دراسة تأثير فترات التحضين والمصدر الكاربوني والنيتروجيني في نمو الفطر *Aureobasidium pullulans* وإنتاج حامض الكلوكونيك

محمد بشير إسماعيل قاسم	عبد الكريم سليمان حسن	رواء محمد جرجيس
قسم علوم حياة	قسم علوم حياة	قسم التمريض
كلية التربية	كلية التربية للبنات	المعهد التقني
جامعة الموصل	جامعة الموصل	الموصل

الاستلام	القبول
2012 / 01 / 17	2012 / 03 / 07

ABSTRACT

In this study (16) different local isolates of the yeast like fungus *Aureobasidium pullulans* were obtained. These isolates were isolated from uninfected leaves of many wild and cultured plants. These isolates were identified as real isolates of *A.pullulans* depending on the microscopic examination to determine the polymorphic form of this fungus. These isolates were screened regarding their efficiency to produce gluconic acid. Two isolates only, *A.pullulans* MU1 and *A.pullulans* MU2 showed a high ability to produce gluconic acid. The two isolates were tested to produce gluconic acid in the liquid media.

A.pullulans MU1 showed a high ability to produce gluconic acid after three days of incubation and therefore this isolate was selected in the latter experiments. In order to enhance the ability of the isolate to produce the acid we study the effect of the medium culture components from carbon and nitrogen source on the production. The results showed that best carbon source to produce maximum quantity of the acid was sucrose at the concentration of 15% so gave (15.1) g/L and best nitrogen source was ammonium chloride at the concentration of (4.8) g/L so gave (25.45) g/L of gluconic acid.

الخلاصة

تم في هذه الدراسة الحصول على (16) عزلة محلية مختلفة للفطر *Aureobasidium pullulans* de Bary الشبيهة بالخميرة عزلت من اوراق عدد كبير من

النباتات البرية والمزروعة غير المصابة. وقد تم تشخيص هذه العزلات بكونها عزلات حقيقية للفطر *A.pullulans* بالاعتماد على الفحص المجهري لهذه العزلات وذلك بهدف تحديد الشكل المتعدد الذي يتميز به هذا الفطر. تم غربلة هذه العزلات من حيث كفاءتها لانتاج حامض الكلوكونيك وتم تحديد عزلتين فقط *A.pullulans* MU1 و *A.pullulans* MU2 اذ بينت هاتان العزلتان كفاءة عالية في انتاج الحامض. اختُبرت العزلتان *A.pullulans* MU1 و *A.pullulans* MU2 من حيث كفاءتها في انتاج حامض الكلوكونيك في الوسط السائل وبينت العزلة *A.pullulans* MU1 قدرة عالية في انتاج الحامض بعد ثلاثة ايام من التحضين ومن ثم اختيرت هذه العزلة في التجارب اللاحقة. وبهدف تعزيز قدرة هذه العزلة على انتاج الحامض فقد تمت دراسة تأثير مكونات الوسط الغذائي من حيث المصدر الكاربوني والنيتروجيني على الانتاج.

بينت النتائج ان افضل مصدر كاربوني لانتاج اقصى كمية من الحامض هو السكروز عند التركيز 15% اعطى انتاجية (15.1) غرام/لتر وافضل مصدر نيتروجيني كلوريد الامونيوم عند تركيز (4.8)غرام/لتر اعطى انتاجية (25.45) غرام/لترمن حامض الكلوكونك.

المقدمة

بصرف النظر عن الاحياء المجهرية الضارة والممرضة اضحت بعض الاحياء المجهرية ومنها الفطريات معينا كبيرا للانسان المعاصر تفيده في انتاج العديد من المواد المختلفة ذات الاهمية الكبيرة في التطبيقات الصناعية الغذائية والدوائية وصناعات اخرى. ان العديد من المركبات العضوية المهمة في حياة الانسان مثل المضادات الحيوية والانزيمات والسكريات المتعددة المايكروبية وبروتين احادي الخلية والحوامض العضوية ومركبات كيمياوية اخرى اصبحت تنتج من قبل الاحياء المجهرية فيما يعرف بعمليات التخمير الصناعية وبات الانسان يسعى في خطى حثيثة ومستمرة في البحث عن عزلات جديدة من الاحياء المجهرية ذات انتاجية عالية لهذه المركبات او مركبات جديدة اخرى، اغلب الحوامض العضوية المعروفة مثل حامض الخليك Acetic acid وحامض الليمون Citric acid وحامض اللبن Lactic acid وحامض الايتاكونيك Itaconic acid وحامض الكلوتاميك Glutamic acid وحامض الكلوكونيك Gluconic acid وغيرها من حوامض عديدة اصبحت تنتج تجاريا بعمليات التخمير الصناعي باستخدام الفطريات عند تنميتها في اوساط غذائية اساسية [1].

ان حامض الكلوكونيك من الحوامض المهمة جدا فهو حامض معتدل لا يحدث تآكل وذو استخدامات كثيرة جدا في الصناعات الغذائية والدوائية وتطبيقات اخرى، وهذا الحامض ينتج حاليا بشكل تجاري بعمليات التخمير للاوساط الغذائية الكاربوهيدراتية بوساطة بعض الاحياء المجهرية كالفطر *Aspergillus niger* والفطر *Aureobasidium pullulans* والبكتريا [2]

Gluconobacter oxydans. وعلى هذا الاساس هدفت الدراسة الحالية الحصول على عزلات للفطر *A.pullulans* ومتابعة انتاجيتها للحامض العضوي كلوكونيك, وتضمنت الدراسة ما يأتي:

1. الحصول على عدد من عزلات الفطر *A.pulluans* من البيئة المحلية وتشخيص هذه العزلات بكونها فعلا تعود للفطر المذكور.
2. تحديد كفاءة العزلات المتحصل عليها في انتاج حامض الكلوكونيك.
3. اختيار احدى العزلات الاكثر كفاءة في انتاج حامض الكلوكونيك.
4. دراسة تاثير نوع المصدر الكاربوني والنيتروجيني وتركيزهما على انتاج حامض الكلوكونيك بوساطة العزلة المنتخبة.

مواد وطرائق العمل

1- الكائن المجهري Microorganism

تم في هذه الدراسة استخدام عزلات الفطر *Aureobasidium pullulans* التي عزلت من اوراق بعض النباتات المختلفة.

2- عزل الفطر *A.pullulans*

عزل الفطر *A.pullulans* بحسب [3] اذ جمعت اوراق غير مصابة لنباتات مختلفة (نباتات برية ونباتات حدائق) قطعت الى اجزاء صغيرة بوساطة شفرة معقمة ووضعت في دوارق مخروطية تحتوي على 40 مل ماء مقطر معقم ثم وضعت في حاضنة عند درجة حرارة 27±2 سيليزية لمدة ثلاثة ايام، بعدها اخذ 0.5 مل من منقوع كل نوع من الاوراق المنقوعة الى دوارق معقمة تحتوي على 25 مل من وسط عزل الفطر *A.pullulans* بحسب [3] والذي يتضمن ما يأتي: (غرام/لتر من الماء المقطر) سكروز 10، $(NH_4)_2HPO_4$ 1، NaCl 0.5، 0.05 $MgSO_4.7H_2O$، K_2HPO_4 2، 0.01 لكل من $FeSO_4$، $MnSO_4$، $ZnSO_4$.

