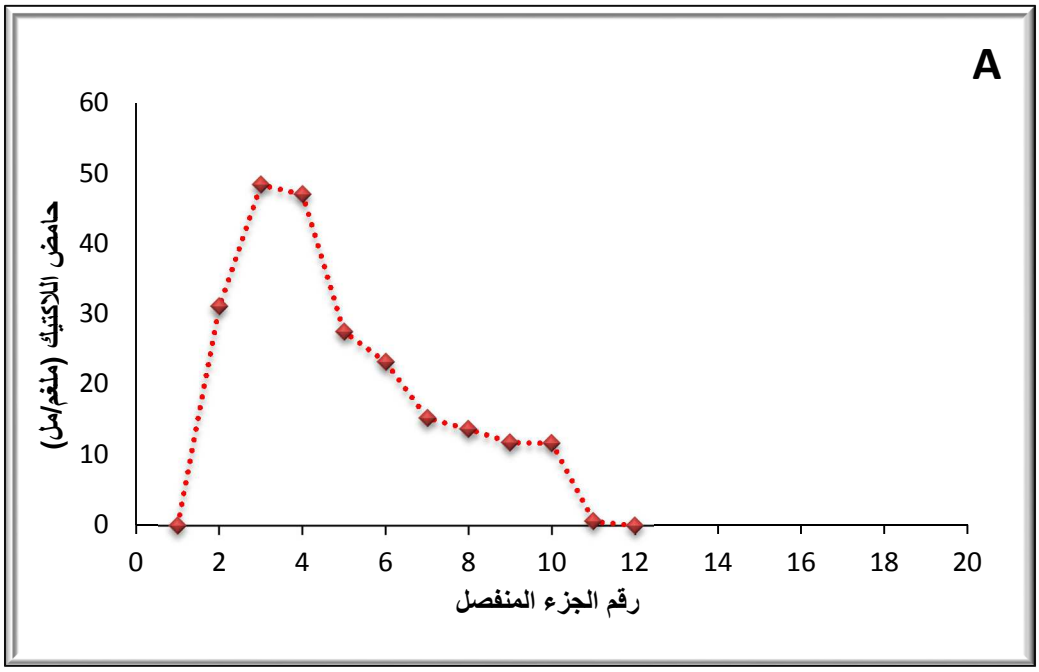
إن تعديل الرقم الهيدروجيني للراشح الحاوي على حامض اللاكتيك بهيدروكسيد الكالسيوم الى (pH 10) ومعاملته حرارياً ونبذه مركزياً ساعد في تحويل حامض اللاكتيك الى لاكتات الكالسيوم اضافة الى قتل البكتريا وتخثير بروتينات الوسط والتخلص من كربونات الكالسيوم الزائدة وتكسير السكريات المتبقية في الوسط (Vijayakumar *et al*.,2008) ، وقد اطلق على المستخلص المتحصل عليه في هذه الخطوة بالمستخلص المروق (Clarified extract).

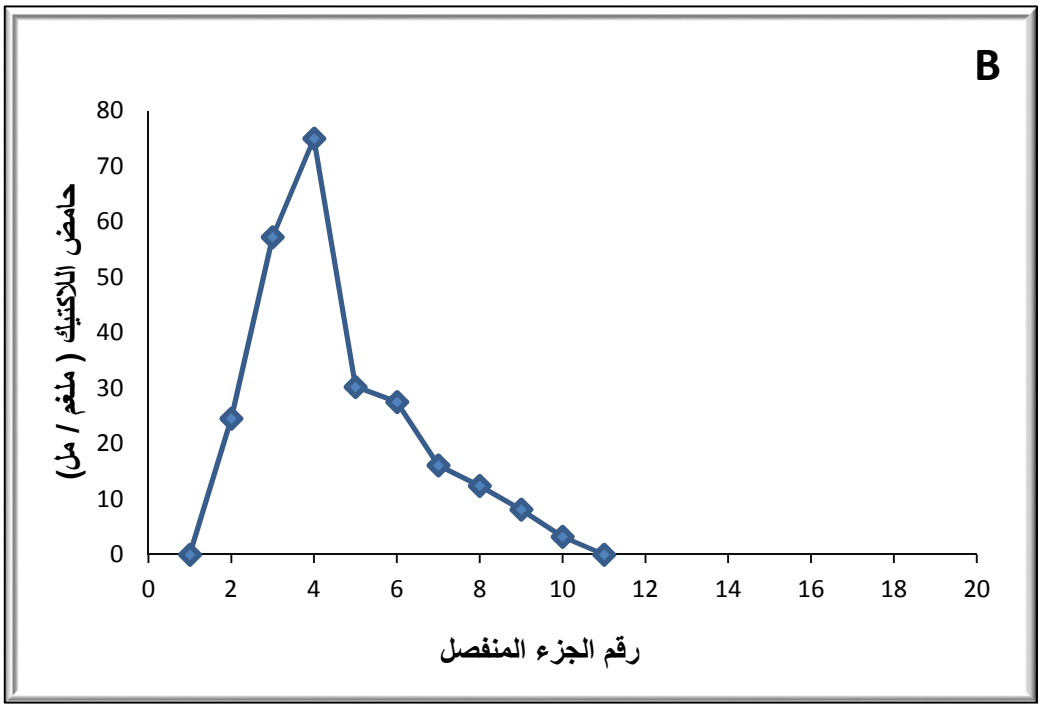
2– التبادل الأيوني الأول

اجريت عملية التبادل الأيوني للراشح الحاوي على حامض اللاكتيك والخارج من خطوة الترويق بأستخدام المبادل الانأيوني (Amberlite IR-400) المحضر بالماء المزال منه الأيونات لأجراءعملية الفصل ، وبعد التأكد من نزول جميع المواد التي لم ترتبط بالمبادل فضلاًعن التأكد من عدم نزول حامض اللاكتيك وذلك بتقدير حامض اللاكتيك للأجزاء الناتجة من عملية الغسل ، تم استرداد الحامض بكربونات الأمونيوم . وقد تمخض عن عملية الاسترداد المذكورة ظهور الحامض في الأجزاء (2-10)(شكل B و A–23) وبعد جمع الأجزاء الحاوية على الحامض وتقدير حامض اللاكتيك لها اظهرت النتائج الموضحة في الجدولين (9 و10)



مخطط (3) : تنقية حامض اللاكتيك من بكتريا *L. acidophilus* و*Lactobacillus* sp. (25) .





شكل (23): فصل حامض اللاكتيك بأستخدام المبادل الأيوني (Amberlite IR -400) من بكتريا :

***L. acidophilus* -A**

B- *Lactobacillus* sp.(25)

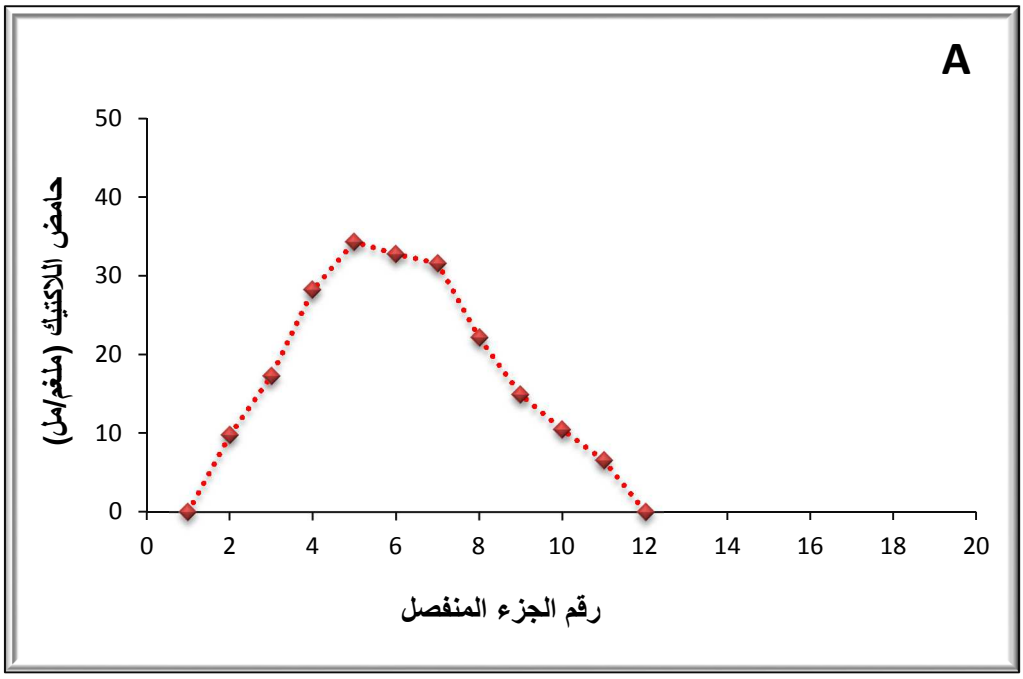
أن كمية الحامض كانت(32.92 و35.63) ملغم/مل وبحصيلة (92.63 و95.84)% للعزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) على التوالي.

