دراسة تأثير بعض الأحماض الأمينية على النشاط النوعي لتوليد غاز ثاني أكسيد الكربون بواسطة بكتيريا *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* المعزولة من اللبن الخام

بن عمر شبة، الهواري بلمختار، مبروك كيحل
قسم العلوم الحياتية، كلية العلوم، جامعة وهران، الجزائر

الملخص

تعتبر أفراد جنس *Leuconostoc* sp بكتريات منتجة لحامض اللبن، وهي غير متجانسة التخمر ويمكن استعمالها في صناعة الأجبان الزرقاء نظرا لإنتاجها للنكهات وغاز الـ CO_2 المسبب للثقوب. تم في هذه الدراسة عزل وتوصيف سلالتين لهذه البكتريا من الحليب الخام للبقر، وتبين بعد المطابقة مع السلالة القياسية (L4) أنهما عبارة عن *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ودرست بعدها حركية الحموضة وحركية انتاج الـ CO_2 لهاتين السلالتين، وقد أظهرت النتائج تفوق السلالة HB1 في تكوينها للحموضة بواقع 43.43 ملليمول من اللاكتات في حين كانت كمية غاز ثاني أكسيد الكربون المنطلقة 7.27 ملليمول وذلك بعد سبع ساعات من التحضين وبمعامل ارتباط 0.94، كما دُرست في ذات الوقت حركية النمو حيث سجل توافق كبير بين الحركيات الثلاث. كما قدّر في هذه الدراسة النشاط النوعي لتوليد غاز الـ CO_2 باستخدام جهاز (Warburg) للسلالات الثلاث، وكانت الأحماض الأمينية المحفزة لزيادة توليد غاز ثاني أكسيد الكربون هي الفالين، التريبتوفان، سيستئين والفينايل ألانين وكانت قيم النشاط النوعي لتوليد الغاز للسلالتين المعزولتين كنسب مئوية من قيم النشاط النوعي المتحصل عليها للسلالة القياسية L_4 تجاه الأحماض الأمينية ذات التأثير الإيجابي على النحو الآتي: 30.27%، 7.60%، 90.42%، 16.58% بالنسبة للسلالة HB1 و0%، 0%، 22.85%، 21.32% بالنسبة للسلالة HB2. وذلك للأحماض الأمينية التالية: الفالين، التربتوفان، السيستئين والفينايل ألانين على الترتيب.

الكلمات الدليلية : الحليب، *Leuconostoc*، الأحماض الأمينية، غاز ثاني أكسيد الكربون وحامض اللاكتيك.

المقدمة

تعتبر أفراد جنس *Leuconstoc* بكتريات متغايرة التخمر يشيع استخدامها في صناعة الزبدة، الألبان، الأجبان المخللات (Patricia *et al.*, 1998, Ercolini *et al.*, 2003) والخمور (Wood 1998, Barrango *et al.*, 2002) الأغذية المتخمرة (Steinkraus 1996, Kim *et al.*, 2005) وفي حفظ الأعلاف (Yimin *et al.*, 1998) وذلك نظرا لما تحظى به هذه البكتريا من الخصائص التالية: القدرة التحميضية، انتاج النكهات (Fergal *et al.*, 2003)، تشكيل الخثرة المحبكة، انتاج الدكستران ذي الاستخدامات الغذائية والطبية (Jeanes 1977, Devoyod *et al.*, 1988) وإنتاج غاز الـ CO_2 المسبب للثقوب في الأجبان الزرقاء وهذه الخاصية لها أهمية كبيرة لدى مصنعي الأجبان. ولقد تطرقت بعض البحوث إلى دراسة بعض العوامل المساعدة على إنتاج غاز الـ CO_2 بواسطة جنس *Leuconostoc* (Holmes *et al.*, 1968; Gendrot *et al.*, 2002, Smit *et al.*, 2004) كما تطرق الباحث Kihal (1996) إلى دراسة تأثير المصادر الكربونية كالسكريات والأحماض العضوية وغيرها على إنتاج غاز الـ CO_2 بينما عمدنا في بحثنا هذا إلى عزل سلالات محلية من بكتريا *Leuconostoc* والتعرف عليها ثم دراسة حركيات النمو، الحموضة وإنتاج غاز الـ CO_2 ودراسة تأثير بعض الأحماض الأمينية على إنتاجه.

المواد وطرق العمل

١- السلالات البكتيرية

تم في هذه الدراسة استخدام سلالتين بكتيريتين من تحت النوع *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* ورمز إليهما HB1، HB2 على التوالي وعزلتا محليا من الحليب البقري الخام كما تم الاستعانة بسلالة قياسية من نفس النوع (L_4) وجلبت من مختبر الميكروبيولوجيا لجامعة ديجون Dijon بفرنسا. وتم حفظ هذه السلالات حفظا قصير المدى حسب طريقة (Accolas & Auclair 1967) وحفظا طويل المدى حسب (Mathot *et al.*, 1994).

