مجلة العلوم الحديثة والتراثية ، 2016 ، 4 (3) : 601 – 616 .
http://www.jmsh.eu

الظروف المثلى لأنتاج البكتريوسين من *Pediococcus acidilactici*-FMAC278 و *Weissella paramesenteroides*-DFR6

زهراء علي مزهر و اسوان حمدالله البيار*
قسم علوم الاغذية / كلية الزراعة / جامعة بغداد / العراق
***Corresponding author: aswanbayar@yahoo.com**

الخلاصة

درست الظروف البيئية لأنتاج البكتريوسين من كلا العزلتين *Pediococcus acidilactici*-FMAC278 و *Weissella paramesenteroides*-DFR6 وشملت مصادر الكاربون، مصادر النتروجين، الاملاح، درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني ومدة الحضن وحجم اللقاح وكانت افضل الظروف لأنتاج البكتريوسين من *P. acidilactici* كما يأتي: الزايلوز 2.5%، الببتون 1.5%، مستخلص اللحم 0.5%، مستخلص الخميرة 0.5%، سترات الامونيوم 0.1%، كبريتات المنغنيز 0.002%، كبريتات المغنيسيوم 0.01%، فوسفات ثنائي البوتاسيوم الحامضي 0.3%، درجة حرارة الحضن 25°م، مدة الحضن 48 ساعة، الرقم الهيدروجيني 8، حجم اللقاح 10^4. اما افضل ظروف انتاج البكتريوسين من بكتريا *W. paramesenteroides* فهي: الزايلوز 2.5%، الببتون 1%، مستخلص اللحم 1.5%، مستخلص الخميرة 0.3%، سترات الامونيوم 0.2%، كبريتات المنغنيز 0.01%، كبريتات المغنيسيوم 0.02%، فوسفات ثنائي البوتاسيوم الحامضي 0.1%، درجة حرارة الحضن 25°م، مدة الحضن 24 ساعة، الرقم الهيدروجيني 6.5، حجم اللقاح 10^6.

Optimal conditions for the production of bacteriocin from *Pediococcus acidilactici*-FMAC278 and *Weissella paramesenteroides*- DFR6

Zahraa A. Mezher and Aswan H. Al-Bayyar*
Food Science Department/College of Agriculture/ Baghdad University
***Corresponding author: aswanbayar@yahoo.com**

Abstract

The two isolates showed higher activity than *L. plantarum*. Environmental conditions for bacteriocin production were studied for both isolates which include Carbon sources, Nitrogen sources, Saltes, Temperature, pH, Incubation time and Inoculation size, The best conditions for bacteriocin production from *P. acidilactici* were: Xylose 2.5%, Peptone 1.5%, Beef extract 0.5%, Yeast extract 0.5%, Ammonium citrate 0.1%, $MnSO_4$ 0.002%, $MgSO_4$ 0.01%, K_2HPO_4 0.3%, Incubation temperature 25ºC, Incubation time 48 hours, pH 8 and Inoculation size 10^4. While the best conditions for bacteriocin production from *W. paramesenteroides* were: Xylose 2.5%, Peptone 1%, Beef extract 1.5%, Yeast extract 0.3%, Ammonium citrate 0.2%, $MnSO_4$ 0.01%, $MgSO_4$ 0.02%, K_2HPO_4 0.1%, Incubation temperature 25ºC, Incubation time 24 hours, pH 6.5 and Inoculation size 10^6 .

المقدمة

الظروف المثلى لأنتاج البكتريوسين: يمكن انتاج البكتريوسين بكميات كبيرة مختبريا في ظروف كيميائية وفيزيائية مثالية بغياب العوامل المحددة (1، 2، 3)، وان انتاج البكتريوسين يكون ذو فعالية كبير اعتمادا على ما يتوفر للكائن الحي المنتج من تغذية ودرجة حرارة الحضن والرقم الهيدروجيني الابتدائي الملائم (4، 5).

1- مصادر الكاربون: يعد الكاربون عنصر اساسي لنمو خلايا الاحياء المجهرية لكونه يؤدي دورا مزدوجا متمثلا ببناء الخلايا وتكاثرها فضلا عن كونه مصدرا للطاقة (6، 7). استعمل (8) الكلوكوز بنسبة (0.25%) لأنتاج البكتريوسين من *L. plantarum* F1 و *L.brevis* OG1.

ذكر (9) ان افضل مصدر كاربون لأنتاج الكتلة الحيوية هو الكلوكوز اما الفركتوز فهو اكثر ملائمة لأنتاج البكتريوسين . استخدم (10) الكلوكوز بتركيز (36.3 g/l) لأنتاج افضل تركيز للبكتريوسين. كما بين (11) ان البكتريوسين المنتج من *Lactobacillus* sp. يصل الى اعلى تركيز له عندما استخدم الدكستروز كمصدر للكاربون بتركيز (14.9 g/l). واستخدم (12) تركيز الكلوكوز (2%) لأنتاج البكتريوسين من بكتريا *L. plantarum* LPCO10. واوضح (13) ان بكتريا *L. plantarum* تحتاج الكلوكوز لأنتاج البكتريوسين.

2- مصادر النتروجين: تؤدي مصادر النتروجين دورا مهما في عملية التخمير اذ انها تدخل في تركيب الاحماض الامينية كونها الوحدة البنائية الاساسية للبروتينات (14). اشار (8) الى ان بكتريا *L. plantarum* المنتجة للبكتريوسين تحتاج الى مستخلص لحم ومستخلص خميرة وببتون للنمو، حيث استعمل الببتون بنسبة (0.5%) لأنتاج البكتريوسين من *L. plantarum* F1 و *L.brevis* OG1. وكذلك اشار (11) ان البكتريوسين المنتج من *Lactobacillus* sp. كان التركيز الامثل له عندما استخدم Ammonium citrate بتركيز (3 g/l). كذلك اشار (15) انه استخدم مستخلص الخميرة Yeast extract كمصدر نتروجيني لأنتاج البكتريوسين من LAB.

3- الرقم الهيدروجيني الابتدائي: وجد (16) ان الارقام الهيدروجينية (5.5، 6، 6.5) حققت اعلى انتاج للبكتريوسين المنتج من قبل *L. curvatus* بالرغم من ان اعلى نمو للكتلة الحيوية كان عند (6،6.5). واستخدم (8) الرقم الهيدروجيني الابتدائي (7) لأنتاج البكتريوسين من *L. plantarum* F1، *L.brevis* OG1 وكما قام (9) بتنمية *Leuconostoc mesenteroides* E131 في رقم هيدروجيني منخفض (5.5) حيث اظهرت النتائج ازدياد نموها مقارنة بالرقم الهيدروجيني الابتدائي الامثل (6.5) لتعزيز انتاج البكتريوسين. وكما اكد (13) ان الرقم الهيدروجيني الابتدائي الملائم لنمو العزلتين *L. plantarum*، *L. acidophilus* بين (5-6) بينما اعلى انتاج للبكتريوسينات كان عند (5.5).