بعد ان اضيف اليه 0.01 غرام/لتر من المضاد الحيوي كلورومفينيكول. وضبط الاس الهيدروجيني عند 4.0 وبمعدل ثلاثة دوارق لكل محلول من محاليل النقع للاوراق المختلفة، ثم حضنت الدوارق في حاضنة هزازة بمعدل رج 140 دورة/دقيقة لمدة يومين في درجة حرارة 27±2 سيليزية، بعدها رفعت الدوارق من الحاضنة وتركت لمدة (20) دقيقة لتستقر ثم اخذ ما لا يزيد عن 0.1 مل بوساطة ماصة دقيقة معقمة من المنطقة العليا لمحلول المزرعة ونشر في اطباق بتري تحتوي على الوسط المذكور اعلاه المضاف اليه الاكار (2%)، وحضنت في درجة حرارة 27±2 سيليزية لحين ظهور مستعمرات الفطريات.

تم نقل الفطريات النامية الى اطباق تحتوي على الوسط PDA وبعد النمو تم تنقيتها بنقل جزء من الغزل الفطري مأخوذ من حافة المستعمرة الفطرية الى انابيب اختبار تحتوي على

وسط (PDA) المائل المعقم ثم وضعت الانابيب في حاضنة عند درجة حرارة (27±2) سيليزية لحين اكتمال نمو مستعمرات الفطريات المعزولة بصورة نقية. اخذت عزلات الفطر *A.pullulans* واهملت الفطريات الاخرى.

3- تشخيص عزلة الفطر *A.pullulans*

تم تشخيص الفطر *A.pullulans* بالاعتماد على شكل الفطر (تواجد الاشكال المتعددة للفطر *A.pullulans* وهي الشكل الخميري والشكل الخيطي والكلاميدوسبورات) وكذلك انتاج الصبغة السوداء القتامين (الميلانين) [4] و[5].

4- ظروف حفظ العزلة Isolate maintenance conditions

حفظت العزلات المختلفة للفطر *A.pullulans* بعد تنميتها على وسط اكار البطاطا والدكستروز (PDA) على شكل مائل داخل انابيب الاختبار Slants في الثلاجة بدرجة حرارة (4) سيليزية، وتم تجديد المزارع كل اسبوعين.

5- الأوساط الزرعية

5-1 وسط عزل الفطر *A.pullulans*

حضر هذا الوسط بحسب [3] ويتضمن هذا الوسط ما يأتي: (غرام/لتر من الماء المقطر) سكروز 10، $(NH_4)_2HPO_4$ 1، NaCl 0.5، $MgSO_4.7H_2O$ 0.05، 2 K_2HPO_4، 0.01 لكل من $FeSO_4$، $MnSO_4$، $ZnSO_4$.

5-2 وسط مستخلص البطاطا والدكستروز والاكار PDA (Potato dextrose agar)

تم استخدام هذا الوسط لغرض حفظ الفطر المستخدم وتنشيطه. حضر هذا الوسط حسب طريقة.[6]

5-3 وسط تحضير اللقاح Inoculum preparation medium

استخدم هذا الوسط لتحضير الباديء أو اللقاح Starter or Inoculum، ويتضمن هذا الوسط ما يأتي: (غرام/لتر من الماء المقطر) كلوكوز 50، K_2HPO_4 5، NaCl 1، $MgSO_4.\ 7H_2O$ 0.2، $(NH_4)_2SO_4$ 0.6، مستخلص الخميرة 2.5 وضبط الاس الهيدروجيني عند 6.5 [7] .

5-4 وسط اختبار كفاءة انتاج حامض الكلوكونيك لعزلات الفطر *A.pullulans*

استخدم هذا الوسط لتنمية عزلات الفطر *A.pullulans* بهدف التعرف على قابليتها لإنتاج حامض الكلوكونيك، يتضمن هذا الوسط ما يأتي: (غرام/لتر من الماء المقطر) كلوكوز 100، مستخلص خميرة 5، $MgSO_4.7H_2O$ 0.5، KH_2PO_4 1، ثايامين 0.1، اكار 20، $CaCO_3$ 10 وتعقم بصورة منفردة وتضاف الى الوسط بعد ذلك، كما ذكر [8].

5-5 وسط انتاج حامض الكلوكونيك Production medium

تم اختيار وسط انتاج حامض الكلوكونيك بوصفه من الاوساط الصناعية المعروفة كيميائياً والداعمة لإنتاج عال من حامض الكلوكونيك من قبل الفطر *A.pullulans*. يحتوي الوسط ما يأتي: (غرام/لتر من الماء المقطر) كلوكوز 150، NH_4Cl 0.3، KH_2PO_4 0.3، $MgSO_4.7H_2O$ 0.3، $MnSO_4.4H_2O$ 0.0023، $FeSO_4.7H_2O$ 0.0028، ثايامين 0.002، بايوتين 0.000025 [8]. ونظرا لعدم توفر فيتامين البايوتين فقد تم اضافة مستخلص الخميرة (0.01) لكونه مصدراً لفيتامين البايوتين، وضبط الاس الهيدروجيني عند (6.5).

6- ضبط وقياس الاس الهيدروجيني Adjustment and Measurement of pH

تم ضبط الاس الهيدروجيني لجميع الاوساط الزرعية التي استخدمت في هذه الدراسة. عند انتهاء فترة التحضين حدد الاس الهيدروجيني الاولي (Initial pH) والاس الهيدروجيني النهائي (Final pH) بوساطة جهاز قياس الاس الهيدروجيني pH meter طراز(PW 94211 philips , England).

7- تحضير اللقاح Inoculum preparation

حضر اللقاح بنقل جزء من مستعمرة الفطر *A.pullulans* المنماة على وسط PDA وبعمر اسبوع واحد وباستعمال عروة التلقيح Loop الى دورق مخروطي معقم حجم 250 مل، يحتوي على 50 مل من وسط تحضير اللقاح (5-3) المعقم. ثم وضع الدورق في حاضنة هزازة في درجة حرارة 27±2 سيليزية وبمعدل رج 140 دورة/دقيقة ولمدة ثلاثة ايام.

8- طرائق التحليل Methods of analysis

8-1 تقدير الكتلة الحيوية Determination of biomass

بعد انتهاء فترة التحضين المعينة تم قياس الاس الهيدروجيني النهائي (Final pH) لكل مزرعة واجريت عملية النبذ لمركزي Centrifugation باستخدام جهاز النبذ المركزي Centrifuge لمحتوى كل دورق وبمعدل 6000 دورة/دقيقة ولمدة 20 دقيقة. اخذ الرائق وترك جانبا لتقدير حامض الكلوكونيك، وجمعت خلايا الفطر باطباق صغيرة جافة وموزونة مسبقا،

جففت في فرن كهربائي Electrical oven عند درجة حرارة 80 سيليزية لمدة 24 ساعة بعدها وزنت الاطباق مع الخلايا بميزان حساس وقيست الكتلة الحيوية بفارق الوزنين[9].

