عزل وتشخيص بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. *mesenteroides* المنتجة للمانيتول من مصادر محلية

شيماء ذياب جدوع السهلاني• آمال كاظم غضبان الاسدي غياث حميد مجيد

قسم علوم الأغذية /كلية الزراعة/جامعة البصرة /البصرة /العراق

الخلاصـــــــــــة

تضمنت الدراسة عزل بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* من مصادر محلية مختلفة وهي الخضروات والمخللات وقد تم الحصول على ثلاث عزلات نقية من الخضروات . شخصت العزلات على أنها بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* اعتمادا على الفحص المظهري والفحص المجهري والاختبارات الكيموحيوية المتضمنة أنتاج غاز ثاني اوكسيد الكاربون من الكلوكوز والاختبار السالب لفحوصات الكاتاليز وإنتاج الامونيا من الارجنين واختزال النترات واستهلاك السترات. كما شخصت على أنها *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. *mesenteroides* من خلال تخميرها لسكر ل- ارابينوز وقد ظهر اختلاف في أشكال المستعمرات البكتيرية عند تنميتها على أوساط زرعية مختلفة منها المحتوية على سكر الكلوكوز مثل وسط M.R.S. الصلب والأخرى المحتوية على السكروز مثل وسط Rogosa وذلك لاختلاف السكريات في تركيب الأوساط. وأظهرت العزلة SH1 الماخوذة من البربين أعلى أنتاج من المانيتول بلغ 9 غم /100 مل بعد تنميتها على وسط الإنتاج.

الكلمات المفتاحية : انتاج المانيتول ، بكتيريا *Leuconostoc mesenteroides*

المقدمـــــــة

انـتج المـانيتول باسـتعمال بكتريـا حـامض اللاكتيـك فـي عـام 1930 وتمتـاز بكتريـا حـامض اللاكتيك غير متجانسة التخمر ولاسيما *Leuconostoc mesenteroides* بقابليتها على تحول الفركتوز إلى المانيتول بنسبة 90% (8) .

وتمتاز بكتريا *Ln. mesenteroides* بقدرتها العالية على إنتاج المانيتول لامتلاكها أنـزيم المـانيتول ديهايدروجنيز إذ يعمـل هذا الأنـزيم علـى اختـزال سكر الفركتـوز إلـى سكر المـانيتول بوجود العامل المساعد $NADH+H^+$. وأنتج المانيتول باستعمال *Ln. mesenteroides* بعدة طرائـق منهـا اسـتعمال المزرعـة المسـتمرة ومزرعـة الوجبـة المغـذاة ومزرعـة الوجبـة الواحـدة وأظهرت الطريقتان الأخيرتان مستويات عالية من الإنتاج لذا استعمالها في إنتاج المانيتول (15)

● مستل من رسالة الماجستير للباحث الأول

المانيتول احد السكريات الكحولية يحتوي على ست ذرات كاربون وهو بنصف حلاوة السكروز وتكون السكريات الكحولية قليلة السعرات الحرارية وبطيئة الامتصاص في الأمعاء لهذا السبب تستعمل كمحليات للمنتجات الغذائية المعروفة باسم Light food والتي تستعمل للأشخاص الذين يعانون من السمنة وداء السكري لان ايض هذه السكريات مستقل عن ايض الأنسولين. ويدخل المانيتول أيضا في الصناعات الصيدلانية والطبية والصناعات الالكترونية ويستعمل المانيتول في تركيب بعض الأوساط الزرعية (14).

ينتج المانيتول من مجموعة متنوعة من الأحياء كالبكتريا والفطريات و الطحالب وبعض النباتات الراقية، وهذا السكر قليل السعرات الحرارية لذا يمكن استبداله بالسكروز أو اللاكتوز أو الفركتوز أو الكلوكوز في المنتجات الغذائية، ويمكن أن يعمل كمانعاً للتاكسد في الخلايا الحيوية ، وفي أمعاء الإنسان يتحول المانيتول إلى أحماض دهنية قصيرة السلسلة نتيجة لنشاط بعض أنواع البكتريا والتي يعتقد أنها تمنع تطور سرطان القولون، ومن ناحية أخرى يؤدي المانيتول إلى حدوث اثأر جانبية مثل انتفاخ البطن والإسهال إذ انه بطي الامتصاص(13) ;(15). وهدفت هذه الدراسة إلى إيجاد عزلات محليه من بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. *mesenteroides* قادرة على أنتاج المانيتول