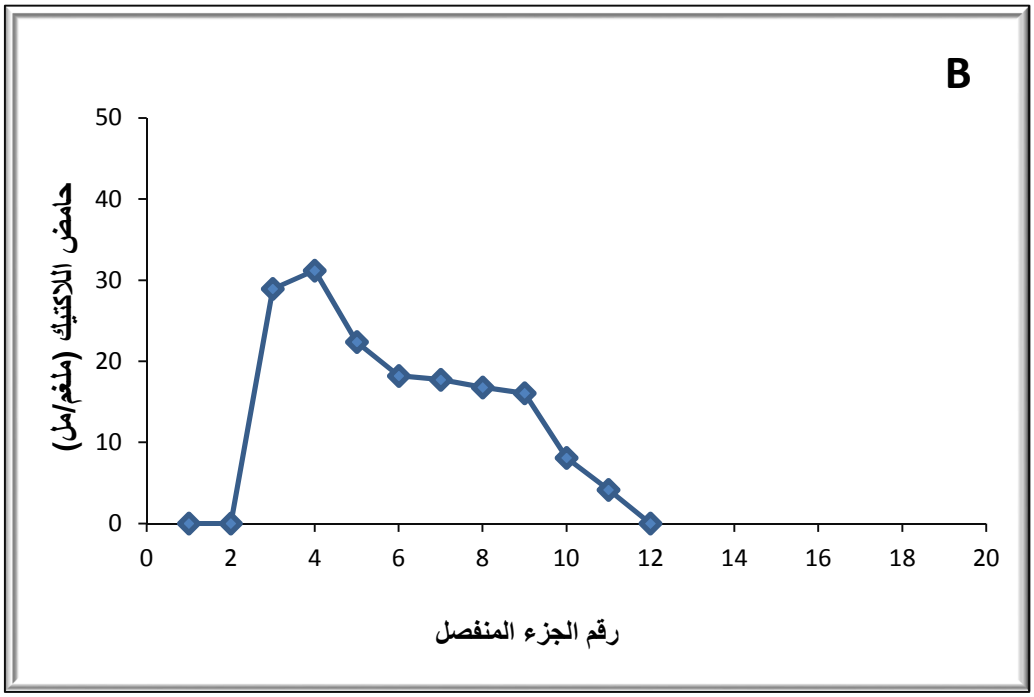
3- التبادل الأيوني الثاني

إن إضافة حامض اللاكتيك الخارج من خطوة التبادل الأيوني الأول الى المبادل الكاتأيوني [Amberlite IR-120 (H)] أسفرت عن نزول حامض اللاكتيك المنتج من العزلة *L. acidophilus* في الأجزاء (2-11) والأجزاء (3-11) للحامض المنتج من العزلة *Lactobacillus* sp.(25) وكما موضح في الشكل (A,B– 24) على التوالي. وقد أدت هذه الخطوة الى تنقية حامض اللاكتيك بالتخلص من المواد التي ترتبط بالمبادل الكاتأيوني وبلغت كمية الحامض (26.07 و28.25)ملغم/مل بحصيلة (88.75 و91.5)% للعزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp. (25) على التوالي.

استخدمت تقنية التبادل الأيوني في تنقية حامض اللاكتيك لكونها طريقة إنتقائية وغير مكلفة ويتم انجازها بوقت قصير(Polat , 2002). وقد أشار Tong *et al.*(2004) الى إستخدام المبادل الانأيوني (Amberlite IRA-92) في تنقية حامض اللاكتيك وبلغت حصيلة الحامض (82.6)% بنقاوة مقدارها (96.2)%.

استخدمت طرق مختلفة لتنقية حامض اللاكتيك من الأحياء المجهرية إذ تمكن Sun *et al.*(2006) من تنقية الحامض من وسط التخمر بخطوتين تضمنت الخطوة الأولى عملية استرة الحامض بأضافة كحول البيوتانول بشكل لاكتات البيوتيل وأسفرت هذه الخطوة عن حصيلة حامض مقدارها 87.7 %أما الخطوة الثانية فتضمنت تنقية الحامض بأستخدام مبادل كاتأيوني وبلغت الحصيلة النهائية لحامض اللاكتيك 89.7 % وبنقاوة مقدارها 90 % .بينما استخدم Bouchoux *et al.*(2006) الترشيح الدقيق (Microfiltration) كخطوة تنقية إضافية للمستخلص الخام الخارج من عملية الترويق للتخلص الجزئي من بعض الأيونات مثل الكالسيوم





شكل(24): فصل حامض اللاكتيك بأستخدام المبادل الأيوني [Amberlite IR 120(H)] من بكتريا:

A- *L. acidophilus*

B- *Lactobacillus* sp.(25)

جدول (9) :تنقية حامض اللاكتيك من العزلة *L. acidophilus*

خطوة التنقية	الحجم (مليلتر)	تركيز حامض اللاكتيك (ملغم/مل)	كمية حامض اللاكتيك الكلية (ملغم)	الحصيلة (%)
1-المستخلص المروق	30	47.98	1439.4	100
2- التبادل الأيوني الأول بأستخدام المبادل (Amberlite IR-400)	40.5	32.92	1333.26	92.63
3- التبادل الأيوني الثاني بأستخدام المبادل Amberlite IR-120 (H)	49	26.07	1277.50	88.75

جدول (10): تنقية حامض اللاكتيك من العزلة *Lactobacillus* sp. (25)