4- درجة الحرارة: لقد لاحظ (16) ان الدرجة الحرارية المثلى لأنتاج البكتريوسين من سلالة *L. curvatus* هي 30°م مقارنة بدرجات الحرارة التي استخدمت (37، 25، 12)°م. واشار (17) الى ان افضل انتاج للبكتريوسين من بكتريا *L. delbreukii* sp. *bulgaricus* تحقق بحرارة 37°م. كما استعمل كل من (18) لأنتاج البكتريوسين من سلالة *Strep. thermophiles* درجة حرارة حضن 37°م، كما استعمل (9) درجة حرارة لأنتاج البكتريوسين من *Leuconostoc mesenteroides* قريبة من الحرارة المثلى للنمو 25°م. ولاحظ (12) ان الحرارة المثلى لأنتاج البكتريوسين 22-27°م المنتج من بكتريا *L. plantarum* LPCO10 . وتوصل

(13) ان درجة الحرارة الملائمة لنمو *L. plantarum*، *L. acidophilus*. هي بمعدل (30-37)°م بينما الحرارة الملائمة للحصول على اعلى انتاج للبكتريوسين عند 30°م.

5- مدة الحضن: اظهرت دراسة قام بها (19) لأنتاج مواد مثبطة من عزلات ثلاثة تنتمي لجنس *Lactobacillus* ان مدة الحضن المثلى تتراوح بين (18-42) ساعة للأنتاج، ولم يحدث اي زيادة بكفاءة التثبيط عند الحضن لمدة 48 ساعة تجاه بكتريا الاختبار *Brucella abortus* ما عدا البكتريا *L. casei* التي اعطت افضل فعالية تثبيطية بعد هذه المدة. كما استخدم (9) لأنتاج البكتريوسين من *L. brevis* OG1 وكذلك *L. plantarum* F1 مدة حضن 72 ساعة. وايضا قام (18) بحضن *Strep. thermophiles* لمدة 24 ساعة لانتاج البكتريوسين. كما اوضح (20) انه عند زيادة فترة الحضن للمزرعة السائلة للبكتريا الى اكثر من 24 ساعة سوف نلاحظ زيادة الفعالية التثبيطية للبكتريوسين بشكل عام. كما لاحظ (13) ان افضل نمو للبكتريا بمدة حضن 48 ساعة، اما اعلى انتاج للبكتريوسينات تم الحصول عليه كان خلال 24 ساعة مما يدل على ان انتاج البكتريوسين حصل خلال نهاية الطور اللوغارتمي وبداية طور الثبات للنمو. واستعمل (15) مدة حضن 72 ساعة لحضن بكتريا LAB لانتاج البكتريوسين.

6- الاملاح: بينت دراسة قام بها (16) ان اضافة 2% من NaCl الى الوسط قلل من انتاج البكتريوسين المنتج من قبل *L. curvatus* بمقدار 50% حيث انه اثر في نمو الخلايا لكن لم تؤثر النسب الاقل المضافة من ذلك على النمو والانتاج. كما استخدم (10) NaCl (1.41 g/l) لتحفيز الانتاج الامثل للبكتريوسين. وكذلك اشار(11) ان البكتريوسين المنتج من *Lactobacillus* sp. كان التركيز الامثل له عندما استخدم NaCl بتركيز (1.39 g/l). ولقد اظهر (21) ان تركيز NaCl التي تحتاجها LAB لأنتاج البكتريوسين هو 1%. واستخدم (15) كبريتات المغنيسيوم وكذلك NaCl و وفوسفات ثنائي البوتاسيوم الحامضي لأنتاج البكتريوسين. توصل (9) الى ان استخدام كبريتات المغنسيوم وكبريتات المنغنيز و فوسفات ثنائي البوتاسيوم الحامضي لم يكن لها اي تأثير على انتاج البكتريوسين.

7- حجم اللقاح: لقد اوضح (22) ان عدد خلايا الكتلة الحيوية المستخدمة لانتاج البكتريوسين من بكتريا *L. mesenteroides* هو 8×10^8 و.م.م. كما اشار (10) ان عدد خلايا الكتلة الحيوية من بكتريا *L. plantarum* YJG يصل الى 10^9 و.م.م اللازمة لأنتاج البكتريوسين. واستخدم (23) عدد خلايا الكتلة الحيوية لـ 10^7-10^8 LABو.م.م لانتاج البكتريوسين.

المواد وطرق العمل

دراسة تأثير الظروف البيئية لأنتاج البكتريوسين: تمت دراسة تأثر عدد من العوامل في انتاج البكتريوسين المنتج من العزلات البكتيرية *Pediococcus*، *Weissella* بأستخدام وسط MRS السائل:

1- تأثير مصادر الكاربون في الانتاج: حُضر وسط MRS السائل مع استخدام مصدر الكاربون الكلوكوز والزايلوز واللاكتوز كلاً على انفراد وبثلاث تراكيز (1.5، 2، 2.5) (وزن/ حجم) وضبط الرقم الهيدروجيني الابتدائي للأوساط الى 6.5 وعُقمت بجهاز المؤصدة لمدة 5 دقائق في درجة حرارة 121°م، وأُلقحت الاوساط المحضرة بمصادر الكاربون الثلاثة المختلفة بمزروع منشط من العزلات البكتيرية في ظروف هوائية وبعمر 24 ساعة وبنسبة لقاح 1%، وحضنت الاوساط الملقحة في درجة حرارة 30°م لمدة

48 ساعة ثم عُرضت للنبذ المركزي 4000 xg لمدة 20 دقيقة، في حرارة 4°م، رشحت عبر مرشحات مايكروبية ذات مسامية 0.22 مايكرومتر.

تم قياس امتصاصية الراشح المحتوي على البكتريوسين على طول موجي 600 نانومتر الذي اتخذ دليلا على كمية البكتريوسين المنتج (24).

2- تأثير مصادر النتروجين في الانتاج: تم تحضير وسط MRS السائل مع تثبيت مصدر الكاربون ونسبته التي اعطت اعلى انتاج للبكتريوسين، تم استبدال نسب مصادر النتروجين فيه وهي :

- ببتون (0.5، 1، 1.5)%.
- مستخلص اللحم (0.5، 1، 1.5)%.
- مستخلص الخميرة (0.3، 0.5، 0.7)%.
- سترات الامونيوم (0.1، 0.2، 0.3)%.

حيث تم تغيير النسب لمصدر نتروجيني واحد وثبتت بقية النسب للمصادر النتروجينية الاخرى وبعد اختيار النسبة الافضل تثبت وتُغير نسبة مصدر نتروجيني اخر وهكذا لبقية المصادر النتروجينية الاخرى، وضبط الرقم الهيدروجيني الابتدائي للأوساط الى 6.5 وعُقمت بجهاز المؤصدة لمدة 5 دقائق في درجة حرارة 121°م، ولُقحت الاوساط المحضرة بمصادر النتروجين الاربعة المختلفة بمزروع منشط من العزلات البكتيرية في ظروف هوائية وبعمر 24 ساعة وبنسبة لقاح 1%، وحضنت الاوساط الملقحة في درجة حرارة 30°م لمدة 48 ساعة ثم عُرضت للنبذ المركزي 4000 xg لمدة 20 دقيقة،في حرارة 4°م، ورشحت عبر مرشحات مايكروبية ذات مسامية 0.22 مايكرومتر. تم قياس امتصاصية الراشح المحتوي على البكتريوسين على طول موجي 600 نانومتر الذي اتخذ دليلا على كمية البكتريوسين المنتج (24).