٢- عزل وتعريف البكتريا

عزلت البكتريا من الحليب الخام للبقر على بيئة MRS المحتوية على ٠,٥% مستخلص خميرة ١,٠% مستخلص

اللحم ١,٠% عديد الببتون، ٠,٥% خلات الصوديوم، ٠,٢% سترات الصوديوم، ٢,٠% جلوكوز، ٠,٢% فوسفات البوتاسيوم الاحادية، ٠,٠٢٥% كبريتات المغنسيوم، ٠,٠٠٥% كبريتات المنغنيز ٠,١ مل من التوين ٨٠؛ ١,٥% أجار وضبط الـــ pH عند ٦,٢ وحضنت البكتريا على حرارة ٢٨°م لمدة ٢٤ ساعة.

وتم تعريف البكتريا بإجراء الاختبارات الكلاسيكية (Larpent & Courgand 1990) والاستعانة بتصنيف برجي. كما تم اختبار تخمير السكريات واستعمال السترات (Kemppler & Mac 1980) وإنتاج الدكستران (Elliker *et al.* 1956, Mayeux *et al.* 1962) واختبار الحساسية للمضادات الحيوية (Bauer *et al.*, 1966 and Bouquien *et al.*, 1989).

٣- تحضير الحليب منزوع القشدة

تم غلي ١٣٠ جراما من الحليب الجاف في ١ لتر ماء مقطر، وبعد نزع الطبقة الدهنية الطافية على سطح الحليب وزع على قوارير سعة ١٠٠ مل ثم عومل حرارياً في المعقم (الأوتوكلاف) على درجة ١١٥°م لمدة 15 دقيقة.

٤- التنشيط على الحليب

تم نقل البكتريا المنشطة سابقا على بيئة MRS إلى الحليب المعقم (٢٠ مل) المضاف له ٠,٣ مل مستخلص خميرة ١٠% (Holmes *et al.*, 1968) وبعد التحضين لمدة ١٨ ساعة على درجة ٢٨°م، أخذت عينة ١٠ مل بواسطة ماصة معقمة ثم أضيفت الى قارورة بها ١٩٠ مل حليب معقم، ثم وزعت هذه الكمية على ٢٠ أنبوبة بواقع ١٠مل / أنبوبة على درجة حرارة ٢٨°م في حضان لمدة ٢٤ ساعة. واستخدمت هذه الأنابيب في قياس الحموضة العيارية وكمية ثاني أكسيد الكربون المحررة على فترات زمنية منتظمة (كل ساعة) وفي نفس الوقت تم تقدير النمو البكتيري وذلك بإجراء التخفيفات المتسلسلة والزرع على بيئة MRS الصلبة كل ساعتين.

٥- قياس القدرة التحميضية

تم قياس القدرة التحميضية طبقاً للطريقة الموصوفة بواسطة Accolas *et al.* (1971) والتي تعتمد على التعادل القاعدي للحموضة المتكونة والمقدرة كدرجة دورنيك. (حيث أن ١ مل NaOH يوافق 10Do وهذه الأخيرة توافق ١٠ ملليجرام من حامض اللاكتيك المتحرر في ١ لتر من الحليب المتخمر).

٦- قياس كمية غاز ثاني أكسيد الكربون المنطلقة

تم تقدير كمية الغاز المنطلقة طبقاً للطريقة الموصوفة بواسطة Kihal (1996) والتي تعتمد على أنسياب السائل المحمض في سحاحة مدرجة تحت ضغط ثابت. ووحدة تقدير الغاز المحرر هي المليمول، حيث أن كل ١ مل من CO_2 يكافئ ٢٤,٧ ملليمول.

٧- دراسة تأثير الأحماض الأمينية على النشاط النوعي لتوليد الغاز:

تم باستخدام جهاز فاربورج (Warburg) وفق الخطوات الآتية:

أ - تحضير المحاليل

- محلول منظم المنجنيز الذى حضر بـــ ٢٠٠ مل K_2HPO_4 ٥٠ ملليمول pH ٥,٥ أضيف لها ٠,١ ملليمول $MnCl_2$.
- محلول منظم المنجنيز المحتوي على السكريات الذي حضر بـــ ٢٠ مل من البفر السابق اضيف لها ٦٠ مللي مول من سترات الصوديوم و٣٠٠ ميلى مول جلوكوز.
- محلول منظم المنجنيز المحتوي على الأحماض الأمينية الذى حضر بإضافة كل حمض أميني على حده بكمية ٦٠ مللي مول إلى ١٠ مل من محلول منظم المنجنيز وغلى على درجة ١٠٠°م لمدة ١٠ دقائق ثم عوملت كل المحاليل حرارياً على درجة ١١٠°م لمدة ١٠ دقائق.

ب- تحضير المعلق البكتيري

لقحت دوارق محتوية على ٤٠٠ مل مرق MRS بـــ ٥ مل من معلق السلالات المنشطة سابقا في مرق MRS ثم حضنت على درجة ٢٨°م لمدة ١٨ ساعة وبعد التأكد من تعكر الوسط وتوليد الغاز عند فتح الدوارق .تم عمل طرد مركزي لمدة ٢ دقيقة بسرعة ٣٠٠٠ دورة/ دقيقة وتم التخلص من الراشح وغسل راسب الخلايا بمحلول منظم المنجنيز ثم علقت الخلايا في ١٠ مل من نفس البفر ثم وزعت على أنابيب صغيرة وحفظت مجمدة.

