الإنتاج الحيوي للتربتوفان من دبس التمر باستخدام عزلات من جراثيم الـ *Escherichia coli*

لما عساف*[(1)] وبتول أوزون[(1)]

(1). قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة حلب، حلب، سورية.

(* للمراسلة: د. لما عساف، البريد الإلكتروني:Lamaassaf403@gmail.com، 0955552432)

تاريخ الاستلام: 2023/03/11 تاريخ القبول:2023/06/11

الملخص:

أجريت الدراسة في مخابر كلية الأغذية – قسم علوم الأغذية –جامعة حلب – سورية. وكانت حول طرائق إنتاج الحمض الأميني التربتوفان من دبس التمر باستخدام جراثيم *Escherichia coli*. تم نقل لقاحة من السلالة النقية لجراثيم *E.coli* على وسط الاغار المغذي (NA) التي تحتوي على ملح كلوريد الصوديوم بتركيز 0.5% وزن / حجم لتنشيط إنتاج الحمض الأميني التربتوفان، ونقلت الى الحاضنة، ثم أخذت لقاحة من المستعمرات النامية، ووضعت في 100مل وسط سائل محفز لإنتاج حمض التربتوفان والذي نقل الى حاضنة هزازة مضبوطة على حرارة 37 درجة مئوية لمدة 6 ساعات بسرعة 150 دورة في الدقيقة، ثم كررت العملية على الوسط نفسه وبعدها أخذت الجراثيم بعد ترشيح الوسط السائل وتم نقلها الى وسط التخمير المولاسي لإنتاج التربتوفان، وتم التأكد من إنتاج التربتوفان بالعودة الى بعض الاختبارات الكيميائية، وبالعودة الى المنحنى البياني الناتج بين قيم الامتصاصية وقيم تركيزات محاليل التربتوفان المعياري تبين أن تركيز التربتوفان في وسط التخمير المولاسي هي 0.1 ملغ/مل

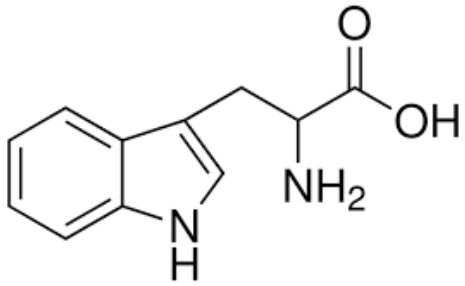
الكلمات المفتاحية: *Echerichia coli*، الحمض الأميني، التربتوفان، دبس التمر.

المقدمة :

يعد التربتوفان حمضاً أمينياً ضرورياً، أي لا يمكن اصطناعه في الجسم بل يجب الحصول عليه من مصدر خارجي كالغذاء، حيث يمتلك سلسلة جانبية هي أكبر سلسلة جانبية عطرية (أروماتية) في الحموض الأمينية (ألفا) وهذه السلسلة مكونة من حلقتين إحداهما سداسية والأخرى خماسية، كما يشكل النتروجين أحد أركانه فهو يصنف من الحموض الأمينية الكبيرة الكارهة للماء. وللحمض صيغة جزيئية ($C_{11}H_{12}N_2O_2$)، وللحمض دور في تكوين الناقل العصبي المحفز (سيروتونين) Sertonin عن طريق نزع مجموعة الكربوكسيل من الحمض الأميني التربتوفان، كما يعد عاملاً يستخدم في المجالات الصيدلانية وخصوصاً في الطب العصبي، و يضاف إلى منتجات الأعلاف كداعم للغذاء، علاوة على ذلك، فإنه شائع الاستخدام في التقانة الحيوية (Mateos *et al.*, 2009).

