Mesopotamia J. of Agric. ISSN: 2224-9796 (Online) مـجـلـة زراعـــة الـــرافديـــن
Vol. (41) No. (1) 2013 ISSN: 1815-316 X (Print) المجلد (41) العدد (1) 2013

تأثير بعض العوامل في إنتاج المانيتول من بكتريا *Lactobacillus brevis*

وليد أحمد محمود حامد صالح محمد عالية شفيق كامل
قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل
E-mail:waleedahmed53@yahoo.com

الخلاصة

عزلت سلالة محلية من بكتريا *Lactobacillus brevis* من نموذج للمخللات التالفة وتم إكثار البكتريا في وسط (Bioconversion medium, MRS) السائل تميزت السلالة بالفعالية العالية لإنزيم المانيتول ديهايدروجينيز. استخدمت الخلايا الحرة والخلايا المقيدة في هلام ألجينات الكالسيوم لإنتاج المانيتول في وسط التحول الحيوي. وصل أعلى إنتاج بعد أربعة أيام من الحضن بدرجة حرارة 37ْم وبتركيز خلايا قدره 2×10^6 خلية/مل. أدى استخدام الخلايا مرة ثانية إلى انخفاض بسيط في قدرتها على الإنتاج وكان التأثير أقل في الخلايا المقيدة. أدت زيادة تركيز الفركتوز إلى ارتفاع ملحوظ في الإنتاج بينما لم يؤثر ذلك لدى استخدام محلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ كوسط للتحول. استخدمت الطريقة المستمرة في عمود زجاجي لإنتاج المانيتول من الخلايا المقيدة ولوحظ وجود علاقة عكسية بين سرعة سريان محلول الفركتوز في العمود وحاصل المانيتول ولكن كمية الحاصل المنتج في وحدة الزمن كانت أكبر في السرعات العالية، لذلك يفضل استخدام سرعات سريان عالية مع إعادة التدوير أكثر من مرة للوصول إلى درجة التحول المطلوبة.

كلمات دالة: مانيتول، مانيتول ديهايدروجينيز، *Lactobacillus brevis*.

تاريخ تسلم البحث 2011/10/17 وقبوله 2012/2/13

المقدمة

في السنوات الأخيرة ازداد الطلب العالمي على الكحولات السكرية كثيراً بسبب الميزات التي تتمتع بها والتي تفيد في حل الكثير من المشكلات التغذوية والصحية فهي تستخدم كمواد محلية في الأغذية لأنها ذات سعرات حرارية منخفضة بالمقارنة مع السكريات الأخرى وهذه الأغذية تصلح للأشخاص الذي يعانون من السمنة فضلاً عن إمكانية استخدامها في المنتجات الغذائية لمرضى السكري لأنها تتأيض بصورة جزئية في الجسم و عدم حاجتها للإنسيولين. يعد المانيتول من الكحولات السكرية المهمة، فبالإضافة إلى استخداماته السابقة فهو يعد من المركبات الدوائية المهمة (Yun و Kim، 1998؛ Korakli وآخرون، 2000) كما يستخدم لتقليل الاستسقاء الخلوي وزيادة إفراز الكلي (Soetaert وآخرون، 1999). وفي المجال الصناعي يستخدم المانيتول في إنتاج الإستر المتعدد (polyester) والإيثر المتعدد (polyether) والتي تعد بدورها مواداً أولية لإنتاج البلاستيك الرغوي (Foamed plastic) (Ladero وآخرون، 2007).

تستخدم بضع طرائق في إنتاج المانيتول منها طريقة الهدرجة الكيميائية والتي تعاني من وجود بعض الصعوبات مثل الحاجة إلى استخدام ضغط وحرارة عاليين لهدرجة خليط الفركتوز والكلوكوز في محلول مائي مع توفر العوامل المساعدة مثل النيكل (Makkee وآخرون، 1985) وتتطلب توفير مواد أولية نقية كالفركتوز والهيدروجين مما يؤدي إلى زيادة تكاليف عمليات الإنتاج، لهذا اتجهت الدراسات في الوقت الحاضر إلى الإنتاج المباشر للكحولات السكرية باستخدام الإنزيمات والأحياء المجهرية مثل البكتريا والخمائر والفطريات الخيطية (Weymarn وآخرون، 2002a). تعد الطرائق المعتمدة على البكتريا أكثر إيجابية في إنتاجها للمانيتول لعدة أسباب منها أن سرعة الإنتاج وان كلاً من الخمائر والفطريات الخيطية لها المقدرة على إنتاج المانيتول ولكن بكميات قليلة علاوة على صعوبة وتعقيد عملية التنقية ولاسيما مع الخمائر لوجود تراكيز عالية من الكليسرول في المزرعة فضلاً عن قابليتهما على استهلاك المانيتول المنتج عند نفاذ السكريات الأولية. لهذه الأسباب تعد البكتريا ولاسيما بكتريا حامض اللاكتيك مختلطة التخمر أكثر كفاءة في إنتاج المانيتول إذ تحول الفركتوز إلى مانيتول مباشرة بفعل إنزيم المانيتول ديهايدروجينيز

البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثالث.

(Mannitol dehydrogenase, MDH). ويتم إنتاج المانيتول من هذه البكتريا لتقليل تكاليف الإنتاج والتنقية والحصول على ناتج أكبر (Soetaert وآخرون، 1990، 1999؛ Weymarn وآخرون، 2002a).

هدف البحث إلى إنتاج سكر المانيتول من بكتريا *Lactobacillus brevis* والمعزولة من المخللات التالفة وذلك بتنمية الخلايا الحرة والخلايا المقيدة على وسط التحول الحيوي (BCM) بطريقة الوجبات فضلاً عن إنتاج المانيتول بالطريقة المستمرة باستخدام الخلايا المقيدة .