3- تأثير الاملاح في الانتاج: حُضر وسط MRS السائل مع تثبيت نسب المكونات الاخرى التي اعطت افضل انتاج للبكتريوسين ،مع استبدال نسب الاملاح المستخدمة في الوسط وهي:

- كبريتات المنغنيز (0.0025، 0.005، 0.01)%.
- كبريتات المغنيسيوم (0.005، 0.01، 0.02)%.
- فوسفات ثنائي البوتاسيوم الحامضي (0.1، 0.2، 0.3)%.

حيث تم تغيير كبريتات المنغنيز وتثبيت النسب للاملاح الاخرى لوسط MRS السائل وعند اختيار افضل نسبة منه تُثبت وتُغير نسب كبريتات المغنيسيوم وهكذا بالنسبة لفوسفات ثنائي البوتاسيوم الحامضي وضبط الرقم الهيدروجيني الابتدائي للأوساط الى 6.5 وعُقمت بجهاز المؤصدة لمدة 5 دقائق في درجة حرارة 121°م، ولُقحت الاوساط المحضرة بمصادر الكاربون الثلاثة المختلفة بمزروع منشط من العزلات البكتيرية في ظروف هوائية وبعمر 24 ساعة وبنسبة لقاح 1%، وحضنت الاوساط الملقحة في درجة حرارة 30°م لمدة 48 ساعة ثم عُرضت للنبذ المركزي 4000 xg لمدة 20 دقيقة، في حرارة 4°م ورشحت عبر مرشحات مايكروبية ذات مسامية 0.22 مايكرومتر. تم قياس امتصاصية الراشح المحتوي على البكتريوسين على طول موجي 600 نانومتر الذي اتخذ دليلا على كمية البكتريوسين المنتج (24).

4- تأثير حجم اللقاح في الانتاج: حُضر الوسط MRS السائل وثبتت المكونات والنسب المثلى التي اعطت افضل انتاج للبكتريوسين وعُدل الرقم الهيدروجيني الى (6.5) وعقمت الدوارق الحاوية على الوسط بالمؤصدة، و لقحت الثلاث دوارق الاولى بحجم لقاح (10^4 × 2.7، 10^5 × 2.7، 10^6 × 2.7) و.م.م من *Pediococcus*بينما لقحت الدوارق الثلاثة الاخرى بحجم لقاح (10^4 ×3.03، 10^5 × 3.03، 10^6 ×3.03) و.م.م من *Weissella*، وحضنت بدرجة الحرارة 30°م ولمدة حضن 48 ساعة، وبعدها عُرضت للنبذ المركزي على سرعة 4000 xg لمدة 20 دقيقة على 4°م وذلك لأزالة الخلايا البكتيرية ورشحت عبر مرشحات مايكروبية ذات مسامية 0.22 مايكرومتر.

تم قياس امتصاصية الراشح المحتوي على البكتريوسين على طول موجي 600 نانومتر الذي اتخذ دليلا على كمية البكتريوسين المنتج (24).

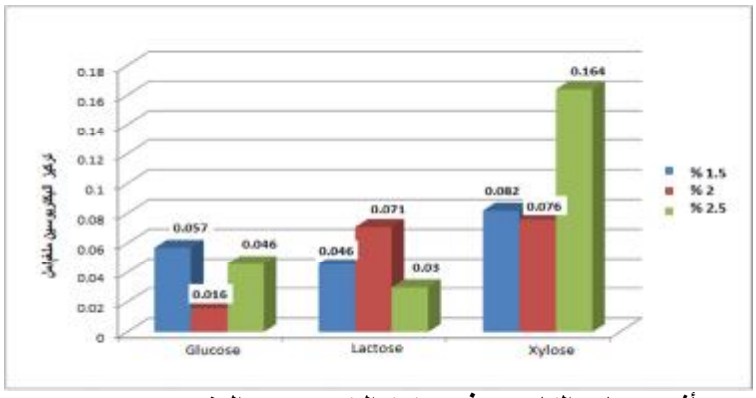
5- تأثير درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني الابتدائي ومدة الحضن في الانتاج: حُضر وسط MRS السائل مع تثبيت نسب المكونات الاخرى التي اعطت افضل انتاج للبكتريوسين وتم تلقيحها بحجم اللقاح الامثل لكل عزلة لأنتاج البكتريوسين.

حيث استخدم لكل عزلة بكتيرية 18 دورق يحتوي على وسط MRS السائل وعُدلت ارقامها الهيدروجينية وبأستخدام ثلاث ارقام هيدروجينية ابتدائية (5، 6.5، 8) وعقمت 5 دقائق بالمؤصدة بدرجة حرارة121°م ولقحت الدوارق بنسبة لقاح 1%، ثم حضنت الدوارق بأستخدام درجات الحرارة (25، 30، 37)°م وبمدتي حضن هي (24، 48) ساعة . وبعدها عُرضت للنبذ المركزي على سرعة 4000 xg لمدة 20 دقيقة على 4°م وذلك لأزالة الخلايا البكتيرية ورشحت عبر مرشحات مايكروبية ذات مسامية 0.22 مايكرومتر. تم قياس امتصاصية الراشح المحتوي على البكتريوسين على طول موجي 600 نانومتر الذي اتخذ دليلا على كمية البكتريوسين المنتج (24).

النتائج والمناقشة

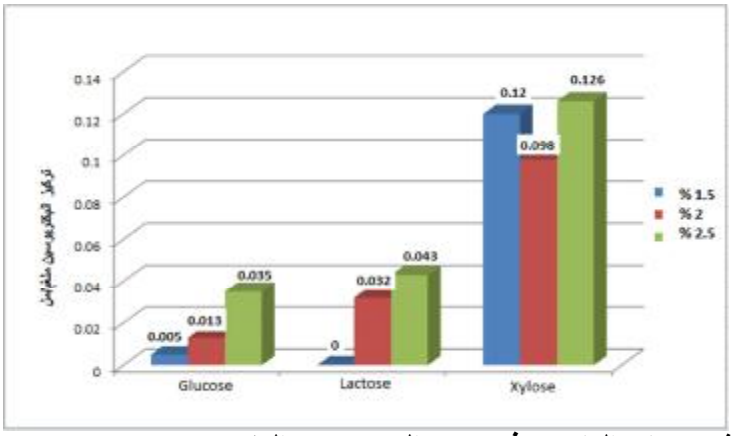
الظروف المثلى لأنتاج البكتريوسين من Pediococcus acidilactici و Weissella paramesenteroides: تم استخدام وسط MRS السائل لدراسة الظروف المثلى للأنتاج واكد (25) ان اعلى انتاجية للبكتريوسين تكون في المزرعة السائلة، كما اكد (26) الى ان وسط MRS السائل افضل وسط لأنتاج البكتريوسين.

1- تأثير مصادر الكاربون: يلاحظ من الشكل (1) الذي يبين تأثير مصادر للكاربون، الكلوكوز واللاكتوز والزايلوز في انتاج البكتريوسين من *P. acidilactici* وبأستخدام وسط MRS السائل في درجة حرارة حضن 30°م لمدة 48 ساعة، وان افضل مصدر للكاربون هو الزايلوز وبنسبة 2.5% حيث بلغ تركيز البكتريوسين 0.164 ملغم/ مل مقارنة بمصادر الكاربون الاخرى الكلوكوز واللاكتوز.