2-8 تقدير حامض الكلوكونيك Determination of gluconic acid

تم تقدير حامض الكلوكونيك في رائق المزرعة الفطرية بطريقة التسحيح وبحسب [10] اذ اخذ 10 مل من رائق المزرعة الفطرية الخالي من خلايا الفطر واضيف اليه كاشف الفينولفثالين (قطرة او قطرتين) ثم سحح المحلول مع هيدروكسيد الصوديوم (0.1ع) لحين الوصول الى نقطة التعادل، حسبت كمية محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.1ع) المضاف، بعد ذلك اضيف زيادة من محلول هيدروكسيد الصوديوم 5 مل وسخن المزيج في حمام مائي (Water bath) عند درجة حرارة 50-55 سيليزية لمدة 10 دقائق اذ انه عند هذه الدرجة، يتم تحلل الكلوكونو-دلتا-لاكتون الموجود كليا الى حامض الكلوكونيك، بعد ذلك يسحح المزيج مع (0.1ع) حامض الكبريتيك الى حين الوصول الى نقطة التعادل. وتحسب كمية حامض الكبريتيك (0.1ع) المضافة وتطرح من كمية محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH المضافة في المرحلة الثانية 5 مل، ثم يضاف الفرق الى كمية محلول هيدروكسيد الصوديوم اللازم لتعادل حامض الكلوكونيك في المرحلة الاولى. ويتم حساب حامض الكلوكونيك المنتج بعملية التخمير كما يلي:

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

حيث ان: V_1 حجم رائق المزرعة

N_1 عيارية حامض الكلوكونيك

V_2 حجم هيدروكسيد الصوديوم

N_2 عيارية محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.1ع)

يضاف الى V_2 مقدار الفرق بين حجم حامض الكبريتيك (0.1ع) وحجم هيدروكسيد الصوديوم المضاف في المرحلة الثانية.

(1) مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.1ع) تعادل 0.0196 غراماً من حامض الكلوكونيك لكل مل، بعد ذلك يضرب حجم محلول هيدروكسيد الصوديوم النهائي في (0.0196) وفي النهاية تحسب كمية حامض الكلوكونيك لكل لتر من رائق المزرعة.

9- التجارب

9-1 اختبار كفاءة عزلات الفطر *A.pullulans* المختلفة على انتاج حامض الكلوكونيك

نقل جزء من المستعمرة الفطرية للعزلات المختلفة على الوسط الغذائي (5-4) المعقم وبمعدل ثلاثة مكررات لكل عينة وبعد التحضين في درجة حرارة 27±2 سيليزية ولمدة 7 ايام، تم تحديد قطر النمو مع (الهالة او المنطقة البيضاء) التي تكونت حول مستعمرة الفطر والتي تدل على انتاج الحامض اذ ان كبر قطر الهالة دلالة على الانتاج الغزير [8].

9-2 مقارنة عزلتي الفطر *A.pullulans* من حيث القابلية على إنتاج حامض الكلوكونيك في وسط الإنتاج وعلى فترات حضانة مختلفة

تم في هذه التجربة زراعة عزلتي الفطر *A.pullulans* المحلية (المتحصل عليها من اوراق النباتات) في وسط الإنتاج (5-5) كلا على حدة لمتابعة انتاج حامض الكلوكونيك ونمو الفطر وتغيرات الاس الهيدروجيني وسجلت البيانات للعينات التي اخذت بعد فترات تحضين مختلفة (1، 2، 3، 4، 5) يوم من تلقيح الوسط الغذائي لعزلتي الفطر *A.pullulans* وعلى ضوء النتائج اختيرت العزلة ذات الانتاجية العالية من حامض الكلوكونيك وبفترة تحضين مثالية واعتمدت في جميع التجارب اللاحقة.

3-9 تأثير أنواع مختلفة من المصدر الكاربوني في إنتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية للفطر *A.pullulans* MU1

صممت هذه التجربة لدراسة تأثير مصادر كاربونية مختلفة على انتاج حامض الكلوكونيك ونمو الفطر وتغيرات الاس الهيدروجيني وكانت المصادر الكاربونية المستخدمة: كلوكوز، سكروز، مانوز، لاكتوز، كالاكتوز، رايبوز، زايلوز، فركتوز، ارابينوز، مالتوز. استخدمت هذه السكريات في اعلاه بتركيز 15% وحضر الوسط الغذائي (5-5) بمكوناته كافة فضلا عن السكريات في اعلاه كلا على حدة. ضبط الاس الهيدروجيني عند 6.5 وتم توزيع الوسط في الدوارق حجم 250 مل بمقدار 50 مل لكل دورق ثم التعقيم والتلقيح.

اخذت النتائج بعد (3) ايام من التحضين اعتماداً على التجربة السابقة. وفي ضوء نتائج هذه التجربة اعتمد السكروز بوصفه مصدرا كاربونيا مثاليا.

4-9 تأثير تراكيز مختلفة من السكروز في انتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية للفطر *A.pullulans* MU1

تم في هذه التجربة دراسة تأثير تراكيز مختلفة من السكروز على انتاج حامض الكلوكونيك، واضيف السكروز الى وسط الانتاج (5-5) بتراكيز مختلفة وكالاتي: (25، 50، 75، 100، 125، 150، 175، 200، 225، 250) غرام/لتر. ضبط الاس الهيدروجيني عند (6.5) وتم توزيع الوسط ثم التعقيم والتلقيح والتحضين واخذت النتائج بعد (3) ايام من التحضين. ولاجل ذلك اعتمد التركيز 15% سكروز.

5-9 تأثير مصادر نيتروجينية مختلفة في انتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية للفطر *A.pullulans* MU1

لغرض التعرف على افضل مصدر نيتروجيني للحصول على اعلى انتاجية من الحامض تم اضافة مصادر نيتروجينية مختلفة الى الوسط الغذائي الاساس الذي يحتوي على السكروز كمصدر كاربوني وتم استخدام المصادر النيتروجينية الآتية اعتمادا على المحتوى النيتروجيني لكلوريد الامونيوم NH_4Cl المستخدم في الوسط الاساس والذي هو

(0.08) غرام نيتروجين لكل لتر من الوسط وكما يأتي: (غرام/لتر) NH_4Cl 0.3، NH_4NO_3 0.23، $NaNO_3$ 0.48، $(NH_4)_2SO_4$ 0.38، $(NH_4)_2CO_3$ 0.27، Urea 0.17، Cysteine 0.69، Glycine 0.43، Asparagine 0.38.