مواد البحث وطرائقه

عزل و تنمية بكتريا *Lactobacillus brevis*: تم الحصول على بعض العزلات من بكتريا حامض اللاكتيك مختلطة التخمر من أحد نماذج المخللات التالفة وتم إكثار الخلايا في وسط MRS السائل والمذكور في Harrigan و McCance (1976) ثم اختبرت انتاجيتها من إنزيم المانيتول ديهايدروجينيز. أختيرت العزلة الأعلى إنتاجاً وأجريت عليها سلسلة من الإختبارات المورفولوجية والكيموحيوية ووجد أنها من نوع *Lb. brevis*.

إنتاج المانيتول: استخدمت البكتريا في إنتاج المانيتول بتنميتها في وسط التحول الحيوي (Bioconversion medium, BCM) والموصوف من قبل Weymarn (2002) مع بعض التحوير. حضر الوسط من المكونات الآتية: تربتون 0.5 غم، مستخلص الخميرة 0.25 غم، فركتوز 60 غم، كلوكوز 10 غم، فوسفات البوتاسيوم الثنائية 2 غم، كبريتات المغنيسيوم 0.2 غم، كبريتات المنغنيز 0.01 غم. أذيبت المكونات في لتر واحد من الماء المقطر وضبط الأس الهيدروجيني إلى 5 وعقم الوسط ثم لقح بالبكتريا وحضن بدرجة حرارة 37ْم لمدة 3 أيام. تم فصل الخلايا بالنبذ المركزي بسرعة 4000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق واستخدم الراشح في تقدير تركيز المانيتول.

تقدير المانيتول: استخدمت الطريقة المذكورة من قبل Tibbling و Scand (1968). أخذ 50 مايكروليتر من العينة (مستخلص رائق) وأضيف إليه 1 مل من كبريتات الخارصين (87 ملليمولر) و1 مل من هيدروكسيد الباريوم (83 ملليمولر) ومزجت جيداً بعد كل إضافة ونبذت مركزياً بسرعة 4000 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة. نقل 0.3 مل من الراشح الرائق إلى أنبوبة اختبار ذات غطاء زجاجي وأضيف إليها 0.1 مل من محلول بيرأيوديت البوتاسيوم (KIO_4) تركيزه 20 ملليمولر مذاب في حامض الكبريتيك (0.5 مولر) ومزجت وتركت لمدة 10 دقائق. أضيف 0.1 مل من محلول أرسينايت الصوديوم (NaA_SO_2) تركيزه 0.2 مولر ثم تركت لمدة 5 دقائق أو أكثر بعد مزجها. أضيف 3 مل من كاشف حامض الكروموتروبيك (Chromotropic acid reagent). سخنت الأنبوبة المفتوحة في حمام مائي بدرجة الغليان لمدة 30 دقيقة ثم أعيد الغطاء بعد دقيقة واحدة من انتهاء المدة. بردت الأنبوبة إلى درجة حرارة الغرفة وسجل الامتصاص الضوئي على طول موجي 570 نانوميتر بعد أن صفر الجهاز بمحلول التصفير (Blank) الذي يتكون من جميع المواد المذكورة أعلاه مع استبدال العينة بالماء المقطر. تم حساب تركيز المانيتول بعمل منحنى قياسي له باستعمال تراكيز 0.1 و 0.2 و 0.3 و 0.4 و 0.5 و 0.6%.

تقدير **فعالية إنزيم المانيتول ديهايدروجينيز:** استخدمت طريقة الكمية لتقدير الفعالية الإنزيمية الموصوفة من قبل الباحثين Martinez وآخرون (1963) والتي إعتمدت على أكسدة المانيتول إلى فركتوز بوجود الإنزيم المذكور وبمساعدة المرافق الإنزيمي β-NAD وفق المعادلة الآتية :

$$\text{D - mannitol} + \beta\text{ - NAD} \underset{\text{dehydrogenase}}{\overset{\text{Mannitol}}{\rightleftharpoons}} \text{D - Fructose} + \beta\text{ - NADH}$$

مزج 1 مل من محلول فوسفات البوتاسيوم الداريء (60 ملليمولر، برقم هيدروجيني 7.6) و 0.2 مل من محلول المانيتول (0.5 مولر) و 1 مل من محلول نيكوتينامايد أدينين ثنائي النيوكليوتيد (β-NAD) (5 ملليمولر) و 0.8 مل من الماء المقطر في أنبوبة اختبار مع ضبط درجة الحرارة على 37ْم. أضيف 0.1 مل من العينة (المحلول الإنزيمي) مع المزج. سجل التغير في الإمتصاص الضوئي على طول موجي 340 نانوميتر خلال خمس دقائق. تم تحضير محلول التصفير (Blank) بنفس الطريقة مع استبدال الإنزيم بالمحلول الدارئ. تم حساب فعالية الإنزيم من المعادلة الآتية:

تركيز الإنزيم (وحدة/ مل) = (الامتصاص الضوئي للعينة – الامتصاص الضوئي للمقارنة) × 3.1 × df × 6.22 × 10.

حيث: 3.1 = الحجم الكلي لمحلول التفاعل. df = ثابت التخفيف. 6.22 = المكافيء الجزيئي لـ β-NAD عند طول موجي 340 نانوميتر. تعرف الوحدة الإنزيمية (Enzyme unit, Eu) بأنها كمية الإنزيم التي تحول مايكرومول واحد من المانتيول إلى الفركتوز في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التفاعل.