ج- حساب الوزن الجاف للخلايا:

تم وزن الطبق (زجاجة ساعة) فارغا ثم وضع به ١٠٠ مايكروليتر من المعلق الخلوي المغسول جيدا وتم وزن الطبق بعد ذلك، ثم وضعت الأطباق في فرن باستور لمدة ساعة على حرارة ١٠٨°م وبعد التجفيف تم وزن الأطباق مرة ثانية، وحسب الوزن الجاف للخلايا.

د- تحضير المزيج التفاعلي:

من أجل قياس النشاط النوعي للمعلق الخلوي، حضر مزيج تفاعلي مكون من ٢,٢ مل من محلول منظم المنجنيز و٠,٢ مل من محلول منظم المنجنيز المحتوي على السترات والجلوكوز و٠,٢ مل من محلول منظم المنجنيز به الحمض الأميني المراد اختباره ثم أضيف٠,١ مل من المعلق الخلوي الذي كان محفوظاً بالتجميد. وتوازياً مع ذلك تم عمل بلانك (شاهد) باستخدام محلول منظم المنجنيز.

هـ- قياس كمية الغاز

استخدم جهاز فاربورج حسب الطريقة الموصوفة بواسطة Kihal (1996) لقياس كمية الغاز المتولد على فترات بينية قدرها ٢ دقيقة لمدة نصف ساعة ولكل حمض أميني على حده. ثم بعدها أجريت الحسابات اللازمة.

النتائج والمناقشة

أ - عزل وتعريف البكتيريا

تم عزل سلالتين محليتين من جنس *Leuconostoc* من الحليب البقري الخام وتم تعريفهما بالاختبارات الكيموحيوية الموصوفة في كتاب برجي (Buchanan & Gibbons 1974) (انظر الجدولين رقمي ١، ٢). كما أظهرت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية (الجدول رقم ٣) مقاومة السلالتين للمضاد الحيوى vancomycine الذى يعتبر عامل انتخاب لهذا الجنس (Benkerroum *et al.*, 1993, Mathot *et al.*, 1994) كما ظهرت مقدرة السلالتين HB1, HB2 على إنتاج الدكستران الذي يعتبر ميزة خاصة لتحت نوع *L.mesenteroides* subsp. detranicum مثل السلالة القياسية L4 (جدول رقم ١). وعليه فان محصلة نتائج تعريف السلالتين HB1, HB2 تشير الى كونهما *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*.

ب- حركيات انتاج الحموضة، انتاج الـ CO_2 والنمو

يتضح من المنحنيين (A), (B) في الشكل (١) والممثلين لإنتاج الحموضة وغاز الـ CO_2 على التوالي وجود توافق كبير بين حركيتي إنتاج حامض اللاكتيك وإنتاج غاز الـ CO_2 بواسطة السلالات الثلاث. وقد تأكد هذا أيضا من خلال التحليل الإحصائي المتمثل في حساب معامل الارتباط (r) لهاتين الصفتين والذي كان مساويا لـ ٠,٩٤، ٠,٩١، ٠,٩٨ للسلالات HB1 ,L4 ,HB2 على التوالي. كما يلاحظ من الشكلين السابقين أيضا تفوق السلالة HB1 فى إنتاجها العالي لكل من حمض اللاكتيك (٤٣,٤٣ ملليمول من حامض اللاكتيك) وغاز الـ CO_2 (٧,٧٢ ملليمول CO_2) بعد ٧ ساعات من التحضين وبمعامل ارتباط ٠,٩٤. أما السلالتين L_4، HB_2 فقد سجل بينهما تفاوت طفيف فيما يخص انتاج الحموضة وغاز الـ CO_2 حيث كانت قيمتهما على الترتيب: ٢٦,٨٨ ملليمول و ٥١ ملليمول بالنسبة للسلالة L_4 بينما كانت ٢٤,٤٤ ملليمول و ٤,٢ ملليمول بالنسبة للسلالة HB_2، ومن ناحية أخرى يظهر من المنحنيين (C)، (D) من الشكل (١) والممثلين للسرعات اللحظية لانتاج الحموضة والـ CO_2 اشتراك السلالات الثلاث في الزمن الأمثل (ساعة) لانتاج

جدول ١: الاختبارات الكيموحيوية التي أجريت على السلالات L_4، HB_1، HB_2

الاختبار	السلالات		
	L_4	HB_1	HB_2
١- صبغة جرام	+	+	+
٢- الكتاليز Cat	−	−	−
٣- الأكسيديز Oxy	−	−	−
٤- البيتاجلاكتوسيديز β. gla	+	+	+
٥- إنتاج الغاز	+	+	+
٦- النمو في الإيثانول ١٠%	−	−	−
٧- النمو عند : pH = 4.4	−	±	+
pH = 9.6	±	±	±
٨- النمو في NaCl بتركيز ٦,٥%	±	±	±
٩- استعمال الأرجنين	-	−	−
١٠- استعمال الفركتوز	+	+	+
١١- استعمال السترات	+	+	+
١٢- انتاج الدكستران	+	+	+