اتبعت الخطوات نفسها كما في التجارب السابقة وتم اخذ النتائج بعد مرور (3) ايام من التحضين.

6-9 تأثير تراكيز مختلفة من المصدر النيتروجيني كلوريد الامونيوم NH_4Cl في إنتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية للفطر *A.pullulans* MU1

لقد اعطى كلوريد الامونيوم بوصفه مصدرا نيتروجينيا اقصى انتاجية لحامض الكلوكونيك في ضوء نتائج التجربة السابقة، فقد صممت هذه التجربة لدراسة تأثير تراكيز مختلفة من كلوريد الامونيوم على انتاج حامض الكلوكونيك. اذ اضيفت تراكيز مختلفة من كلوريد الامونيوم الى الوسط الغذائي وعلى انفراد وكما يأتي: (0.3، 0.8، 1.3، 1.8، 2.3، 2.8، 3.3، 3.8، 4.3، 4.8) غرام/لتر. وتم متابعة التجربة كما هو موضح سابقا.

النتائج والمناقشة

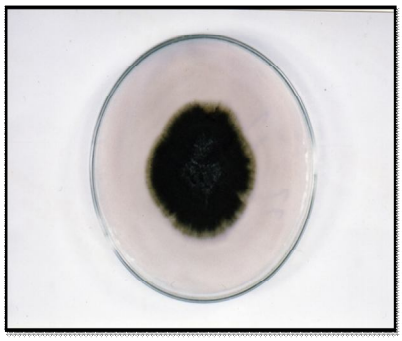
تشخيص العزلات المحلية للفطر *Aureobasidium pullulans*

تم تشخيص 16 عزلة محلية للفطر *A.pullulans* والتي تميزت باللون الاسود (شكل 1)، اذ ان هذا الفطر يتميز باللون الاسود نتيجة لافراز صبغة الميلانين أو القتامين السوداء [5]. وقد تبين بوساطة الفحص المجهري للفطر *A.pullulans* حقيقة الاشكال المتعددة للفطر وهي الشكل الخميري والخيطي والكلاميدوسبورات (شكل 2) ان هذه الاشكال الخيطي والخميري والكلاميدوسبورات تعد صفة مميزة للفطر *A.pullulans*.[4] وبالاعتماد على الاختبارات آنفة الذكر فقد تم تنقية العزلات المختلفة بشكل مطلق وحفظت بوصفها عزلات حقيقية للفطر *A.pullulans*.

مقارنة العزلات المحلية المختلفة للفطر *A.pullulans* من حيث اختبار كفاءتها في إنتاج حامض الكلوكونيك

اظهرت نتائج مقارنة انتاجية حامض الكلوكونيك للعزلات المختلفة عند تنميتها في اطباق بتري حاوية على وسط اختبار كفاءة انتاج حامض الكلوكونيك (5-4)، ان هناك عزلتين فقط اعطت انتاجية عالية نسبيا لهذا الحامض، وقد تم تحديد كفاءة هاتين العزلتين بالاعتماد على قطر الهالة المتكونة حول مستعمرة عزلة الفطر *A.pullulans* واهمال العزلات الاخرى اذ ان زيادة قطر الهالة يعني ان هناك كفاءة في انتاج حامض الكلوكونيك، وقد تم اختيار هاتين العزلتين فقط من بين العزلات الست عشرة المتحصل عليها كعزلات محلية للفطر *A.pullulans* (*A.pullulans* MU1 و *A.pullulans* MU2)

(شكل 3)، تتميز بانتاجية عالية لحامض الكلوكونيك. وقد اشار [8] ان زيادة قطر الهالة المحيطة بالفطر تمثل كفاءة عالية لعزلة الفطر *A.pullulans* في انتاج حامض الكلوكونيك.

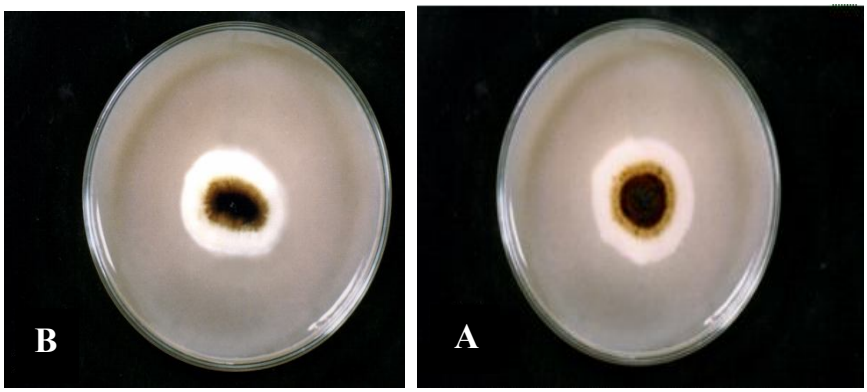


شكل (1): الفطر *A.pullulans* النامي على وسط (PDA) وبعمر خمسة ايام

شكل (2): الأشكال المتعددة للفطر *A.pullulans*

A: الطور الخميري B: الطور الخيطي (طور المايسليوم) C: طور الكلاميدوسبورات

قوة التكبير 40X



شكل (3): كفاءة انتاج حامض الكلوكونيك بوساطة عزلتي الفطر *A.pullulans*

***A.pullulans* MU1 :A، *A.pullulans* MU2 :B**

مقارنة عزلتي الفطر *A.pullulans* MU1 و *A.pullulans* MU2 من حيث الكفاءة في انتاج حامض الكلوكونيك في الوسط السائل

اظهـرت نتـائج مقارنـة انتاجيـة حـامض الكلوكونيـك بوسـاطة عزلتـي الفطـر *A.pullulans* MU1 و *A.pullulans* MU2 (جدول 1 و شكل 4) ان اقصى انتاجية لحامض الكلوكونيك (12.7) غرام/لتر تم الحصول عليها بوساطة العزلة *A.pullulans* MU1 بعد 3 ايام من التحضين، بينما اعطت العزلة *A.pullulans* MU2 اقصى انتاجية لحامض الكلوكونيك بلغت 10.4 غرام/لتر بعد 5 ايام من التحضين وقد تمت المقارنة بين هاتين الفترتين الزمنيتين لان فيهما تم الحصول على اعلى انتاجية للحامض.