نظراً لأهمية حمض التربتوفان Tryptophan للجسم كونه من الحموض الأمينية الضرورية، هناك العديد من الدراسات والأبحاث التي تهتم بإنتاجه، وبعض الدراسات ركزت على إنتاجه عن طريق بكتريا العصيَة القولونية *Escherichia coli* حيث تنشط هذه الجراثيم على وسط تخمير (دبس التمر) الحاوي على حمض أميني (السيرين) والأندول، فتعمل بوجود السيرين والأندول

وبواسطة أنزيم التربتوفاناز triptophanase المنتج من هذه الجراثيم لإعطاء التربتوفان (Fernstrom, 1988). ويوضح الشكل رقم (1) الصيغة التفصيلية للتربتوفان



الشكل (1):الصيغة التفصيلية للحمض الأميني التربتوفان

ولتلبية الطلب المتزايد من التربتوفان، تم تطوير مجموعة واسعة من الأساليب الكيميائية والتكنولوجيا الحيوية، فكان التصنيع الكيميائي أول الطرائق المطبقة على النطاق الصناعي. بحلول نهاية الثمانينات تم إنتاج الحمض الأميني التربتوفان من خلال سلسلة من العمليات الكيميائية والانزيمية والتخميرية، حيث كان الإنتاج الأنزيمي للتربتوفان يتضمن خطوة تفاعل واحدة فقط، ويمكن إجراؤه باستخدام أنزيمات نقية معزولة (Tryptophan synthase or tryptophanase) أو بواسطة مجموعة متنوعة من الأحياء الدقيقة التي تفرز الأنزيمات إلى وسط التفاعل، ومن أكثر الأحياء الدقيقة المستخدمة لإنتاج الحمض الأميني التربتوفان هي *Escherichia coli* (Bhattacharyya *et al*, 2015).

تحوي جراثيم *E.coli* على النظام الأنزيميTryptophan-Synthaseاو Tryptophanase لإنتاج التربتوفان وفقا للتفاعل (سيرين+الإندول) حيث يحفز أنزيم Tryptophan synthase على إنتاج التربتوفان، ويزداد إنتاج التربتوفان من جراثيم الـ*E.coli* عند وجود الركائز الأساسية سابقة الذكر، وإن معظم إنتاج التربتوفان يتم عن طريق التخمر الحيوي بشكل رئيسي. وفي هذه إحدى الدراسات وجد أن دبس التمر باستخدام جراثيم الـ *E.coli* يمكن أن يشكل ركيزة جيدة ليس فقط كمصدر للكربون ولكن أيضا كمصدر للسيرين لإنتاج التربتوفان (Van der Heijden *et al*, 2005).

الصفات العامة لجراثيم *E.coli*:

صنفت الـ *E.coli* حسب تصنيف العالم برجي Bergeys manual ضمن العائلة المعوية(Garrity *et al*., 2005)

هي عبارة عن عصيات سالبة لصبغة غرام، متحركة بوساطة الأسواط المحيطية peritrichous flagella التي تحيط بكامل الجسم وغير مكونة للأبواغ، مستعمراتها ملساء ناعمة ومحدبة قليلاً، رطبة، غير مخاطية أو مخاطية عند امتلاكها للمحفظة capsule، ذات حافة حادة كاملة، وردية لماعة على وسط الماكونكي اغار Macconkey agar ، خضراء معدنية لماعة green metalic sheen على وسط ايوزين أزرق الميثيلين Eosin Methylene Blue (EMB)، وايضاً تكون مستعمرات وردية على وسط اغار الكروماجين أورينتيشن Cromagar Orientation،غير مخمرة لسكر السيلوبييوز celluobios واكثر من 89 %منها مخمرة لسكر الرامنوز ramenose، وأكثر من 90 % منها مخمرة لسكر السوربيتولsorbetole، كما انها غير محللة للجيلاتين gelatin وغير منتجة لغاز كبريتيد الهيدروجين H_2S في وسط اغار الحديد ثلاثي السكر Triple sugar iron agar (TSI)، معظمها منتجة لانزيم β-glucoronidase، ولا تنمو بوجود سيانيد البوتاسيومKCN وتنمو عند درجة حموضة تتراوح بين 4.4-9، ودرجة الحرارة المثلى لنموها هي 36-35 درجة مئوية، كما انها تكون موجبة لاختبار الكتاليز catalase وسالبة لاختبار الأوكسديز oxidase واليوريز urease و موجبة لاختبار الأندول indole الذي يعد الاختبار الأهم الذي يميزها عن أفراد العائلة

المعوية الأخرى. فضلاً عن انها غير مستهلكة للسترات citrate كمصدر وحيد للكربون، كما انها موجبة لاختبار أحمر المثيل red methyl وسالبة لاختبار فوكس بروسكاوير Vogase-proskauer (Egashira *et al*. 2006).