شكل (1) تأثير مصادر الكاربون في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici*

اما بالنسبة للبكتريوسين المنتج من *W. paramesenteroides* فيلاحظ من الشكل (2) ارتفاع واضح في تركيز البكتريوسين بأستخدام مصدر الكاربون الزايلوز وبنسبة 2.5% حيث بلغ تركيزه 0.126 ملغم/مل مقارنة بالأنخفاض الكبير في تركيز البكتريوسين بأستخدام الكلوكوز واللاكتوز حيث لم ينتج عند استخدام لاكتوز 1.5%.

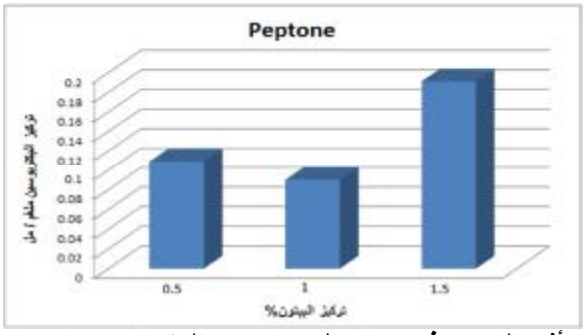


شكل(2) تأثير مصادر الكاربون في تركيز البكتريوسين المنتج من *W.paramesenteroides*

وبينت النتائج ان افضل مصدر كاربوني لأنتاج البكتريوسين من *P. acidilactici* و *W. paramesenteroides* هو الزايلوز 2.5% وهذه النتائج تناقض ما جاء في (27)، وهذا قد يعود الى اختلاف اجناس البكتريا المستخدمة.

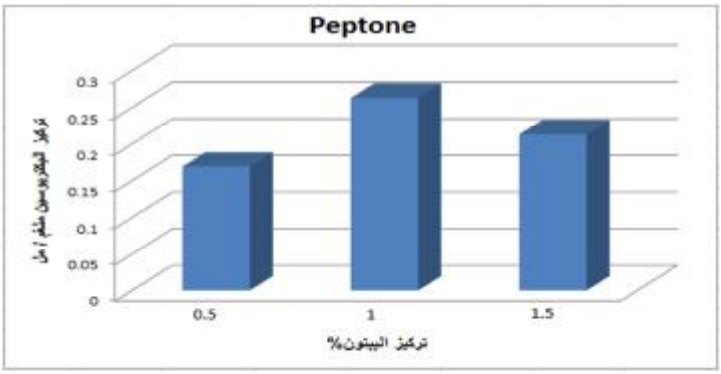
وتتباين الدراسات التي تشير الى افضلية مصادر الكاربون في انتاج البكتريوسينات من LAB فقد لاحظ (10) ان الكلوكوز بتركيز (36.3 g/l) هو افضل مصدر لأنتاج البكتريوسين. اوضح (11) ان البكتريوسين المنتج من *Lactobacillus* sp. يصل الى اعلى تركيز له عندما يكون تركيز الدكستروز (14.9 g/l).

2- تأثير مصادر النتروجين: استخدمت مصادر النتروجين الاربعة المكونة للوسط بتراكيز مختلفة للوصول الى الانتاج الامثل، يلاحظ من الشكل (3) الذي يمثل تأثير تراكيز مختلفة من الببتون في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici* حيث وجد ان افضل تركيز هو 0.191 ملغم/مل بأستخدام نسبة ببتون 1.5%.



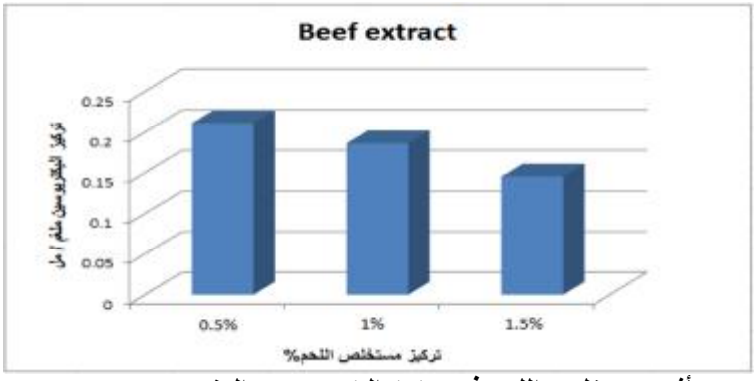
شكل (3) تأثير الببتون في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici*

اما بالنسبة للبكتريوسين المنتج من *W. paramesenteroides* فيلاحظ من الشكل (4) تأثير المصدر النتروجيني الببتون في تركيز البكتريوسين وان اعلى تركيز له هو 0.263 ملغم/مل بأستخدام ببتون بنسبة 1%.



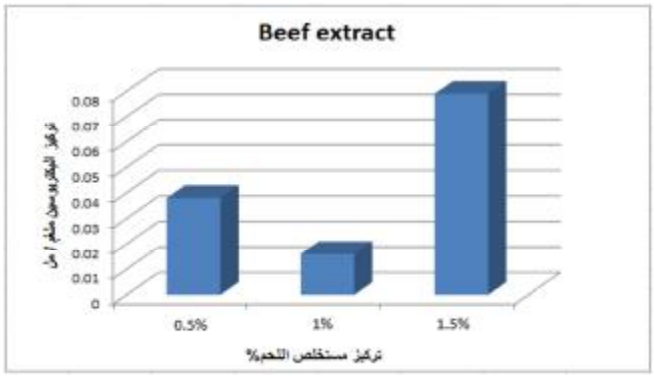
شكل (4) تأثير الببتون في تركيز البكتريوسين من *W. paramesenteroides*

اما المصدر النتروجيني مستخلص اللحم فيلاحظ من الشكل (5) الذي يمثل تأثير مستخلص اللحم في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici* حيث وجد ان اعلى تركيز هو 0.211 ملغم/مل بأستخدام نسبة مستخلص اللحم 0.5%.



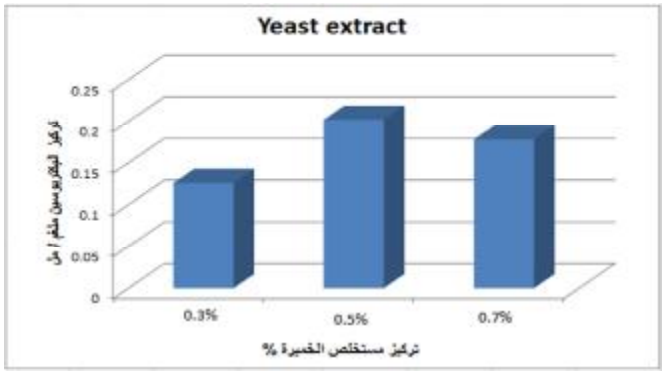
شكل (5) تأثير مستخلص اللحم في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici*

ويلاحظ من الشكل (6) تأثير مستخلص اللحم في انتاج البكتريوسين من *W. paramesenteroides* فأعطى اعلى تركيز (0.079) ملغم/مل بأستخدام مستخلص لحم 1.5%.