جدول٢: تخمير السكريات

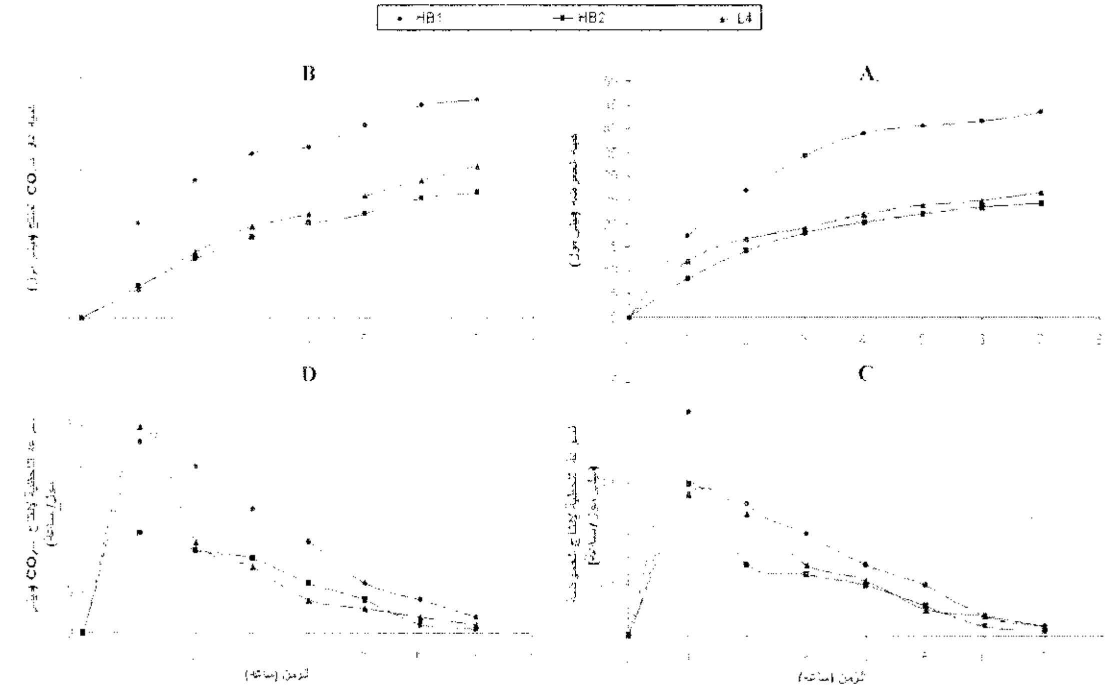
إنتاج الحمض من		السلالات		
		L_4	HB_1	HB_2
أرابينوز	L.Arabinose	−	−	−
فركتوز	D.Fructose	+	+	+
تريهالوز	Trehalose	+	+	+
سيلبيوز	Cellobiose	d	d	d
دكستروز	Dextrose	d	d	d
مالتوز	Maltose	+	+	+
سكروز	Sacharose	+	+	+
لاكتوز	Lactose	+	+	+
رافينوز	Rafinose	−	d	+
جالاكتوز	Glactose	+	d	+
ليفيلوز	Luvelose	+	+	+
مانيتول	Manitole	−	d	+
سوربيتول	Sorbitole	+	d	d

+ : موجب − : سالب d أو ± : التفاعل بطئ أو متغير حسب السلالات

جدول ٣: نتائج حساسية السلالات للمضادات الحيوية

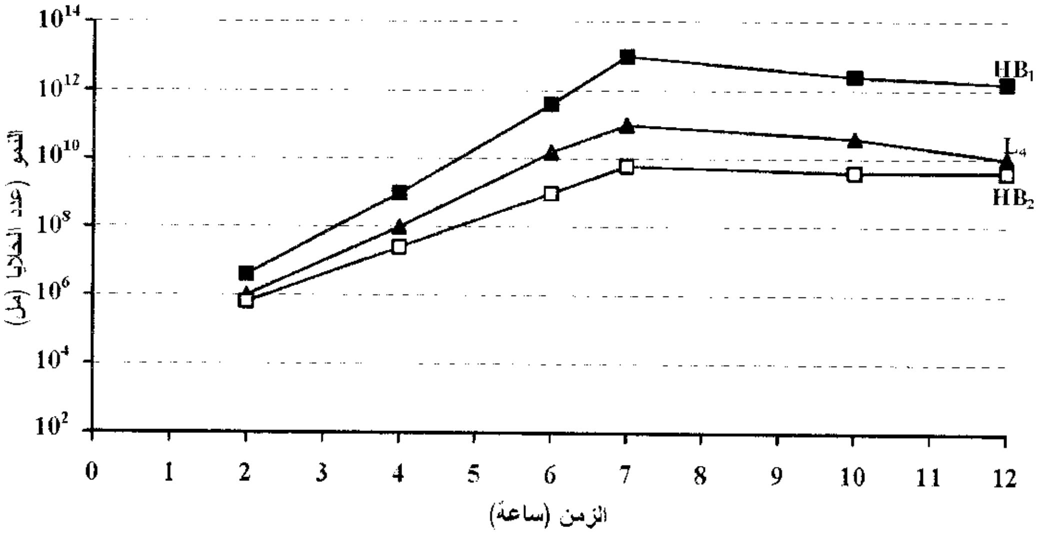
المضاد الحيوي	رمزه	تركيزه	السلالات		
			L_4	HB_1	HB_2
Vancomycine	VAN	30 µg	م	م	م
Streptomycine	S	10 UI	م	م	م
Gentamycine	GM	10 UI	ح	ح	ح
Pristinamycine	PT	15 µg	ح	ح	ح
Tetracycline	TE	30 UI	ح	ح	ح
Ac.Nalidixine	Na	30 µg	م	م	م
Sulfamides	SSS	200 µg	م	م	م
Virginiamycine	VG	15 µg	ح	ح	ح
Amoxilline	AMX	25 µg	م.ح	ح	ح
Oxytetracycline	OT	30 UI	ح	ح	ح
Amikacine	AN	30 µg	م	م	م