تقييد الخلايا البكتيرية: لغرض إنتاج المانيتول من الخلايا المقيدة استخدمت طريقة الحجز في هلام ألجينات الكالسيوم (Calcium alginate gel) الموصوفة من قبل Bickerstaff (1997) بمزج 50 مل من محلول ألجينات الصوديوم المعقم (2%) مع 1 مل من معلق الخلايا البكتيرية المركز. نقل المزيج إلى محقنة طبية (Syringe). تم إنزال قطرات المعلق بهدوء من المحقنة إلى سطح محلول كلوريد الكالسيوم (0.15 مولر) مع التحريك البطيء للمحلول حيث تتصلب القطرات للحصول على حبيبات هلامية كروية متجانسة تحجز بداخلها الخلايا البكتيرية المقيدة. تركت حبيبات الهلام في المحلول مدة ساعة واحدة لغرض زيادة صلابتها ثم جمعت ونقلت إلى دورق يحتوي على ماء مقطر معقم وخزنت في الثلاجة لحين الاستعمال.

إنتاج المانيتول: من الخلايا الحرة والمقيدة بطريقة مزارع الوجبات: تمت دراسة تأثير بعض العوامل المزرعية في إنتاج المانيتول.

تأثير مدة الحضن في إنتاج المانيتول: تم تحضين الخلايا الحرة في وسط التحول الحيوي لمدة 7 أيام مع قياس كمية المانيتول الناتجة يومياً لتحديد أفضل مدة للإنتاج.

تأثير تركيز الخلايا في إنتاج المانيتول: تم حساب عدد الخلايا البكتيرية الحية في مزرعة اللقاح والذي بلغ 3×10^{8} خلية / مل ثم لقحت بها أربعة دوارق حاوية على وسط التحول الحيوي (BCM) بتراكيز 1 و 2 و 3 و 4×10^{6} خلية / مل. أما في حالة الخلايا المقيدة فقد أضيفت حبيبات الخلايا المقيدة لإعطاء التراكيز المذكورة أعلاه من الخلايا البكتيرية. تم الحضن على 37 ْم مدة أربعة أيام تلاها قياس كمية المانيتول المنتج.

تأثير تكرار استخدام الخلايا في إنتاج المانيتول: تمت استخدام الخلايا الحرة والمقيدة مرتين لمعرفة مدى ثبات النشاط الحيوي للخلايا في عملية إنتاج المانيتول.

تأثير تركيز سكر الفركتوز في إنتاج المانيتول: استخدمت تراكيز متتالية من الفركتوز (20 و 30 و 40 و 50 و 75 و 100 غم / لتر) مع 10 غم كلوكوز / لتر من الوسط الغذائي لمعرفة تأثير تركيز الفركتوز في إنتاج المانيتول من قبل الخلايا الحرة.

إنتاج المانيتول من الخلايا المقيدة بالطريقة المستمرة: بعد تحضير حبيبات الخلايا المقيدة تم تعبئتها في عمود زجاجي مزدوج الجدران (1.4 × 19.5 سم) وغسلت بالماء المقطر وتم إمرار محلول الركيزة (6% فركتوز + 1% كلوكوز) بسرعات سريان (Flow rates) تراوحت بين 5 - 30 مل / ساعة مع ضبط درجة الحرارة على 37 ْم حيث تمت دراسة تأثير سرعة السريان على الإنتاج وحسبت مدة بقاء الركيزة (Residence time) في العمود باستخدام العلاقة الآتية:

$$\text{مدة بقاء الركيزة في العمود (ساعة)} = \frac{\text{حجم العمود (مل)}}{\text{سرعة السريان (مل / ساعة)}}$$

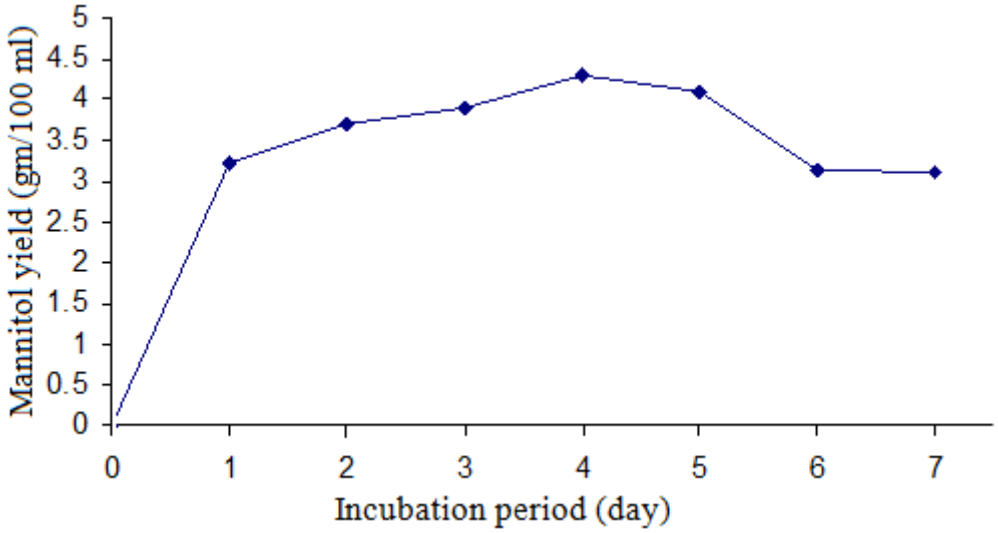
النتائج والمناقشة

بعد تنمية بكتريا *Lb. brevis* في وسط MRS السائل أجريت عملية تكسير الخلايا باستخدام الموجات فوق الصوتية للحصول على المستخلص الخلوي والذي تم فيه قياس فعالية إنزيم المانيتول ديهايدروجينيز حيث بلغت 51.48 وحدة إنزيمية / 100 مل من الوسط الغذائي. ويعد إنتاج هذا الإنزيم من قبل البكتريا مؤشراً جيداً على قدرتها لإنتاج المانيتول لكون هذا الإنزيم هو المسؤول عن عملية اختزال الفركتوز إلى المانيتول. وقد تمت دراسة تأثير بعض العوامل في إنتاج المانيتول من الخلايا الحرة والمقيدة لبكتريا *Lb. brevis* المنماة في وسط التحول الحيوي (BCM) المحتوي على سكري الفركتوز والكلوكوز.