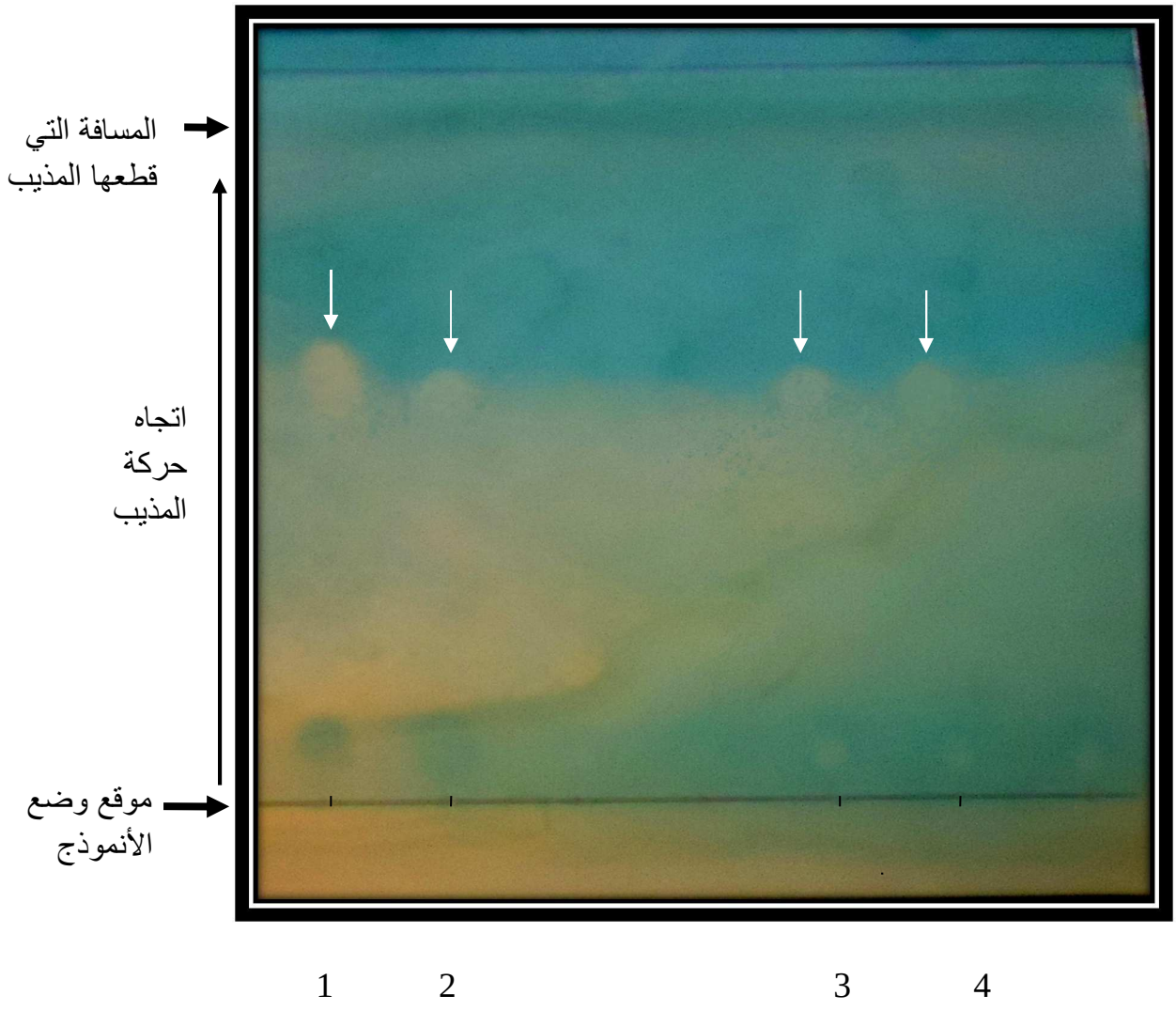
خطوة التنقية	الحجم (مليلتر)	تركيز حامض اللاكتيك (ملغم/مل)	كمية حامض اللاكتيك الكلية (ملغم)	الحصيلة (%)
1-المستخلص المروق	30	51.43	154.29	100
2- التبادل الأيوني الأول بأستخدام المبادل (Amberlite IR-400)	41.5	35.63	1478.65	95.84
3- التبادل الأيوني الثاني بأستخدام المبادل Amberlite IR-120 (H)	50	28.25	1412.70	91.56

والمغنيسيوم قبل مروره بأغشية الديلزة الكهربائية للحصول على أكبر نقاوة ممكنة من حامض اللاكتيك .

للحامض الناتج درجات مختلفة من النقاوة بحسب الغرض من انتاجه : الحامض الخام (Crude) أوما يسمى (Technical grade) يكون ملوناً ويصنع للاستخدامات التجارية ويحضر بسهوله بأضافة حامض الكبريتيك لأزالة الكالسيوم عن اللاكتات من وسط التخمر المسخن المرشح ثم يركز الحامض ، ويستخدم في الصناعات التي لاتحتاج الى درجات عالية من النقاوة كالصناعات الجلدية .والنوع الغذائي(Edibl grade) ذولون ثلجي بتركيز (50-80)% يتطلب خطوة تنقية اضافية عن النوع السابق . والنوع البلاستيكي (Plastic grade) وهو أكثر نقاوة من النوعين السابقين ويكون عديم اللون وذو تركيز (50-80) % والنوع الأنقى (u.s.p) ذو تركيز (90)% يستخدم في الصناعات الصيدلانية (Vijayakumar *et al.*,2008).

9-3 فصل حامض اللاكتيك بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)

تم استخدام هذا النوع من الكروماتوغرافيا لمعرفة نوع النظير الضوئي لحامض اللاكتيك (L أوD)form ،وفحص نقاوة الحامض وقياس قيمة (R_f) باستخدام Dioxane 90 % كمذيب في عملية الفصل .وأسفرت عملية الترحيل عن ظهور بقعة غير منتظمة الشكل ذات لون اصفر على ارضية زرقاء بعد رش الصفيحه بكاشف (Bromocresol green) شكل (25) وهي مشابهة للبقعة غير المنتظمة للحامض القياسي ،لذا فأن النتيجة المتحصل عليها تشير الى احتمال كون حامض اللاكتيك نقياً .وقد تم حساب قيمة (R_f) للحامض قيد الدراسه حيث بلغ 0.535 لحامض اللاكتيك المنتج من بكتريا *L. acidophilus* و 0.541 للحامض المنتج من بكتريا *Lactobacillus* sp.(25) وهي مقاربه لقيمة (R_f) للحامض القياسي والتي بلغت 0.559 . إن تقارب قيم (R_f) لحامض اللاكتيك مع قيمة (R_f) للحامض القياسي (L)form يعد أحد الأدلة على ان حامض اللاكتيك المنتج من العزلتين المذكورتين أعلاه يكون



الشكل (25) : كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة لحامض اللاكتيك :

المسار **1 : حامض اللاكتيك القياسي .**

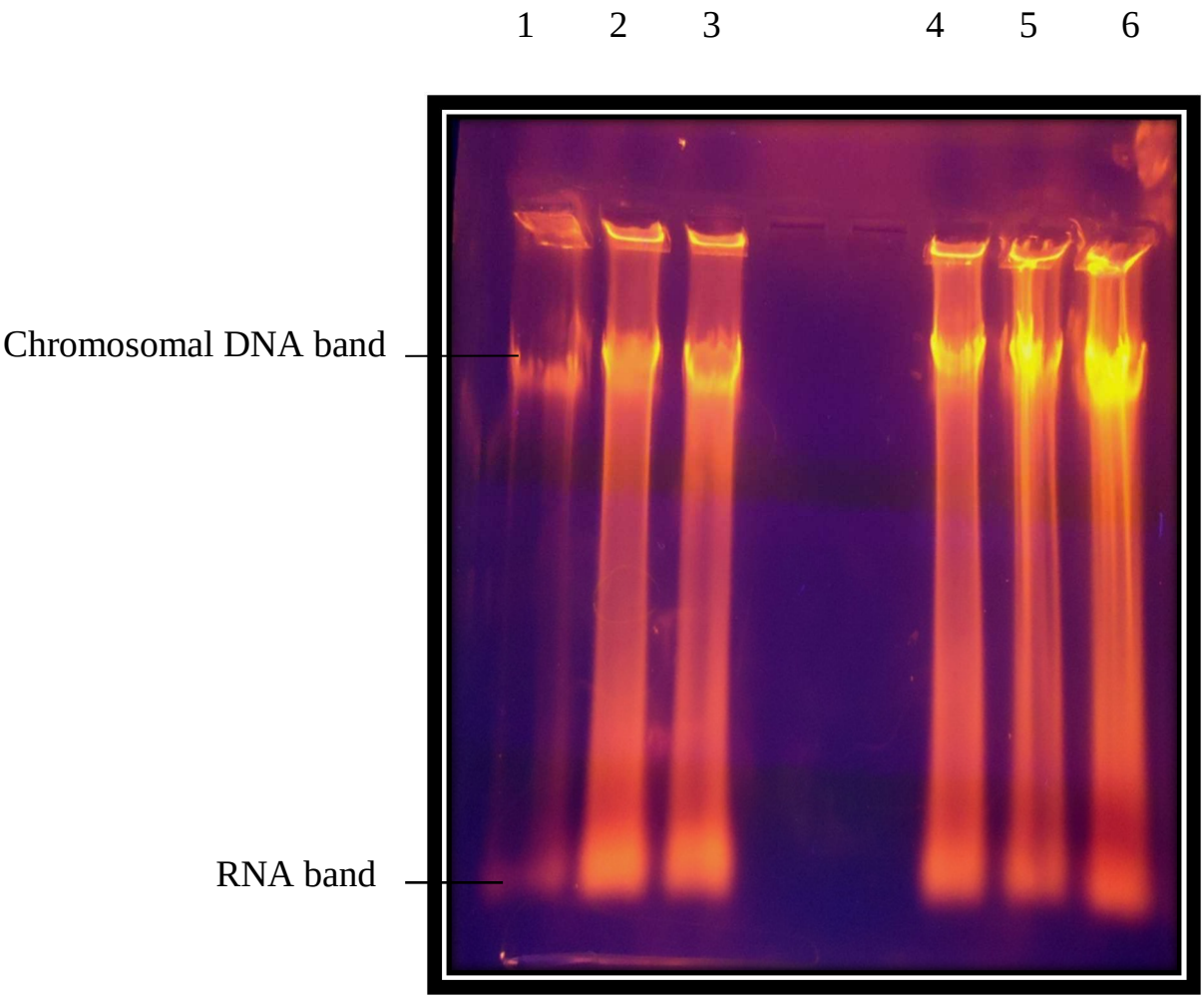
المسار **2 : حامض اللاكتيك المنتج من العزلة (25) *Lactobacillus* sp. .**