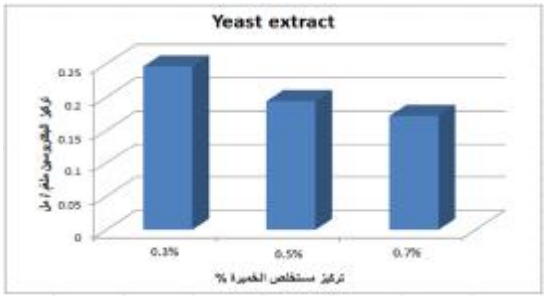
شكل (6) تأثير مستخلص اللحم في تركيز البكتريوسين المنتج من *W. paramesenteroides*

وعند استخدام المصدر النتروجيني مستخلص الخميرة فيلاحظ من الشكل (7) تأثير مستخلص الخميرة في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici* حيث ان افضل تركيز للبكتريوسين هو 0.202 ملغم/مل بأستخدام مستخلص خميرة بنسبة 0.5%.



شكل (7) تأثير مستخلص الخميرة في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici*

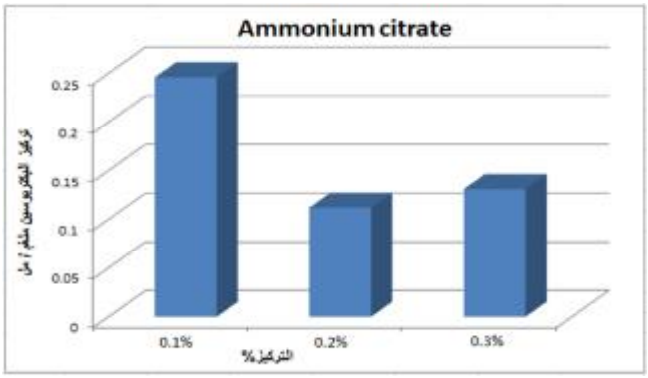
كما يلاحظ من الشكل (8) تراكيز مختلفة من مستخلص الخميرة وتأثيرها في تركيز البكتريوسين المنتج من *W. paramesenteroides* حيث وجد ان افضل تركيز للبكتريوسين هو 0.246 ملغم/مل بأستخدام مستخلص خميرة 0.3%.



شكل(8) تأثير مستخلص الخميرة في تركيز البكتريوسين المنتج من*W. Paramesenteroides*

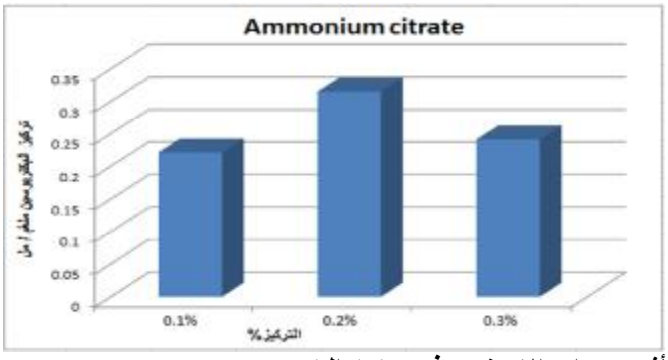
أستخدم (10، 15) مستخلص الخميرة كمصدر نتروجيني عضوي لأنتاج البكتريوسين. واشار (28) الى ان اضافة مستخلص الخميرة تزيد من انتاجية البكتريوسين. وايضا بين (8) ان بكتريا *L.plantarum* المنتجة للبكتريوسين تحتاج مستخلص اللحم ومستخلص الخميرة والببتون للنمو.

يبين الشكل (9) تأثير تراكيز مختلفة من سترات الامونيوم في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici* وسجل اعلى تركيز بمقدار 0.246 ملغم/مل عند تركيز 0.1% سترات امونيوم.



شكل (9) تأثير سترات الامونيوم في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici*

اما الشكل (10) فيوضح تركيز سترات الامونيوم المستخدمة لأنتاج البكتريوسين من *W. paramesenteroides* وان اعلى تركيز للبكتريوسين هو 0.315 ملغم/مل وذلك بأستخدام 0.2% سترات الامونيوم.



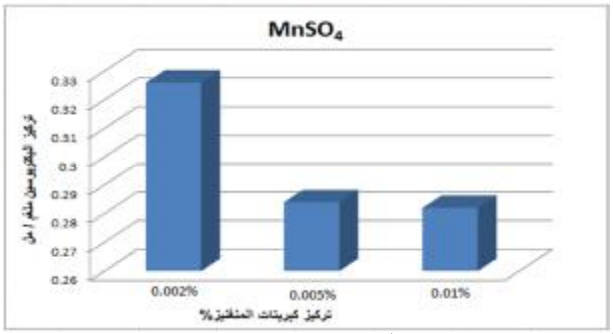
شكل (10) تأثير سترات الامونيوم في تركيز البكتريوسين من *W. paramesenteroides*

واستخدم (8) سترات الامونيوم فوجد انه لم يكن لها اي تأثير في انتاج البكتريوسين. وكذلك اشار (11) الى ان التركيز الامثل المستخدم من سترات الامونيوم لأنتاج البكتريوسين من *Lactobacillus* sp. هو (3 g/l).

ومن ذلك يتبين انه اظهرت النتائج الاختلاف الكبير في التراكيز المثلى للمصادر النتروجينية المستخدمة بين العزلتين وربما يعود هذا التباين الى الاختلاف في النوع البكتيري وبالتالي تباين الظروف المزرعية الملائمة للنمو والانتاج.

3- تأثير الاملاح في الانتاج: تم استخدام ثلاث انواع من الاملاح المختلفة كبريتات المنغنيز وفوسفات ثنائي البوتاسيوم الحامضي وكبريتات المغنيسيوم وبنسب متباينة من اجل الحصول على افضل انتاج للبكتريوسين المنتج من *P. acidilactici* و *W. paramesenteroides*.

اذ يلاحظ من الشكل (11) الذي يبين التراكيز المختلفة من كبريتات المنغنيز في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici* فتم ملاحظة ارتفاع تركيز البكتريوسين الى 0.326 ملغم/مل وبأستخدام كبريتات المنغنيز 0.002%.

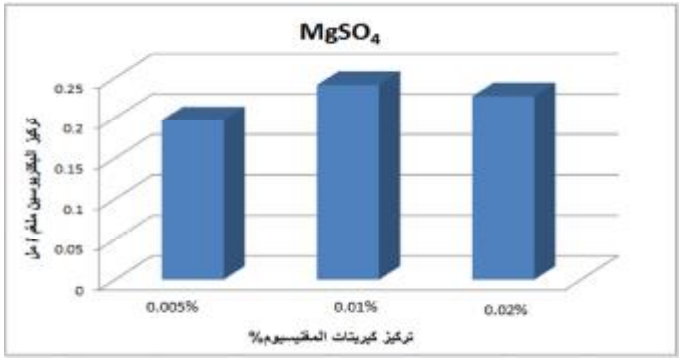


شكل (11) تأثير كبريتات المنغنيز في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici*

اما من الشكل (12) فيلاحظ ان تركيز البكتريوسين المنتج من قبل*W. paramesenteroides* وصل الى 0.183 ملغم/مل بأستخدام كبريتات المنغنيز 0.01%.