تأثير مدة الحضن في إنتاج المانيتول: يتبين من الشكل (1) ازدياد حاصل المانيتول بزيادة مدة الحضن حتى اليوم الرابع إذ بلغت كمية المانيتول المنتجة 4.3 غم/ 100 مل من الوسط. ويلاحظ أن بكتريا *Lb. brevis* كانت متوسطة السرعة في تحويل سكر الفركتوز وإنتاج المانيتول.

تطابقت النتيجة مع ما قام به Saha و Nakamura (2003) في دراسة مقارنة لتسعة أنواع من بكتريا حامض اللاكتيك من حيث سرعتها في إنتاج المانيتول من سكر الفركتوز فوجدا أن بكتريا *Lb. brevis* كانت بطيئة الإنتاج نسبياً في حين كانت *Lb. intermedius* B-3693 الأسرع إنتاجاً بالمقارنة مع بقية

الأنواع. وقد تباينت المدة اللازمة للوصول إلى أعلى إنتاج كثيراً باختلاف تركيز الفركتوز في الوسط إذ تراوحت بين 15 ساعة باستخدام فركتوز بتركيز 150 غم / لتر إلى 136 ساعة لدى مضاعفة تركيز الفركتوز. وعند إدخال سكر الكلوكوز في مكونات الوسط (100 غم فركتوز + 50 غم كلوكوز) كانت المدة اللازمة للوصول إلى أقصى إنتاج حوالي 20 ساعة. ووجد Soetaert وآخرون (1995) أن إنتاج المانيتول



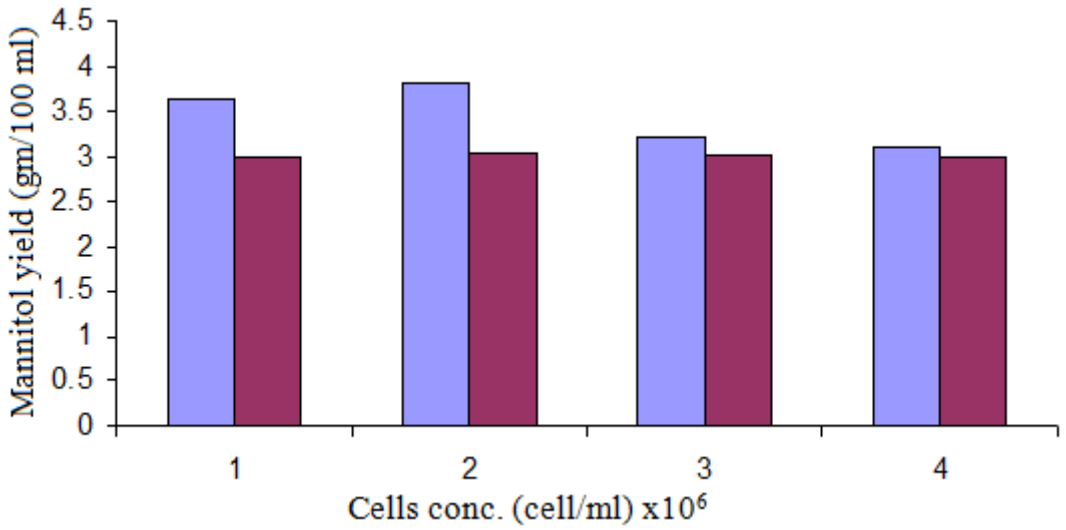
الشكل (1): تأثير مدة الحضن في إنتاج المانيتول بوساطة بكتريا *Lb. brevis*
Fig. (1): Effect of incubation period on mannitol production by *Lb. brevis*.

من بكتريا *Leuoconostoc. mesenteroides* استغرق مدة قدرها 35 ساعة باستخدام وسط يحوي 100غم فركتوز و 50 غم كلوكوز / لتر إذ بلغ ناتج المانيتول 0.6 غم/ غم فركتوز. في حين وجد Yun و Kim (1998) أن بكتريا *Lactobacillus* sp. Y-107 استغرقت 120 ساعة بوجود 100 غم / لتر فركتوز للوصول إلى حاصل مانيتول قدره 0.73 غم/غم فركتوز.

تأثير تركيز الخلايا في إنتاج المانيتول: يتبين من الشكل (2) أن حاصل المانيتول قد ازداد بزيادة تركيز الخلايا في البداية إذ وصل إلى 3.81 غم/ 100 مل عند التركيز الثاني ثم انخفض في التركيزين الثالث والرابع إلى 3.21 و 3.10 غم/100 مل، وعلى التوالي في الخلايا الحرة. وفي حالة الخلايا المقيدة لوحظ أن إنتاج المانيتول ارتفع بزيادة تركيز الخلايا المقيدة أيضاً إذ وصل في التركيز الثاني (2×10^6 خلية /مل) إلى 3.04 غم/ 100 مل في حين انخفض في التركيزين الثالث والرابع قليلاً فوصل إلى 3.01 و 2.99 مل، وعلى التوالي. يستنتج من هذا أن زيادة كثافة الخلايا البكتيرية في الوسط قد أدى إلى تنافسها على استهلاك المكونات الغذائية بدون أن تؤثر كثيراً في إنتاج المانيتول وقد يعود ذلك إلى الاستهلاك السريع للكلوكوز وتكيف الخلايا لاستهلاك الفركتوز بعد فسفرته ثم دخوله دورة الكلايكوليسس (أمبدن مايرهوف) مما أدى إلى