المـواد وطـــرائق العمـــــل

مصادر العزلات Isolates sources

استعملت عدة مصادر لعزل *Ln. mesenteroides* منها الخضروات والمخللات ، وقد تم الحصول على الخضروات من الأسواق المحلية إذ جلبت الخضروات بوساطة أكياس من البولي اثيلين وتركت لمدة يومين في الحاضنة عند25 مْ من اجل الحصول على خضروات ذابلة ومتحللة ، ومن الخضروات التي استعملت اللهانة *Brassicaoleracea* var.*capitata* والكراث *Allium kurrat* والكرفس *Apium graveolens* var. *dulce* والخيار *Cucumis sativus* والبربين *Portulasa oleracea* والريحان *Ocium basilicum* والفجل *Raphanus sativum* والنعناع *Mentha piperita* أما المخللات فهي مخلل اللهانة Sauerkraut ومخلل الخيار Pickled cucumbers وقد حضرت في المختبر .

عزل البكتريا من المخللات Isolation of *Ln. mesenteroides* from pickles

عزلت البكتريا من مخلل اللهانة ومخلل الخيار وقد حضرا وفقا إلى (3). وذلك بأخذ قطرات بوساطة الناقل (Loop) ونشرها على سطح الوسط Rogosa agar والوسط Selective M. R. S. agar ثم حضنت الأطباق عند 25مْ لمدة24-48 ساعة.

عزل البكتريا من الخضروات Isolation of *Ln. mesenteroides* from vegetables

انتخبت أنواع الخضروات التي كانت بحالة من التحلل لتسهيل الحصول على البكتريا ، وضعت بعضها في أكياس من البولي اثيلين بعد ترطيبها بالماء المقطر المعقم ثم حضنت لمدة يومين عند 25مْ ثم اخذ 11غم من كل نوع من أنواع الخضروات ونقل إلى 99 مل من المحلول الفسيولوجي 0.85% كلوريد الصوديوم ثم عملت بقية التخافيف ، اخذ 1 مل من التخافيف واستعملت طريقة الصب Pour plate method في إطباق وباستعمال الوسط Rogosa agar والوسط Selective M. R. S. agar وحضنت عند 25مْ لمدة 24-48 ساعة، كما عزلت البكتريا بأخذ مسحة من سطح الخضروات ونشرها على سطح الوسط Rogosa agar والوسط Selective M. R. S. agar ثم حضنت الإطباق عند 25مْ لمدة 24-48 ساعة (1).

الفحوصات التشخيصية Identification tests

شخصت البكتريا المعزولة على أنها *Ln. mesenteroides* بدراسة صفاتها الشكلية وإجراء الاختبارات الكيموحيوية وحسب الطرائق المعتمدة (2);(6);(7);(12)

الصفات الشكلية Morphological characteristics

درست الصفات الشكلية للمستعمرات المعزولة بتنميتها على الأوساط الزرعية الصلبة التي ذكرت أنفا وقد تضمنت شكل المستعمرات، حجمها، لونها، مظهرها، حافتها، ارتفاعها.

الفحص ألمجهري Microscopic examination

اجري الفحص المجهري لخلايا المستعمرات المعزولة بعد تصبيغها بصبغة كرام للتعرف على شكل الخلايا البكتيرية ونوع اصطباغها كما اجري التصبيغ السالب Negative staining باستعمال الحبر الصيني للتعرف على المحفظة (الكبسول) وكذلك فحصت حركة البكتريا بطريقة القطرة المعلقة Hanging drop technique (5).

الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

وتضمنت الفحوصات الآتية : إنتاج الغاز من الكلوكوز (11)، فحص أنزيم الكاتاليز (18)، فحص استهلاك السترات واختزال النترات (4)، إنتاج الامونيا من الارجنين (10)، تأثير الرقم الهيدروجيني 4.8 و 6.5 في نمو البكتريا و تأثير درجات الحرارة في نمو البكتريا والرقم الهيدروجيني النهائي (6)، النمو في 10% كحول الايثانول، تحمل عند 55 مْ لمدة 15 دقيقة وعند 60 مْ لمدة 30 دقيقة، النمو في تركيز(3 و6.5)%كلوريد الصوديوم، إنتاج الحامض من الكاربوهيدرات (9) ، إنتاج الدكستران (1) .