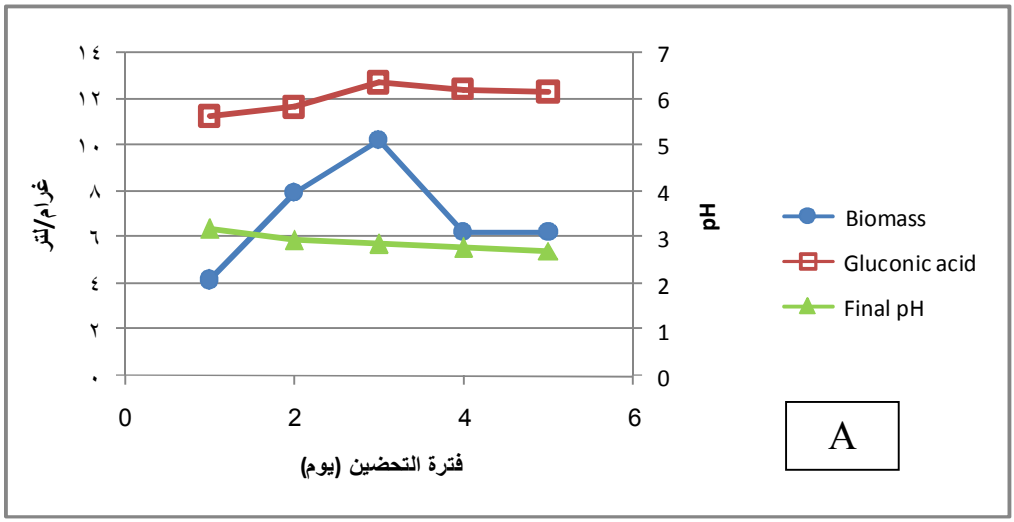
فيما يتعلق بالكتلة الحيوية فقد كان هناك ارتفاع في الكتلة الحيوية مع زيادة فترة التحضين ولحد اليوم الثالث بالنسبة للعزلة MU1 حيث بلغت(10.21) غرام/لتر، وبعد ذلك كان هناك انخفاض في الكتلة الحيوية. ويبدو ان تراكم المواد الايضية في المزرعة الفطرية ادت الى حدوث تثبيط في نمو الفطر. اما بالنسبة للعزلة MU2 فيبدو ان اقصى نمو للفطر تم بعد يومين من التحضين حيث بلغت 5.83 غرام/لتر وكان هناك انخفاض ضئيل جدا في الكتلة الحيوية في الايام الثلاثة الاخيرة من التحضين.

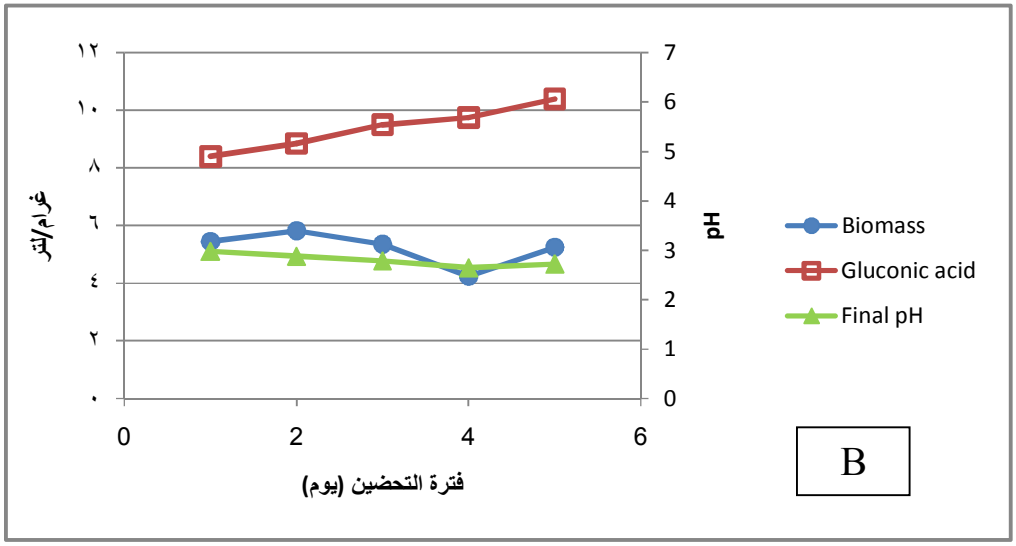
الاس الهيدروجيني النهائي للوسط الغذائي انخفض خلال فترات التخمير المختلفة عن 6.5 وهذا يمثل صورة طبيعية لمزرعة الفطر لان هذا الفطر ينتج حامضا عضويا (حامض الكلوكونيك) ومن المؤكد سوف يؤدي هذا الى انخفاض بالاس الهيدروجيني للمزرعة الفطرية. وبالاعتماد على الانتاجية العالية للعزلة MU1 من حامض الكلوكونيك فقد تم اختيار هذه العزلة في التجارب اللاحقة، واعتمدت فترة التحضين ثلاثة ايام في التجارب اللاحقة أيضاً.

جدول (1): إنتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية والاس الهيدروجيني النهائي لعزلتي الفطر *A.pullulans* خلال خمسة ايام من التحضين عند درجة حرارة (27 ± 2) سيليزية

عزلتي الفطر	فترة التحضين Incubation (يوم)	الكتلة الحيوية Biomass (غرام/لتر)	حامض الكلوكونيك Gluconic acid (غرام/لتر)	الاس الهيدروجيني النهائي Final pH
MU1	1	4.16 (0.29)	11.25 (0.78)	3.18
	2	7.94 (0.04)	11.65 (0.35)	2.94
	3	10.21 (1.22)	12.70 (0.85)	2.86
	4	6.26 (0.27)	12.45 (0.35)	2.73
	5	6.23 (0.17)	12.3 (0.14)	2.72
MU2	1	5.45 (0.69)	8.40 (0.42)	2.98
	2	5.83 (0.94)	8.85 (0.49)	2.88
	3	5.36 (0.14)	9.50 (0.57)	2.79
	4	4.25 (0.43)	9.75 (0.78)	2.65
	5	5.25 (0.70)	10.40 (0.42)	2.72

كل قيمة تمثل معدل لمكررين. اما الارقام بين القوسين فهي تمثل الانحراف المعياري ± (S.D)





شكل (4): انتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية والاس الهيدروجيني النهائي لعزلتي الفطر A: *A.pullulans* MU1 و B: *A.pullulans* MU2 على التوالي خلال خمسة ايام من التحضين

تأثير أنواع مختلفة من المصدر الكاربوني في إنتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية للفطر *A.pullulans* MU1

تم تنمية العزلة *A.pullulans* MU1 في وسط الانتاج (5-5) باستخدام سكريات مختلفة بتركيز (15%) بوصفها مصادر كاربونية. وتبين النتائج (جدول 2 وشكل 5) بان اضافة كل من السكروز والكلوكوز الى الوسط الغذائي اعطت اعلى انتاجية من حامض الكلوكونيك (14.95 و 13.85) غرام/لتر على التوالي، بعد 3 ايام من التحضين. بينما كانت اقل انتاجية للحامض عند استخدام الكلاكتوز بحيث بلغت (6.1) غرام/ لتر، في حين تباينت السكريات

الاخرى المستخدمة في هذه التجربة بوصفها مصادر كاربونية في دعم انتاج الحامض او تثبيطه ما بين اعلى واقل قيمة للانتاج.