المساران **3 و4 : حامض اللاكتيك المنتج من العزلة *L. acidophilus* .**

من نوع form(L). وأشارت إحدى الدراسات الى أن قيمة (R_f) لحامض اللاكتيك بلغت 0.45 (Allan, 1998) وهذه القيمه أقل من القيمة المتحصل عليها في هذه الدراسة .ووجد Sajewicz *et al*.(2008) ان قيم (R_f) للنظيرين الضوئيين (L و D) عند فصله لحامض اللاكتيك الراسيمي بأستخدام المذيبDioxane في عملية الفصل بلغت (0.69 و0.88) للنظيرين الضوئيين (L و D) ، على التوالي. وفي دراسة عن قيم (R_f) للاحماض العضوية الموجودة في الفواكه وجد Gallander(1985) أن قيمة (R_f) لحامض اللاكتيك 0.75 .

10-3 التحري عن وجود البلازميدات في بكتريا *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25)

لغرض التعرف على المحتوى البلازميدي للبكتريا المنتجة لحامض اللاكتيك قيد الدراسة تم استخلاص الدنا الكلي من هاتين العزلتين . وتشير نتائج الترحيل الكهربائي الموضحة في الشكل (26) الى عدم ظهور اي حزمة بلازميدية رغم مدة الترحيل الطويلة المستخدمة في هذه الدراسة. إن هذه النتيجة تشير الى أن الجينات المسؤولة عن انتاج حامض اللاكتيك تكون كروموسومية الموقع .وقد أسفرت نتائج عزل الدنا الكروموسومي عن الحصول على دنا بتركيز (3.12و3.15)ملغم /مليلتر وبنقاوة مقدارها(1.591 و1.615) للعزلتين *L. acidophilus* و *Lactobacillus* sp.(25) ،على التوالي.



الشكل (26) : الترحيل الكهربائي في (0.8)% اكاروز في دارئ الترس – أسيتيت وبفرق جهد كهربائي مقداره 70 فولت

المسارات **1 و2 و3** : **الدنا الكلي للعزلة *Lactobacillus* sp. (25)**

المسارات **4 و5 و6** : **الدنا الكلي للعزلة *L. acidophilus***

المصادر

References

المصادر العربية :

البكر ، عبد الجبار (1972) . نخلة التمر ، ماضيها وحاضرها والجديد في زراعتها وصناعتها وتجارتها . شركة مطبعة الوطن .

الحيدري ، نظام كاظم .(1991) . التطبيقات الصناعية للأحياء المجهرية . في : علم الأحياء المجهرية . تأليف لجنة من تدريسي قسم علوم الحياة / جامعة بغداد .

الحيدري ، نظام كاظم والمصلح ، رشيد محجوب (1989) . الأحياء المجهرية الصناعية ، الطبعة الأولى ، جامعة بغداد .

الخفاجي ، زهرة محمود (1990) . التقنية الحيوية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي / جامعة بغداد . مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر .

ساجدي ، عادل جورج وعلي ، علاء يحيى محمد .(1987) . أساسيات التخمرات الصناعية الجزء الأول . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي / جامعة البصرة . مطبعة جامعة البصرة .

صالح ، ضحى سعد .(1991) . تغذية الأحياء المجهرية . في : علم الأحياء المجهرية .(1991) . تأليف : لجنة من تدريسي قسم علوم الحياة / جامعة بغداد .

المظفر ، سامي (2009) . أساسيات الكيمياء الحياتية . الطبعة الأولى . دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة .عمان.

وحيد ، ليلى عبد الكريم .(2008) . الأطلس الملون للبكتريا الطبية . وزارة الصحة . دائرة مدينة الطب . مديرية المختبرات التعليمية .

المصادر الأجنبية :

Abdul Karim ,M. I.; Mel, M.; Jamal, P. ; Salleh, M. R. M. and Alamin, N. (2006). Media screening of lactic acid fermentation using *Lactobacillus rhamnosus* . Journal of Agricultural Technology .2(2): 203-210 .

Adnan, A. F. M. and Tan,I. K. P. (2003). Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential.

Adthalungrong, C.and Temviriyanukul, S. (2010). Optimization of lactic acid production from tapioca starch hydrolysate by *Lactobacillus casei* TISTR 453. KKU Res. J. 15(5) .

Aeschlimann, A.and von Stockar, U.Appi .Microbiol . Biotechnol. 32. (1990). 398. Cited From .(Vijayakumar *et al* ., 2008) .

Agarwal, L.; Dutt, K.; Meghwanshi, G. K. and Saxena, R. K. (2008). Anaerobic fermentative production of lactic acid using cheese whey and corn steep liquor. Biomedical and Life Sciences . Biotechnology Letters. Volume 30, Number 4, 631- 635.

Ahmed , T. and Kanwal. R.(2004). Biochemical Characteristics of Lactic acid Producing Bacteria and Preparation of Camel Milk Cheese by Using Starter Culture. Pakistan Vet. J .,24 (2) .

Akerberg , F. C. and Zacchi , G. (2002). An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour, Bioresour. Technol. 75 . 119- 126. Cited from. (Zhang *et al* ., 2007)

Al- Chezzy, L. W. M. (2003). Identification of local isolate of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and using it to production lactic acid from local renewable resources . Ms.C. Thesis. College of Agriculture .

Al- Nasser, W.A. H. (2007). Study of The Adherence of *Lactobacillus acidophilus* on The Uroepithelial Cells and It's InterferenceWith The Adherence of some of Urogenital Pathogens. Ms.C.Thesis. College of Science .Univercity of Baghdad .

AL- Obaidi ,Z. S. ; Gh.M. Aziz ; Th. S. AL- Hakkak and M. A. AL- Hilli .(1987) . Optimization of propagation medium for bakers yeast using date extract and molasses . Date palm J.5(1) : 164-178 .

AL- Saud, N. H.M. (2009**) .** Production of Fermented and Therapeutic Foods by Utilization of Various Starters and Substrates. Ms.c. thesis. College of Agriculture. University of Baghdad .

Al-Hissnawy, D. S. A .A. (2002). Bacteriological and Immunological study of some aerobic bacteria causing acute and chronic tonsillitis in Najaf Governorate .Ms.C .Thesis . College of Science University of Kufa .

Allan, P. (1998). Chemistry Review. Volume 7, Number 3, Pages 24 and 25 .

