دراسة انتاجية حامض الكلوتاميك من بكتريا *Bacillus subtilis* EN3 معزولة من التربة

إيمان جابر جاسم العطار
نضال محمد صالح
قسم علوم الأغذية/ كلية الزراعة/جامعة بغداد
شيماء حسين الراجحي
كلية الصيدلة / جامعة النهرين

استلم في: 6اذار2016 قبل في : 11ايار 2016

الخلاصة

عُزلت بكتريا جنس *Bacillus* من التربة واختبرت قدرتها على انتاج حامض الكلوتاميك، وشخصت البكتريا بطرائق التشخيص التقليدية وبنظام الفايتك VITEK-2. ودرست الظروف المثلى للانتاج ومحاولة تحسين انتاجية العزلة بالتلاعب بمكونات الوسط الانتاجي وبالظروف البيئية لوسط الانتاج. وجد ان 24 عزلة من اصل 70 عزلة بكتيرية تعود الى جنس Bacillus وتبين ان 13 عزلة تعود الى نوع *B.subtilis* بالأعتماد على الصفات الفسيولجية والكيموحيوية. ولأن الاختبارات المزرعية والمجهرية والكيموحيوية لاتمكن من التشخيص الدقيق لعزلات *B.subtilis* فقد اخضعت 13 عزلة الى التشخيص بنظام VITEK-2. اظهرت نتائج التشخيص ان هناك عزلتان منها EN5 وEN3 شخصت على انها *B.subtilis* فضلاً عن عزلة واحدة تجارية A1 ايضا شخصت على انها *B.subtilis*. واختيرت من بينها العزلة الاكثر قابلية على انتاج حامض الكلوتاميك وهي العزلة *B.subtilis* EN3، التي بلغت انتاجيتها 2 ملغم/مل. وقد درست الظروف المثلى لانتاج حامض الكلوتاميك من هذه البكتريا باستعمال وسط شبه صناعي حضر باضافة مستخلص مخلفات التمر Date extraction (DE) مصدرا كاربونيا عند تركيز 10%، ونترات الامونيوم أفضل مصدر نتروجيني عند تركيز 2% من وسط الانتاج, وتحققت أفضل أنتاجية لحامض الكلوتاميك بلغت 7.2 ملغم/مل عند حرارة 34°م ورقم هيدروجيني ابتدائي 6.5, وحققت عملية التهوية والتحريك رفع تركيز حامض الكلوتاميك المنتج عندما كانت نسبة حجم الوسط الى حجم الدورق 5:1 في الحاضنة الهزازة بسرعة 180 دورة / دقيقة, ولمدة حضن 72 ساعة, وتم الحصول على نسبة تحسن بلغت 360% عما أنتجته العزلة البرية.

الكلمات المفتاحية: انتاج حامض الكلوتاميك، تشخيص *B.subtilis*، التخمر، مصدر كاربون، مصدر نتروجين، TLC.

البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الأول

المقدمة

تُعد الاحماض الامينية نوع (L) مركبات بايولوجية مهمة ، وتأتي اهميتها بالدرجة الثانية بعد المضادات الحيوية، وقد ازداد الطلب على حامض الكلوتاميك في الصناعات الغذائية إذ انه مادة محسنة للطعم والنكهة [1]. وهو اول حامض اميني انتج تجارياً عن طريق التخمر المايكروبي باستعمال Coryneform Bacteria, فقد اكتُشف وشُخص في عام 1866 من قبل عالم الكيمياء الالماني Heinrich Ritthausen, وفي عام 1909 انتج اول ملح لحامض الكلوتاميت احادي الصوديوم تجارياً تحت اسم تجاري Ajinomoto التي تعني "اصل النكهة"، وتميز بطعم فريد يقع خارج مناطق التذوق الاربعة المعروفة واطلق على هذا الطعم في الصين بالطعم الخامس او ما يُعرف أومامي (Umami) [2]. وعُرفت اربع طرائق رئيسية لانتاج الاحماض الامينية وهي التخليق الكيميائي والاستخلاص من تحلل المواد البروتينية والحفز الانزيمي واستعمال الاحياء المجهرية بطريقة التخمر, وقد حازت الطريقة الأخيرة الافضلية في انتاج احماض أمينية نوع (L) الحيوي [3]. وبذلت جهود كبيرة للبحث عن مصادر مايكروبية قادرة على افراز حامض الكلوتاميك باستعمال مصادر كاربونية طبيعية متوفرة ورخيصة مثل مولاس البنجر والقصب السكري ومخلفات البطاطا والبطاطا الحلوة والكاسافا كمواد اولية [4]. وتوسع البحث عن مصادر مايكروبية منتجة لحامض الكلوتاميك فقد توجهت انظار الباحثين نحو انواع من جنس *Bacillus sp.*, وما نشر حديثاً من الدراسات في مجال تحسين قدرة *Bacillus subtilis* على انتاج الأحماض الأمينية, تعد من الكائنات المجهرية الآمنة ومنحت لقب GRAS (Generally Recognizeda as Safe) من قبل منظمة الغذاء والدواء الامريكية FDA [5]. واول تطبيق غذائي لها يعود الى اكثر من الف سنة عندما استُعملت فعلياً بانتاج الغذاء الياباني natto المتكون من فول الصويا المتخمر التي حظيت بقبول ورضا المستهلك [6]. اما الدراسة الحالية فقد تضمنت الحصول على عزلة محلية من البكتريا *B.subtilis* لها القدرة على انتاج حامض الكلوتاميك وتشخيصها بالطرائق التقليدية وبنظام VITEK 2، والافادة من بعض مخلفات مصانع الأغذية في تحضير اوساط شبه طبيعية لأنتاج حامض الكلوتاميك بطريقة التخمر، مع تعيين الظروف المثلى لانتاجه عن طريق التلاعب بمكونات الوسط والعوامل الفيزياوية المؤثرة فيه.

المواد وطرائق العمل

بكتريا جنس Bacillus منتجة لحامض الكلوتاميك

نقل 10 غم من عينات مختلفة من التربة الماخوذة من (كلية الزراعة/جامعة بغداد) الى 90 مل ماء مقطر ومزج جيدا ووضعت في حمام مائي 80°م لمدة 15 دقيقة ، واجريت لها سلسلة من التخافيف العشرية وزرعت في اطباق على الوسط الزرعي الأكار المغذي (N.A) Nutrient agar ثم التقطت المستعمرات النامية واعتمدت طريقة العزل والتشخيص على مبدأ المرحلية والحذف التي ادت الى اختصار الخطوات العملية باقل عدد ممكن من من الاختبارات، وحددت الخصائص الزرعية والمظهرية لها واخضعت للفحص المجهري للتعرف على شكل الخلايا وتكوينها للابواغ وتفاعلها مع صبغة كرام، وصولا الى سلسلة من الاختبارات الكيموحيوية وفقا للمفاتيح التصنيفية الواردة في المرجع العلمي المختص Bergey's manual of systemic bacteriology [7] بهدف تشخيصها على مستوى الجنس والنوع.

الفحوصات الكيموحيوية

استعملت الاوساط الزرعية والكواشف والمحاليل الجاهزة والتركيبية، وعقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121°م وتحت ضغط 15 باوند/انج^2 لمدة 15 دقيقة، واستعملت بكتريا الاختبار بعمر 18-24 ساعة للتلقيح.

فحص تسييل الجيلاتين Gelatin liquification: اجري الاختبار وفق ما ذكره [8]، إذ أستعمل وسط الجيلاتين المغذي Nutrient Gelatin في الكشف عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم الجيلاتينيز Gelatinase.

فحص تحلل النشأ Starch hydrolysis: استعمل وسط أكار النشأ Starch Agar الذي حضر حسب طريقة [9] اذ استعمل هذا الوسط لمعرفة قابلية البكتريا على تحليل النشأ، اذ يعد ظهور مناطق بنية اللون حول المستعمرات نتيجة موجبة لتحلل النشا.

أختبار الأندول Indol test: استعمل وسط انتاج الاندول Indol Production Medium الذي حضر وفق طريقة [9] وعُدت النتيجة موجبة عند ظهور حلقة حمراء في قمة الوسط.

فحص تخمر السكريات وانتاج الغاز: حضر وسط تخمر السكر fermentation sugar medium وفق طريقة [10] استعمل هذا الوسط في الكشف عن قابلية البكتريا على تخمر السكريات وانتاج الحامض عن طريق تغير لون الكاشف من اللون البنفسجي الى اللون الاصفر وعدت النتيجة موجبة في حالة تكوين غاز داخل انبوبة درهم.

فحص اختزال النترات Nitrate reduction: حضر وسط اختزال النترات Nitrate Reduction Broth وفق طريقة [9] وعدت النتيجة موجبة عند ظهور اللون الوردي المحمر.

اختبار اللسثينيز Lycithinase: حضر الوسط Egg Yolk Agar وفق طريقة [11] واستعمل هذا لمعرفة قابلية البكتريا على تحلل اللسثنين. وتعد النتيجة موجبة اذا كان هناك ترسبا حول خط النمو البكتيري.

فحص النمو بتركيز ملحي مرتفع : اجري الفحص وفق طريقة [12] باستعمال الوسط السائل NB يضاف له NaCl بنسبة 5% و7% و10%، 7 ووزع على انابيب اختبار وعقم بالمؤصدة، لقحت الانابيب بمسحة من العزلات المنشطة في

مائل الاكار المغذي (Slant) وحضنت في 37°م ولمدة 24 ساعة مع متابعة كثافة النمو الحاصل ومقارنته بالوسط غير الملقح.