م: مقاومة ح: حساسة م.ح: متوسطة الحساسية



شكل ١: حركيات إنتاج الحموضة وغاز CO_2 والسرعات اللحظية لهما

حمض اللاكتيك وغاز الـــ CO_2 وهو الزمن الموافق للسرعة العظمى للإنتاج. وعموما كانت قيم السرعات اللحظية لإنتاج الحموضة والـــ CO_2 للسلالات الثلاث HB_1، HB_2، L_4 على الترتيب التالي (٢,٢، ١,٤، ١,٣) ملليمول لاكتات/ساعة و(٢,٣، ١,٢، ٢,٥) ملليمول CO_2/ ساعة. وبما أن حامض اللاكتيك وغاز الـــ CO_2 هما الناتجان الرئيسيان لتخمير كلا من اللاكتوز والسترات فإن الزيادة فيهما دلالة على النمو المتزايد للبكتيريا (Salou *et al.*, 1994, Bourel *et al.*, 2001) وإلى جانب التوافق الذي سجل بين حركيتى إنتاج الحمض والغاز سجل أيضا انسجام كبير لحركية النمو معهما وهذا واضح من الشكل رقم (٢) الذي يُبرز التزايد المستمر لأعداد الخلايا للسلالات الثلاث.



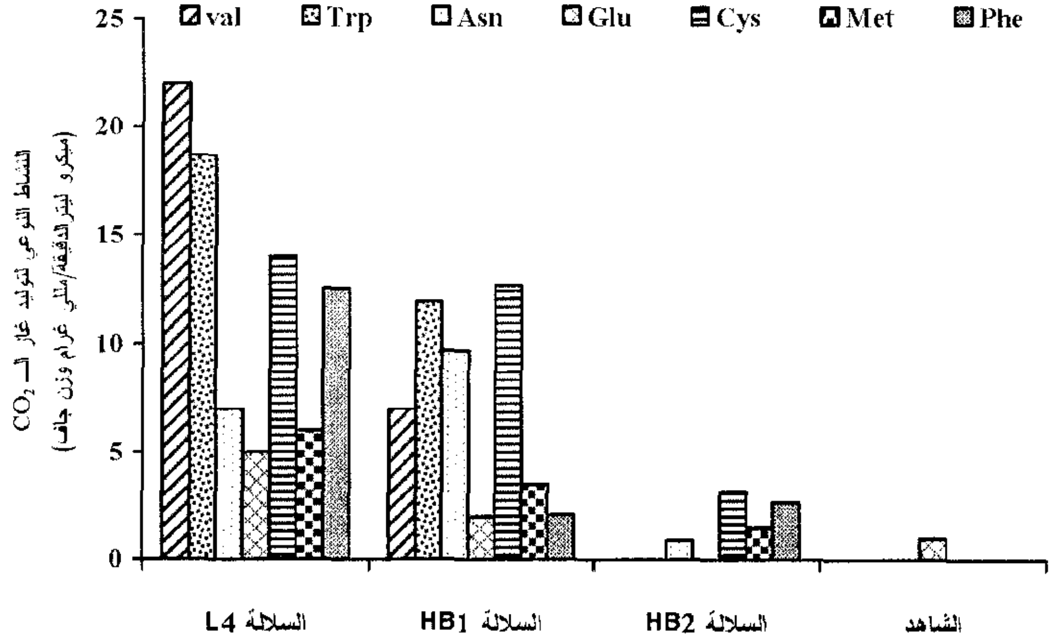
شكل ٢: حركية النمو للسلالات الثلاث HB_1، HB_2، L_4

يمكن تفسير التوافق والانسجام الكبير الملحوظ بين حركيات النمو، الحموضة وإنتاج غاز ثاني أكسيد الكربون بارتباطها الوثيق واعتماد كل حركية على الأخرى حيث أن حركتي إنتاج غاز الـ CO_2 والحموضة ترتبطان بهدم السترات واللاكتوز والذي يتوقف على الكثافة البكتيرية للبادئ والتي حددت بما لا يقل عن ٦×١٠[٦] وحدات مكونة للمستعمرة/مل من الحليب وهو العدد المطلوب لتشكيل الثقوب في الأجبان. وتجدر الإشارة أيضا إلى كفاءة طريقة انسياب السائل المحمض في السحاحة لتقدير غاز الـ CO_2 والمستخدمة في هذا البحث والموصوفة من قبل Kihal (1996).