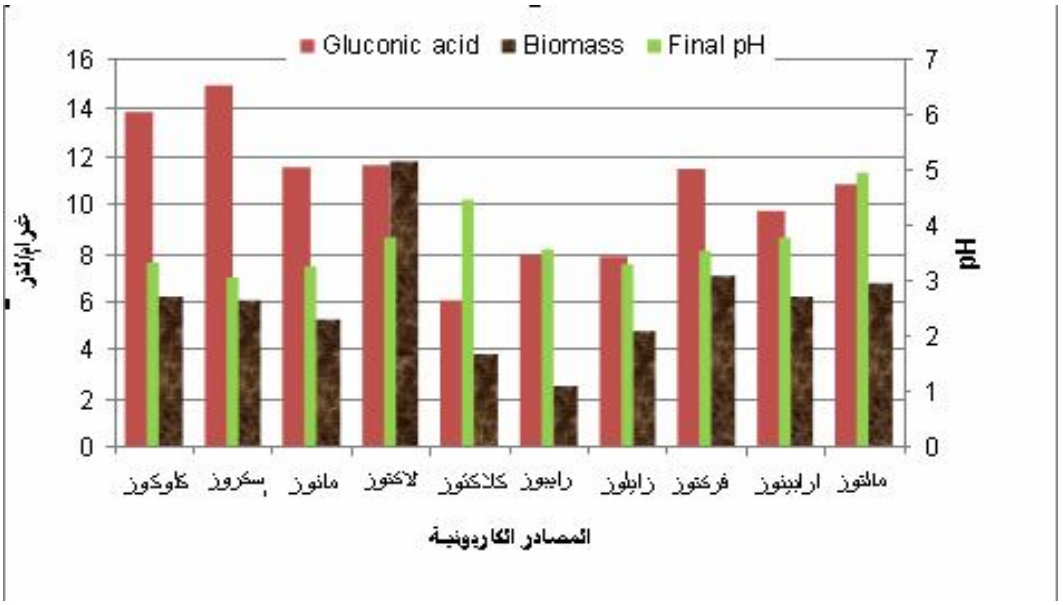
ان هذه النتيجة المتحصل عليها في هذه الدراسة اتفقت مع ما ذكره [10] اذ استخدم السكروز والكلوكوز لانتاج حامض الكلوكونيك بوساطة الفطر *Penicillium luteum*. كما ان هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه [8] الى ان الكلوكوز هو افضل سكر لانتاج حامض الكلوكونيك بوساطة الفطر *A.pullulans*.

اما ما يخص الاس الهيدروجيني النهائي فان هناك انخفاضا ملحوظا عن الاس الهيدروجيني الاولي 6.5 ولجميع انواع السكريات المستخدمة في هذه التجربة، ويبدو ان هذا الانخفاض نتيجة لانتاج الحامض العضوي الكلوكونيك وتراكمه اثناء فترة التخمير.

جدول (2): تأثير انواع مختلفة من المصدر الكاربوني في انتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية والاس الهيدروجيني النهائي للفطر *A.pullulans* MU1

المصدر الكاربوني Carbone Source السكريات 15%	الكتلة الحيوية Biomass (غرام/لتر)	حامض الكلوكونيك Gluconic acid (غرام/لتر)	الاس الهيدروجيني النهائي Final pH
كلوكوز	6.21 (0.52)	13.85 (0.49)	3.36
سكروز	6.04 (0.69)	14.95 (0.07)	3.08
مانوز	5.26 (0.06)	11.60 (0.42)	3.27
لاكتوز	11.81 (0.67)	11.70 (0.71)	3.78
كالاكتوز	3.89 (0.07)	6.10 (1.13)	4.47
رايبوز	2.56 (0.29)	8.00 (0.57)	3.58
زايلوز	4.77 (0.44)	7.90 (0.28)	3.30
فركتوز	7.11 (0.37)	11.50 (0.56)	3.54
ارابينوز	6.19 (0.40)	9.75 (0.64)	3.79
مالتوز	6.76 (0.50)	10.85 (0.63)	4.96

كل قيمة تمثل معدل لمكررين. اما الارقام بين القوسين فهي تمثل الانحراف المعياري ± (S.D)



شكل (5): تأثير انواع مختلفة من المصدر الكاربوني في انتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية والاس الهيدروجيني النهائي للفطر *A.pullulans* MU1

تأثير تراكيز مختلفة من السكروز في انتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية للفطر *A.pullulans* MU1

تم زراعة الفطر *A.pullulans* MU1 في وسط الانتاج المزود بتراكيز مختلفة من السكروز بوصفه مصدرا كاربونيا. اظهرت النتائج (جدول3 وشكل 6) بعد (3) ايام من التحضين ان زيادة تركيز السكروز في الوسط الغذائي ادت الى زيادة انتاج حامض الكلوكونيك. وبصورة عامة فان انتاجية حامض الكلوكونيك كانت متقاربة عند تراكيز السكروز (15 و 17.5 و 20 و 22.5)% اذ تم الحصول على انتاج من حامض الكلوكونيك (15.10 و 15.10 و 15.15 و 15.00) غرام/لتر على التوالي. بينما كان هناك انخفاض في انتاج حامض الكلوكونيك عندما اضيف السكروز بتركيز 25% اذ تم الحصول على (13.8) غرام/لتر من حامض الكلوكونيك.

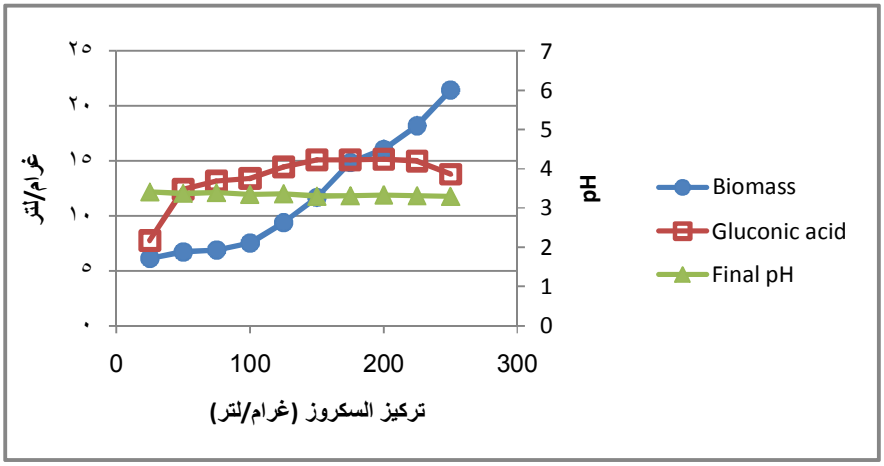
اشار [10] الى الحصول على اقصى كمية لحامض الكلوكونيك (129.7) غرام/لتر عند تركيز 25 % من الكلوكوز المستخدم كمصدر كاربوني في الوسط الغذائي لتنمية الفطر *P.luteum*.