فحص النمو بدرجات حرارة مختلفة: لقحت الاطباق الحاوية على وسط الاكار المغذي بمسحة من العزلات بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق في درجة 35 و 45 و 55°م لمدة 24 ساعة ويعد ظهور النمو نتيجة موجبة للفحص.

فحص الحركة Motility test: فحصت حركة البكتريا قيد الاختبار بطريقة القطرة المعلقة Hanging Drop، الموصوفة من [9].

فحص استهلاك السترات Citrate Utilization: استعمل الوسط الجاهز Simmons's Citrate Agar وحضر تبعاً لتعليمات الشركة المصنعة HiMedia، يُعد تغير لون الوسط من الاخضر الى الازرق المضيء نتيجة موجبة [13].

فحص Litmus Milk: حضر وسط Litmus Milk حسب ماذكره [9]. ويعد وجود خثرة متقطعة في الوسط مع تغير اللون الى الأزرق نتيجة موجبة لهذا الفحص.

اختبار Vogas-Proskaur: حضر وسط Glucose Phosphate Broth حسب طريقة [9] وعدت النتيجة موجبة عند تكوين لون احمر بعد اضافة 5 قطرات من كاشف المثيل الأحمر.

أختبار Methyl red: حضر وسط Glucose Phosphate Broth كما ذكره [9] وعدت النتيجة موجبة عند تكوين لون احمر شاحب بعد اضافة كاشف V-P.

فحص تحلل الكازين: حضر وسط اكار الحليب Milk Agar على وفق طريقة [9]، وعدّ ظهور منطقة شفافة حول النمو دليلاً على تحلل الكازين.

اختبار اليوريز Ureas: حضر وسط اليوريا الصلب Urea Agar على وفق طريقة [14] ويعد التغير في لون الوسط من الاصفر الى الوردي المحمر جراء تغيير الرقم الهيدروجيني نتيجة تكوين الامونيا من اليوريا بفعل انزيم اليوريز, وعد هذا التغير باللون نتيجة موجبة.

فحص الكاتاليز Catalase: اجري الفحص باضافة قطرات من محلول بيروكسيد الهيدروجين 3%على المستعمرات النامية على وسط الأكار المغذي ويدل ظهور فقاعات غازية على ايجابية الفحص [13].

فحص الاوكسيديز Oxidase: اجري هذا الفحص وفق طريقة [13] ويعد ظهور اللون البنفسجي خلال 10 ثوان نتيجة موجبة للفحص.

تشخيص العزلة بنظام VITEK2

استعمل نظام التشخيص الآلي VITEK2 في تأكيد تشخيص عزلات *Bacillus subtilis* التي شُخصت بالفحوصات الكيموحيوية, اذ استعملت عدة التشخص الخاصة بالاحياء المجهرية الموجبة لكرام والتابعة لعائلة Bacillaceae (BCL) الحاوية على 63 فحصاً ووفق تعليمات الشركة المصنعة (bioMerieux).

وسط الابذار (اللقاح) Seed Medium: حضر الوسط وفق طريقة [15]، الذي يتكون من (غم/لتر) كلوكوز 40، خلاصة الخميرة 10، 0.5 $MgSO_4.7H_2O$، 1 K_2HPO_4، 1 KH_2PO_4، 2.5 NaCl، 0.1 $MnSO_4.H_2O$.

وسط الانتاج الأساسي Basal Production Medium (BPM): حضر الوسط وفق طريقة [16] والمحورة من قبل باحث الدراسة الحالية، الذي يتكون من(غم/لتر) 2 غم $(NH_4)_2SO_4$، 2غم Urea، 1غم KH_2PO_4، 0.5 غم $MgSO_4.7H_2O$، 0.05 غم $FeSO_4.7H_2O$، 0.5 غم NaCl، 3µg Biotin ، المصدر الكاربوني يتضمن سكريات نقية و مستخلصات مخلفات مصانع الاغذية.

الفحوصات التي اجريت على وسط التخمر خلال الدراسة

الكشف النوعي عن حامض الكلوتاميك: اتبعت طريقة Paper chromatography (PC) الموصوفه من [17] للكشف النوعي لحامض الكلوتاميك لجميع العزلات المستحصل عليها في مراحل العزل والتشخيص لغرض انتقاء العزلات المنتجة لحامض الكلوتاميك لأجراء الدراسات اللاحقة عليها.

التقدير الكمي لحامض الكلوتاميك: اتبعت Thin Layer Chromatography (TLC) حسب الطريقة الموصوفة من [18] لتقدير كمية حامض الكلوتاميك ، إذ استعمل محلول الفصل البيوتانول: حامض الخليك: ماء مقطر (20:20:80)، وطور لون البقع المفصولة باستعمال كاشف اللننهيدرين (0.2% كحول اثيلي)، ثم جففت الالواح وقشطت البقع بعد تحديدها ووضعت في انابيب اختبار تحوي 5 مل ايثانول(75%)، وقرأت الامتصاصية على الطول الموجي 570 نانومتر وقدر حامض الكلوتاميك بالرجوع الى المنحنى القياسي الموضح بالشكل (1).

تقدير الرقم الهيدروجيني: تم قياس الرقم الهيدروجيني لوسط الانتاج باستعمال جهاز pH .meter

قياس النمو البكتيري: قيست كثافة النمو البكتيري بطريقة قياس الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer وفق الطريقة المتبعة من [19]، وذلك بأخذ حجم معين من العالق البكتيري لوسط الانتاج وسجلت امتصاصيته على الطول الموجي 600، تم التعرف على كثافة النمو (اعداد الخلايا الحية و.ت.م/مل) في الوسط الانتاجي بالرجوع الى المنحنى القياسي لأعداد الخلايا الحية الموضح بالشكل (2).

تقدير كمية الكلوكوز المتبقية: استعملت طريقة DNS (3ˆ,5ˆ- Dinitro Salicylic Acid) التي وصفت من [20]. وقُدر تركيز الكلوكوز المتبقي بوسط الأنتاج بالرجوع الى منحنى الكلوكوز القياسي الموضح بالشكل (3).

تحديد الظروف المثلى لانتاج حامض الكلوتاميك

دراسة تأثير المصدر الكاربوني في انتاج حامض الكلوتاميك

تم اختبار مصادر كاربونية متمثلة بالسكريات الصناعية النقية والمتضمنة الكلوكوز والفركتوز والسكروز واختبرت عدة مصادر كاربونية طبيعية شملت مستخلص مخلفات التمر ومستخلص مخلفات العنب اللذين حضرا حسب الطريقة [21]، وقصر لونهما باستعمال الفحم المنشط حسب طريقة [22]. وحضر مستخلص مخلفات البطاطا وفق طريقة [23] ومستخلص سبوس الرز حضر وفق طريقة [24]. وقدرت نسبة الكاربوهيدرات الكلية للمستخلصات قيد الدراسة بطريقة [25].

تحديد نوع المصدر الكاربوني الأمثل: اضيفت المصادر الكاربوني قيد الاختبار بتركيز موحد الى وسط الانتاج الاساسي باستعمال لقاح من بكتريا *B.subtilis* EN3 بتركيز (2.8×10^6 و.ت.م/مل) وحضنت بحاضنة هزازه 120 دورة/دقيقة وبدرجة 37°م وعند رقم هيدروجيني بدائي 7 ولمدة أنتاج 48 ساعة، لأختبار المصدر الكاربوني الامثل لأنتاج حامض الكلوتاميك.

تحديد التركيز الامثل لمستخلص مخلفات التمر: استعملت تراكيز مختلفة من المستخلص الطبيعي الذي اعطى افضل انتاجية، شملت 2% و4% و6% و8% و10% و12%.

تحديد مصدر النتروجين الأمثل: شملت نترات البوتاسيوم وفوسفات الأمونيوم وكلوريد الأمونيوم ونترات الأمونيوم وكبريتات الأمونيوم والببتون واليوريا ، اضيفت بتركيز 1%، مع مراعاة استعمال التركيز الامثل للمصدر الكاربوني.

تحديد التركيز الأمثل لمصدر النتروجين الأمثل: اختبرت تراكيز مختلفة لأفضل مصدر نتروجيني لأنتاج حامض الكلوتاميك، شملت 0.5% و1% و2% و3%.

تحديد درجة الحرارة المثلى: أختبر تأثير اربع درجات حرارية هي 25 و28 و31 و 34 و37 و42°م في انتاج الحامض مع مراعاة الظروف المثلى المتحققة في التجارب السابقة.

تحديد الرقم الهيدروجيني الامثل: حضر وسط الانتاج الاساسي بأرقام هيدروجينية تراوحت بين 5.5-8 وبفارق نصف رقم هيدروجيني بين معاملة وأخرى مع مراعاة تعديل الوسط حسب التجارب السابقة.