طريقة إنتاج المانيتول Mannitol production method

غربلت العزلات العائدة لبكتريا*Ln.mesenteroides* sub sp. *mesenteroides* على أساس أنتاجها للمانيتول واتبعت طريقة (17) لإنتاج المانيتول.

- **تنمية البكتريا وإنتاج المانيتول**

1- تنشيط بكتريا *Ln. mesenteroides* sub sp. *mesenteroides* في وسط (M.R.S.) السائل عند 25مْ لمدة 24 ساعة .

2- نقل بواسطة ماصة معقمة 1% من المزرعة البكتيرية المنشطة إلى وسط إنتاج المانيتول واستعمل الرقم الهيدروجيني 6.5 بدلاً من 7 وحضن عند 25 مْ لمدة 48 ساعة وباستعمال الحاضنة الهزازة بسرعة 200 دورة / دقيقة المجهزة من شركة Kottermann .

- **استخلاص وتنقية المانيتول من وسط الإنتاج**

1- بعد انتهاء مدة الحضن اجري الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 30 دقيقة لفصل الراشح والتخلص من الكتلة الحيوية (خلايا البكتريا).

2- ركز الراشح بواسطة المبخر الدوار Rotary evaporator رقمه RE120 نيوزلندي الصنع. عند درجة حرارة 40-50 م بحيث تكون نسبة المواد الصلبة المتبقية حوالي 60%.

- **بلورة وتقدير المانيتول الناتج**

1- أضيف 1 غم من المانيتول القياسي إلى الراشح المركز لبدء عملية البلورة.

2- برد الراشح من درجة 35- 5 م وبمعدل تخفيض درجتين لكل ساعة بدلاً من درجة لكل ساعة لمدة 15 ساعة لغرض البلورة ، ثم بقى على درجة 5 م لمدة 12 ساعة.

3- بعد 24 ساعة من بدء عملية البلورة تفصل البلورات عن السائل المتبقي باستعمال ورق الترشيح من نوع واتمان رقم (3) Whatman No. 3 تحت التفريغ وبوجود قمع بخنر Vacuum Buchner ، بعد ذلك غسلت البلورات المتكونة بالايثانول للتخلص من الشوائب ثم جففت البلورات عند درجة حرارة 60 م .

4- حسب المانيتول الناتج بوزنه باستعمال الميزان الحساس المجهز من شركة Sartorius AGGO Ttingen الألمانية مع الأخذ بنظر الاعتبار طرح كمية المانيتول المضافة لبدء البلورة ، كذلك حسبت وزن الخلايا الجافة(الكتلة الحيوية) بعد تجفيف الخلايا ووزنها .

النتائـــج والمنـــاقشة

العزل والتشخيص Isolation and Identification

تبعا لخطوات العزل وتشخيص بكتريا *Leuconostoc* الواردة في(2) تم الحصول على ست عزلات من مصادر مختلفة وهي البربين والنعناع والكراث والريحان والفجل والكرفس ورمز لها بالرموزSH6,SH5, SH4,SH3,SH2,SH1 على التوالي.

الصفات الشكلية

درست الصفات الشكلية للعزلات الست وذلك بتنميتها على الأوساط الصلبة إذ عزلت البكتريا اعتمادا على شكل المستعمرات النامية على وسط Rogosa الصلب ووسط .M.R.S الصلب، إذ كانت المستعمرات النامية على الوسط الأول منتشرة وشفافة ولماعة ولزجة ومرتفعة الشكل (1) أما المستعمرات النامية على الوسط الثاني فكانت صغيرة جدا بحجم رأس الدبوس وناعمة ومستديرة ولونها ابيض مائل للرمادي الشكل (1) .