ج - تأثير بعض الأحماض الأمينية على النشاط النوعي لتوليد غاز الـ CO_2

أظهرت النتائج الممثلة في الرسم البياني بالشكل (٣) والجدول رقم (٤) تأثيراً متفاوتاً للأحماض الأمينية على النشاط النوعي لتوليد غاز الـ CO_2 لكل من السلالات الثلاث حيث يلاحظ انفراد السلالة L_4 بأقصى نشاط نوعي محفز لكل من الأحماض الأمينية التالية: فالين Val، تريبتوفان Trp، سيستئين Cys، فينايل الأنين Phe، اسباراجين Asn، ميثيونين Met، وحمض الجلوتاميك Glu والتي كانت قيمتها المقدرة بالمايكروليتر/ دقيقة/ ملليجرام من الوزن الجاف على النحو التالي: ٢٢,٠، ١٨,٦، ١٤,٠، ١٢,٦، ٦,٦، ٦,٠، ٤,٦ ثم تليها السلالة HB_1 بنشاط نوعي متوسط لتوليد الغاز بتحفيز الأحماض الأمينية التالية وعلى النحو التالي: Asn (٩,٠٠)، Val (٦,٦٠)، Met (٢,٦٦)، Cys (١٢,٦٦)، Trp (١١,٣٣).

أما فيما يخص السلالة HB2 فقد اتسمت بنشاط نوعي ضئيل لتوليد الغاز بالنسبة لبعض الأحماض الأمينية بينما كان منعدما بالنسبة لبعضها الآخر حيث كانت القيم (٣,٢، ٢,٧، ١,٥، ١,٣٣) وبالنسبة لـ Cys، Phe، Met، Asn على التوالي. أما الـ Trp، Glu، Val فكان نشاطها النوعي معدوما وعلى العموم فقد كان النشاط النوعي للسلالات الثلاث محسوساً مقارنة بالمعاملة القياسية ولوحظ أن كلا من الـ Val، Cys، Trp أعطت نشاطا نوعيا مقبولا لتوليد غاز الـ CO_2 للسلالات الثلاث. ويمكن تفسير تفوق السلالات المعزولة خاصة HB_1 على السلالة القياسية L_4 في إنتاج ثاني أكسيد الكربون عند استخدام المصادر الكربونية وحدها إلى فروق متعلقة بالسلالات نفسها حيث يبدو أن السلالة HB_1 تفضل المصادر الكربونية المتمثلة في الجلوكوز والسترات فقط في إنتاج غاز الـ CO_2 حيث أن إضافة الأحماض الأمينية لها قد شجع نموها على حساب الإنتاج (catabolite repression) بينما السلالة القياسية L_4 فيبدو أن إضافة الأحماض الأمينية لها يعتبر فعلا عاملا محفزاً لزيادة إنتاجها لغاز الـ CO_2 لأنها تعتمد عليها كمصادر ثانوية وإضافية لإنتاج غاز الـ CO_2 عن طريق عمليات إزالة مجاميع الكربوكسيل منها على شكل غاز ثاني أكسيد الكربون، وبالتالي يرتفع الإنتاج. ويوضح الباحث Garvie (1967) الاختلاف بين أفراد جنس *Leuconostoc* من حيث احتياجها للأحماض الأمينية ويقسمها



شكل ٣: تأثير بعض الأحماض الأمينية على النشاط النوعي لتوليد غاز الـ CO_2 بواسطة السلالات L_4، HB_1، HB_2

جدول ٤: تأثير بعض الأحماض الأمينية على النشاط النوعي لتوليد غاز الـCO_2 بواسطة السلالات L4، HB1، HB2

النشاط النوعي لتوليد غاز الـCO_2 (µM/دقيقة/مغ)					
الحمض الأميني المحفز	L4	الحمض الأميني المحفز	HB₁	الحمض الأميني المحفز	HB₂
Val	٢٢,٠	Cys	١٢,٦ (%٩٠,٤٢)**	Cys	٣,٢ (%٢٢,٨٥)
Trp	١٨,٦	Trp	١١,٣ (%٦٠,٧٠)	Phe	٢,٧ (%٢١,٣٢)
Cys	١٤,٠	Asn	٩,٠ (%١٣٥,٠)	Met	١,٥ (%٢٥,٠٠)
Phe	١٢,٦	Val	٦,٦ (%٣٠,٢٧)	Asn	١,٣٣ (%١٩,٩٦)
Asn	٦,٦	Met	٢,٦ (%٤٤,٣٣)	Glu	٠
Met	٦,٠	Phe	٢,١ (%١٦,٥٨)	Val	٠
Glu	٤,٦	Glu	٢,٠ (%٤٢,٩٠)	Trp	٠

** الأرقام التي بين الأقواس تمثل قيم النشاط النوعي لتوليد الغاز للسلالتين المعزولتين كنسب مئوية من قيم النشاط النوعي المتحصل عليه في العزلة القياسية L4