انخفاض إنتاج المانيتول. ذكر Weymarn وآخرون (2002a) أن زيادة تركيز الخلايا البكتيرية لا تؤدي إلى زيادة الإنتاج النوعي للمانيتول (Specific mannitol productivities) فعند زيادة أعداد البكتريا فان إنتاج المانيتول الحجمي ازداد من 8.3 غم / لتر / ساعة إلى 26.2 غم / لتر / ساعة محسوبة على أساس الوزن الجاف للخلايا (Cell dry weight, cdw). ويعود السبب إلى سرعة تحويل سكر الفركتوز إلى المانيتول وتبدو هذه الزيادة وكأنها ناتجة عن زيادة تركيز الخلايا. والاعتقاد السائد لأهمية تأثير التركيز أن الخلايا تستهلك المانيتول الناتج بعد نفاذ السكر في الوسط. وقد ذكر Neves وآخرون (2002) أن بعض الأنواع من البكتريا تقوم باستهلاك المانيتول الناتج عند نفاذ السكر كركيزة في الوسط مثل بكتريا *Lb. plantarum* و*Lb. lactis* MG 1363 وبعض الأنواع التابعة لجنس *Bifidobacteria* وبعض سلالات *Streptococcus mutans* و *E. coli* إذ أنها تتمكن من استخدامه كمصدر للطاقة الأولية للنمو. وذكر Weymarn (2002) أن كل من الأعفان والخمائر يمكن أن تنتج المانيتول ولكن بكميات قليلة لا تصلح

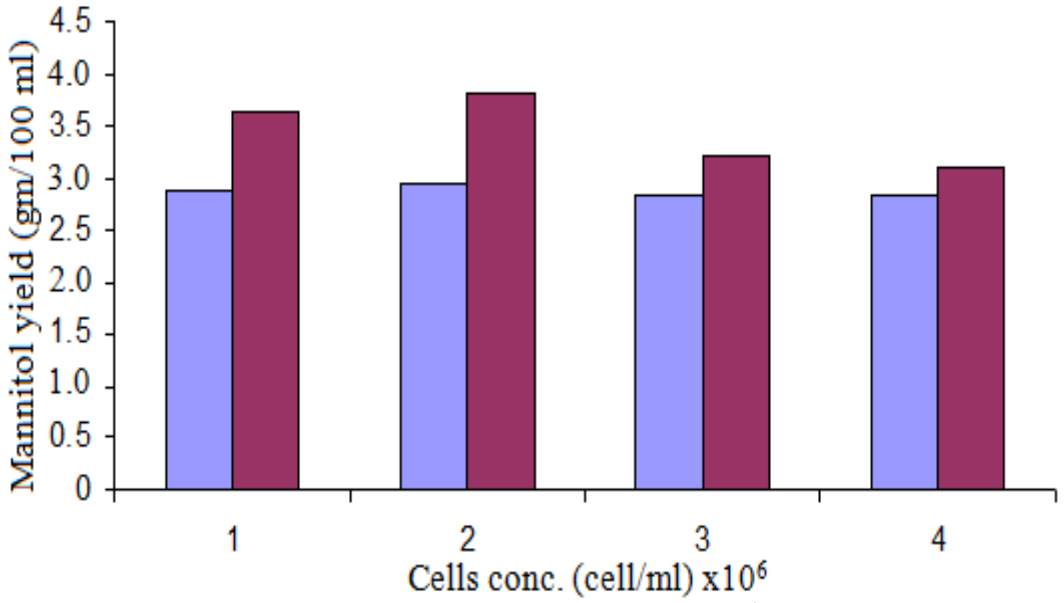
للإنتاج التجاري وأغلب هذه الأحياء المجهرية قادرة على استهلاك المانيتول بسهولة مما يؤدي إلى صعوبة السيطرة على عملية الإنتاج.



الشكل (2): تأثير تركيز خلايا *Lb. brevis* الحرة والمقيدة في إنتاج المانيتول
(□: الخلايا الحرة، ■: الخلايا المقيدة).

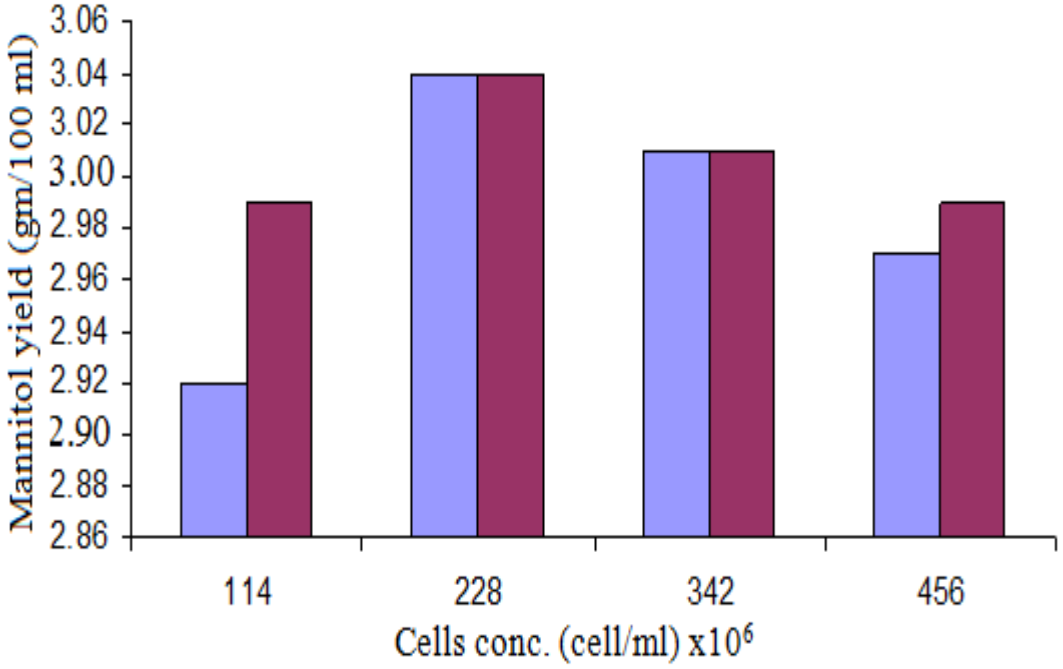
Fig. (2): Effect of free and immobilized *Lb. brevis* cells concentration on mannitol production (□: Free cells, ■: Immobilized cells).