الصفات المجهرية

درست أشكال الخلايا وذلك بتصبيغها بصبغة كرام ، إذ كانت خلايا جميع العزلات موجبة لصبغة كرام. وقد اختلفت أشكال الخلايا تبعا لنوع وسط التنمية إذ ظهرت الخلايا النامية على الأوساط الصلبة بشكل خلايا عصوية بيضوية مزدوجة Diplococcobacilli ، أما في الأوساط السائلة فكان شكلها يشبه بكتريا *Lactobacillus* وهذا يتفق مع (2) .كذلك اجري فحص حركة

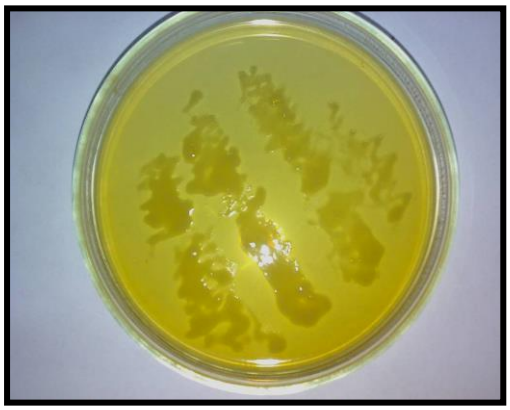
البكتريا باستعمال طريقة القطرة المعلقة Hanging drop technique وكان جميع خلايا العزلات غير متحركة ،وتم التعرف على الكبسول بوساطة التصبيغ السالب للبكتريا باستعمال الحبر الصيني وأظهرت جميع العزلات قدرتها على تكوين الكبسول ،إذ ظهر الكبسول تحت المجهر بشكل مناطق شفافة حول الخلايا .

الفحوصات الكيموحيوية

يبين جدول (1) الفحوصات الكيموحيوية للعزلات الست المتحصل عليها من مصادر مختلفة إذ ظهرت جميع العزلات القدرة على إنتاج غاز CO2 من الكلوكوز، كما أظهرت نتيجة سالبة لاختبار الكاتاليز واختزال النترات وإنتاج الامونيا من الارجنين و استهلاك السترات واستطاعت جميع العزلات النمو في رقم هيدروجيني 6.5 ولم تتمكن من النمو في الرقم الهيدروجيني 4.8 إما بالنسبة لدرجات الحرارة فأعطت نتيجة موجبة عند النمو في درجة حرارة (37,25,15,10)مْ ونتيجة سالبة عند (45,40,5)مْ ، وتباينت نتائج العزلات الست عند النمو في تركيز10% ايثانول إذ أعطت العزلات (SH6,SH5,SH2,SH1) نتيجة سالبة بينما العزلة (SH4,SH3) نتيجة موجبة ،وتبين إن جميع العزلات لها القدرة على تحمل درجة حرارة 55 م لمدة 15دقيقة ولم تستطيع التحمل 60مْ لمدة 30 دقيقة ، وأظهرت جميع العزلات القدرة على إنتاج المانيتول من الفركتوز. واستطاعت العزلات النمو في تركيز 6.5%كلوريد الصوديوم مما ساعدنا في تفريقها عن *Ln.pseudomesenteroides* ، ولتفريقها عن *Ln. paramesenteroides* اجري اختبار إنتاج الدكستران من السكروز.

استطاعت العزلات الست تخمير العديد من الكاربوهيدرات (الكلوكوز،الفركتوز،المالتوز ،السكروز،الكالاكتوز،السيليبايوز،التريهالوز،السالسين،المانيتول،المانوز،اللاكتوز) وان تخميرها لسكر الرافينوز قد ميزها عن بكتريا *Ln. citreum* فقد أظهرت العزلةSH4، SH5,SH1 نتيجة موجبة وهذا يؤكد أنها تعود لبكتريا *Ln. mesenteroides* أما العزلة SH6,SH3,SH2 فقد أعطت نتيجة سالبة وهذا يرجح إن تكون تابعة لبكتريا*Ln. citreum* كما إن ايجابية تخمرها لسكر ل- ارابينوز أثبتت إن هذه العزلات تعود لنوع *mesenteroides* subsp. *mesenteroides* وميزها عن بقية أنواع*Ln. mesenteroides* (6) . تم مقارنة نمو المستعمرات وشكلها على أوساط حاوية على الكلوكوز وأخرى حاوية على السكروز ،إذ كانت المستعمرات النامية على النوع الأول صغيرة ومستديرة وبيضاء ومائلة للرمادي وملساء وناعمة وغير منتجة للمادة اللزجة ، أما المستعمرات النامية على النوع الثاني فكانت

منتشرة وكبيرة ولماعة وشفافة ولزجة ولونها يتراوح من الأبيض إلى الرمادي.وجميع النتائج اتفقت مع الاختبارات الواردة في (7) ;(12) ;(2) . وعلى ضوء ذلك تم انتقاء العزلات SH1 (البربين) ،SH4 (الريحان)،SH5 (الفجل) في الكشف عن قدرتها على إنتاج المانيتول.