تتميز بعض أنواع تمور النخيل بغناها بالعناصر الغذائية المهمة، من حيث احتوائها على نسبة عالية من المواد السكرية والأملاح المعدنية والفيتامينات، هذه العناصر يمكن أن تستخلص حتى من ثمار التمر منخفضة الجودة، على شكل محلول يعرف بدبس التمر، والذي يستخدم كمادة أولية في العمليات الحيوية التخميرية.

الدبس هو ذلك السائل السكري المركز المستخلص من التمر أو ما يسمى بـ (مستخلص فاكهة التمر)، ذو لون أحمر مصفر أو أحمر داكن مائل إلى السواد، تتم عملية استخلاص دبس التمر على الساخن أو على البارد، وكلا الطريقتين تنتجان الدبس ولكن كل طريقة تنتج دبساً مختلفاً في درجة اللون، فالطريقة الباردة تعطي دبساً مصفراً (ذهبياً)، أما الطريقة الساخنة فتعطي اللون الداكن، وكلا الطريقتين لها ظروفها الخاصة.

- الطريقة الباردة:

وهي الطريقة التي تعتمد على عصر ثمار التمر بوضعها في أكياس من الخيش ومن ثم ضغطها بواسطة المكابس فتعطي دبساً ذو لون فاتح ذهبي ودرجة نقاوة منخفضة، حيث يحوي الكثير من الشوائب غير المرغوبة مما يجعله عرضة إلى التلف. وقد يستعمل الفلاحون طريقة أخرى وهي طريقة الضغط، حيث يتم وضع ثمار التمر في غرفة فوق بعضها البعض، ويتم جمع سائل التمر بعد سيلانه من التمر إلى مجرى نتيجة الضغط ويكون لونه أصفر ذهبي.

- الطريقة الساخنة:

تتم عملية الاستخلاص في خزانات حرارية تحت التفريغ، بغية خفض درجة غليان مزيج التمر والماء، والخزان مصمم على شكل أسطواني طولاني مصنوع من الحديد غير القابل للصدأ ومزود بجدار مزدوج لأن التسخين المباشر يؤثر على مواصفات الشراب الناتج، و تصل درجة حرارة المزيج لحوالي 60درجة مئوية تحت التفريغ، كما يزود الخزان بخلاط حلزوني الشكل داخل خزان الاستخلاص ويدور حول محوره لدفع العصير بالتقدم نحو مقدمة الخزان، وتحتوي نهاية الخزان على فتحة لخروج دبس التمر، ومنه لسطح غربال هزاز مصنوع من معدن غير قابل للصدأ، يسمح بمرور المستخلص السائل فقط، وتبقى أجزاء التمر على الغربال، حيث تندفع نحو الأمام نتيجة الحركة الاهتزازية لتسقط داخل مكبس وظيفته فصل العصير عن بقايا التمر بعد عملية الاستخلاص، ثم يوجه التمر المعصور إلى مرحلة استخلاص ثانية شبيهة بالأولى. وفيما يلي جدول رقم (1) يبين التركيب الكيميائي لدبس التمر الناتج من الاستخلاص:

الجدول (1):التركيب الكيميائي لدبس التمر

المكونات	الوزن الجاف (%)
سكريات كلية	76.6
سكريات مختزلة	81.7
سكروز	4.9
رطوبة	22.8
حموضة	0.2
بروتين	2.1
رماد(أملاح معدنية)	6.6
كما يحتوي على نسبة عالية من فيتامين أ وب	

شخصت جراثيم *E.coli* لأول مرة من قبل العالم الألماني Theodore Escherich في عام 1885م خلال دراسته على الجراثيم الطبيعية الموجودة في الأمعاء، وكذلك عزلت من براز الأطفال الرضع كجراثيم متعايشة تستوطن الأمعاء مباشرة بعد الولادة، وفي

عام1945 م وجد العالم Bray ان سلالة من الـ *E.coli* كانت السبب الرئيس لإسهال الأطفال الرضع في انكلترا واطلق عليها Enteropathogenic E.coli.(Shibata and Fukuwatari ., 2015)