تحديد سرعة التحريك والتهوية المثلى: درس تأثير سرعة دوران الحاضنة الهزازة باستعمال سرع مختلفة شملت 40 و60 و80 و 120 و160 و180 و220 دورة/دقيقة، ودرس تأثير التهوية بأتباع اسلوب نسبة حجم الوسط الانتاجي الى حجم الدورق (تغيير حجم الدرق) واستخدمت في هذه التجربة دوارق بحجوم مختلفة كل منها يحتوي على حجم ثابت من وسط الانتاج لكي تغدو نسبة حجم الوسط : حجم الدورق 3:1 و5:1 و6:1 و10:1 و15:1 و20:1 على التوالي.

تحديد مدة الانتاج المثلى: استعملت كل الظروف المثلى التي تم تعيينها في الفقرات السابقة في تجربة استهدفت تحديد المدة اللازمة للوصول الى اعلى انتاجية من حامض الكلوتاميك, مع رصد التغيرات الحاصلة في وسط الانتاج من حيث تركيز حامض الكلوتاميك والنمو البكتيري والرقم الهيدروجيني وكمية الكلوكوز المتبقي لغاية 96 ساعة وبواقع 12 ساعة بين متابعة وأخرى.

حساب نسبة التحسن لأنتاجية حامض الكلوتاميك: حسبت نسبة التحسن لأنتاجية حامض الكلوتاميك بعد تعيين الظروف المثلى لوسط الأنتاج على وفق المعادلة التالية:

$$\text{تحسن الإنتاجية (\%)} = \frac{\text{الأنتاجية في الخطوة قيد الدراسة (ملغم/مل)}}{\text{الأنتاجية قبل تعيين الظروف المثلى (ملغم/مل)}} \times 100$$

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus subtilis*

اخضعت 70 عزلة لدراسة الصفات المزرعية إذ أُعتمد التشخيص بالبدء على شكل وحجم ولون المستعمرات وطبيعة نموها, إذ اظهرت 24 عزلة صفات جنس Bacillus عند تنميتها على الوسط الزرعي الاكار المغذي في 37°م لمدة 24 ساعة، مستعمرات بيضاء الى كريمي مع ارتفاع مسطح بالوسط، كثيفة لزجة قليلاً غير منتظمة الشكل ذات حواف متموجة ولها رائحة القش القديم, وتكون مستعمراتها مزدحمة على سطح الطبق، واستكمل دراسة صفاتها المجهرية فأستبعدت العزلات التي لم تظهر صفات مجهرية مقاربة او مطابقة لصفات جنس Bacillus من حيث كونها موجبة لصبغة كرام وتمتلك اشكالاً عصوية او شبه عصوية تتجمع بشكل سلاسل قصيرة وغالباً ما تكون بشكل ازواج مكونة للأبواغ شبه مركزية (Semicentral) وذلك استنادا الى اسس التصنيف وفق ما جاء به [7] في تشخيص جنس Bacillus. ووفقا لنتائج دراسة الصفات المجهرية التي افرزت نتائجها عزلات مطابقة لصفات جنس Bacillus أجري عليها بعض الاختبارات الكيموحيوية والفسيولوجية تمهيدا لتحديد نوع جنس Bacillus، إذ يلخص الجدول (1) و (2) نتائج هذه الاختبارات حيث تم استبعاد خمس عزلات اعطت نتائج متباينة مع صفات *Bacillus subtilis* وفق المفاتيح التصنيفية المعتمدة [26] و [27] ، ووقع الأختيار على 13 عزلة هي EN3 و EN4 وEN5 وEN9 وEN14 وEN19 وEN24 و

EN25 وEN29 و EN30 و EN34 و EN35 و EN39 تميزت هذه العزلات بصفات مقاربة لصفات *Bacillus subtilis* ومنتجة لحامض الكلوتاميك.

التشخيص بنظام الفايتك 2 (Vitek 2 Compact System)

أعتمد على اختبار الفايتك 2 لتشخيص 13 عزلة بكتيرية فضلا عن العزلة التجارية بعد التأكد منها بوساطة الاختبارات الكيموحيوية الاولية [28]. واظهرت نتائج الأختبار ان هناك عزلتين هما EN3 و EN5 شخصت على انها *B.subtilis* بنسبة احتمالية 94% و90% على التوالي فضلا عن عزلة تجارية *B.subtilis* A1 بنسبة احتمالية 96%، في حين شخصت العزلات EN4 و EN9 وEN19 وEN24 وEN34على انها *Bacillus pumilus* و *Bacillus megaterium* و*Brevibacillus choshinensis* و *Bacillus licheniformis* و *Geobacillus thermoleovorans* على التوالي، أما العزلات EN14 وEN25 وEN29 وEN30 و EN35 و EN39 فلم يتم تشخيصها (Unidentified Organism).

تحديد العزلة الأكفأ في انتاج حامض الكلوتاميك

اشتملت الغربلة الكمية للعزلات المشخصة نوع *B.subtilis* في هذه المرحلة على عزلتين فضلاً عن العزلة التجارية A1 اذ أُختبرت مقدرتها على انتاج حامض الكلوتاميك، لوحظ تفوق العزلة EN3 بأنتاج حامض الكلوتاميك والتي بلغت 2 ملغم/مل, في حين بلغت انتاجية العزلة EN5 1.15 ملغم/مل، اما العزلة التجارية A1 فقد بلغت 0.92 ملغم /مل.

تقدير النسبة المئوية للكاربوهيدرات الكلية لمخلفات مصانع الأغذية

قدرت النسب المئوية للكاربوهيدرات متمثلة بالكلوكوز في المستخلصات لمخلفات التمر والعنب والبطاطا وسبوس الرز، فقد كان مستخلص مخلفات التمر اعلى نسبة كاربوهيدرات بلغت 8% يليه مستخلص العنب 5% ثم البطاطا 3.5% وادناها سبوس الرز 2%.

تحديد الظروف المثلى لانتاج حامض الكلوتاميك

تأثير المصدر الكاربون في انتاج حامض الكلوتاميك

يبين الشكل (4) تأثير سبعة مصادر كاربونية تضمنت اربعة مصادر طبيعية شملت مستخلصات مخلفات التمر (DE) والعنب (GE) والبطاطا (PE) وقشور الرز (السبوس) (BE) وثلاثة سكريات صناعية نقية كلوكوز(Glu) وفركتوز (Fru) وسكروز (Suc) في انتاج حامض الكلوتاميك بعد اضافتهم الى الوسط الأنتاجي الأساسي بتركيز 20 غم/لتر وباستعمال بكتريا *Bacillus subtilis* EN3 (2.8×10^{6}و.ت.م/مل). لوحظ ان مستخلص مخلفات التمر(DE) كان يماثل الكلوكوز في انتاجية حامض الكلوتاميك عند نفس التركيز, اذ أعطى الكلوكوز اعلى انتاجية بلغت 1.76 ملغم/مل، اما DE فقد بلغت انتاجية 1.73 ملغم/مل، ويأتي مستخلص العنب بالدرجة الثانية من حيث تأثيره في انتاجية حامض الكلوتاميك بواسطة البكتريا قيد الدراسة والبالغة 1.44 ملغم/مل وهي ايضا مقاربة للنتيجة التي تحققت بأضافة سكر الفركتوز 1.49 ملغم/مل، لكنها كانت اعلى من النتيجة المستحصل عليها باضافة بأضافة السكروز الى الوسط الانتاجي والبالغة 1.38 ملغم/مل، واعطى مستخلص السبوس اقل 0.835 ملغم/مل، وهذه النتيجة تمكننا من استغلال مخلفات معامل تصنيع التمر لأقحامها في اوساط الانتاج التخمرية والحصول على نواتج تخمرية كالاحماض الامينية والانزيمات والمضادات الحيوية وغيرها من النواتج الايضية وبالتالي تؤدي الى خفض كلفة الانتاج وبنفس الوقت تقليل مخاطر التلوث البيئي عند رميها كمخلفات، وقد جاءت هذه النتائج مقاربة لما حصل عليه [19] عند استعمالهم مخلفات زراعية، المتمثلة بقشور الكاسافا ومخلفات الذرة ومخلفات الاناناس كمصدر كاربوني وحيد لانتاج حامض الكلوتاميك واوضح ان هناك تباين في نسبة انتاج حامض الكلوتاميك تعود الى نوع السكريات التي تحويها هذه المخلفات الزراعية فقد بلغت اعلى كمية من حامض الكلوتاميك 4.1 ملغم/مل بواسطة بكتريا *B.subtilis* بأستعمال مخلفات الذرة (نسبة الكاربوهيدرات فيها 71.6%).
وبغية تحديد التركيز الأمثل من مستخلص DE في انتاج حامض الكلوتاميك من بكتريا *B.subtilis* EN3، دُرس تأثير استعمال تراكيز مختلفة من DE في الوسط الانتاجي, ويوضح الشكل (5) ان الانتاجية تزداد مع زيادة تركيز DE في الوسط، اذ تم الحصول على اعلى انتاجية والبالغة 2.74 ملغم/مل عند تركيز10%، في حين شهد انتاج حامض الكلوتاميك انخفاضا بزيادة تركيز نسبة المادة السكرية الى 12%. ويمكن ان يعود انخفاض الانتاجية عند المستويات العالية من الكلوكوز الى حدوث تثبيط بالمادة الاساس لفعالية بعض الانزيمات او الى زيادة نسبة الكاربون الى النتروجين في الوسط [29].