(1)

(2)

شكل (1) نمو بكتريا *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* المعزولة مختبرياً على الأوساط المختلفة (1)وسط Rogosa , (2) وسط M.R.S.

جدول (1) الفحوصات الكيموحيوية للعزلات *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* المتحصل عليها من مصادرها المختلفة

ت	نوع الاختبار	مصدر العزلات					
		البربين SH1	النعناع SH2	الكراث SH3	الريحان SH4	الفجل SH5	الكرفس SH6
1	إنتاج الغاز من الكلوكوز	+	+	+	+	+	+
2	إنتاج أنزيم الكاتليز	-	-	-	-	-	-
3	استهلاك السترات	-	-	-	-	-	-
4	اختزال النترات	-	-	-	-	-	-
5	إنتاج الامونيا من الارجنين	-	-	-	-	-	-
6	النمو في الرقم الهيدروجيني6.5	+	+	+	+	+	+
	النمو في الرقم الهيدروجيني4.8	-	-	-	-	-	-
7	النمو في درجة حرارة 5 مْ	-	-	-	-	-	-
	النمو في درجة حرارة 10 مْ	+	+	+	+	+	+
	النمو في درجة حرارة 15مْ	+	+	+	+	+	+

	النمو في درجة حرارة 25مْ	+	+	+	+	+	+
	النمو في درجة حرارة 37 مْ	+	+	+	+	+	+
	النمو في درجة حرارة 40 مْ	-	-	-	-	-	-
	النمو في درجة حرارة 45 مْ	-	-	-	-	-	-
8	الرقم الهيدروجيني النهائي	3.9	4.1	4.1	4.3	4.4	4.1
9	النمو في 10% ايثانول	-	-	+	+	-	-
10	التحمل عند55مْ لمدة 15دقيقة	+	+	+	+	+	+
	التحمل عند60مْ لمدة 30دقيقة	-	-	-	-	-	-
11	النمو في 3% كلوريد الصوديوم	+	+	+	+	+	+
	النمو في 6.5% كلوريد الصوديوم	+	+	+	+	+	+
12	إنتاج المانيتول	+	+	+	+	+	+
13	إنتاج الدكستران	+	+	+	+	+	+
14	إنتاج الحامض من الكاربوهيدرات						
	الكلوكوز	+	+	+	+	+	+
	الفركتوز	+	+	+	+	+	+
	المالتوز	+	+	+	+	+	+
	ل-ارابينوز	+	+	+	+	+	+
	السكروز	+	+	+	+	+	+
	الكالاكتوز	+	+	+	+	+	+
	الرافينوز	+	-	-	+	+	-
	السيليبايوز	+	+	+	+	+	+
	التريهالوز	+	+	+	+	+	+
	السالسين	+	+	+	+	+	+
	المانيتول	+	+	+	+	+	+
	المانوز	+	+	+	+	+	+
	اللاكتوز	+	+	+	-	+	+