AL-Sheik , A.A.(1999). Compression study of biochemical properties for local isolate and standard strain of *Lactobacillus acidophilus* and using it for production of biotherapeutic products. Thesis, University of Baghdad. Ph.D. Diary microbiology. Iraq. Cited from. (Nawaf ,2001) .

Altaf, M.; Naveena, B. J. and Reddy, G. (2005). Screening of Inexpensive Nitrogen Sources For Production of L (+) Lactic acid From Starch by Amylolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in Single Step Fermentation. Food Technol. Biotechnol. 43(3). 235-239.

Altaf, M. ;Naveena, B. J. and Reddy, G. (2007). Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation .Bioresource Technology. 98. 498- 503 .

Amin, G. A. and Talhi, A. A. (2007). Production of L- Lactic Acid by Immobilized Cell Reactor of The Bacterium *Corynebacterium glutamicum* Entrapped in to Carrageenan Gel Beads. World Applied Sciences Journal. 2(1): 62-67.

Amran, A. M. M. (1999). Isolation and identification of homofermentative lactic acid bacteria and studying their physiological characteristics and their suitability to be used as starters . Ms.C . Thesis . College of Agriculture . University of Basrah .

Arnaud, J.P .; Lacroix , C. and Castaigne , F. (1992) . Counterdiffusion of lactose and lactic acid in k- carrageenan / locust bean gum gel bead with or without entrapped lactic acid bacteria . Enzyme Microb. Technol . 14: 715- 724 .

Boekhorst, J.; Siezen, R. J.; Zwahlen, M. C.; Vilanova, D.; Pridmore, R. D.; Mercenier, A.; Kleerebezem, M.; de Vost, W. M. ; Brussow, H. and Desiere , F. (2004). The complete genomes of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus Johnsonii* reveal extensive differences in chromosome organization and gene content . Microbiology. 150 . 3601- 3611.

Bouchoux, A. ;De Balmann ,H. R.; and Lutin, F.(2006). Investigation of nanofiltration as apurification step for lactic acid production processes based on conventional and bipolar electrodialysis operations.Purif. Technol. 52.266.

Buchanan, R.E. and Gibbons, S.E.(1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Williams and Wilkins. Baltimore Maryland, USA.Cited from. (Nawaf, 2001).

Burton, L. V.(1937). By-products of milk. Food. Ind. Vol. 9 , pp. 571-575. Cited from. (Gunduz**,** 2005) .

Busairi, A.M. (2010). Effect of Nitrogen Source and Initial Sugar Concentration on Lactic acid Fermentation of Pineapple Waste Using *L. delbrueckii* .Teknik .Vol. 31, No.1, ISSN 0852-1697 .

Buyukkilci, A. O. and Harsa, S. (2004). Batch production of L (+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 79: 1036–1040.

Canchaya, C.; Claesson, M. J.; Fitzgerald, G. F.; Sinderen, D. V. and O'Toole,P. W. (2006). Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. Microbiology. 152. 3185-3196.

Cao, X.; Yun, H.S. and Koo, Y. M. (2002). Recovery of L (+) Lactic acid by anion Exchange Resin Amberlite IR-400 . Biochem. Eng. J. 11: 189-196 .

Champagne, C. P. and Gardner, N. J.(2001). The effect of protective ingredients on the survival of immobilized cells of *Streptococcus thermophilus* to air and freeze- drying . EJB Electronic, Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458. Vol.4, No.3.

Cock, L. S.and deStouvenel ,A. R. (2006). Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs *lactis* isolated from sugar cane plant. Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458. Vol.9, No.1 .

Cock, L. S. and de Stouvenel , A. R. (2007). Lactic acid fermentation production using wast from the harvest of green sugar cane substrate. Inerciencia . Vol. 32. No. 5 .

Collee , J. G. ; Fraser , A. G. ; Marrmion , B. P. and Simmons , A. S.(1996). Practical medical microbiology . 14th ed. Chuachill Livingstone. Cited from. (Al-Hissnawy, 2002 ; Al- Chezzy, 2003) .

Condon, S .(2006). Responses of lactic acid bacteria to oxygen . FEMS microbial .let : 46 ; 269- 80 . Cited from (Mukhopadhyay , 2009) .

Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G. and Sorrentino, E. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese Lait. 85, 193-204.

Corton, E.; Piuri, M.; Battaglini, F. and Ruzal, S. M.(2000).Characterization of *Lactobacillus* Carbohydrate Fermentation Activity Using Immobilized Cell Technique . Biotechnol . Prog. 16. 59-63 .

Cowan, S.T. ;and Steel, K.J.(1965).Manual for the Identification of Medical Bacteria .Cambridge University Press. Cited from **.(**AL- Nasser ,2007) .

Danielsen, M. and Wind, A. (2003) Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. Int. J .Food Microbiol 82, 1-11.

deLima, C. J. B. ;Coelho, L. F.; Da Silva, G. P. ; Alvare, G. L. and Contiero, J. (2010). L(+) Lactic acid Production by New *Lactobacillus Rhamnosus* B 103. Journal of Microbial &Biochemical Technology. Volume 2(3) : 064-069 .

Desai, A. (2008). Strain identification, viability and probiotics properties of *Lactobacillus casei* .Ph. D. Thesis. Victoria university, Werribee Campus Victoria, Australia .

Doleyres, Y. and Lacroix, C.(2004). Technologies with free and immobilized cells for probiotic bifidobacteria production and protection. Appl. Biotechnol. Food Sci. Pol. In press.

Dudez, A. M.; Chaillou, S.; Hissler, L.; Stentz, R.; Verges, M. C. C.; Alpert, C. A. And Zagorec, M. (2002). Physical and genetic map of the *Lactobacillus sakei* 23k chromosome . Microbiology .148 .421-431 .

Dumbrepatil , A. ; Adsul, M.; Chaudhari , S. ; Khire, J. and Gokhale ,D. (2008). Utilization Of Molasses Sugar For Lactic acid Production By *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *delbrueckii* Mutant UC-3 Batch Fermentation . Applied and Environmental Microbiology. Vol. 74 , No. 1.p. 333- 335 .

Egorov , N. S. (1985) . Antibiotics ascientific approach . Mir publishers Moscow .

EL- Hawary, F. ; Selim, I. A. and Omar, S. A.(2009). Production of L (+) Lactic Acid From Whey By Immobilized Whole Cells of *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus gasser*. The First International Conference of Food Industries and Biotechnology & Associateted Fair .

Erdogrul ,O. and Erbilir, F. (2006). Isolation and characterization of *Lactbacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from Various foods. Turk J. Biol. 30. 39-44 .

Farooq, U. (2006) . Production and Utilization of Organic Acids From Food Industrial Wastes Through Fermentation Technology .Ph.D. Thesis . Institute of Food Science and Technology University of Agriculture Faisalabad .

Flynn, S. (2001). Molecular characterisation of bacteriocin producing genes and plasmid encoded functions of the probiotic strain. *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. Ph.D. Thesis, Department of Microbiology, University College Cork, Ireland.. Cited from . (Canchaya *et al*., 2006).

Francois, Z. N.; El Hoda, N.; Florence, F. A.; Paul, M. F. ; Felicite, T. M. and El Soda.(2007). Biochemical Properties of Some Thermophilic Lactic Acid Bacteria Strains From Traditional Fermented Milk Relevant To Their Technological Performance as Starter Culture. Biotechnology. 6 (1): 14-21.

Frieling, P. and Schugerl, K. (1999). Rccovery of lactic acid from aqueous model solution and fermentation broths. Process Biochem. 34: 685-696 .

Gallander , J. (1985). Major Organic Acids In Fruits . The Science Workbook: Student Research Projects In Food-Agriculture - Natural Resources, College of Agriculture, Ohio State University **.**

Gard, A.; Jonsson, G. ;Schmidt, A. S. and Ahring, B.K. Bioresour . Technol. 81.(2002). 217 . Cited from .(Vijayakumar *et al* ., 2008) .

Gardner, N. J.; Savard, T.; Obermeier, P.; Caldwell, G. and Champagne, C. P. (2001). Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. International Journal of Food Microbiology .64. 261-275 .