مصدر النتروجين

اختبرت سبعة مصادر نيتروجينية شملت مصدرين عضويين هما الببتون واليوريا وخمس مصادر لاعضوية شملت نترات البوتاسيوم وفوسفات الامونيوم وكلوريد الامونيوم ونترات الامونيوم وكبريتات الامونيوم كلاً على حدة وبتركيز موحد 0.2%, بعد ان ثبت نوع وتركيز المصدر الكاربوني (مستخلص مخلفات التمر عند تركيز 10%) وعند درجة حرارة 37°م ورقم هيدروجيني ابتدائي 7. والشكل (6) يبين تأثير هذه المصادر على انتاج حامض الكلوتاميك حيث تفوقت نترات الامونيوم من بين جميع المصادر التي تم اختيارها, اذ بلغ تركيز حامض الكلوتاميك 3.285 ملغم/مل ويليها كبريتات الامونيوم وكلوريد الامونيوم وفوسفات الامونيوم بنسب بلغت 2.87 و2.315 و2.055 ملغم/مل على الترتيب، وادناها نترات البوتاسيوم 1.525 ملغم/مل بينما تفوقت اليوريا عند استعمالها كمصدر نيتروجيني عضوي, حيث كانت الأنتاجية 3.06 ملغم/مل، في حين ادنى مستوى لانتاج حامض الكلوتاميك كان عند استعمال الببتون كمصدر نيتروجيني

عضوي اذ بلغ 1.525 ملغم/مل. وعند مقارنة نترات الامونيوم NH_4NO_3 كأفضل مصدر لاعضوي مع اليوريا كأفضل مصدر عضوي نلاحظ تفوق نترات الامونيا على اليوريا في انتاج حامض الكلوتاميك، وقد يعود السبب الى ان أيونات NH_4^+ الحرة المطلوبة لاجل انتاج حامض الكلوتاميك تكون متوفرة في مصادر النيتروجين اللاعضوية اكثر مما في المصادر العضوية [30]. تفضل البكتريا المنتجة لحامض الكلوتاميك املاح الامونيوم على غيرها من مصادر النتروجين اذ ان ايون الامونيوم NH_4^+ في هذه الاملاح يحفز انزيم Glutamate dehydrogenase (GDH) المسؤول عن تحول الكلوتارات الى كلوتاميت [31].

وجرى اختبار تراكيز مختلفة من نترات الأمونيوم 0.5% و 1% و 2% و 3% بغية تحديد التركيز الامثل في انتاج حامض الكلوتاميك, إذ اظهرت النتائج الموضحة في الشكل (7) ان اعلى انتاجية لحامض الكلوتاميك بلغت 3.72 ملغم/مل عند تركيز 2% نترات الامونيوم ، في حين حصل انخفاض الانتاج عند استعمال تراكيز اقل من 2% اذ بلغت ادنى كمية 3.28 ملغم/مل و3.5 ملغم/مل عند استعمال 0.5% و1% من نترات الامونيوم على التوالي، وكذلك الحال لوحظ انخفاض كمية الانتاج عند استعمال تركيز اعلى من 2% ليبلغ الانتاج 3.58 ملغم/مل عند تركيز 3%. وجاءت هذه النتيجة موافقة لما حصل عليه [32] عند استعماله 2% كبريتات الامونيوم كمصدر نيتروجيني للحصول على أعلى تركيز لحامض الكلوتاميك بوساطة سلالة من *Brevibacterium strain*.

درجة الحرارة

شملت هذه الدراسة تأثير ست درجات حرارية هي 25 و28 و31 و34 و37 و40 °م في انتاج حامض الكلوتاميك بالوسط الذي تم تحديد مكوناته في التجارب السابقة وعند رقم هيدروجيني 7, ويبين الشكل (8) ان افضل درجة حرارة للانتاج هي 34°م اذ بلغت الانتاجية 5.54 ملغم/مل، في حين لوحظ انخفاض مستوى الانتاجية دون هذا المستوى عند حرارة 25 و 28 °م لتبلغ 2.52 ملغم/مل و 3.2 ملغم/مل على التوالي, كما ان انتاجية حامض الكلوتاميك انخفضت الى 4.33 ملغم/مل و2.1 ملغم/مل عند رفع درجة حرارة الحضن الى 37°م و40°م. ان درجة الحرارة المثلى لنمو البكتريا المنتجة للاحماض الامينية تقع بين 30 و 35°م, وان انخفاض انتاجية البكتريا من الاحماض الامينية في درجات الحرارة العالية والمنخفضة يعود الى انخفاض كفاءة التوجيه الايضي للكلوكوز [33].

الرقم الهيدروجيني

يعد الرقم الهيدروجيني الابتدائي لوسط الانتاج من اهم العوامل المؤثرة في انتاجية الاحماض الامينية من البكتريا, لذا تمت دراسة تاثير ارقام هيدروجينة 5.5 و6 و 6.5 و7 و7.5 و8 في انتاج حامض الكلوتاميك من بكتريا *B.subtilis* EN3 في الوسط الأنتاجي الذي احتوى على 10% مستخلص مخلفات التمر و2% نترات الأمونيوم وحرارة 34 °م ويبين الشكل (9) ان اعلى انتاجية من حامض الكلوتاميك قد تحققت في وسط الانتاج الذي تم ضبط رقمه الهيدروجيني الى 6.5 قبل التلقيح, اذ بلغت 6.12 ملغم/ مل, كما يتضح من الشكل نفسه ان انتاجية حامض الكلوتاميك تصل الى أدنى مستوى 2.1 ملغم/ مل عند الرقم الهيدروجيني 5.5 الأبتدائي, كما يلاحظ حدوث انخفاض الانتاجية عند ارتفاع الرقم الهيدروجيني الى 8 لتبلغ انتاجية حامض الكلوتاميك 3.2 ملغم/ مل. ان عامل الرقم الهيدروجيني له تأثيرات واضحة على فسلجة الاحياء المجهرية عن طريق تأثيره على ذوبانية المواد الغذائية وأمتصاصها وعلى نشاط الانزيمات وعلى الشكل المورفولوجي لغشاء الخلية, وتكوّن نواتج ثانوية وتفاعلات الاكسدة والاختزال [34]. وقد جرى قياس النمو للخلايا البكتيري (OD_{600}nm) في نهاية مرحلة الأنتاج مرافقة لتقدير حامض الكلوتاميك عند الأرقام الهيدروجين المختبرة، وأتضح ان كثافة نمو الخلايا ازداد مع اقتراب الرقم الهيدروجيني الأبتدائي الى التعادل فنلاحظ من الشكل نفسه ان كثافة النمو ارتفعت من 0.5 عند رقم هيدروجيني ابتدائي 5.5 لتصل الى 1.108 عند رقم هيدروجيني ابتدائي 6، ثم تبلغ اقصاها 2.4 و2.35 عند الرقم الهيدروجيني 7 و7.5 على التوالي. وقد يعود زيادة كثافة النمو في الاوساط الزرعية ذات الارقام الهيدروجينية القريبة من التعادل الى طبيعة النظام الفسيولوجي للكائن المجهري الذي يؤثر على ذوبانية المغذيات وامتصاصها وعلى النشاط الأنزيمي فضلا ن تأثيرة على الطبيعة المورفولوجية لغشاء الخلية وعلى تكوين النواتج الأيضية.

تأثير التهوية والتحريك

نظراً لاهمية التهوية في انتاج حامض الكلوتاميك بالدوارق الهزازة فقد درس تأثير النسبة بين حجم الوسط الانتاجي الى حجم الدورق المستعمل في الانتاج, الاختلاف في حجم الوسط داخل الدورق يؤدي الى تغيرات في شدة الحركة وكذلك في تجهيز الاوكسجين مع مراعاة الظروف المثلى لأنتاج حامض الكلوتاميك التي تم تحديدها في التجارب السابقة من حيث مكونات الوسط والظروف البيئية للانتاج. اذ يوضح الشكل (10) ان استعمال نسبة 5:1 وسرعة دوران 180 دورة/دقيقة حققت اعلى انتاجية من حامض الكلوتاميك بلغت 6.56 ملغم/مل عند درجة الحرارة المثلى 34°م، كما نلاحظ انخفاض الأنتاجية في كلتا حالتي التهوية الوفيرة المتمثلة بالمعاملة السادسة والخامسة (20:1) و(12:1) وفي حالة التهوية المحدودة المتمثلة بالمعاملة الاولى (3:1), ففي المعاملتين السادسة والخامسة يرتفع انتاج حامض الكلوتاميك بزيادة سرعة الدوران ليبلغ 0.92 ملغم/مل و1.17 ملغم/مل على التوالي عند 160 دورة/دقيقة، بعدها يبدا تركيز حامض الكلوتاميك بالانخفاض عند سرعة 180 و220 دورة/دقيقة. وبنفس الاسلوب يتزايد نمو الخلايا(على اساس الكثافة الضوئية) لتبلغ أقصاها 3.6 نانومتر عند استخدام نسبة (5:1) وسرعة دوران 180 دورة /دقيقة كما موضح ذلك في

الشكل (11) ، اما في المعاملتين السادسة والخامسة فقد انخفض نمو الخلايا (على اساس الكثافة الضوئية) ليبلغ 1.13 و 1.22نانومتر على التوالي, وقد يعود هذا الانخفاض في الانتاجية ونمو الخلايا الى نفاذ المصدر الكاربوني والنتروجيني فضلاً عن المغذيات الاخرى من الوسط الانتاجي بسبب النمو السريع للخلايا البكتيرية نتيجة وفرة الاوكسجين المذاب, إذ تعمل زيادة سرعة الدوران للحاضنة على زيادة مزج الاوكسجين بالوسط وزيادة ذائبيته، وتحتاج البكتريا الى الاوكسجين الذي يعمل كمستلم نهائي للالكترونات في الايض الخلوي, ولكن وفرة الاوكسجين بمستويات عالية يؤدي الى تشجيع الايض عبر دورة TCA وخفض توجيه الايض نحو مسار PPP مما ينتج عنه قلة توفر NADPH الضروري لتخليق حامض الكلوتاميك وتراكم كميات من α-Ketoglutaric acid [35].