أنتاج المانيتول

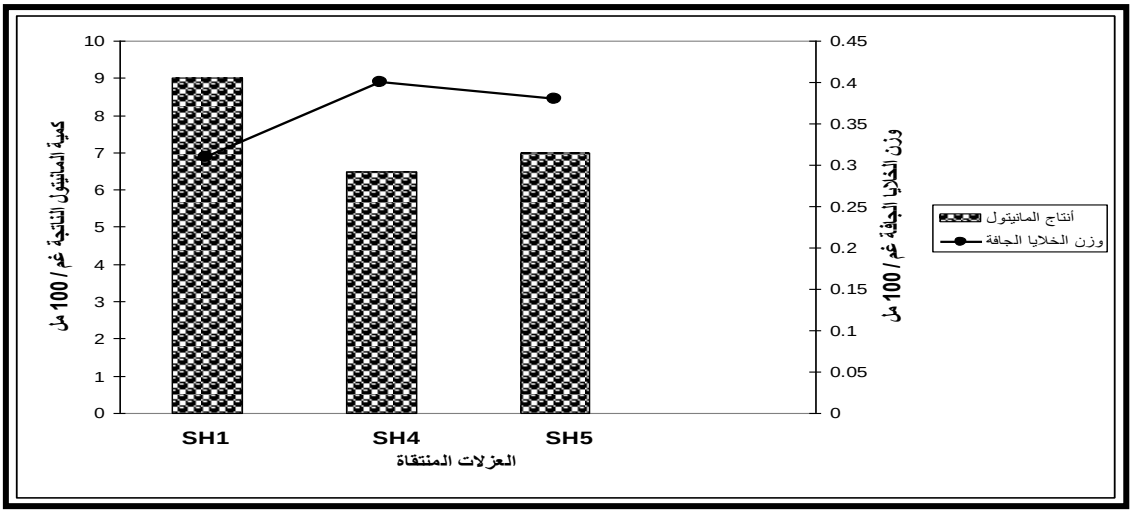
بعد انتهاء عملية التخمر وفصل الخلايا باستعمال جهاز الطرد المركزي اخذ الراشح وكان لونه اصفر مائل إلى البني بينما الراسب الذي يمثل الكتلة الحيوية كان لونه ابيض مائل إلى الرمادي،

ثم ركز الراشح وكانت نسبة المواد الصلبة 60 %بعدها أجريت البلورة للراشح وكان المانيتول الناتج لونه ابيض وشكله ابري وطعمه حلو بارد شكل (10) وهذا يتفق مع(17) ;(19).

شكل (2) المانيتول الناتج من العزلة (SH1) المنماة على الوسط الإنتاجي

انتخاب العزلة الأكثر إنتاجا

بين الشكل (3) كمية المانيتول الناتجة من العزلات الثلاث المنقاة وأظهرت العزلة التي حصل عليها من البربين إنتاجا عاليا من المانيتول بلغ 9 غم / 100مل وقد رمز لها بالرمز (SH1) ومن هذا يتبين أن إنتاج هذه العزلة قد تساوى مع إنتاج السلالة المعروفة التابعة للبكتريا *Ln. mesenteroides* M204 المستعملة على النطاق التجاري إذ بلغت كمية المانيتول المنتجة منها 9 غم/100مل (16)، بينما كانت نتائج العزلات البكتيرية الأخرى (SH5, SH4,) (7.0, 6.5) غم / 100مل على التوالي .وكان وزن الخلايا الجافة للعزلة (SH1) 0.3 غم / 100مل وهي قليلة مقارنة مع بقية العزلات وقد يعود سبب ذلك إلى ايض البكتريا الذي اتجه نحو أنتاج المانيتول أو قد يكون بسبب تركيب الوسط كارتفاع تركيز الفركتوز (الشكل 3).وقد استعملت العزلة (SH1) كأفضل عزلة لإنتاج المانيتول ودرست الظروف المثلى للإنتاج.



شكل (3) تأثير العزلات المختلفة في المانيتول الناتج ووزن الخلايا الجافة للعزلات البكتيرية المنتقاة من مصادر مختلفة المنماة في الوسط الإنتاجي القياسي،الرقم الهيدروجيني 6.5درجة الحرارة 25مْ /48 ساعة.