Garg , F.C. (2003). Experimental Microbiology . CBS Publisher and Distributors . India.

Goksungur, Y. and Guvence, U. (1999). Production of Lactic acid From Beet Molasses by Calcium Alginate Immobilized *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202 . J. Chem.. Technol. Biotechnol. 74. 131-136.

Goksungur, Y. and Zorlu, N. (2001). Production of Ethanol from Beet Molasses by Ca- Alginate Immobilized Yeast Cell in a packed – Bed Bioreactor. Turk J. Biol.25. 265- 275.

Gonzalez, M. I.; Alvarez,S. ; Riera, F.and Alvarez,R. (2006). Economic evaluation of an integrated process for lactic acid production from ultrafiltered whey. Journal of food engineering .

Guisan , J. M. (2008). Immobilization of Enzymes and Cells .Second Edition . Humana Press . Totowa , New Jersey .

Gunduz, M. (2005) . Lactic acid Production By *Lactobacillus Casei* NRRL B-441 Immobilized In Chitosan Stabilized Ca-Alginate Beads. Ms.C. Thesis . Graduate School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology.

Habova, V.; Melzoch, K. and Rychtera, M. (2004). Modern Method of Lactic acid Recovery from Fermentation Broth. Czech J. Food Sci.Vol. 22, No. 3: 87-94 .

Hadadji, M. and Bensoltane, A. (2006). Growth and lactic acid production by *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in goat's milk. African Jornal of Biotechnology. Vol. 5 (6) , pp. 505-509 .

Hadzja , O. (1974) . A simple method for the quantitative determination of muramic acid . Anal. Biochem . 60: 512-517. Cited From.(King and White, 1977) .

Haug,A.; Larsen, B. and Smidsrod, O. (1966). A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis . Acta Chem . Scand. 20 . 183 . Cited from .(Guisan , 2008) .

Hilton, E. ; Isenberg, H.D.; Alperstein, P.; France, K. and Borenstein, M.T. (1992). Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as a prophylaxis for candidal vaginitis. Ann. Intern. Medici. 116(5): 353-357. Cited from .(Nawaf,2001) .

Holt , J.C. and Krieg, N.R. (1986) . Bergey s Manual of Systematic Bacteriology , vol. 2, Williams and Wilkins , London. Cited from. (AL-Saud ,2009)

Hongxian, L. and Jianqiang, L. (2008). Study on production of lactic acid by immobilized cells. CNKI: SUN: ZNGZ .

Huang, L. P.; Jin,B. ; P. Lant, and Zhou,J. Biotechnological Production of Lactic acid Integrated With Potato Wastewater Treatment By *Rhizopus Arrhizus*, J. Chem. Technol. Biotechnol. 78 (2003) 899–906. Cited From . (Zhang *et al*., 2007) .

Idris, A. and Suzana, W. Process Biochem. 41. (2006). 1117. Cited from . (Vijayakumar *et al* ., 2008).

Ivanova, E.; Chipeva, V.; Ivanova, I. ; Dousset, X. and Poncelet, D. (2002). Encapsulation of Lactic acid bacteria in calcium alginate beads for bacteriocin production. Journal of culture collections . Volume 3. pp. 53-58.

Jogdand, S. N. (1993). Advances in Biotechnology. Himalaya Publishing House. First Edition.

John, R. P. ; Nampoothiri, K. M.and Pandey , A. Process Biochem .41. (2006). 759 . Cited from .(Vijayakumar *et al* ., 2008) .

Junyan, L.; Guangfei, Q. and Ping, N. (2006). Cell Immobilization Technology and Application. GMSARN International Conference on Sustainable Development : Issues and Prospects For GMS .

Kandler, O. and Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus* In:Bergey's Manual of Systematic Bacteriology . Vol. 2.(Sneath. P. H. Ed.) pp. 1208-1231. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD. Cited from .(Amran , 1999) .

King , V. A. E. ; Huang, H. Y.; and Tsen, J. H. (2006). Fermentation of Tomato Juice by Cell Immobilized *Lactobacillus acidophilus* .

King, J. D. and White, D. C.(1977) . Muramic Acid as a Measure of Microbial Biomass In Estuarine and Marin Samples . Applied and Environmental Microbiology . Vol. 33, No.4, P. 777-783.

Kious, J. J. (2000). *Lactobacillus* and Lactic acid Production. Prepared in partial fulfillment of the requirements of the Office of Science, DOE ERULF under the direction of Min Zhang in Strain Development at the National Renewable Energy Laboratory.

Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., H ildebrandt, B., Muller-Bertling, S., Witte, W. and Goossens, H. (2007) Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. J. Antimicrob Chemother 59, 900-912.

Klovrychev , M. F. ; Korolev , P. N.and Bulgakova , V. G.(1979) . Effect of copper ions and unfavourable pH on protein and RNA synthesis of *Candida utilis* . Microbiology . 47 : 357-361 . Cited from **. (**Panesar *et al*., 2007) .

Korhonen, J.M., Danielsen, M., Mayo, B., Egervarn, M., Axelsson, L., Huys, G. and von Wright, A. (2008) Antimicrobial susceptibility and proposed microbiological cut-off values of lactobacilli by phenotypic determination. Int. J. Prob. Preb. 3, 257-268. Cited from . (Korhonen , 2010) .

Korhonen. J. (2010) . Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria . Dissertation In Forestry and Natural Sciences . 7.

Kotzamanidis, C. ; Roukas, T. and Skaracis, G. (2002) . optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130 . World J. Microbiol. Biotechnol. 18: 441-448 .

Krieg , N. R. and Holt, J.G. (1984) . Bergey's Manual of Systematic Bacteriology . Volume 1. Williams and Wilkins . Baltimore / London .

Li ,Y. ; Canchyaya, C.; Fang, F. ; Raftis, E.; Ryan, K. A.; Van Pijkeren, J.P.; Van Sinderen, D. and O'Tool, P.W. (2007). Distribution of Megaplasmids In *Lactobacillus salivarius* and Other Lactobacilli . J. Bacterial. 189 : 6128- 6139.

Liasi, S. A.; Azmi, T. I.; Hassan, M. D.; Shuhaimi, M. ; Rosfarizan, M. and Ariff, A. B. (2009). Antimicrobial Activity and Antibiotic Sensitivity of Three Isolates of Lactic acid Bacteria From Fermented Fish Product, Budu. Malaysian Journal of Microbiology, Vol. 5(1), pp. 33-37.

Liu, S.Q.; Asmundson, R.V.; Gopal, P.K.; Holland, R. and Crow, V. L. (1998). Influence of reduced water activity on lactose metabolism by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* at different pH values. Appl. Environ. Microbiol. 64. 2111-2116 . Cited from (Adnan . and Tan , 2003).

Liu, Y. ; Wen, Z.; Liao, W. ; Liu, C. and Chen, S. Optimization Of The Process For The Production of L(+)-Lactic acid From Cull Potato By *Rhizopus oryzae*, Eng. Life Sci. 5 (2005) 343–349. Cited From . (Zhang *et al*.,2007) .

Magnuson, J. K. and Lasure L. L.(2004). Organic Acid Production By Filamentous Fungi. Lene-12. Page 307.

Mahmoud, D. A. R.;and Helmy, W. A.(2009). Potential Application of Immobilization Technology in Enzyme and Biomass Production .Journal of Applied Sciences Research , 5(12): 2466-2476.

Malathi, J . and Jyostna , V. (2009). Manual of Practical Microbiology . PharmaMed Press .

Maniruzzaman, M.; Khan, M. F. R.; Amin, M. M.; Paul, A. K. and Islam, M. (2010). Isolation and identification of bacterial flora from milk of apparently healthy buffalo- cows. Int. J. BioRes. 1(3): 13-16 .

Matsumoto, M. ; Takagi,T. and Kondo, K. (1998). Separation of lactic acid using polymeric containing a mobile carrier . J. Ferment . Bioeng. 85: 483-487 .