مدة الانتاج المثلى

تم اجراء هذه التجربة في الظروف المثلى لانتاج حامض الكلوتاميك من بكتريا *B.subtilis* EN3 التي تم تحديدها في التجارب السابقة من هذه الدراسة ، وسجلت انتاجية البكتريا *B.subtilis* EN3 من حامض الكلوتاميك ومراقبة التغيرات الحاصلة بالرقم الهيدروجيني و كثافة النمو وتركيز السكر المتبقي (ملغم/مل) كل 12 ساعة ولمدة 96 ساعة , كما يوضح الجدول (3) بعض التغيرات الحاصلة على وسط الانتاج اثناء تحديد المدة المثلى للانتاج والتي استمرت 96 ساعة. اذ لم يحدث انتاج كفوء لحامض الكلوتاميك في الاثنتي عشرة ساعة الاولى من الحضن, في حين انتجت هذه البكتريا 0.6 ملغم/مل من حامض الكلوتاميك بعد 24 ساعة من الحضن, وسجلت اعلى انتاجية من حامض الكلوتاميك والتي بلغت 7.2 ملغم/مل بعد 72 ساعة من الحضن, ثم انخفضت انتاجية حامض الكلوتاميك لتصل الى 2.11 ملغم/مل بعد 96 ساعة، وقد يعود هذا الانخفاض في انتاجية حامض الكلوتاميك الى عدة عوامل، اهمها حصول تغيرات في الاليات التنظيمية لمسار تخليق حامض الكلوتاميك جراء ما طرأ على وسط الانتاج من تغيرات بيئية كانخفاض تركيز الكاربون والنتروجين وانخفاض الرقم الهيدروجيني للوسط, وايضاً تراكم النواتج العرضية [36]. لوحظ حصول حالة انخفاض في الرقم الهيدروجيني مرافقة لانتاج حامض الكلوتاميك وتراكمه في الوسط, فقد انخفض الرقم الهيدروجيني من 6.5 الى 6.11 بعد 24 ساعة لتصل الى 5.12 بعد مرور 72 ساعة من انتاج حامض الكلوتاميك، ويعد انخفاض الرقم الهيدروجيني لوسط الانتاج احد اهم المؤشرات التي تنعكس على انتاج حامض الكلوتاميك بواسطة الاحياء المجهرية, كونه من الاحماض الامينية الحامضية, لذا يوصى دائماً بمراقبة الاس الهيدروجيني لوسط التخمر والمحافظة عليه عند حدود القيمة البدائية [23]. وايضاً يتبين من الجدول نفسه ان خلايا بكتريا *B.subtilis* EN3 المستخدمة في انتاج حامض الكلوتاميك قد دخلت مرحلة الثبوت العددي بعد مرور 24 ساعة من الحضن على 34°م بدلالة الكثافة الضوئية OD600 والتي بلغت حدها الاقصى بعد 36 ساعة وبفارق 36 ساعة عن الزمن اللازم لبلوغ انتاجية حامض الكلوتاميك حدودها القصوى والتي كانت عند الساعة 72 من الحضن. وايضا يوضح الجدول انخفاض كمية السكر المتبقي (الكلوكوز) مع تقدم مدة التخمر وملاحظة تأثير ذلك على تركيز حامض الكلوتاميك المنتج, اذ كان معدل استهلاك الكلوكوز بهذه الفترة 68%, وقد يتوافق هذا الاستهلاك مع النمو المايكروبي في الوسط الانتاجي ويستمر الانخفاض في تركيز السكر المتبقي الى ان بلغ 4.04 ملغم/مل بعد 96 ساعة من التخمر.

مستوى تحسين انتاجية البكتريا *B.subtilis* EN3 من حامض الكلوتاميك

هدفت التجارب السابقة محاولة تحسين انتاجية العزلة البكتيرية قيد الدراسة من حامض الكلوتاميك وذلك بتحديد الظروف المثلى للانتاج والذي ساهم في تحسين الأنتاجية لحامض الكلوتاميك من 2 ملغم/مل لعزلة *B.subtilis* EN3 البرية قبل تعيين الظروف المثلى الى 7.2 ملغم/مل بعد تعيين الظروف المثلى (اي بنسبة تحسن 360%)، اذ يعود معظم التحسن في هذه الخطوة الى زيادة تركيز المصدر الكاربوني المتمثل بمستخلص مخلفات التمر من 4% الى 10% واستعمال نترات الأمونيوم كمصدر نتروجيني بنسبة 2% وباستعمال حرارة 34°م ورقم هيدروجيني ابتدائي 6.5 وعند شدة اهتزاز بلغت 180 دورة/دقيقة ولفترة تخمر بلغت 72 ساعة.

المصادر

1. Shyamkumar, R., Moorthy, I.M.G., Ponmurugan, K. and Baskar, R. (2014). Production of L-glutamic acid with Corynebacterium glutamicum (NCI M2168) and *Pseudomonas reptilivora* (NCIM 2598): A study on Immobilization and Reusability. Avicenna Journal of Medical Biotechnology, 6 (3): 163-168.
2. Ault, A. (2004). The Monosodium glutamate story: The commercial production of MSG and other amino acids. J.Chemical Education, 81(3): 347-355.
3. Crueger, W. and Crueger, A. (1982). Amino acids. In: "Biotechnology: A Text Book of Industrial Microbiology". T. D. Brock, ed. Sinaur Association Inc., Madison.
4. Schallmey, M., Singh A., and Ward O.P. (2004). Developments in the use of Bacillus species for industrial production. Canada. J. Microbiol., 50: 1-17.

5. Zweers, J.C., Baràk, I., Becher, D., Driessen, A.J.M., Hecker, M., Kontinen, V.P., Saller, M.J., Vavrova, L. and Dijl, J.M.V. (2008). Towards the development of Bacillus subtilis as a cell factory for membrane proteins and protein complexes. Microbial cell factories, 7:10.
6. Westers L., Wasters, H. and Quax, W.J. (2004). Bacillus subtilis as cell factory for pharma ceutical oroteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. Biochim. Biophys. Acta., (1694): 299-310.
7. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. (1974) Bergy's Manual of Determinative Bacteriology. (8th Ed.). Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
8. Cruickshank, R., Duguid, J., Marimon, B. and Swain, R. (1975). Medical Microbiology the Practical of Medical Microbiology.. 2, 12th edition, Churchill Livingstone, UK.
9. Harrigan, W.F. and McCance, M.E. (1976). Laboratory methool in food and dairy microbiology. Academic press Inc. San Diego.
10. Atlas, R.M. (2005). Handbook of Media for Environmental Microbiology. Second Edition. Taylor and Francis Group. USA.
11. Jan, M. H., Carlos, A. and Tony, t. (1998). Bacteriological Analytical manual, 8th Edition, Revision A.
12. Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G., Balows, A. and Schlegel, H.G. (1981). The Prokaryotes. Vol. II. Springer–Verlag New York.
13. MacFaddin J.F. (2000). Biochemical tests for identification of Medical Bacteria, 3rd ed. Lippincott Wilkins and Williams, philadephia.
14. Atlas, R. M. (1995). Principles of microbiology. 15. Biotechnology, Mosby, Inc. Missouri. 597-648.
15. Pasha, S.Y., Ali, M.N., Tabassum, H. and Mohd, M.K. (2011). Comparative Studies on production of glutamic acid using with type, mutants, immobilized cells and immobilized mutatnts of Corynebacterium glutamicum. Internationl Journal of Engineering Science and Technology, 3(5): 3941-3949.
16. Gutcho, S.J. (1973). Chemicals by Fermentation. Noyes Data Corp. New Jersey. 215.
17. Malik F., (2007). Studies on mino acid producing bacteria through microbial fermentation using different agriculture wastes. University of the Punjab Lahore. Thesis of Ph.D.
18. Mohammed, A., Abdul Moheman, and El-Desoky. G.E. (2012). Amino acid and Vitamin determinations by TLC/HPLC: review of the current state. Central European Journal of Chemistry, 10(3): 731-750.
19. Lawal. A.K, Oso, B.A., Sanni A.I, Grillo, J.A. and Elemo, G.N. (2011). Production of L.glutamic acid from Bacillus isolates cultivated on agro-industrial wastes containing medium. Global Research journal of Microbiology, 1(3): 043-055.
20. Whitaker, J. R. and Bernhard, R. A. (1972). Experiments for: An Introduction to Enzymology. Whiber Press, Davis.
21. Ahmed, Y.M., Khan, J.A., Abulnaja, K.A., and Al-Malki, A.L. (2013).production of glutamic acid by *Corynebacterium glutamicum* using dates syrup as carbon source. African Journal of Microbiology Research, 7(19): 2071-2077.