أكد الباحث Denhma عام 2011 على أهمية التربتوفان، حيث تم إنتاج التربتوفان من دبس التمر بتركيز 10 غ/ل حيث يحتوي على كميات لابأس بها من السيرين والأندول الكافية لإنتاج التربتوفان، وتم قياس التربتوفان المنتج باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة وهي 0.48 ميلي مولر، وقد بين خلال دراسته أن إضافة كمية زائدة من الأندول كان له تأثير مثبط لإنتاج التربتوفان.(Denham, 2011)

كما قام أيضا العالمان kang و في العام 2013 بإنتاج الأندول من التربتوفان باستخدام إنزيم Treptophanase المعزول من جراثيم *E.coli*، حيث تم تحويل الحموض الأمينية الى كميات متساوية من الأندول وصلت الى 5 ميللي مولر.

كما قام Alav. وزملاؤه عام (2018) بدراسة النماذج الحركية الهجينة التيمن خلالها تربط الخلايا مادة الركيزة أثناء عمليات التمثيل الغذائي، وبالتالي تم اقتراح طرائق لتعديل الكائن الدقيق وراثيًا لأغراض معينة، وتم استخدام جراثيم الـ *E.coli* في إنتاج التربتوفان، حيث تم تعديل سلالة E. coli المستخدمة لامتصاص الغلوكوز بنظام أكثر كفاءة .

كما بينت دراسة أجريت في العام 2017 أهمية التربتوفان كحمض أميني عطري يستخدم على نطاق واسع في الصناعات الغذائية والكيميائية والصيدلانية. وبالمقارنة مع طرائق الاصطناع التقليدية، فإن إنتاج التربتوفان بواسطة الأحياء الدقيقة صديق للوسط و تكاليفه منخفضة، كما أن مخزون الأعلاف قابل للتجديد. ومع تطور الهندسة الوراثية، تم تحقيق إنتاج عالي الكفاءة من التربتوفان باستخدام *E.coli*، ومع ذلك، لا تزال هناك تحديات أمام تصنيع L-tryptophan الحيوي ليكون منافسًا من حيث التكلفة (Abdelhamid and Abozahra. 2017).

هدف البحث:

- الحصول على سلالة نقية من عزلات الـ *Escherichia coli*.
- إنتاج الحمض الأميني التربتوفان.
- قياس تركيز التربتوفان المنتج في وسط التخمير الحيوي.

مواد وطرائق البحث:

دبس التمر: تم الحصول عليه من مصادر مختلفة من مدينة حلب

Escherichia coli :عزلت من مياه المجاري (مدينة حلب)

الأوساط المستخدمة في البحث:

a) Nutrient Agar (NA): وسط تعداد عام مغذية لنمو وتكاثر الجراثيم، وتعقم في الصاد الموصد (الأوتوغلاف) .

b) Macconkey Agar (MA) : وسط تخصصية لنمو جراثيم، *E. coli* وتعقم في الصاد الموصد .

c) Eosin methylene blue (EMB): وسط تخصصية لنمو جراثيم *E.coli*، وتعقم في الصاد الموصد.

d) يتكون وسط إنتاج الحمض الأميني التربتوفان من :

0.5 % مستخلص خميرة، وكلوريد الصوديوم ، و 1% غلوكوز ،و 1% ببتون،

0.5% كبريتات الأمونيوم، وتعقم في الصاد الموصد.

e) وسط تخميري من دبس التمر:

1% ببتون، 0.5% مستخلص خميرة، 0.5 % كلوريد الصوديوم.

0.05% كبريتات الأمونيوم، 10غرام دبس تمر وتعقم بالصاد الموصد .(Wen *et al*, 2017)

طرائق البحث:

-عزل جراثيم *Escherichia coli*:

نقل 10مل من مياه المجاري الى (90) مل ماء مقطر معقم موجود في دورق معياري، وهنا تم الحصول على المعلق الأساسي ذو التخفيف (10^{-1})، ثم حضرت سلسلة من التخفيفات العشرية من المعلق الأساسي. وبعد تحضير وسط الزرع (الاغار المغذي) وفق التعليمات المذكورة سابقاً، تم تعقيمها في الصاد الموصد (أوتوغلاف) عند درجة حرارة 121 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة. ثم تم الزرع الجرثومي في أطباق بتري حاوية على الوسط المتصلبة، بمعدل 1مل من كل تخفيف الى الطبق (3مكررات من كل طبق)، وتم تحضين الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 48 ساعة. ونقلت المستعمرات الجرثومية النامية الى الوسط التخصصي لنمو جراثيم *E.coli* (Blair *et al.*, 2014).