المصادر

1. **الاسدي،آمال كاظم غضبان** (2003) تحسين إنتاج الدكستران من عزلة محلية لبكتريا *Leuconostoc mesenteroides* . أطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة ، جامعة البصرة.
2. Axelsson L.T.(2004) Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. *In*: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd ed. Salminen, S.von Wright, A. and Ouwehand A. eds.Marcel Dekker, Inc., New York, pp:1-66
3. Carr, C. ; Cutting, V. and Writing, G. C.(1975) Lactic acid bacteria in beverages and food. Academic press.
4. Collee, J. G.; Miles, R. S. and Batt, B. (1996) Test for identification of bacteria. *In:* practical medical of Microbiology.4th ed. (Collee, J. G.; Mormion, B.P. ; Francer, A. G. and Simmons, A. eds.) ,Mackie and McCartney. New York. pp:131.
5. Cowan, S. C. and Steel, K. J. (1975) Manual identification of medical bacteria .2nd eds. Cambridge University press. Cambridge, London,pp:39-149.
6. Garvie, E. I. (1986) Gram positive cocci.Genus *Leuconostoc*, *In*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.;Sharpe,M.E. and Holt,J.G. eds.) Vol. 29, Williams and Wilkins, Baltimore.pp. 1071-1075.
7. Garvie, E. I.(1974) Genus *Leuconostoc In:* Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th edition Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. pp:510-513.
8. Grobben,G.J.; Peters,S.W.P.G.;. Wisselink, H.W.;Weusthuis, R. A.;Hoefnagel, M.H.N.; Hugenholtz, J. and Eggink, G.(2001) Spontaneous formation of a mannitol-producing of *Leuconostoc mesenteroides* grown in fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(6):2891–2894.
9. Hardie, J. M. (1986) *Streptococcus* In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (Sneath, P.H.A.; Mair, N. S. ;Sharpe, M.E. and Holt, J.G. eds.) Vol. 2 Baltimore, Williams and Wilkins Co. pp. 1043-1071.
10. Harley, J.P. and Prescott, L. M. (1996) Laboratory exercises in microbiology printed in U.S.A.
11. Harrigan, W. F. (1998) Laboratory methods in food and dairy microbiology, 3rd ed. Academic, Press, London U.K.

12. Holt, J.G.; Krieg, N. R. ; Sneath, P. H. A. ; Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994) Bergey's manual of deteminative bacteriology 9th ed. Williams and Wilkins Baltimore Maryland U.S.A.pp:527-541.
13. Hugenholtz. J. ; Sybesma, W. ;Groot, M. N. ; Wisselink. W. ; Ladero. V. ; Burgess. K. ; van Sinderen, D. ; Piard, J. C.; Eggink, G. ; Smid, E. J. ; Savoy, G. ; Sesma. F. ; Jansen, T. ; Hols, P. ;Kleerebezem, M.(2002) Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *J. Antonie Van Leeuwenhoek* 82:217-235.
14. Lawson,M.E.(1997) Sugar alcohols. In: Kirk-othmer encyclopedia of chemical technology, eds. Kroschwitz J.I. and Howe-Grant, M. 4th ed., vol. 23, John Wiley and Sons Inc. New York. pp: 93-119.
15. Neves, A.R.;Pool, W.A.;Kok, J.;Kuipers, O.P.;Santos, H. (2005) Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* the input from in vivo NMR. *FEMS Microbiol. Rev*. 29:531-54.
16. Soetaert , W.; Buchholz, K. and Vandamme, E. J. (1995) Production of D-mannitol and D-lactic acid by fermentation with *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Agro-Food Industry Hi-Tech.* 6: 41-44.
17. Soetaert, W. ; Vanhooren, P. T. and Vandamme, E.J. (1999) Production of mannitol by fermentation, Methods Biotechnology . Vol.10 (Carbohydrate Biotechnology Protocols). Edited by Bucke , C. Humana Press Inc. Totowa, N J. pp:261-275.
18. Taylor, W. I. and Achanzar, D.(1972) Catalase test as an aid in the identification Enterobacteraceae. *Appl. Microbiol.*Vol.24 pp:58-61.
19. von Weymarn, N. ; Kiviharju, K. ; Jaaskelainen, S. and Leisola , M.(2003) Scale-up of a new bacterial mannitol production process. *Biotechnol Prog.*19(3):815-821.

Isolation and identification *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. *mesenteroides* from local sources , It's ability mannitol produce

Shayma T. G. Al-Sahlany Amal K. Al-Asadi Gheyath H.Majeed
Department of Food Science and Biotechnology College of Agriculture-University of Basrah Basrah-Iraq.

Summary

The study included isolation of isolates of *Leuconostoc mesenteroides* from different local sources, which were: vegetables, pickles. Three pure isolates were isolated from vegetables. All isolates were identified to be *Leuconostoc mesenteroides* depending on morphological, microscopic examinations and biochemical tests which included gas production from

glucose, negative tests of catalase, ammonia production from arginine, nitrate reduction and citrate utilization. The isolates identified to be *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. *mesenteroides* through their ability to ferment L-arabinose. Different shapes of colonies appeared when grown on different media containing glucose such as MRS agar and the other media containing sucrose such as Rogosa agar.The higher mannitol produce was 9 g/100ml from the isolate of Purslane which called (SH1) from production media.