22. Nachat, N., Tobarameekul, P. and Worathanakul, P. (2014).Activated Carbon from Bagasse for Syrup Decolorization as an Alternative for Waste Management and the Assessment of Carbon Footprint.Environment and Natural Resources J., 12(2): 66-73.
23. Moosavi-NaSab, M., Izadi, M., and Hosseinpour, S., (2010). Glutamic acid production from potato by Brevibacterium linens. World academy of science, Engineering and Technology, 4: 1043-1045.
24. باقر، عبد الواحد، العبيدي، خالد عباس، محمد، يسرى خالد وطوبيا، نديم ميخائيل. كفاءة بعض عزلات خميرة *Saccharomyces cerevisia* المحلية وعزلة تجارية جافة لانتاج خميرة الخبز بعد تنميتها في مستخلص مخلفات صناعة الرز الحاوي على تراكيز مختلفة من المواد الصلبة الذائبة والبايوتين. (2002). مجلة علوم المستنصرية. (139)، (19): 1-9.
25. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers. P.A. and Smith, F. (1956). Phenol Sulfuric acid method for the determination of total carbohydrates, Anal. Chem, 28: 350-356.
26. Breed R.S., Murray, E.G.D. and Smith, N.R. (1957). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th Ed. William and Wilkins Company, Baltimore.
27. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H., Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994). "Bergey's manual of determinative Bacteriology". 9th Ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
28. Funke, G., Monnet, D., de Bernardis C., Graevenitz, A.V. and Freney, J. (1998). Evaluation of the Vitek 2 system for Rapid Identification of Medially Relevant Gram-Negative Rods. J. Clinical Microbiology, 36(7): 1948-1952.
29. Ingraham, J. L., Maaloe, O. and Neidhardt, F. C. (1983). Growth of the bacteria cell. Sinauer associates Inc. Publishers Sunder land and Massachusettes.
30. Goto, A. and Kunioka, M. (1992). Biosynthesis and hydrolysis of poly- (γ-glutamic acid) from Bacillus subtilis IFO 3335, Biosci. Biotechnol. Biochem., 56(7): 430-437.
31. Riviera, J. (1977). Industrial application of microbiology. Translated by Moss, M. O. and Surrey, J. E. University Press,166-169.
32. Nadeem, S., Niaz, B., Muzammil, H.M., Rana, S.S., Rajok, M.I. and Shakoori, A.R. (2011). Optimizing carbon and Nitrogen sources for L-Glutamic acid production by Brevibacterium strain NIABSS-67. Pakistan J. zool., 43(2): 285-290.
33. Eggeling, L., Pfefferle, W. and Saham, H. (2001). Amino acids. In "Basic Biotechnology". Ratledge, C. and Kristiansen, B., Cambridge Univ., Press. Combrigde, UK. 281-303.
34. Bajaj, I.B. and Singhal, R.S. (2009). Sequential optimization Approach for Enhanced production of poly (γ- glutamic acid) from Newly Isolated *Bacillus subtilis*. Food Technol. Biotechnol., 47(3): 313-322.
35. Shah, A. H., Ahmad, S. and Khan, G.M. (2002). Optimization of culture Conditions for L-lysine fermentation by *Corynebacterium glutamicum*. J. Biological Sciences. 2(3): 151-156.
36. Bala, S. (1976). Studies on the microbial production of Amino acids. Uineversity of the Punjab Lahore. Thesis of Ph.D.

جدول (1) نتائج الاختبارات الكيموحيوية لعزلات بكتريا *Bacillus subtilis* EN3

العزلة	الأختبارات													تخمر الكاربوهيدرات					الكشف النوعي*
	فحص الأوكسديز	فحص الكاتليز	فحص الأندول	فحص V-P	استهلاك السترات	تحلل النشأ	أختزال النترات	تحلل الكازين	تحلل الجيلاتين	اليوريز	اللستثيز	التموس	M R	كلوكوز	سكروز	لاكتوز	مانيتول	مانوز	
EN1	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-+
EN2	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	++
EN3	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+++
EN4	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	++
EN5	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	++
EN9	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+++
EN13	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-+
EN14	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	++
EN16	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	_	-	-	+	-	-	-	-+
EN17	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-+
EN19	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	++
EN20	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-+
EN21	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-+
EN24	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	++
EN25	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	++
EN28	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
EN29	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+++
EN30	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	++
EN33	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	- +
EN34	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	_	-	+	-	-	+	-	+++
EN35	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	++
EN38	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-+
EN39	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+++
EN40	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	++
A1	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	++

*A1 العزلة التجارية *Bacillus subtilis* A1 ، - لاتنتج ، - + انتاج ضعيف ، ++ انتاج متوسط ، +++ انتاج مقبول

جدول (2) نتائج الاختبارات الفسيولوجية لعزلات بكتريا Bacillus

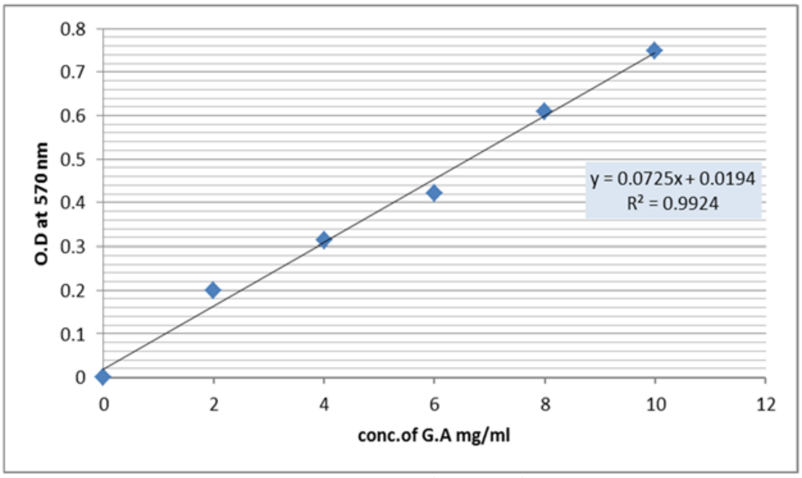
العزلة	تصبيغ كرام	تكون الأبواغ	الحركة	النمو بوجود % NaCL			النمو بحرارة مختلفة م°				النمو عند PH مختلف		
				%5	%7	%10	25	35	45	55	5	7	9
EN1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
EN2	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
EN3	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
EN4	+	+	+	+	+	-	- +	+	+	-	-	+	+
EN5	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
EN9	+	+	+	+	-	-+	+	+	+	-	-	+	+
EN13	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	- +	+	+
EN14	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
EN16	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
EN17	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+

+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	EN19
+	+	- +	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	EN20
+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	EN21
+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	EN24
+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	EN25
+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	EN28
+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	EN29
+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	EN30
+	+	-+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	EN33
+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	EN34
+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	EN35
+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	EN38
+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	EN39
+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	EN40
+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	A1

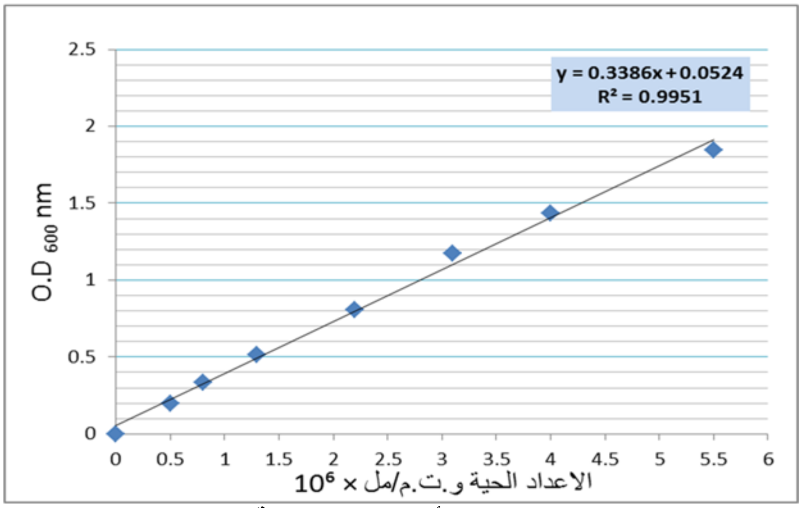
+ يوجد نمو   - لا يوجد نمو   +- نمو ضعيف

جدول (3) التغيرات الحاصلة على وسط انتاج حامض الكلوتاميك عند تحديد مدة الأنتاج المثلى