فيما يتعلق بنمو الفطر فقد بدا واضحا ان هناك زيادة في انتاج الكتلة الحيوية كانت مرافقة لزيادة تركيز السكروز اذ وصل اقصى انتاج من الكتلة الحيوية (21.46) غرام/لتر عند استخدام السكروز بتركيز 25 %. ويبدو ان هناك علاقة شبه طردية ما بين زيادة انتاجية حامض الكلوكونيك ونمو الفطر مع زيادة تركيز السكروز ولغاية مستوى السكر الامثل للنمو والانتاجية.

جدول (3): تأثير تراكيز مختلفة من السكروز في انتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية والاس الهيدروجيني النهائي للفطر *A.pullulans* MU1

تركيز السكروز (غرام/لتر)	الكتلة الحيوية Biomass (غرام/لتر)	حامض الكلوكونيك Gluconic acid (غرام/لتر)	الاس الهيدروجيني النهائي Final pH
25	6.12 (0.16)	7.75 (0.49)	3.41
50	6.72 (0.24)	12.40 (0.42)	3.37
75	6.90 (0.40)	13.15 (0.35)	3.39
100	7.52 (0.38)	13.40 (0.42)	3.35
125	9.39 (0.45)	14.45 (0.49)	3.36
150	11.69 (0.38)	15.10 (0.28)	3.30
175	14.85 (0.55)	15.10 (1.13)	3.31
200	16.05 (0.57)	15.15 (0.63)	3.33
225	18.21 (0.50)	15.00 (0.28)	3.31
250	21.46 (0.72)	13.80 (0.71)	3.29

كل قيمة تمثل معدل لمكررين. اما الارقام بين القوسين فهي تمثل الانحراف المعياري ± (S.D)



شكل (6): تأثير تراكيز مختلفة من السكروز في انتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية والاس الهيدروجيني النهائي للفطر *A.pullulans* MU1

تأثير أنواع مختلفة من المصدر النيتروجيني في انتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية للفطر *A.pullulans* MU1

تم اضافة مصادر نيتروجينية مختلفة الى وسط الانتاج المستخدم لتنمية الفطر *A.pullulans* MU1 بتركيز متساوٍ على اساس المحتوى النيتروجيني المستخدم في الوسط الاساس كلوريد الامونيوم NH_4Cl والذي هو 0.08 غرام نيتروجين/لتر. اوضحت النتائج المبينة في (جدول 4 وشكل 7) بعد 3 ايام من التحضين، ان المصدر النيتروجيني كلوريد الامونيوم قد اعطى اقصى انتاجية لحامض الكلوكونيك اذ بلغ 14.70غرام/لتر، في حين ان اقل انتاج للحامض تم الحصول عليه عند استخدام اليوريا كمصدر نيتروجيني اذ بلغ الانتاج 6.35 غرام/لتر. ويليه نترات الصوديوم $NaNO_3$ (6.40) غرام/لتر ومن ثم كاربونات الامونيوم $(NH_4)_2 CO_3$ (6.65) غرام/لتر.

اتفقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليه [8] الى ان كلوريد الامونيوم هو افضل مصدر نيتروجيني للحصول على اعلى انتاج من حامض الكلوكونيك بوساطة الفطر *A.pullulans*.

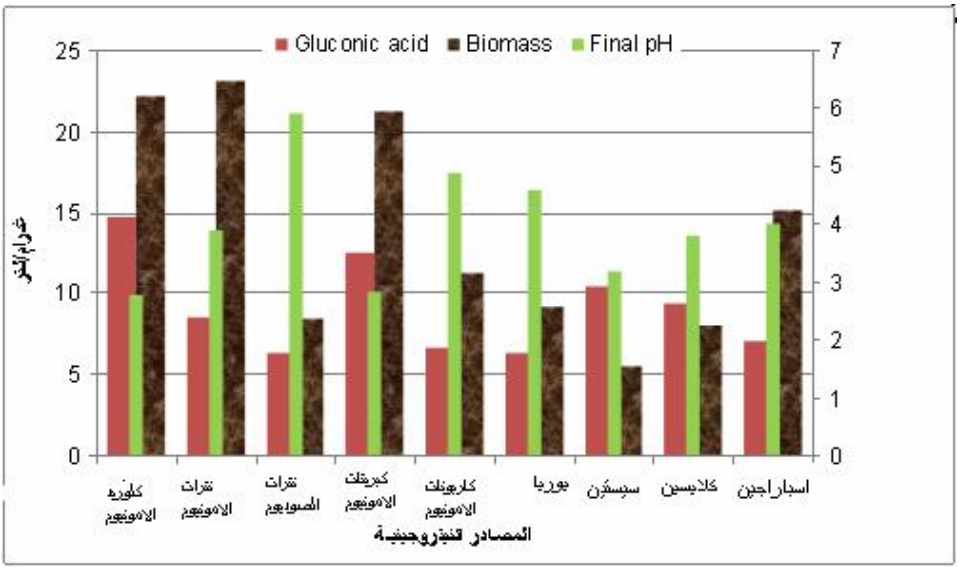
أما نمو الفطر *A.pullulans* MU1 فقد تم الحصول على اقصى انتاجية للكتلة الحيوية عند استخدام نترات الامونيوم NH_4NO_3 اذ بلغت 23.09 غرام/لتر واقل كتلة حيوية عند استخدام الحامض الاميني السستين Cysteine حيث بلغت 5.57 غرام/لتر. ويبدو من نتائج هذه التجربة ان المصادر اللاعضوية للنيتروجين المستخدمة قد دعمت انتاجية عالية لحامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية اكثر من المصادر العضوية للنيتروجين المستخدمة في هذه التجربة. انخفض الاس الهيدروجيني النهائي بعد التخمر عن الاس الهيدروجيني الاولي بسبب انتاج الحامض.

جدول (4): تأثير انواع مختلفة من المصدر النيتروجيني في انتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية والاس الهيدروجيني النهائي للفطر *A.pullulans* MU1

المصدر النيتروجيني Nitrogen Source (0.08 غرام نيتروجين/لتر)	الكتلة الحيوية Biomass (غرام/لتر)	حامض الكلوكونيك Gluconic acid (غرام/لتر)	الاس الهيدروجيني النهائي Final pH
NH_4Cl	22.19 (0.68)	14.70 (0.57)	2.79
NH_4NO_3	23.09 (0.23)	8.55 (0.49)	3.91
$NaNO_3$	8.48 (0.04)	6.40 (0.42)	5.91
$(NH_4)_2 SO_4$	21.23 (0.21)	12.55 (0.21)	2.85
$(NH_4)_2 CO_3$	11.30 (1.53)	6.65 (0.21)	4.89
Urea	9.16	6.35	4.60

	(0.35)	(0.12)	
3.19	10.50 (0.28)	5.57 (0.01)	Cysteine
3.82	9.40 (0.42)	8.04 (0.21)	Glycine
4.01	7.15 (0.07)	15.15 (0.39)	Asparagine

كل قيمة تمثل معدل لمكررين. اما الارقام بين القوسين فهي تمثل الانحراف المعياري ± (S.D).