إلى فئتين، فئة أكثر تطلبا (تحتاج من٧ إلى ١٦ حامض أميني) وتشمل الأنواع غير المنتجة للدكستران ونخص بالذكر *L. paramesenteroides* وفئة اقل تطلبا (تحتاج لأقل من ٨ أحماض أمينية) وهي المنتجة للدكستران والمتمثلة في النوع *L. mesenteroides* ومن جهة أخرى أشار الباحث Holmes وأخرون (1968) الذين درسوا العوامل المؤثرة على إنتاج غاز الـ CO_2 بواسطة *Leuconostoc citrovorum* بأن إضافة ٠,٢٥ % من مستخلص الخميرة الغني بالأحماض الأمينية يحفز إنتاج غاز الـ CO_2 بنسبة ١٦,٠%، كما أشار الباحث Smith وأخرون (2004) إلى أهمية نقل وأيض الأحماض الأمينية في إنتاج غاز CO_2 والنكهات في منتجات الألبان . وإلى جانب هذا أشار Cogan (1992) إلى أن تقدير النشاط النوعي لتوليد الغاز في جهاز المبادلات الغازية التنفسية يتطلب تواجد بعض العوامل مثل NAD و$MnCl_2$ اللذين يسمحان بأكسدة حمض الكربونيك H_2CO_3 المتولد في الوسط إلى CO_2. كما انه أشار إلى الدور الإيجابي لأيونات Mn^{2+} على استعمال السترات وإنتاج الاستوين بواسطة *L. mesenteroides susbsp cremoris* التي نمت في وسط الحليب المدعم بمستخلص الخميرة كما أوضح Dong وأخرون (2000) تأثير العناصر المعدنية والـ pH على نمو وبقاء *L. mesenteroides*. كما تم التوصل من خلال هذه الدراسة إلى تحديد بعض الظروف المثلى للنشاط النوعي الأقصى لتوليد الغاز والمتمثلة في: درجة الحرارة المثلى: ٢٠-٢٥°م، الـ pH الأمثل (٥,٥)، الوزن الجاف، حيث لوحظ أنه من خلال تركيز خلوي يقارب1.2 ملجم/مل يمكن مراقبة قياس النشاط النوعي لتوليد الغاز ، وكذا الركيزة المضافة حيث لوحظ أن إضافة بعض الركائز (سكريات، أحماض عضوية، أحماض أمينية) إلي مزيج التفاعل من شأنه تحفيز النشاط النوعي كما هو الحال عند إضافة السترات إلى المصدر السكري وهذا يعزى إلى إنتاج الـ ATP من مسار الاسيتات كيناز أو حث بعض الأنزيمات المحفزة لاستقلاب الركيزة المضافة (Cogan 1981, Cogan 1987) كما أكد Kihal (1996) أن للظروف السابقة للتحضين دورا فعالا في توليد الغاز حيث لاحظ أن النشاط النوعي لتوليد الغاز من سكرين معينين يرتفع ارتفاعا محسوسا لا سيما لو تمت تنمية الخلايا على بيئة MRS محتوية على هذين السكرين.

REFERENCES

Accolas, J.P & Auclair, **1967.** conservation a létat conglcé de suspensions de bacteries lactiques concentriques sous faible. volume I bacteries lactique mesophiles. Le Lait. **463**: 253 – 259

Accolas, J.P., Veaux, M. & Auclair, J. **1971.** Etude des interaction entre divers bacteries lactiques thermophiles, en relation avec la fabrication des fromage a pate cuit. Le Lait. **51**: 249 - 272

Barrango, R., Yoon, S., Breidt, F., Henry, Jr., Fleming, P. & Tood, R.K. **2002.** Identification and characterization of *Leuconostoc fallax* strains isolated from an industrial sauerkraut fermentation. Appl. Envir. Microbiol. **68**: 2877–2884.

Bauer, A.N., Kerby, W.M , Sherris, J.C. & Turk, M. **1966.** Antibiotic susceptibility testing by standardized single disc method. Ann. Clin. Pathol. **45**: 493 – 496

Benkerroum, N; Misbah, M, Sandine, W.E. & Tantaoui, A. **1993.** Developpement and use of selective medium for isolation of *Leuconostoc* Sp. from vegetable and dairy product. Appl. Environ . Microbiol. **59**: 607 – 609

Bosset, J. D, Paucharo, J.P & Gauhr. **1986.** Application d'une electrode sensible ala pression partielle de dioxyde de corbone au dosage "in – situ" de se composant dans quelques produits laitiers fermentes. Le Lait. **66:** 353 – 370.

Bouquien, C. Y; Desmazeaud, M-D & Corrieuc **1989.** Caracterisation d'une aminopeptidase chez *Streptococcus cremoris AM2* et d'une α- galactosidase chez *Leuconostoc lactis CNRZ 1091*. Le Lait **69**:71 – 81.

Bourel, G., Henini, S., Krantar, K., Oraby, M., Divies, C. & Garmyn, D. **2001.** Mètabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*. Le Lait **81**: 75 – 82.

Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. **1974.** Genus *Leuconostoc* in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol **II**. pp 1071 – 1075, William, Wilkins and Baltimore.

Cogan, T.M. **1981.** Constitutive nature of enzymes of citrate metabolism in *Streptococcus, Lactis* subsp. *diacetylactis*. J. Dairy . Res. **48**: 489 – 495.

Cogan, T.M. **1995.** Flavour production by dairy starter cultures. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. **79**: 495 – 645.

Cogan, T.M. **1987.** Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc*. sp. effect on growth, substrates and products. J. Appl. Bacteriol. **63**: 551 – 558.

Devoyod, J.J. & Pollain, F. **1988.** Les leuconostoc proprietés: leur role en technologie laitiere. Le Lait **39**: 249 – 280

Dong, S.K; steven, T. & Scott, F. **2000.** Effect of pH and trace mineral on long term starvation of *Leuconostoc mesenteroides*. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 976 – 981.

Elliker, P. R ; Anderson, A.W. & Hannesson **1956.** Agar medium for lactic bacteria. J. Dairy Sci. **39**: 1911 – 1615

Ercolini, D., Hill, P.J. & Dodd C.R. **2003.** Bacterial community structure and location in silton cheese. Appl. Envir. Micobiol. **69**: 3540 – 3548.