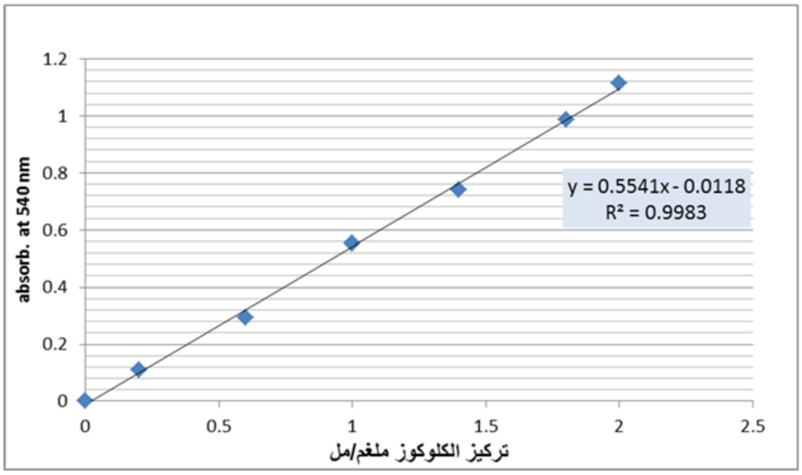
تركيز حامض الكلوتاميك (ملغم/مل)	كثافة النمو OD 600	تركيز الكلوكوز المتبقي (ملغم/ مل)	الرقم الهيدروجيني	مدة الحضن (ساعة)
0	0.05	100	6.5	0
0.6	0.4	90.8	6.81	12
2.02	1.06	78.12	5.63	24
4	2.11	75	5.38	36
6.2	2.17	61.85	5.21	48
6.73	2.21	47.5	5.18	60
7.2	1.928	31.7	5.12	72
4.55	1.78	9.14	5.77	84
2.11	1.702	4.05	7.02	96



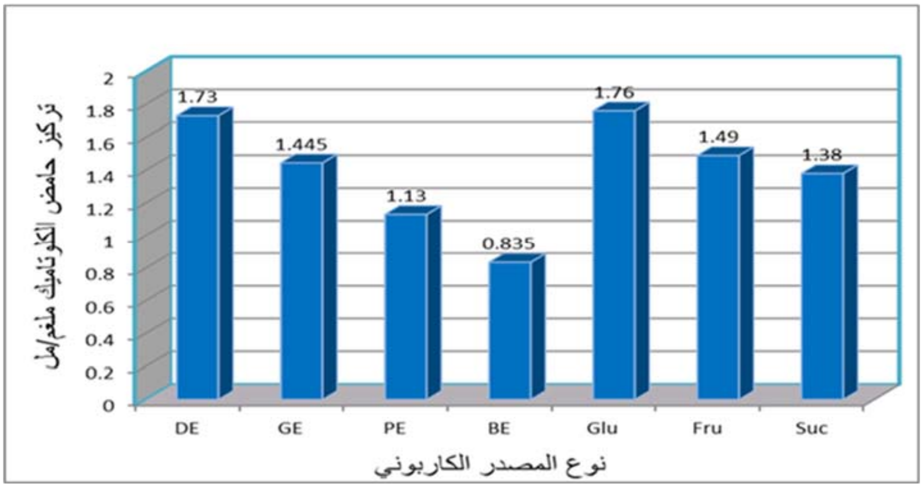
شكل (1) المنحنى القياسي لتقدير حامض الكلوتاميك



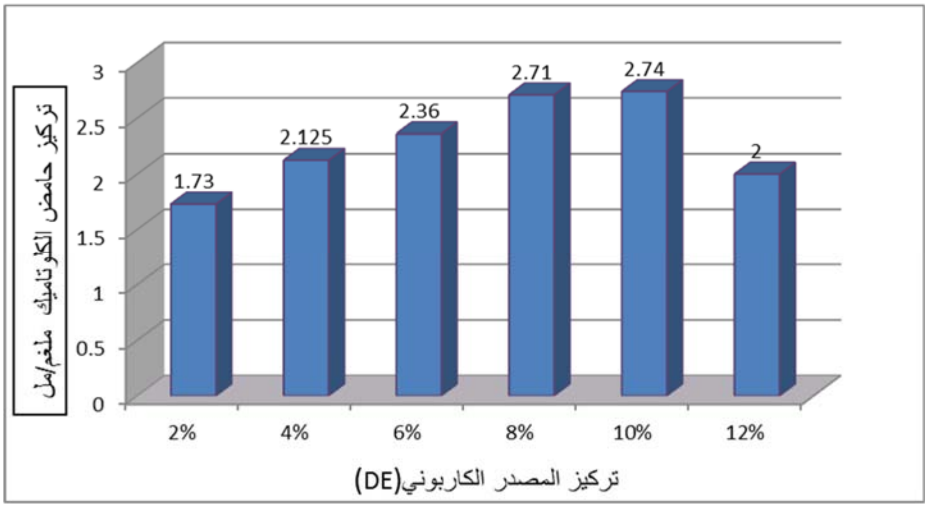
شكل (2) المنحنى القياسي لحساب أعداد الخلايا الحية لبكتريا ***B. subtilis*** **EN3**



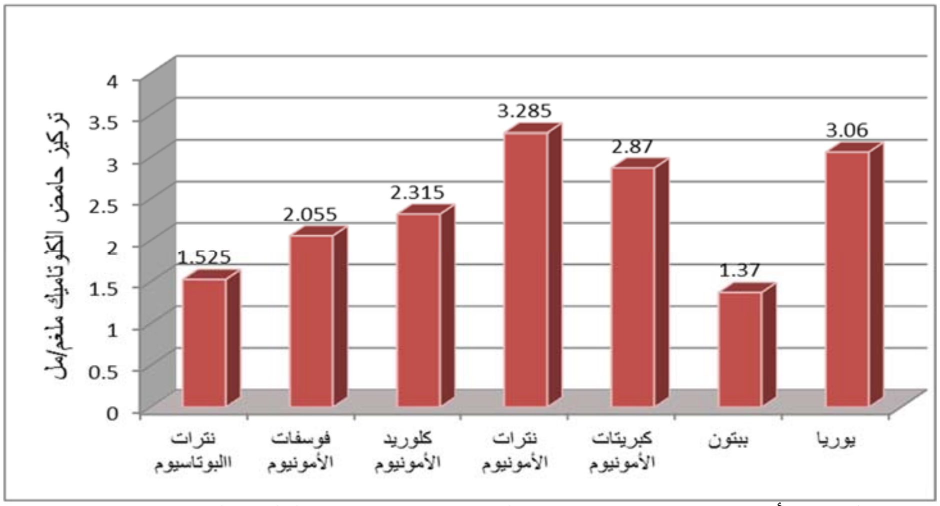
شكل (3) المنحنى القياسي لتقدير الكلوكوز المتبقي



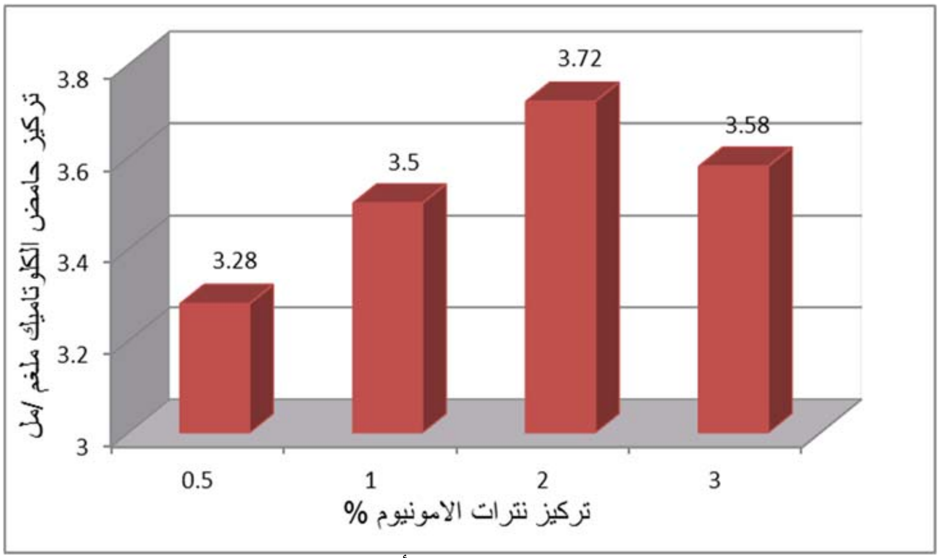
شكل (4) أنتاجية حامض الكلوتاميك من عزلة بكتريا *B.subtilis* EN3
بأستعمال مصادر كاربونية مختلفة



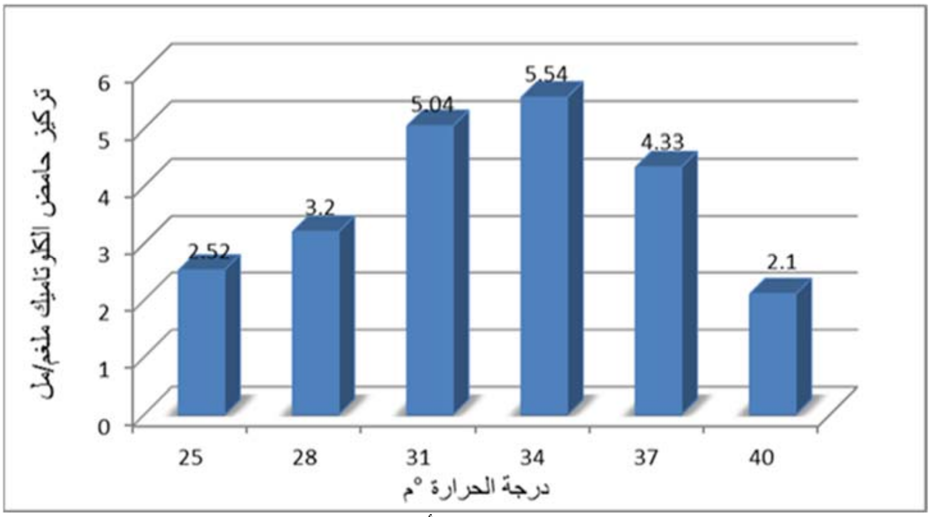
شكل (5) العلاقة بين تراكيز مختلفة من مستخلص مخلفات التمر DE
وانتاج حامض الكلوتاميك من بكتريا EN3