عزل جراثيم *Escherichia coli* وحفظها:

بعد تحضير وسط ماكونكي اغار، قمنا بنقل لقاحة من المستعمرات النامية على وسط الاغار المغذي (NA) السابقة بوساطة إبرة تلقيح معقمة الى وسط ماكونكي اغار التخصصية، ووضعت الأطباق بشكل مقلوب في الحاضنة عند درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 48 ساعة حتى ظهور مستعمرات *E.coli*، تم تكرار العملية السابقة وذلك بنقل لقاحة من المستعمرات النامية الى أطباق جديدة تحوي وسط الماكونكي اغار المعقم حتى الحصول على سلالة نقية من *E.coli*.

وبغرض حفظ السلالة النقية، تم نقل جزء من المستعمرات النامية على الأطباق السابقة إلى أنبوب زجاجي يحوي وسط ماكونكي اغار مصبوبة بشكل مائل، يتم التخطيط ثم التحضين لمدة 48 ساعة حتى تظهر النموات بعدئذ، تحفظ عند حرارة من 6-4 درجة مئوية

تشخيص العزلات:

حضرت لطاخة من مستعمرات *E.coli* على شريحة زجاجية وصبغت بصبغة غرام وفحصت الشرائح مجهرياً للتحري عن الصفات المظهرية والمجهرية وذلك بصبغ الخلية الجرثومية وفحصها تحت المجهر، كما استخدمت بعض الاختبارات الكيميائية – الحيوية كاختبار الأوكسيديز، واختبار استخدام السترات، واختبار التحلل المائي للنشاء، واختبار الكاتالاز، واختبار تحلل الجيلاتين، وتخمر السكريات.

إنتاج الحمض الأميني التربتوفان:

بعد عزل بكتريا *Escherichia coli* والحصول على سلالة نقية، تم نقل لقاحة من السلالة النقية لل*E.coli* الى وسط (NA) تحوي ملح الصوديوم بتركيز 0.5% وزن / حجم لتنشيط إنتاج الحمض الأميني التربتوفان، ومن ثم يتم التحضين عند درجة حرارة 34درجة مئوية لمدة 24 ساعة حتى ظهور المستعمرات. ثم تم أخذ لقاحة من المستعمرات ولقحت بها 100مل من وسط سائلة لإنتاج حمض التربتوفان، تم التحضين في حاضنة هزازة على حرارة 37 درجة مئوية لمدة 6 ساعات بسرعة 150 دورة في الدقيقة.

الشكل(2):الحاضنة الهزازة

تم تكرار العملية على نفس الوسط مرة أخرى ثم يرشح الوسط السائل الثاني، وتم نقل الخلايا إلى 100 مل من الوسط التخميري المولاسي، وضع وسط التخمير في الحاضنة من دون تحريك الوسط، عند درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 48 ساعة، بعد ذلك تم ترشيح وسط التخمير، والحصول على الراشح الذي يحوي التربتوفان الشكل رقم (3)، وتم قياس تركيزه.

تم إضافة 2مل من وسط التخمير الحاوي على التربتوفان الى أنبوب اختبار زجاجي، ثم أضيف 2مل من الفورم ألدهيد وبعد ذلك أضيف بحذر بضع قطرات من حمض الكبريت المركز على جدران الأنبوب مع مراعاة عدم الرج. يلاحظ تشكل حلقة بنفسجية، وهي دليل على وجود التربتوفان (Wen *et al*, 2017) .