Miller ,G .I. (1959) . Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar . Anal. Chem. , 3r . 426-428 .

Mirdamadi, S.; Atashgahi, S.; Rajabi, A.; Mohseni,F. A.;Roayaei, M. and Hamedi, J.(2008). Cell entrapment of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 39392 for lactic acid production. Iranian Journal of Biotechnology, Vol. 6, No.1 .

Mirdamadi, S.; Sadeghi, H.; Sharafi, N.; Fallahpour, M.; Mohseni , F. A.; and Bakhtiari ,M. R.(2002). Comparison of Lactic acid Isomers Produced by Fungal and Bacterial Strains. Iranian Biomedical Journal. 6 (2&3) : 69-75 .

Miyamoto, T.; Reddy, N. S. and Kataoka, K. (1996). Lactic acid and Diacetyl Production of Nitrosoguanidine Mutants Derived from *Lactobacillus casei* 34143 in Soymilk. Scientific Reports of The Faculty of Agriculture Okayama University. Vol.85, 45-50 .

Mukhopadhyay, a. (2009). Bioconversion of Paper Mill Lignocellulosic Materials To Lactic Acid Using Cellulose Enzyme Complex and Microbial Cultures . Ms. C . Thesis. Kansas State University . Manhattan, Kansas.

Nair, P. S. and Surendran, P. K. (2005). Biochemical Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated From Fish and Prawn. Journal of Culture Collections. Volume 4: 48-52.

Nancib, A. ; Nancib, N. ; Mezaine – Cherif, D.; Boubendir,A.; Fick, M. ; Boudrant, J. Bioresour. Technol. 96. (2005). 63. Cited From .(Vijayakumar *et al* ., 2008) .

Nancib, N. ; Nancib,A.; Boudjelal, A.; Benslimane, C.; Blanchard, F. and Boudrant, J. (2001). The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of Lactic acid from date juice by *Lactobacillus case*i subsp. *rhamnosus*. Bioresource Technology . Volume 78, Issue 2, Pages 149-153 .

Naranong, N. and Poocharoen, D. (2001). Production of L-Lactic acid from Raw Cassava Starch by *Rhizopus oryzae* NRRL 395.

Narayanan, N.; Roychoudhury, P. K. and Srivastava, A. (2004). L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. Electronic Journal of Biotechnology ISSN : 0717-3458. Vol. 7,No. 2, Issue of August 15 .

Narita, J. ; Nakahara, S. ; Fukuda, H. and Kondo, A. J. Biosci. Bioenng . 97. (2004). 423 . Cited From .(Vijayakumar et al ., 2008) .

Naveena, B. J. ;Altaf, M.; Bhadrayya, K. and Reddy, G. (2004). Production of L(+) Lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in Semi- Solid State Fermentation Using Wheat Bran. Food Technol. Biotechnol. 42(3). 147-152 .

Nawaf ,M. G. (2001). The Use of *Lactobacillus acidophilus* as a Probiotic for the Prevention and Treatment of Experimental Rat Enteritis . Ms.C. Thesis. College of Medicine .University of Tikrit.

Ohkouchi, Y. and Inoue, Y. Bioresour .Technol. 97.(2006). 1554. Cited from **.** (Vijayakumar *et al* ., 2008) .

Olaoye,O. A. and Onilude, A. A. (2009). A Study on Isolation of Presumptive Technologically Important Microorganisms From Nigerian Beef. American – Eurasian Journal of Sustainable Agriculture ,3(1): 75-83.

Orive, G. ; Hernandez, R. M. ; Gascon, A.R. Et Al. (2004). History, challenges and promisis of cell microencapsulation . Trends Biotechnol . 22. 87-92. Cited from .(Guisan , 2008) .

Ostlie, H. M. ;Treimo, J. and Narvhus, J. A. (2005). Effect of Temperature on Growth and Metabolism of Probiotic Bacteria In Milk. International Dairy Journal Volume 15,Issue 10, Pages 989-997.

Panesar, P.S. ;Kennedy, J. F.; Knill, C.J. and Kosseva , M. R. (2007). Applicability of pectate – entrapped *Lactobacillus casei* cells for L (+) lactic acid production from whey. Biotechnological Products and Process Engineering.

Pelinescu, D. R.; Sasarman, E.; Chifiriuc, M. C.; Nohit, A. M.; Avram, I.; Serbancea , F. and Dimov ,T. V.(2009). Isolation and identification of some *Lactobacillus* and *Enterococcus* strains by a polyphasic taxonomical approach. Romanian Biotechnological Letters. 14 (2): 4225-4233 .

Polat, Z. (2002). L(+) Lactic Acid Purification From Fermentation Broth Using Ion Exchange Resins. Ms. C. Thesis. Izmir Institute of Technology .Izmir, Turkey .

Pospiech , T. and Neumann, T. (1995). Salting out procedure for the isolation of genomic DNA . In : Preparation and analysis of genomic and plasmid DNA .T. Kieser led. Norwich ,UK .

Prescott, S.C. and Dunn, C.G. (1959). Industrial microbiology. 3rd. ed. McGraw-Hallbook Company. New York. PP.:304-331.

Prevost, H. and Divies, C. (1992). Cream fermentation by a mixed culture of lactococci entrapped in to – layer calcium alginate gel beads . Biotechnol. Let. 14: 583-588 .

Rangaswamy, V. and Ramakrishna, S. V.(2008). Lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* in a dual reactor system using paked bed biofilm reactor .Journal Compilation . The Society for Applied Microbiology ,Letters in Applied Microbiology .46 .661-666 .

Rao, C. S.; Prakasham, R. S.; Lakshmi, C. H. and Rao, B. (2009). Effect of Various Immobilization Matrices on *Lactobacillus delbrueckii* Cells For Optically Pure L (+) Lactic Acid Production. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy. Vol. 3(3).311-319 .

Ray, R.C.; Sharma, P. and Smita, H.P.(2009) .Lactic acid production from Cassava fibrous residue using *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407. Journal of Enviromental Biology. 30(5): 847-852.

Reuter,G. ; Klein,G. ; and Goldberg,M.(2002).Identification of Probiotic Cultures in food samples .Food Res.Internation.,35:117-124. Cited from **.(**AL- Nasser ,2007) .

Richter, K. and Trager, A. Acta Biotechnol.14. (1994). 367. Cited From . (Vijayakumar *et al* ., 2008) **.**

Saito, K.; Abe, A.; Sujaya, I. N.; Sone, T. And Oda, Y. (2004). Comparison Of *Amylomyces rouxii* and *Rhizopus oryzae* in Lactic acid Fermentation of Potato Pulp . Food Sci.Technol. Res., 10(2), 229-231 .

Sajewicz, M.; John, E.; Kronenbach, D. ; Gontarska, M. and Kowalska, T. (2008). TLC Study of the Separation of The Enantiomers of Lactic Acid. Acta Chromatographica. 20(3): 367-382.

Schepers , A. W.; Thibault ,J. and Lacroix ,C. (2002) . *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH controlled batch cultures in whey permeate / yeast extract medium .part II : Kinetic modeling and model validation , Enzyme Microb . Technol. 30 .187-194 .

Senthuran,A.; Senthuran, V, ; Hatti- Kual, R. and Mattiasson, B. J. Biotechnol. 73. (1999). 61 . Cited from .(Vijayakumar *et al* ., 2008)

Shindo ,S. and Tachibana, T.(2004). Production of L-Lactic acid From Spent Grain, By –Product of Beer Production. Journal of The Institute of Brewing .Vol. 110, No. 4.

Stephenson, F. H. (2003). Calculations For Molecular Biology and Biotechnology . Academic Press .

Sun, X.; Wang, Q. ; Zhao, W. ; Ma, H.and Sakata, K. Sep. Purif . Technol. 49. (2006). 43 . Cited from. (Vijayakumar *et al* ., 2008) .