Fergal, P, R., Dorte, M. P., Diana, L. & Dan, N. **2003.** Plasmid encoded diacetyl (acetoin) reductase in *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Appl. Envir. Microbiol. **69**: 304 – 311.

Garvie, E.I. **1967.** The growth factor and amino acid requirement of species of the genus *Leuconostoc* including *Leuconostoc paramesenteroides* and *Leuconostoc oenos*. J. Gen. Microbiol . **48**: 429 – 447

Gendrot, F., Foucaud – Scheunemanm, C., Ferchichi, M. & Hemme, D. **2002.** Characterization of amino acid transport in the dairy strain *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides CNR Z1273*. lett. Appl. Microbiol. **35** (4): 291 – 5.

Holmes, B, Sandine, W.E. & Elliker, P.R. **1968.** Some factors influencing carbon dioxide production by *Leuconostoc citrovorum* . Appl. Microbiol. **1**: 56 – 61

Jeanes, **1977.** Fermentation broth rhealogy during dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* B512 (F) as a possible tool for control. Appl. Microbial Biotechnol. (1993) **40**: 251 – 257

Kemppler, G.M & Mackey, L.L. **1980.** Improved medium for detection of citrate fermenting *Streptococcus lactis subsp diacetylactis*. Appl. Microbiol. **49**: 926 – 927

Kihal, M. **1996.** Etude de la Production du Dioxide de Carbon par *Leuconostoc mesenteroides*. Elements d' Application en Technologie Fromagére Type Fromage Bleu. Thése de Doctorat d etat. universite d Oran. Algerie.

Kim, J., Chun, J. & Han, H. **2005.** *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. Inter. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology **150**: 1915 – 1919.

Kneifer, W. & Grentner, I. **1992**. A simple method for estimating the corbon dioxyde product of mesophilic starter cultures. Milchwissensschuft. **47**: 708 – 711

Larpent, J.P., & Courgand, M.L. **1990.** Memento de Microbiologie 2[eme] edition. Technique et Documentation Lavoisier

Mathot, A.G., Kihal, M., Prevost, H. & Divies, C. **1994**. Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar media. Int. Dairy. J. **4**: 459 - 469

Mayeux, J., Sandine, W. & Elliker, P. **1962.** A selective medium for detecting *Leuconostoc* organism in mixed strain starter cultures. J. Dairy. Sci . **45**: 655

Patricia, R.M., Leocadio, A., Gonzalaz, D.D. & Delos Reyes, C.G. **1998.** Growth and metabolic activity of cheese starter in CO_2 - acidified and non-acidified refrigerated milk. European Food Research and Technology. **206** (3): 197–183

Salou, P., Loubiere, P. & Pareilleux, A. **1994.** Growth and energetic of *Leuconostoc* during co metabolism of glucose with citrate or fructose Appl. Environ. Microbiol. **60**: 1459 – 1466

Smit, B.A., Engels, W., J., Wouters, J.T. & Smit, G. **2004.** Diversity of L-leucin catabolism in various microorganisms involved in dairy fermentation, and identification of the rate. Controlling step in the formation of the potent flavour component 3-methyl butanal. Appl. Microbial. Biotechnol. **64** (3): 396-402.

Steinkraus, K.H. **1996** Handbook of Indigenous Fermented Food. 2[nd] (ed) revised and Enlarged – New York, Marcel Dekk. p. 776.

Wood, A. **1998.** Microbiology of fermented food 2[nd] (ed), London, UK Science Academic, Vol. **1** and **2**

Yimin, C., Yoshimi, B., Masuhiro, O., Sodahiro, O., Sumio, K. & Takashi, N. **1998.** Influence of *Lactobacillus* spp. from an inoculant and *Weissella* and *Leuconostoc* spp. from forage crops on silage fermentation. Appl. Envir. Microbiol. **64**: 2982 – 2987.

Effect of Some Amino Acids on CO_2 Production by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* Isolated from Raw Milk

Cheba, B.O., E. Belmokhtar. & M. Kihal

Biological Science Dept., Fac. of Science, Oran University, Algeria

ABSTRACT

The members of the genus *leuconostoc* are heterofermentative lactic acid bacteria and play an important role in the dairy industry. The most important functions of this bacteria are their ability to produce CO_2 and flavour compounds through lactose and citrate metabolisms. The gazogenesis activity of these genus is responsible for the type of slits open formed in cheese curd .

The present study aimed to investigate the effect of some amino acids on gazogenesis activity. Two strains of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* were isolated from raw cow milk of Ain-Turk-region. - Oran - Algeria. The maximal speeds of lactate and CO_2 production after 1 hour incubation at 30°C were 2.2 mM lactate/hr and 2.3 mM CO_2/hr, respectively with correlation coefficient of 0.94.

The amino acids valine, tryptophan, cysteine and phenylalanine exhibited the most efficient stimulating effect on CO_2 production measured by Warburg apparatus. The gazogenesis activity of the two isolated strains as percentage of gazogenesis activity of the standard strain L_4 were: 30.27%, 60.7%, 90.42% and 16.58% for the strain HB_1 and 0%, 0%, 22.85%, 21.32% for the strain HB_2 for valine, tryptophan, cysteine and phenylalanine, respectively.