الشكل(3):ترشيح الوسط التخمير المولاسي

قياس تركيز التربتوفان:

لإجراء التفاعل اللوني تم اخذ دورق سعة 100 مل ذي غطاء نقلت إليه المحاليل التالية بواسطة الماصة بالتسلسل التالي (1مل من الراشح الحاوي على التربتوفان الناتج عن وسط التخمير المولاسي، 0.5 مل من محلول بارا داي ميتيل أمينو بنز ألدهيد 2.5% مع الرج، 0.2 مل محلول نترات الصوديوم 2% مع الرج، 28 مل من حمض كلور الماء النقي HCl (37%) مع الرج، ثم ترك الدورق مدة (30) دقيقة عند درجة حرارة الغرفة، وذلك لإعطاء فرصة لتطور التفاعل اللوني وظهور اللون الأزرق، بعد ذلك أكمل الحجم حتى العلامة بالكحول الإيتيلي (50%)، وتم تحضير الشاهد باتباع الخطوات السابقة نفسها لكن باستخدام (1) مل ماء مقطر عوضاً عن المحلول المدروس. تم قياس الامتصاصية على جهاز المطياف الضوئي عند طول موجي (610) نانو متر وتم حساب تركيز التربتوفان بالاستعانة بالمنحنى القياسي المعد مسبقاً (Wen *et al*, 2017) .

النتائج والمناقشة:

1-التركيب الكيميائي لدبس التمر:

يبين الجدول رقم (2) التركيب الكيميائي لدبس التمر المراد تخميره.

الجدول (2):التركيب الكيميائي لدبس التمر الناتج عن الاستخلاص

المكونات	النسبة المئوية
الرطوبة%	17%
المادة الجافة%	82.88%
السكريات الكلية%	79.67%
السكر المرجع%	74.37%
السكروز%	5.3
pH	5.45%
الرماد%	7.93%
الازوت الكلي%	1.58%
الازوت غير البروتيني%	0.5%

2-الحصول على سلالة نقية من جراثيم *Escherichia coli*:

شخصت العزلة مظهرياً باستخدام المجهر الالكتروني بعد تلوينها بصبغة غرام، فوجد أنها جراثيم عصوية، غير متجمعة، سالبة لصبغة غرام، غير مكونة للأبواغ متحركة بواسطة الأسواط المحيطية ، كما أن مستعمراتها ملساء ناعمة محدبة قليلاً، غير مخاطية، أو مخاطية عند امتلاك المحفظة، هوائية أو لا هوائية اختيارياً، تظهر بشكل مستعمرات وردية لماعة على وسط ماكونكي اغار. كما يوضح الشكل رقم (4)السلالة النقية لجراثيم *E. coli* النامية على وسط

الشكل (4): مستعمرات *E coli* على وسط NA

3- توصيف العزلة من خلال الاختبارات الحيوية الكيميائية:

يبين الجدول رقم (6) والشكل (5) نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية لتوصيف جراثيم *Escherichia coli*، ومن خلال دراسة الجدول السابق تبيّن أن العزلة كانت سالبة لاختبار السترات لأنها لا تستطيع تمثيل السترات كمصدر وحيد للكربون، كما أنها سالبة أيضاً لاختبار الأوكسيداز لعدم مقدرتها على افراز انزيم السيتوكروم، وأنها سالبة لاختبار تحلل النشاء لعدم مقدرتها على افراز انزيم الأميلاز، وسالبة لاختبار تحلل الجلاتين لعدم إنتاجها انزيم الجيلاتيناز، في حين انها موجبة لاختبار تخمر السكريات الثلاثية، وموجبة لاختبار الكاتلاز حيث فككت جراثيم *E.coli* بيروكسيد الهيدروجين الى ماء وأوكسجين .

الجدول (3): نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية لجراثيم *E.coli*

اسم الاختبار	النتيجة
السترات	-
الأوكسيداز	-
تخمر السكريات الثلاثية	+
الكاتالاز	+
حلمهة النشاء	-
تحلل الجيلاتين	-

وعليه وجدنا أن صفات العزلة كانت مشابهة لصفات *Escherichia coli* حسب ما ورد في تصنيف برجي. كما يوضح الشكل رقم(5)، الصور المرفقة في الأسفل، النتائج اللونية للاختبارات الكيميائية الحيوية لجراثيم *Escherichia coli*:

اختبار الكاتالاز **اختبار الاوكسيداز**

تمثيل السترات **اختبار تخمر السكريات**

الشكل (5): النتائج اللونية للاختبارات الكيميائية الحيوية لجراثيم *Echerichia coli*

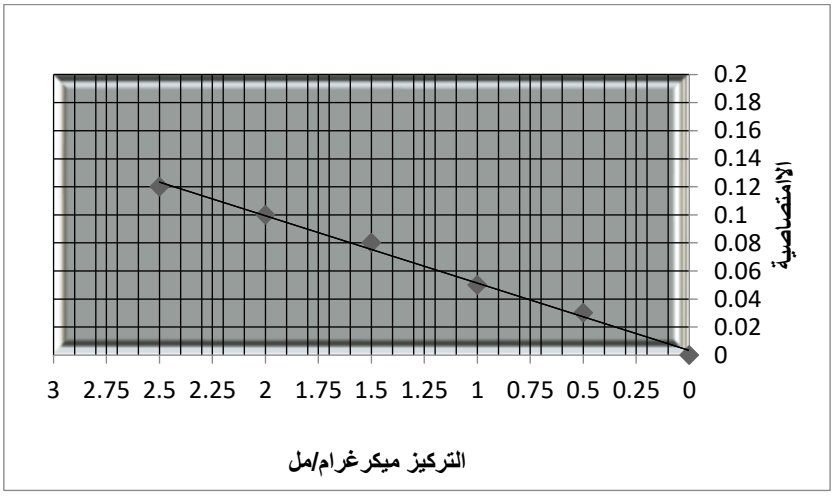
4-الكشف عن الحمض الأميني التربتوفان:

يلاحظ من الشكل رقم (6) ظهور حلقة الأندول ذات اللون البنفسجي الغامق الناتجة عن ارتباط الحمض الأميني التربتوفان مع زمرة الألدهيد من الأسيت الدهيد أو الفورم الدهيد معطية نواتج تكاثف ملونة بلون بنفسجي غامق

الشكل(6):تفاعل هوبكنز كول

5-قياس تركيز الحمض الأميني التربتوفان:

بالعودة الى المنحني البياني الناتج بين قيم الامتصاصية وقيم تركيزات محاليل التربتوفان كما هو موضح بالشكل (7)، ظهرت لدينا المعادلة الخطية الثابتة التالية: $y=0.048x+0.0033$ $(R^2=0.99)$ وبما أن قيمة الامتصاصية للراشح الذي يحوي التربتوفان كانت 0.055 وبإسقاط قراءة الامتصاصية على المنحنى المعياري تبين أن تركيز التربتوفان في وسط التخمير المولاسي هي (0.1 ملغ/مل)



الشكل (7): المنحى القياسي للتربتوفان

الاستنتاجات ومناقشة النتائج:

- كانت العزلة تابعة لجراثيم *Escherichia coli*، وكانت سالبة لاختبار السترات لأنها لا تستطيع تمثيل السترات وتحلل النشاء و تحلل الجلاتين ، في حين انها موجبة لاختبار تخمر السكريات، و الكاتلاز.
- كان تركيز التربتوفان في وسط التخمير المولاسي هي (0.1 ملغ/مل)

المقترحات والتوصيات:

-استعمال وسط تخمير اخر رخيص الثمن غير. دبس التمر كالمولاس.

-إنتاج الحمض الأميني التربتوفان من جراثيم أخرى.

-استخلاص مواد فعالة أخرى غير التربتوفان من وسط التخمير المولاسي .

المراجع:

Abdelhamid, S. M.; and R. R. Abozahra (2017). Expression of the Fluoroquinolones Efflux Pump Genes Acra And Mdfa in Urinary Escherichia coli Isolates. PJM. 66(1):25-30.

Alav, I. ; J. M.Sutton; and K. M. Rahman (2018). Role of Bacterial Efflux Pumps in Biofilm Formation. J Antimicrob Chemother.2(3): 1-18.

Bhattacharyya**,** S.; A. Sarfraz; M. A. A. Ansari; and N. Jaiswal (2015). Characterization and antibiogram of Uropathogenic Escherichia coli from a tertiary care hospital in Eastern India. Int J Curr Microbiol App Sci. 4(2): 701-705.