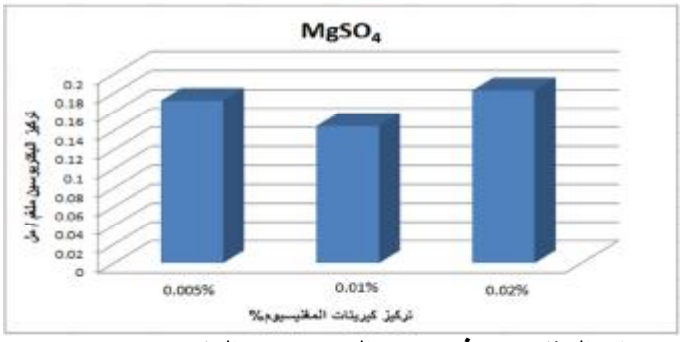
شكل (12) تأثير كبريتات المنغنيز في تركيز البكتريوسين المنتج من *W. paramesenteroides*

أما استخدام كبريتات المغنيسيوم الموضح تأثيره في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici* فنلاحظ من الشكل (13) ان نسبة 0.01% من $MgSO_4$ اعطى افضل تركيز للبكتريوسين إذ بلغ 0.241 ملغم/مل.



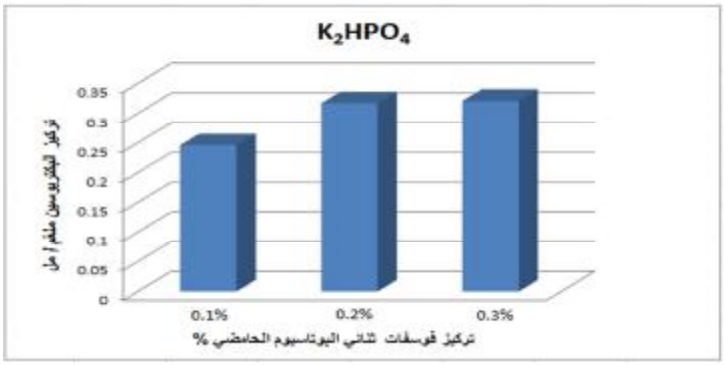
شكل (13) تأثير كبريتات المغنيسيوم في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici*

اما تأثير النسب المتباينة من كبريتات المغنيسيوم في تركيز البكتريوسين المنتج من *W. paramesenteroides* في الشكل (14) فيلاحظ ان افضل تركيز للبكتريوسين هو 0.183% بأستخدام نسبة 0.02% من $MgSO_4$، فلوحظ ان البكتريوسين المنتج من *W. paramesenteroides* تساوت كمية انتاجه بأستخدام الملحين $MgSO_4$ و $MnSO_4$.



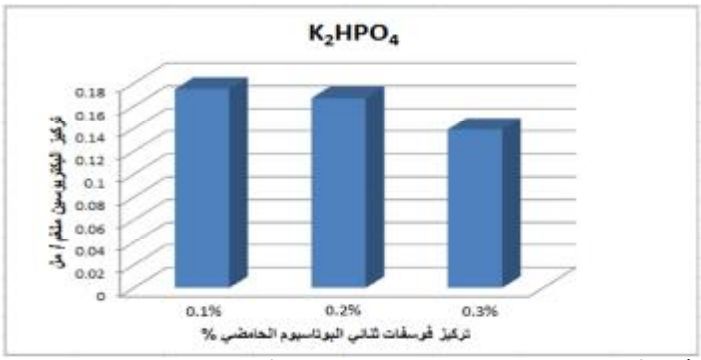
شكل (14) تأثير كبريتات المغنيسيوم في تركيز البكتريوسين المنتج من *W. paramesenteroides*

أما بالنسبة لفوسفات ثنائي البوتاسيوم الحامضي، لوحظ تأثيره في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici* في الشكل (15) فأنتج اعلى تركيز للبكتريوسين 0.321 ملغم/مل عند نسبة 0.3% K_2HPO_4 وتركيز 0.317 ملغم/مل للبكتريوسين عند نسبة 0.2% إذ كان الفارق ضئيلا.



شكل (15) تأثير فوسفات ثنائي البوتاسيوم الحامضي في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici*

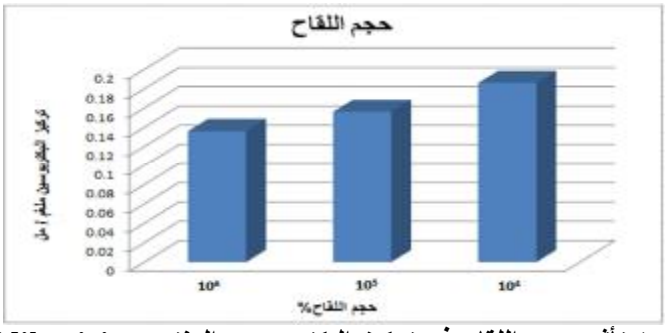
اما بالنسبة لتأثير نفس الملح فوسفات ثنائي البوتاسيوم الحامضي في تركيز البكتريوسين المنتج من *W. paramesenteroides* مبين في الشكل (16) فأن افضل تركيز له هو 0.175 ملغم/مل بأستخدام 0.1% من K_2HPO_4.



شكل (16) تأثير فوسفات ثنائي البوتاسيوم الحامضي في تركيز البكتريوسين المنتج من *W. paramesenteroides*

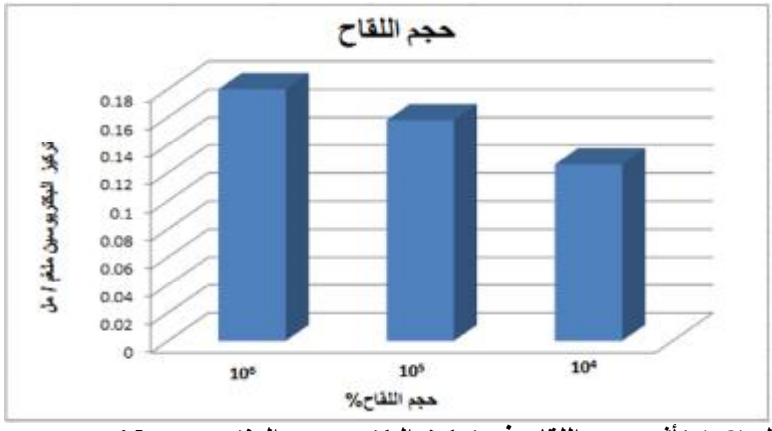
تناقضت النتائج مع ما ذكره (8) الذي استخدم كبريتات المغنسيوم وكبريتات المنغنيز و فوسفات ثنائي البوتاسيوم الحامضي وتوصل الى انه لم يكن لها اي تأثير على انتاج البكتريوسين واستنتج الى ان الاختلاف في الكميات المنتجة من البكتريوسين يعتمد على التباين في تركيز العناصر المكونة للوسط ، واستخدم (15) كبريتات المغنيسيوم وكذلك NaCl و K_2HPO_4 لأنتاج البكتريوسين.

4- تأثير حجم اللقاح: يوضح الشكل (17) تأثير ثلاثة احجام من اللقاح في انتاج البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici* وهي (2.7×10^4، 2.7×10^5، 2.7×10^6) و.م.م وذلك بأستخدام MRS السائل في درجة حرارة حضن 30°م ومدة حضن 24 ساعة ويلاحظ من الشكل ان افضل حجم لقاح هو (2.7×10^4) و.م.م إذ بلغ التركيز 0.186 ملغم/مل.