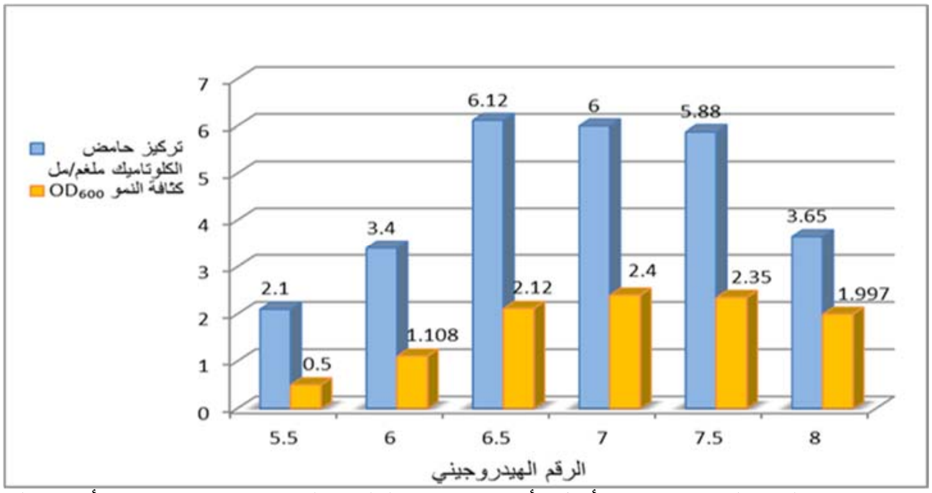
شكل (6) تأثير مصادر نتروجينية مختلفة في انتاج حامض الكلوتاميك من بكترياEN3
عند درجة حرارة 37° ورقم هيدروجيني 7



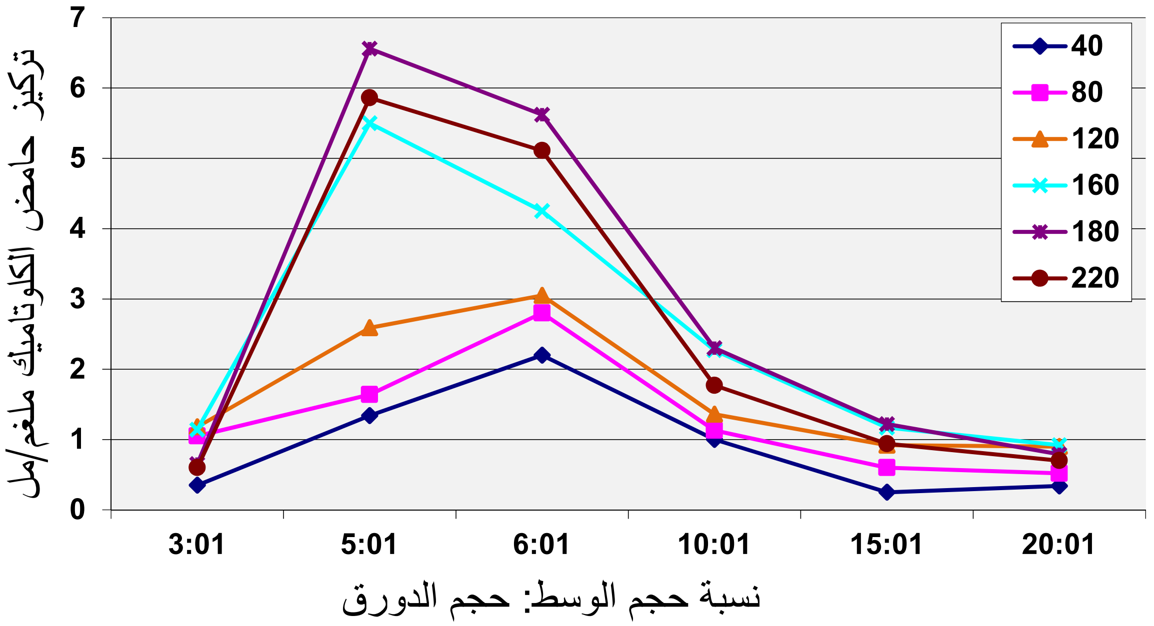
شكل (7) العلاقة بين تراكيز مختلفة من نترات الأمونيوم في انتاج حامض الكلوتاميك



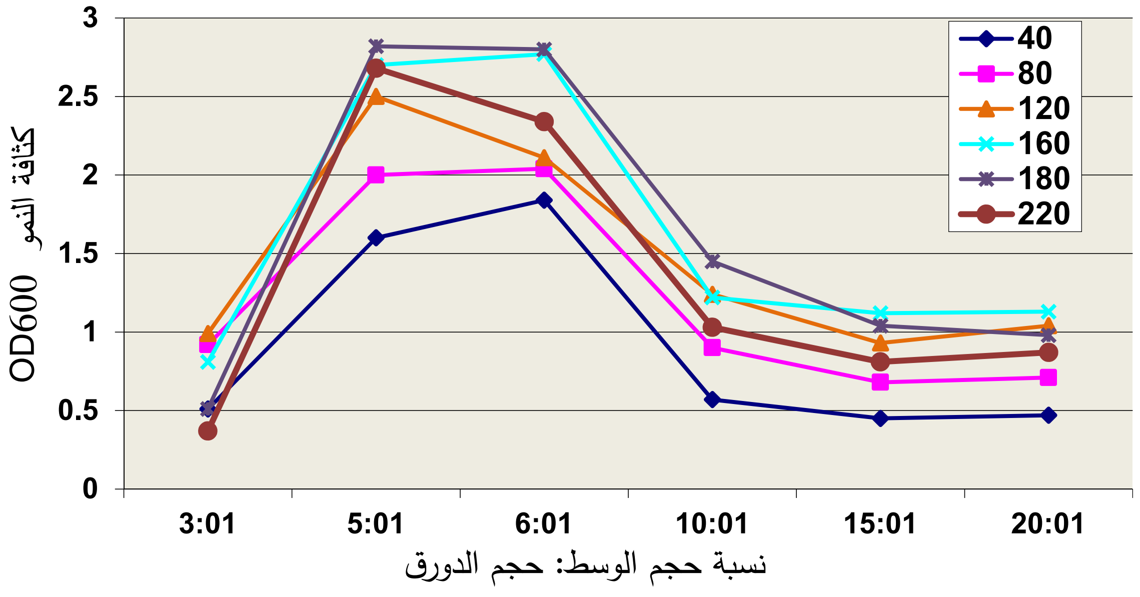
شكل (8) تحديد درجة الحرارة المثلى لأنتاج حامض الكلوتاميك من بكتريا EN
عند رقم هيدروجيني 7 ومصدر كاربون 10%



شكل (9) تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لأنتاج حامض الكلوتاميك من بكتريا EN3 وتأثيره على كثافة النمو عند درجة الحرارة المثلى 34°م



شكل (11) تاثير التهوية وشدة الحركة في انتاج حامض الكلوتاميك من بكتريا *B.subtilis* EN3



شكل (12) تأثير التهوية وشدة الحركة على كثافة نمو خلايا بكتريا *B.subtilis* EN3

Study Productivity of Glutamic Acid by *Bacillus subtilis* EN3 Isolated from the Soil

Eman J. Al-Attar
Nidhal M. Salih
Dept. of Food Science /College of Agriculture /University of Baghdad
Shaymaa H. Al-Rajhi
College of Pharmacy /University of Al Nahrain

Received in:6March2016, Accepted in :11May2016

Abstract

The genus Bacillus bacterium isolated from soil and tests their ability to produce glutamic acid, the bacteria are diagnosed by traditional methods and VITEK-2 system. And we studied the optimal conditions for production and try to improve the productivity of the isolation by manipulating the components of the production medium and of the circumstances environmental of production medium. There is 43 isolates of the 70 bacterial isolates belonging to the genus *Bacillus* depending on phenotypic characteristics of the colonies and microscopic characteristics and found that 13 isolated revert to species *B.subtilis* depending on physiological and biochemical characteristics. As well as on microscopic and biochemical tests, 13 isolates were subjected to the diagnostic by VITEK-2 system. The results showed that EN5 and EN3 diagnosed as *B.subtilis* as well as a commercial isolate A1 was also diagnosed as *B.subtilis* was selected EN3 isolation, as highest productivity (2 mg/ml).then optimal conditions was studied to produce glutamic acid by using the semi synthesis medium contained waste of extract dates (DE) as best Carbone source at 10% and use of ammonium nitrate as the best source of nitrogen at 2% from the production medium, and achieved better productivity of glutamic acid amounted to 7.2 mg/ml, at the temperature 34°C, pH initial 6.5, ventilation and agitation increase concentration of glutamic acid product when the proportion of medium size to the size of the flask 5:1 in the shaker incubator speeds of 180 rpm, for incubated period of 72 hours, were obtained, improvement rate was amounted to 360% from what was produced wild isolation**.**

Key words: Production of glutamic Acid, Diagnose *B.subtilis*, Fermentation, Carbon & Nitrogen source, TLC

Part of Ph.D. Thesis of the first author