تأثير تكرار استخدام الخلايا في إنتاج المانيتول: تم إعادة استخدام الخلايا مرة ثانية لإنتاج المانيتول، فبعد الانتهاء من عملية الإنتاج للمرة الأولى فصلت الخلايا الحرة والمقيدة بالنبذ المركزي في ظروف معقمة وأعيد استخدامها مرة أخرى في تلقيح وسط جديد. ويتبين من الشكلين (3 و 4) وجود انخفاض بسيط في إنتاجية المانيتول في الدورة الثانية من الإنتاج وفي حالتي الخلايا الحرة والمقيدة. ففي حالة الخلايا الحرة بلغ الإنتاج في الدورة الثانية 2.90 و 2.94 و 2.83 و 2.82 غم/ 100 مل للتراكيز الأربعة المذكورة سابقاً وعلى التوالي، مقارنة بـ 3.63 و 3.81 و 3.21 و 3.10 غم/ 100 مل، وعلى التوالي في الدورة الأولى، أي بانخفاض يعادل 2.25%. أما في حالة الخلايا المقيدة فقد كان إنتاج المانيتول 2.92 و 3.04 و 3.01 و 2.97 غم/ 100 مل، وعلى التوالي في الدورة الثانية مقارنة بـ 2.99 و 3.04 و 3.01 و 2.99 غم/ 100 مل، وعلى التوالي في الدورة الأولى من الإنتاج. قد يعود انخفاض الإنتاج إلى موت بعض الخلايا البكتيرية أو إلى انخفاض فعاليتها فضلاً عن انخفاض فعالية إنزيم المانيتول ديهايدروجينيز الموجود في هذه الخلايا. ومع ذلك فان الانخفاض كان بسيطاً. وتشير النتائج إلى إمكانية إعادة استخدام الخلايا الحرة والمقيدة أكثر من مرة بنجاح، مما يقلل كلفة الإنتاج ولاسيما عند مراعاة توفير الظروف المثلى لفعالية ونشاط الإنزيم المسؤول عن تحويل الفركتوز إلى المانيتول فضلاً عن توفر مادة الركيزة (Substrate) وهي الفركتوز. وقد نجح Weymarn وآخرون (2002b) في إنتاج المانيتول من بكتريا *Leuc. mesenteroides* بعد تكرار 14 دورة تحول باستخدام مفاعل حيوي نوع (Membrane cell-recycle bioreactor, MCRB) إذ بلغ ناتج المانيتول 26.2 غم/ لتر/ ساعة، وحاصل المانيتول 97% وبقي مستوى الإنتاج عالياً في جميع الدورات.



الشكل (3): تأثير تكرار استخدام خلايا *Lb. brevis* الحرة في إنتاج المانيتول
(■: الدورة الأولى، □: الدورة الثانية).

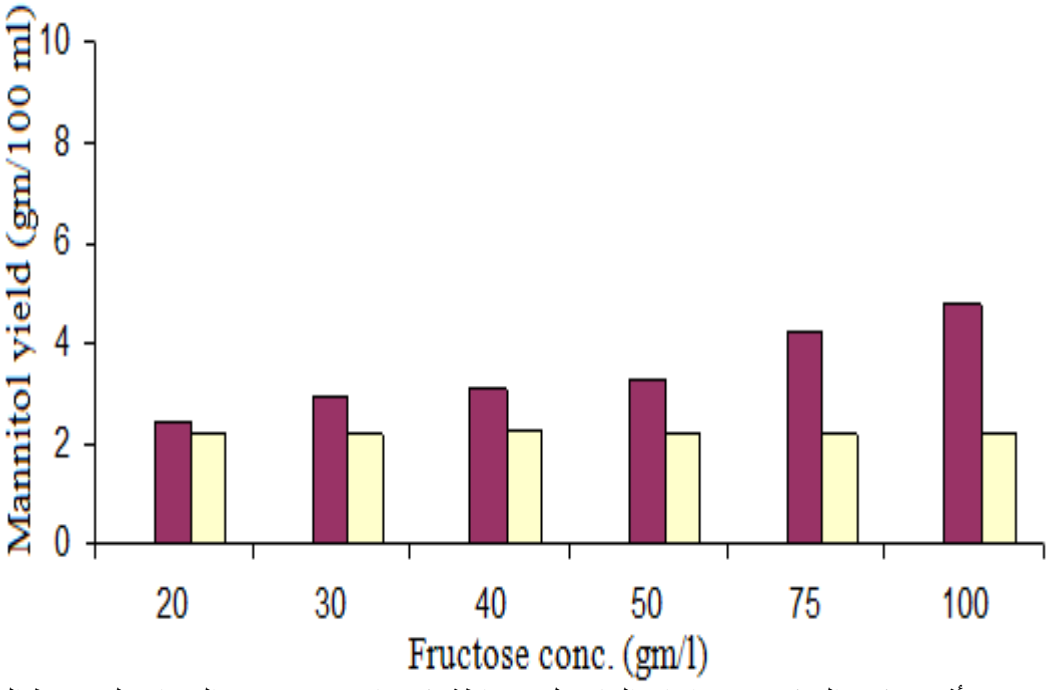
Fig. (3): Effect of the repeated use of free *Lb. brevis* cells on mannitol production (■: First cycle, □: Second cycle).