Sun, Y.; Li, Y.L.; Bai, S.Y.; Yang, H. and Hu, Z. D. (1998). Stability of Immobilized *R. oryzae* In Repetitive Batch Producing of L (+) Lactic acid Effect of Inorganic Salts Bioprocess Engineering . 19 .155 – 157. Cited from .(Thongchul , 2005).

Tenney, D. (1996). Acidophilus. Woodland Publishing. Pleasant Grove, UT.

Thongchul , N. M. S. (2005). Lactic Acid Production By Immobilized Rhizopus Oryzae In Arotating Fibrous Bed Bioreactor . Ph.D . Thesis . The Ohio State University .

Timmer, I.M.K. ; Kromkamp, J. and Robbertsen, T. (1994). Lactic acid separation from fermentation broths by reverse osmosis and nanofiltration. J. Memb. Sci., 92:185-197 .

Tong, W.Y.; Fu, X. Y. ; Lee, S. M.; Jie, Y. ; Liu, J.W. ;Wei, D. Z. and Koo, Y. M. Biochem. Eng. J. 18 .(2004). 89. Cited Fro .(Vijayakumar *et al* ., 2008).

van Kranenburg, R., Golic, N., Bongers, R., Leer, R. J., de Vos, W. M.; Siezen, R. J. and Kleerebezem, M. (2005). Functional analysis of three plasmids from Lactobacillus plantarum. Appl Environ Microbiol 71, 1223–1230.

Verdenelli, M. C.; Ghelfi, F.; Silvi, S.; Orpianesi, C.; Cecchini, C. and Cresci, A. (2009). Probiotic Properties of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* Isolated From Human Faeces . Eur. J. Nutr.

Vijayakumar, J.;Aravindan, R .and Viruthagriri, T. (2008). Recent Trends in the Production, Purification and Application of Lactic Acid. Chem. Biochem. Eng. Q. 22 (2):245-264.

Wang, T. T. and Lee, B. H. (1997). Plasmids in Lactobacillus. Crit Rev. Biotechnol . 17, 227–272 .

Wee , J.Y.; Kim, J.N. and Ryu, H.W. (2006). Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications . Food Technol. Biotechnol. 44(2). 163-172 .

Wee, J. Y. ; Kim, H. O.; Yun, J. S. and Ryu, W. (2006). Pilot- Scale Lactic Acid Production Via Batch Culturing of *Lactobacillus* sp. RKY2 Using Corn Steep Liquor as a Nitrogen Source . Food Technol. Biotechnol. 44(2): 293-298.

Whitaker , J. R. (1972) . Principles of enzymology for the food science . Marcel Dekker , Inc. Newyork .

Yanez, R. ; Moldes , A. B.; Alonso, J.L . and Parajo, J.C. (2003) . production of D(-) lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. Torquens . Biotechnol . Lett . 25 .1161-1164 .

Yoo , I. ; Seong ,G. H.; Chang, N. H.and Park , J.K. (1996) . Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells In liquid – corn alginate capsules for lactic acid production . Enz. Microbial Technol . 19: 26- 433 .

Yoo, I. K.; Cheng, N. N.; Lee, E. G. ;Cheng, Y.K. and Moon, S.H. (1997). Effect of B vitamin supplementation on lactic acid production by *Lactobacillus casei* . J. Ferment. Bioeng. 84: 172- 175.

Yousif, A. K. ; Benyamin , N.D. ; Kado, A. ; Mehi- Alddin and Ali, S. M. (1982) .Chemical composition of four Iraqi date cultivars . Date Palm Journal . 1 (2) : 285-294 .

Yuwono , S. D. and Hadi , S. (2008). Production of Lactic Acid From Onggok and Tofu Liquid Waste With Concentrate Maguro Waste Supplement By Streptococcus Bovis .Australian Journal of Basic and Applied Sciences . 2(4) : 939 – 942 .

Zhan, X.; Wang, D. ;Tuinstra, M.R.; Bean, P.A.; Seib, X.S. and SUN, X.S.(2003). Ethanol and lactic acid production as affected by sorghum genotype and location. Industrial Crops and Products. 18 :245-255 .

Zhang, W.;Yu, D. ; Sun, Z.; Chen, X.; Bao, Q.; Meng, H.; Hu, S. and Zhang, H. (2008). Complete nucleotide sequence of plasmid plca 36 isolated from Lactobacillus casei Zhang. Plasmid 60: 131-135 .

Zhang, Z. Y. ;Jin, B. and Kelly, J. M. (2007). Production of Lactic acid From Renewable Material by *Rhizopu*s Fungi .Biochemical Engineering Journal.35. 251-263.

Zhu, Y. ;Zhang, Y. and Li, Y.(2009). Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. Appl Microbiol Biotechnol .83: 597-610.

Summary

The present study included the isolation and identification of *Lactobacillus* from different sources in addition to investigate their abilities in lactic acid production .The study also used the cell immobilization technique for the efficient isolates , lactic acid was purified from the immobilized cell .the results revealed the following :

1- Twenty bacterial isolates belonged to the genus of *Lactobacillus* were obtained from different sources included raw milk , pickles , rural dairy, whey and yoghurt . The above isolates (in addition to three isolates belong to the same genus obtained from College of Veterinary / Baghdad University and one isolate of *Lactobacillus acidophilus* obtained from College of Agriculture / Baghdad University) were subjected to a screening program to test their abilities for lactic acid production using different incubation conditions . Results showed that *L. acidophilus* and *Lactobacillus* sp. (25) were the higher producer isolates and chosed to be used for further studies .

2- The optimum cultural conditions for the production of lactic acid from *L. acidophilus* and *Lactobacillus* sp. (25) were studied . Highest production of lactic acid was obtained by using date juice (6 and 8) % (reducing sugars) for the two isolates , respectively supplemented with 0.7 % yeast extract and 1 % calcium carbonate , adjusted to pH 6.5 ; inoculated with cells at inoculums size (4)% and incubated in static conditions at 37 °C for(60 and 48) hours to the two mentioned isolates , respectively .

3- Cells of *L. acidophilus* and *Lactobacillus* sp. (25) were immobilized using entrapment method with two different supports . Results showed that agar – agar was more efficient in lactic acid production in compare with sodium alginate . Factors affect cells immobilization were studied and the results showed that (3)% agar – agar as a support with (1×10^9) cell / ml gave the highest production of lactic acid .

4- Some of the optimal conditions for lactic acid production from the immobilized cells of *L. acidophilus* and *Lactobacillus* sp.(25) were studied . The results revealed the following :

A- The best date juice concentration and yeast extract for lactic acid production were (4 and 0.3)% for both isolates , respectively .

B- The optimal incubation periods for lactic acid production were (60 and 72) hours for *L. acidophilus* and *Lactobacillus* sp. (25), respectively.

C- The immobilized cells for both isolates were stable during five repeated cycles and no acid production loss was observed during the studied periods.

5- Lactic acid was isolated from culture filtrate of *L. acidophilus* and *Lactobacillus* sp.(25) . The isolation procedure included Clarification step, Ion exchange with anionic exchanger (Amberlite IR- 400) and Ion exchange with cationic exchanger [Amberlite IR 120- (H)]. Lactic acid yield obtained were (88.75 and 91.56)% for the above mentioned isolates , respectively .

6- Purified lactic acid from both isolates used in this study showed a single spot when separated in thin layer chromatography with an R_f value of (0.535 and 0.541) for the acids purified from *L. acidophilus* and *lactobacillus* sp. (25) , respectively .

7- Results showed the absence of plasmids in both *Lactobacillus* isolates used in this study indicating that the genes responsible for the production of lactic acid are chromosomally located .

Production and Purification of Lactic Acid from Immobilized *Lactobacillus* Local Isolates

A Thesis

Submitted to the College of Science University of Kerbala

in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biology

By

Suhad Ridha Muteeb AL-Tayie

B.SC. Kerbala university 2008

Supervied by

Asst. Prof. Dr. Ali Abdul Kadhim AL-Ghanimi

April : 2011