شكل (17) تأثير حجم اللقاح في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici*

كما يلاحظ في الشكل (18) تأثير حجم اللقاح في انتاج البكتريوسين المنتج من *W. paramesenteroides* حيث تبين ان افضل تركيز بلغ 0.108 ملغم/مل في حجم لقاح مضاف (3.03×10^6) و.م.م.

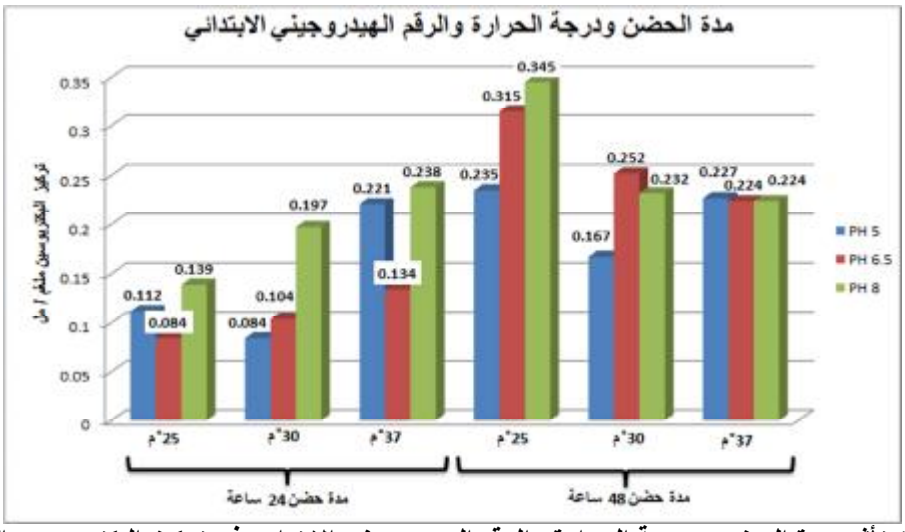


شكل (18) تأثير حجم اللقاح في تركيز البكتريوسين المنتج من *W. paramesenteroides*

واستعمل (23) خلايا من LAB بتركيز (10^7-10^8) و.م.م في الوسط. ولقد اوضح (22) ان عدد خلايا الكتلة الحيوية المستخدمة لانتاج البكتريوسين من بكتريا *L. mesenteroides* هو8×10^8 و.م.م.

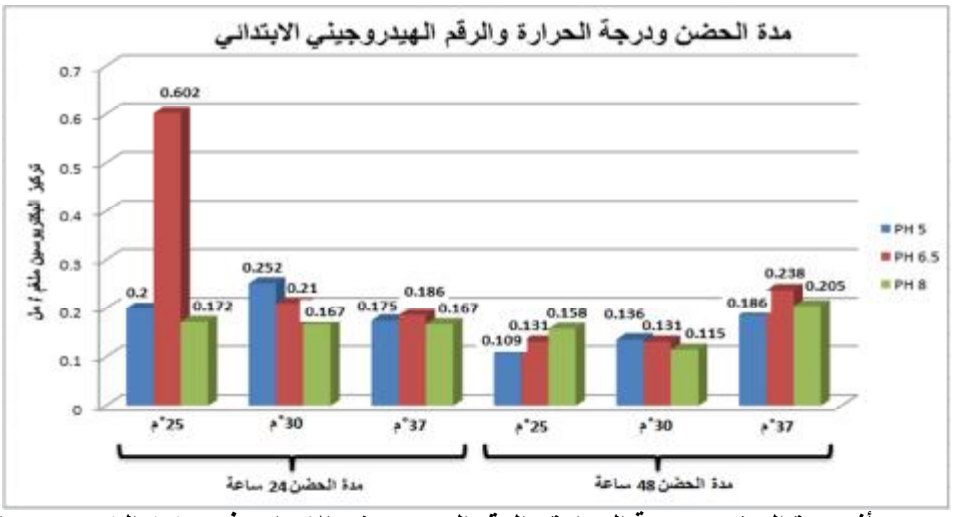
5- تأثير مدة الحضن ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني الابتدائي في الانتاج: يلاحظ من الشكل (19) دراسة تأثير مدة الحضن 24، 48 ساعة في ثلاث درجات حرارة (25، 30، 37)°م وبأستخدام ثلاث ارقام هيدروجينية ابتدائية (5، 6.5، 8) في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici* وذلك في وسط MRS السائل.

يلاحظ من الشكل ان اعلى تركيز للبكتريوسين هو 0.345 ملغم/مل في مدة حضن 48 ساعة وفي درجة حرارة 25°م وعند رقم هيدروجيني ابتدائي 8.



شكل (19) تأثير مدة الحضن ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني الابتدائي في تركيز البكتريوسين المنتج من *P. acidilactici*

كما يلاحظ من الشكل (20) حصول ارتفاع كبير في تركيز البكتريوسين المنتج من *W. paramesenteroides* حيث وصل الى 0.602 ملغم/مل في ظروف حضن 24 ساعة ودرجة حرارة 25°م ورقم هيدروجيني ابتدائي 6.5.



شكل (20) تأثير مدة الحضن ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني الابتدائي في تركيز البكتريوسين المنتج من *W. paramesenteroides*

اتفقت نتائج الحرارة المثلى لأنتاج البكتريوسين من *W. paramesenteroides* و *P. acidilactici* مع ما ذكره (9،29) ووجد ايضا (12) ان الحرارة المثلى لأنتاج البكتريوسين تتراوح بين 22-27°م. ولاحظ (27) ان افضل رقم هيدروجيني ابتدائي للأنتاج هو 6، حيث تشابهت هذه النتيجة مع الرقم الهيدروجيني ابتدائي لأنتاج البكتريوسين من *W. paramesenteroides*، وظهرت نتائج درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني الابتدائي للـ *P. acidilactici* و *W. paramesenteroides* مقاربة لما حصل عليه (30) حيث بين ان الحرارة المثلى هي 24°م والرقم الهيدروجيني الابتدائي الافضل بين 5-8. وتوصل (13) الى ان افضل فعالية للبكتريوسين انتجت بعد مدة تحضين 18-24 ساعة، بينما اكد (8) ان افضل مدة حضن هي 24 ساعة.

بشكل عام ربما يعزى سبب التباين في مدة الحضن الملائمة لأفضل انتاج للبكتريوسين الى ان انتاج البكتريوسين يصل حده الاقصى في وقت متأخر من مرحلة الثبات وبعد مرحلة الثبات يلاحظ انخفاض في نشاط البكتريوسين ربما يعود الى نشاط انزيمات Proteinases الذاتية خارج الخلية. واوضح ايضا (31) في دراسة اجراها حول تأثير اختلاف الظروف المزرعية في انتاج البكتريوسين من البكتريا التي قام بدراستها ان اختلاف الظروف المزرعية يؤثر سلباً او ايجاباً في انتاج البكتريوسين وان اضافة بعض المواد قد تؤثر سلباً على انتاج البكتريوسين.