الشكل (4): تأثير تكرار استخدام خلايا *Lb. brevis* المقيدة في إنتاج المانيتول
(■: الدورة الأولى، □: الدورة الثانية).

Fig. (4): Effect of the repeated use of immobilized *Lb. brevis* cells on mannitol production (■: First cycle, □: Second cycle).

تأثير تركيز سكر الفركتوز في إنتاج المانيتول: لدراسة تأثير تركيز الفركتوز في إنتاج المانيتول أجريت تجربتان: تم في الأولى استخدام وسط التحول الحيوي (BCM) وفي التجربة الثانية استخدم محلول فوسفات البوتاسيوم الداريء (65 ملليمولر). وقد أضيف إلى كل من الوسطين تراكيز متدرجة من الفركتوز وأضيف الكلوكوز في التجربتين بتركيز 10 غم / لتر. ويلاحظ من الشكل (5) أن إنتاج المانيتول قد ازداد بزيادة تركيز سكر الفركتوز في الوسط إذ بلغ حاصل المانيتول 7.5 و 8.4 و 9.6 و 10.2 و 12.7 و 14.3 غم/ لتر باستخدام تراكيز الفركتوز 20 و 30 و 40 و 50 و 75 و 100 غم / لتر، وعلى التوالي في وسط التحول الحيوي. أما عند استخدام محلول فوسفات البوتاسيوم الداريء فلوحظ انخفاض حاصل المانيتول إذ بلغ 6.7 غم/ لتر فقط في جميع تراكيز الفركتوز المستخدمة وأن كمية قليلة من سكر الفركتوز قد تحولت إلى المانيتول، ولم تؤثر زيادة التركيز في كمية الناتج، وقد يعود السبب إلى عدم توفر المتطلبات الغذائية للخلايا وإنتاج المرافق الإنزيمي (NADH) الضروري لإنزيم المانيتول ديهايدروجينيز ليبدي فعاليته في عملية التحول. وقد درس Saha و Nakamura (2003) تأثير إضافة الفركتوز بتراكيز تراوحت بين 150- 300 غم / لتر في إنتاج المانيتول من بكتريا *Lb. intermedius* B-3693فلاحظا ازدياد حاصل المانيتول بزيادة تركيز الفركتوز علاوة على زيادة مدة النمو واستهلاك الفركتوز والتي بلغت 72 ساعة عند تركيز سكر الفركتوز 300 غم / لتر بالمقارنة مع مدة النمو البالغة 16 ساعة عند التركيز 250 غم / لتر، ولاحظا أن حاصل المانيتول لم يتأثر كثيراً بتركيز الفركتوز لأن البكتريا تقوم بتحويل الفركتوز في المراحل الأولى من النمو ولا تستهلك المانيتول الناتج حتى عند نفاد الفركتوز مع استمرار تركيز نواتج تخمر المانيتول (حامضي اللاكتيك والخليك) لتزداد زيادة ضئيلة باستمرار عملية التخمر للحالات الأربع جميعها. أما Weymarn وآخرون (2002b) فوجدوا أن زيادة تركيز سكر الفركتوز له تأثير سلبي على ناتج المانيتول إذ انخفض الناتج الحجمي عند زيادة تركيز سكر الفركتوز وكذلك انخفض الناتج النوعي للمانيتول.



الشكل (5): تأثير تركيز الفركتوز في إنتاج المانيتول بوساطة بكتريا *Lb. brevis* المنماة على وسط التحول الحيوي (■) ووسط فوسفات البوتاسيوم الدارئ (□).

Fig. (5): Effect of fructose concentration on mannitol production by *Lb. brevis* grown on bioconversion medium (■), and phosphate buffer medium(□).

إنتاج المانيتول من الخلايا المقيدة بالطريقة المستمرة: يبين الجدول (1) العلاقة بين سرعة سريان محلول الركيزة وحاصل المانيتول والذي بلغ 11 و 6.2 و 4.84 و 3.5 و 2.95 و 2.55% بسرعات سريان 5 و 10 و 15 و 20 و 25 و 30 مل/ ساعة، وعلى التوالي. يلاحظ وجود علاقة عكسية بين سرعة السريان وحاصل المانيتول، إذ انخفض الحاصل عند زيادة سرعة السريان ويعود السبب إلى انخفاض مدة بقاء مادة الركيزة في العمود (Residence time) بزيادة السرعة ومن ثم قلة مدة تلامس الركيزة مع الخلايا لتتحول إلى الناتج. أما في السرعات البطيئة فتكون مدة بقاء مادة الركيزة في العمود أطول مما يتيح فرصة كافية لتلامسها مع الخلايا المقيدة ومن ثم تحويل الفركتوز إلى المانيتول.

الجدول (1): تأثير سرعة السريان في كفاءة إنتاج المانتيول من خلايا *Lb. brevis* المقيدة وبالطريقة المستمرة

Table (1): Effect of flow rate on mannitol production efficiency by immobilized *Lb. brevis* cells using continuous process.