Blair, J. M.; G. E. Richmon; and L. J. Piddock (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-Negative Bacteria and Their Role in Antibiotic Resistance. Future Microbiol. 9(10): 1165–1177.

Denham, S.A., K. Zinsser; and C.S. Bailey (2011) Emotional Intelligence in the First Five Years of Life. Encyclopedia on Early Childhood Development, Centre of Excellence for Early Childhood Development and Strategic Knowledge Cluster on Early Child Development.7(12): 25-25.

Egashira, Y.; S.Nagaki; and H. Sanada (2006).Tryptophan-Niacin Metabolism in Rat with Puromycin Aminonucleoside-Induced Nephrosis. Int J Vitam Nutr Res.76 (1): 28-33.

Fernstrom, J.D (1988).Tryptophan, Serotonin and Carbohydrate Appetite: Will the Real Carbohydrate Craver Please Stand up. J. Nutr. 118 (11): 1417-9.

Garrity G.M.; , D.J.Brenner; N.R .Krieg; and J.T. Staley (2005) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer, New York. 2nd Edition. 2 (6):126-235.

Kang, S. W. and D. J. Young (2013).The tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid suppresses T cell responses by inhibiting dendritic cell activation . Online January .17(3):721-6.

Katsumi, S.; T. Fukuwatari and T. Kawamura(2014). Conversion Percentage of Tryptophan to Nicotinamide is Higher in Rice Protein Diet than in Wheat Protein Diet in Rats. International Journal of Tryptophan Research. 8(26): ISSN1178-6469.

Lowry, O.H.; N.J. Rbrough; A.L. Farr; R.J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 193(12):265-275.

Mateos, S. S.; C. L. Sánche,z; S. D. Paredes; C.Barriga; and A. B. Rodríguez (2009).Circadian Levels of Serotonin in Plasma and Brain after Oral Administration of Tryptophan in Rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 104 (1): 9-52.

Shibata, K. and T. Fukuwatari (2015). Nutritional Aspect of Tryptophan: Metabolism International Journal of Tryptophan Research. 6(1):12-16.

Van der Heijden, F.M.; D. Fekkes; S.Tuinier; A.E. Sijben; R.S.Kahn; and W.M.Verhoeven (2005).Amino Acids in Schizophrenia: Evidence for Lower Tryptophan Availability during Treatment with Atypical Antipsychotics. J. Neural Transm. 112 (4): 577-585.

Wen, X.; Liu,N.; , Z. Jia (2017). Production of L-tryptophan by Microbial Fermentation. College of Bioengineering, Dalian Medical University, Liaoning, China. 12 (25):789-791.

Biological production of Tryptophan from Date Molasses Using Isolates of *Escherichia coli*

Lama Assaf*(1) and Batoul Ozzoun(1)
(1). Food Science Department, Faculty of Agriculture, University of Aleppo, Syria.
(*Corresponding author: Dr. Lama Assaf. E-Mail: Lamaassaf403@gmail.com).

Received: 11/03/2023 Accepted: 11/06/2023

Abstract
The study was conducted in the laboratories of the Faculty of Food - Department of Food Sciences - Aleppo University - Syria. It was aiming to investigate the producing the amino acid tryptophan from date molasses using *Escherichia coli*. A pure strain of E. coli was transferred to agar medium (NA) that contains sodium chloride salt at a concentration of 0.5% w/v to activate the production of the amino acid tryptophan, and transferred to the incubator, then inoculated from the growing colonies, and placed in 100 ml of liquid medium. A catalyst for the production of tryptophan acid, which was transferred to a shaking incubator set at a temperature of 37 degrees Celsius for 6 hours at a speed of 150 rpm per minute, then the process was repeated on the same medium, and then the bacteria were taken after filtering the liquid medium and transferred to a molasses medium fermentation to produce tryptophan, and the production of tryptophan was confirmed. Tryptophan By going back to some chemical tests, and by comparing the absorbance values of the fermentation medium with the standard curve of tryptophan, it was found that the concentration of tryptophan in the fermentation medium was 0.1 mg/ml.
Key words: *Echerichia coli*, amino acid, treyptophan, date molasses