المصادر

1- Leroy, F.; De Vuyst, L. 2000. Sakacins; In: Naidu, N.; Eds. Natural Food Antimicrobial Systems., CRC Press, Boca Raton, USA. ,589-610.
2- Verluyten, J.; Messens, W. and De Vuyst, L. 2004. Sodium chloride reduces production of curvacin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* strain LTH 1174, originating from fermented sausage. Applied and Environmental Microbiology. ,70: 2271–2278.
3- Van den Berghe, E.; Skourtas, G.; Tsakalidou, E. and De Vuyst, L. 2006. *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 produces the lantibiotic, macedocin, at temperature and pH conditions that prevail during cheese manufacture. Int. J. Food Microbiol. ,107: 138–144.
4- Todorov, S.D.; Dicks, L.M.T. 2004. Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31 Enz. Microbiol. technol. ,36: 318-326.
5- Furtado, D.N.; Todorov, S.D.; Chiarini, E.; Destro, M.T.; Landgraf, M.and Gombosy de Melo Franco, B.D. 2009. Goat milk and cheese may be agood source for antilisterial bacteriocin-producing lactic acid bacteria .J .Biotechnol .,775-778.
6- Bhat, K.M.; Maheshwari, R. 1987. Sporotrichum thermophile Growth, Cellulose Degradation, and Cellulase Activity. Appl. Enviro. Microbio. ,53(9): 2175-2182.
7- Akinyosoye, F.A.; Arotupin, D.J. and Akinyanju, J.A. 1995. Cellulolytic activity at a fresh isolate of *Aspergillus niger* from Sawdust. Bioscience Research Communications. ,7(1): 25-29.
8- Ogunbanwo, S.T.; Sanni, A.I. and Onilude, A.A. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. African Journal of Biotechnolog. , 2(8): 219–227.
9- Drosinos, E.H.; Mataragas, M.; Xiraphi, N.; Moschonas, G.; Gaitis, F. and Metaxopoulos, J. 2005. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. Meat Science. ,69(2): 307-317.
10- Han, B.; Yu, Z.; Liu, B.; Ma, Q. and Zhang, R. 2011. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* YJG, isolated from the mucosa of the gut of healthy chickens. African Journal of Microbiology. ,5(10): 1147-1155.
11- Selvaraj, R.; Bharathiraja, B.; Praveenkumar, R.; Palani, S. and Thyagarajan, R. 2012. Optimization of bacteriocin production by Lactobacillus using response surface Methodology. International Journal of Bioprocess Technology. ,1(1): 1-9.
12- Juodeikiene, G.; Basinskiene, L.; Bartkiene, E. and Matusevicius, P. 2012. Mycotoxin decontamination aspects in food, feed and renewable using fermentation processes, in Agricultural and Biological Sciences–Structure and Function of Food Engenieering. Eissa, A.A.; Eds. ,1171-204.

13- مجيد، معزز عبد الرضا واحمد، موفق محمود. 2013. دراسة بعض العوامل المؤثرة في نمو بكتريا حامض اللاكتيك وانتاج البكتريوسينات. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية. عدد خاص بوقائع المؤتمر العلمي الاول لقسم علوم الاغذية.
14- ساجدي، عادل جورج والباقر، علاء يحيى. 1987. المايكروبايولوجي الصناعي (الجزء الأول). أساسيات التخمرات الصناعية. مطبعة جامعة البصرة.
15- Upendra, R.S.; khandelwal, p.; gana, k. 2016. Bacteriocin Production from Indigenous Strains of Lactic Acid Bacteria Isolated from Selected Fermented Food Sources, International Journal of Pharma Research and Health Sciences,volume. ,4(1).
16- Casla, D.; Requena, T. and Gomez, R. 1996. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and arti-sanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105. Journal of Applied Bacteriology, 81: 35-41.
17- Balasubramanyam, B.V.; Varadaraji, M.C. 1998. Cultural Conditions for the production of bacteriocin by a native isolate of *Lactobacillus delbruekii ssp. bulgaricus* CFR 2028 in milk medium. J. of Applied Microbiology. ,84: 97-102.
18- Gilbreth, S.E.; Somkuti, G.A. 2005. Thermophilin 110: A bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* ST110. Current Microbiology. ,51: 175-182.
19- Mahmood, N.N.; Baqir, A.W. 2000. Study of the inhibitory effect of *Lactobacillus* on some food pathogenic bacteria. AL-mustanisiriya. J. Sci. ,11(1):1.
20- نجيب، ليث مصلح وتركي، احمد محمد والحديثي، رأفت حمدي. 2007. عزل البكتريوسن من عزلات بكتيرية منتخبة و دراسة طيفها التثبيطي ضد بعض انواع البكتيريا المرضية. مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة. مجلد (1). العدد (2).
21- Noordiana N.; Fatimah, A.B. and Mun, A.S. 2013. Antibacterial agents produced by lactic acid bacteria isolated from Threadfin Salmon and Grass Shrimp. International Food Research Journal., 20(1): 117-124.
22- Daba, H.; Pandian, S.; Gosselin, J.F.; Simard, R.E.; Hunag, J. and Lacroix, C. 1991. Detection and Activity of a Bacteriocin Produced by *Leuconostoc mesenteroides*. Applied and Environmental Microbiology. ,57(12): 3450-3455.
23- Moracanin, S.V.; Turubatovic, L.; Skrinjar, M. and Obradovic, D. 2013. Antilisterial Activity of Bacteriocin Isolated from Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides IMAU:10231 in the Production of Sremska Sausages: Lactic Acid Bacteria Isolation, Bacteriocin Identification and Meat Application Experiments. Antilisterial Activity of Bacteriocin, Food Technol. Biotechnol. ,51 (2): 247–256.
24- Mahdy, S.A.; Kalaichelvan, P.T. 2013. Isolation and Characterization of Nisin-Like Peptide Produced by Lactococcuslactis Isolated from Indian Curd. Eng. and Tech. Journal. ,31(3).
25- Tagg, J.R.; Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria, Bacteriol. Rev. ,40: 722-756.
26- Karthikeyan, V.; Santhosh, S.W. 2009. Study of Bacteriocin as a Food Preservative and the *L .acidophilus* Strain as Probiotic. Department of Biotechnology, School of Bioengineering, SRM University, Kattankulathur-603203, Tamilnadu, India. Pakista Journal of Nutrition. ,8(4): 335-340.
27- Zendo, T.; Eungruttanagorn, N.; Fujioka, S.; Tashiro, Y.; Nomura, K.; Sera, Y.; Kobayashi, G.; Nakayama, J.; Ishizaki, A. and Sonomoto, K. 2005. Identification

and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. Journal of Applied Microbiology. ,99: 1181–1190.

28- Riley, M.A.; Goldstone, C.M.; Wertz, J.E. and Gordon, D. 2003. A phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare. J. Evol. Biol. ,16: 690-697.

29- Malheiros, P.S.; Anna, V.S.; Todorov, S.D. and Franco, B.D. 2015. Optimization of growth and bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a. Brazilian J. Microbiol., 46(1): 825-834.

30- Soumya, T.V.; John, R. and Jose, S. 2012. Characterization of Bacteriocin Produced by Lactobacillus SP and Optimization of Cultural Conditions. Int. J. Sci. Res. Pub., 2(12): 2250-3153.

31- Sarika, A.R.; Lipton, A.P. and Aishwarya, M.S. 2010. Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under Different Culture Conditions. J. Food Science and Technology. ,2(5): 291-297.