شكل (7): تأثير أنواع مختلفة من المصدر النيتروجيني في انتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية والاس الهيدروجيني النهائي للفطر *A.pullulans* MU1

تأثير تراكيز مختلفة من كلوريد الامونيوم NH_4Cl في انتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية للفطر *A.pullulans* MU1

بينت النتائج (جدول 5 وشكل 8) وبعد 3 ايام من التحضين تدرج في زيادة انتاج حامض الكلوكونيك بزيادة تركيز كلوريد الامونيوم وصولا إلى اقصى انتاجية عند 4.8 غرام/لتر اذ بلغ انتاج الحامض 25.45 غرام/لتر، بينما اقل انتاجية لحامض الكلوكونيك 14.05 غرام/لتر تم التوصل اليها عند 0.3 غرام/لتر علما ان 0.3 غرام/لتر من كلوريد الامونيوم يعادل محتوى نيتروجيني 0.08 غرام نيتروجين/لتر والمستخدم في وسط الانتاج (5-5).

بين [8] الى انه باستخدام 0.5 غرام/لتر من كلوريد الامونيوم كمصدر نيتروجيني تم الحصول على اعلى انتاج لحامض الكلوكونيك بوساطة احد عزلات الفطر *A.pullulans*.

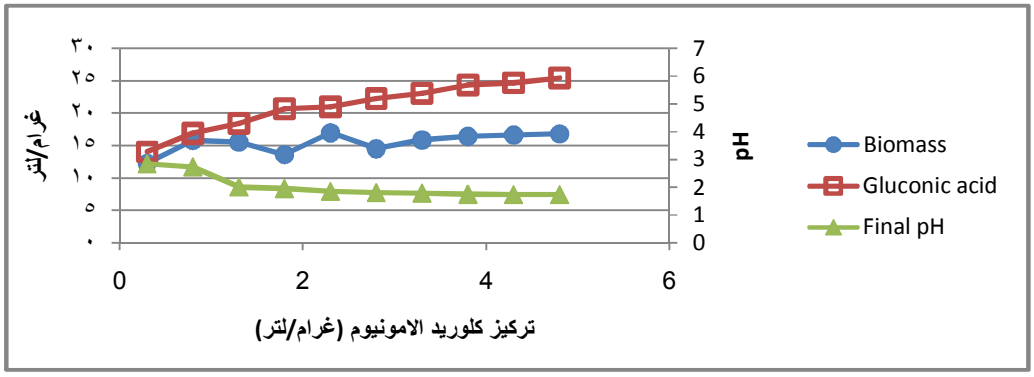
أما فيما يتعلق بانتاج الكتلة الحيوية فقد تباينت بشكل قليل مع اختلاف تراكيز كلوريد الامونيوم المستخدم، ويبدو ان التراكيز العالية من كلوريد الامونيوم قد دعمت انتاجية عالية

للكتلة الحيوية وقد تم الحصول على اقصى انتاجية للكتلة الحيوية 16.99 غرام/لتر عند اضافة كلوريد الامونيوم بمقدار 2.3 غرام/ لتر، وادنى انتاجية للكتلة الحيوية تم الحصول عليها عند اضافة 0.3 غرام/ لتر من كلوريد الامونيوم، وبشكل عام فان زيادة كمية كلوريد الامونيوم قد دعم انتاجية عالية لحامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية. ان الاس الهيدروجيني النهائي انخفض عن الاس الهيدروجيني الاولي لجميع تراكيز المصدر النيتروجيني المستخدمة في هذه الدراسة.

جدول (5): تأثير تراكيز مختلفة من كلوريد الامونيوم NH_4Cl في انتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية والاس الهيدروجيني النهائي للفطر *A.pullulans* MU1

كمية NH_4Cl (غرام/لتر)	الكتلة الحيوية Biomass (غرام/لتر)	حامض الكلوكونيك Gluconic acid (غرام/لتر)	الاس الهيدروجيني النهائي Final pH
0.3	12.27 (0.22)	14.05 (1.06)	2.84
0.8	15.79 (0.74)	16.90 (0.28)	2.73
1.3	15.54 (0.26)	18.45 (0.49)	2.01
1.8	13.61 (0.70)	20.70 (0.85)	1.95
2.3	16.99 (0.63)	21.00 (0.42)	1.86
2.8	14.53 (0.54)	22.25 (0.21)	1.80
3.3	15.88 (0.44)	23.10 (0.28)	1.79
3.8	16.43 (0.23)	24.40 (0.14)	1.75
4.3	16.63 (0.34)	24.70 (0.57)	1.74
4.8	16.82 (0.23)	25.45 (0.35)	1.74

كل قيمة تمثل معدل لمكررين. اما الارقام بين القوسين فهي تمثل الانحراف المعياري ± (S.D)



شكل (8): تأثير الكميات المختلفة المضافة من كلوريد الامونيوم NH4Cl في انتاج حامض الكلوكونيك والكتلة الحيوية والاس الهيدروجيني النهائي للفطر *A.pullulans* MU1

المصادر

1) الخفاجي, زهرة محمود. التقنية الحيوية. مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر, الموصل, العراق.(1990)

2) Ramachandran, S.; Fontanille, P., Pandey, A. and Larroche, C. Gluconic acid: properties, application and microbial production. Food Technol. Biotechnol., 44:185-195.(2006).

3) Pollock, T.J.; Thorne, L. and Armentrout, R.W. Isolation of new *Aureobasidium* strain that produce high – molecular weight pullulan wieh reduced pigmentation. Appl. Environ. Microbiol., 58: 877-883 (1992).

4) P0llock, T.J. Pullulan from polymorphic *Aureobasidium pullulans* SIM Ind. Microbiol. News., 42: 147-155 (1992).

5) Gadd, G.M. Melanin production and differentiation in batch cultures of the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*. FEMS Microbial. ett., 9:237-240 (1980).

6) Booth, C. "Fungul Culture Media In Methods In Microbiology". Edited by Booth, Academic Press, New York, U.S.A., 4: 49-94 (1971).

7) Ono, K.; Yasuda, N. and Ueda, S. Effect of pH on pullulan elaboration by *Aureobasidium pullulans* S-1. Agric. Biol. Chem., 41: 2113-2118 (1977).

8) Anastassiadis, S.; Aivasidis, A. and Wandrey, C. Continuous gluconic acid production by isolated yeast-like mould strains of *Aureobasidium pullulans.* Appl. Microbiol. Biotechnol., 61:110-117 (2003).

9) العبيدي, صفاء اسماعيل رشيد. ظروف انتاج وطبيعة السكر المتعدد البوليولان المنتج بوساطة احدى العزلات المحلية للفطر *Aureobasidium pullulans*. رسالة ماجستير, كلية التربية, جامعة الموصل, العراق.(1998)

10) Herrick, T. and May ,E. The production of gluconic acid by the *Pencillium luteum*–purpurogenum group: II. Some optimal conditions for acid formation. J.Biol. Chem., 77: 185- 195 (1928).