حاصل المانيتول (%) Mannitol yield (%)	مدة بقاء الركيزة في العمود (ساعة) Residence time (hour)	سرعة السريان (مل/ساعة) Flow rate (ml/hr)
11.00	6.0	5
6.20	3.0	10
4.84	2.0	15
3.50	1.5	20
2.95	1.2	25
2.55	1.0	30

وعلى الرغم من أن السرعة البطيئة قد أعطت حاصلاً أكبر وكما يبدو ظاهرياً من الجدول. إلا أن كمية الحاصل في وحدة الزمن كانت أكبر في حالة زيادة السرعة، أي أنه يفضل استخدام السرعة العالية مع إعادة التدوير (Recycling) أكثر من مرة للحصول على درجة التحول المطلوبة. وقد نجح Ojamo وآخرون (2000) في استخدام الخلايا المقيدة لبكتريا *Leuc. pseudomesenteroides* بالطريقة المستمرة فحصلوا على ناتج قدره 30 غم/ لتر/ ساعة، ولكن حاصل المانيتول انخفض إلى 8.5% مقارنة مع طريقة الوجبات المغذاة إذ كان ناتج المانيتول 11غم / لتر / ساعة أما حاصل المانيتول فبلغ 94%، وأضيف الفركتوز والكلوكوز بنسبة 1:2 كمواد أولية في هذه الطرق. أما Soetaert وآخرون (1990) فلاحظوا أن تغيير طريقة الإنتاج من الوجبات المغذاة إلى طريقة التقييد كان له تأثير سلبي على حاصل المانيتول إذ انخفض إلى 60% بطريقة التقييد بعد أن كان 94% بطريقة الوجبات المغذاة وعلى الرغم من التحسن الضئيل للناتج الحجمي إذ وصل إلى 8.9 غم/ لتر/ ساعة بطريقة التقييد بعد أن كان 6.3 غم/ لتر/ ساعة بطريقة الوجبات المغذاة.

EFFECT OF SOME FACTORS ON THE PRODUCTION OF MANNITOL FROM *Lactobacillus brevis*

W. A. Mahmood H. S. Mohammed A. S. Kamil
Food Sci. Dept., College of Agriculture. and Forestry, Mosul University, Iraq
waleedahmed53@yahoo.com

ABSTRACT

A strain of *Lactobacillus brevis* was isolated from a spoiled pickle sample and propagated in MRS liquid medium. The strain possessed high mannitol dehydrogenase activity. The free and immobilized cells in calcium alginate gel

beads were used for the production of mannitol using batch culture in bioconversion medium (BCM). The highest mannitol yield was achieved after four days of incubation at 37 ^{o}C using cells concentration of $2x10^{6}$ cells/ml. The reuse of the cells for mannitol production led to a little decrease in their produtibility. The effect was minor with immobilized cells. Mannitol production was proportional to fructose concentration in BCM medium while there was no effect upon using potassium phosphate buffer medium. The continuous mannitol production by immobilized cells was conducted in a glass column. A reverse relationship was noticed between fructose solution flow rate and mannitol yield, but the production rate was higher at higher flow rates. Thus, it is advised to apply fast flow rate with repeated substrate recycling in order to achieve the desired conversion of fructose.
Key words: mannitol, mannitol dehydrogenase, *Lactobacillus brevis*.

Received 17/10/2011 Accepted:13/2/2012

المصادر

Bickerstaff, G. F. (1997). Immobilization of Enzymes and Cells. p. 61-66. Humana Press, Totowa, New Jersey, U.S.A.

Harrigan, W. F.; M. E. McCance (1976). Laboratory Methods In Food And Dairy Microbiology. Academic Press, INC, London.

Korakli, M. ; E. Schwarz; G. Wolf; W. P. Hammes (2000). Production of mannitol by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *Advanced Food Science. 22: 1-4.*

Ladero V.; A. Ramos; A. Wiersma; P. Goffin; A. Schanck; M. Kleerebezem; J. Hugenholtz; E. Smid; P. Hols (2007). High-level production of the low-calorie sugar sorbitol by *Lactobacillus plantarum* through metabolic engineering. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (6): 1864-1872.

Makkee, M.; A. P. Kieboom; H-von Bekkum (1985). Production methods of D-mannitol. *Starch. 37: 136-141.*

Neves, A. R.; A. Ramos; C. Shearman; M. J. Gasson; H. Santos (2002). Catabolism of mannitol in *Lactococcus lactis* MG 1363 and a mutant defective in lactate *dehydrogenase. Microbiology. 148: 3467-3476.*

Ojamo, H.; H. Koivikko; H. Heikkila (2000). Process for the production of mannitol by immobilized micro-organisms. PCT patent application WO, 0004181.

Saha, B. C.; L. K. Nakamura (2003). Production of mannitol and lactic acid by fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Biotechnology and Bioengineering. 82 (7): 864-887.*

Soetaert, W. ; J. Domen; E. J. Vandamme (1990). Production of mannitol by *Leuconostoc mesenteroides*, immobilized on reticulated polyurethane foam. Proceedings of Physiology of Immobilized Cells, 307-310. Elsevier, Amsterdam.

Soetaert, W.; K. Buchholz; E. J. Vandamme (1995). Production of D-mannitol and D-lactic acid by fermentation with *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnology Letters. 24: 9-12.*

Soetaert, W. ; P. T. Vanhooren; E. J. Vandamme (1999). Production of mannitol by fermentation. *Methods* in *Biotechnology. 10: 261-275.*

Tibbling, G.; J. Scand (1968). Routine method for micro-determination of mannitol in serum. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. *22(1): 7-10.*

Weymarn, N. (2002). Process Development for Mannitol Production by Lactic Acid Bacteria. PhD. Thesis, Helsinki University of Technology, Finland.

Weymarn, N.; M. Hujanen; M. Leisola (2002a). Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochemistry. 37: 1207-1213.*

Weymarn, N.; K. Kiviharju; M. Leisola (2002b). High-level production of D-mannitol with membrane cell-recycle bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 29: 44-49.*

Yun, J. W.; D. H. Kim (1998). A comparative study of mannitol production by two lactic acid bacteria. *Journal of Fermentation and Bioengineering. 85(2): 203-*208.