إنتاج حامض ألستريك بواسطة عزلات محلية مختلفة من الفطر *Aspergillus niger*♦

محمد بشير إسماعيل قاسم
قسم علوم الحياة / كلية التربية

إنعام جاسم محمد الحمداني
قسم علوم الحياة / كلية التربية للبنات

جامعة الموصل

ABSTRACT

Thirty two different local isolates of the fungus *Aspergillus niger* were obtained from different sources such as (seeds , plant parts , soil , air , and plants callus infected with the fungus).The local isolates were compared with their efficiencies to produce citric acid. Production of citric acid by the isolate obtained from chickpea seeds highly exceeded that produced by other isolates of the fungus .The production of citric acid by this isolate was(20.41g \l)after ten days of incubation.

الخلاصة

تم الحصول على (32)عزلة محلية مختلفة من *الفطر Aspergillus niger* عزلت من مصادر مختلفة مثل(البذور ، الأجزاء النباتية ، التربة ، الهواء ، وكالس النباتات المصابة بالفطر). قورنت العزلات المحلية المختلفة للفطر من حيث قابليتها على إنتاج حامض الستريك . فاق إنتاج العزلة المعزولة من بذور الحمص من إنتاج حامض ألستريك بدرجة كبيرة ماأنتجته العزلات المحلية الأخرى للفطر وكانت إنتاجية هذه العزلةالمحلية (20.41 غم /لتر) من حامض ألستريك بعد عشرة أيام من التحضين .

المقدمة

عزل حامض ألستريك (2-هيدروكسي بروبان 1-2-3 ثلاثي حامض الكاربوكسليك) اولاً وبلّور من عصير الليمون من قبل Karl Wihrelm scheele سنة (1784) يوجد هذا الحامض بشكل طبيعي في ثمار أنواع فصيلة الليمون والتفاح والأناناس والكمثرى والخوخ وعدت الفواكه من الفصيلة الليمونية كمصدر غني بالإنتاج التجاري لحامض ألستريك (1). حامض ألستريك هو احد نتاجات التقانة الحيوية وهو من الحوامض العضوية المهمة له

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4 - 5 أيلول 2007

تطبيقات عديدة في الأغذية والصناعات الكيميائية والصيدلانية كمواد منكهة ومواد حافظة ومثبتة (2) . حامض ألستريك من أهم المركبات الكيمائية المنتجة بواسطة الصناعة التخميرية Industrial fermentation باستخدام سلالات معينة من الفطر *Aspergillus niger* بتنميته في أوساط غذائية غنية بالسكر (3) . وبعد انتهاء عملية التخمر يفصل رائق المزرعة الفطرية ويضاف له اوكسيد الكالسيوم بكميات معينة لترسيب سترات الكالسيوم التي تعزل بالترشيح وبعد ذلك يضاف حامض الكبريتيك بتركيز معين لتحرير حامض ألستريك وترسيب كبريتات الكالسيوم (4) .

يمكن تحسين إنتاجية الحامض من الفطر *A. niger* عن طريق تحسين الظروف التخميرية مثل درجة الحرارة والتهوية والأس الهيدروجيني واستخدام أوساط غذائية مناسبة أو البحث عن عزلات ذات إنتاجية عالية أو تحسين العزلات بتغير أنظمتها الوراثية باستخدام المطفرات الفيزيائية والكيميائية حيث إن العديد من سلالات الفطر *A. niger* المستخدمة على نطاق صناعي قد اجري لها تغيرات في طرازها الوراثي من خلال استخدام طرائق التطفير المختلفة للحصول على سلالات ذات قدرة إنتاجية عالية (5) .

تم في هذا البحث الحصول على سلالات (عزلات) محلية للفطر *A.niger* منتجة لحامض الستريك .

المواد وطرائق العمل

الكائن المجهري :

استخدمت في هذه الدراسة عدة عزلات من الفطر *Aspergillus niger* تم الحصول عليها من مصادر متعددة.

الأوساط الزرعية :

1.وسط مستخلص البطاطا والدكستروز والاكار(PDA) .

حضر هذا الوسط حسب طريقة Booth(6). ويتضمن هذا الوسط (غم /لتر من الماء المقطر)200غم من البطاطا الطازجة ،20غم من الدكستروز ،20غم من الاكار وإكمال الحجم إلى واحد لتر . أستخدم هذا الوسط لغرض عزل وحفظ العزلات المختلفة من الفطر *A. niger* وقد تم تجديد مزارع العزلات المختلفة على هذا الوسط كل اسبوعين .

2. وسط إنتاج حامض ألستريك

تم اختيار وسط حامض ألستريك بوصفه من الأوساط المعروفة كيمائياً والداعمة لإنتاج عالٍ من حامض ألستريك (7) يحتوي الوسط ما يلي :

(غم/لتر من الماء المقطر) . (140) من السكروز التجاري ، (KH_2PO_4 (1.0 ، (2.50) NH_4NO_3 ، ($MgSO_4.7H_2O$ (0.250 ، ($CuSO_4.5H_2O$ (0.040 . وتم ضبط الأس الهيدروجيني عند (2.5) .

عزل السلالات المحلية

العزل من البذور

تم الحصول على بذور لنباتات متعددة وهي بالأساس أعلاف حيوانية(تم الحصول عليها من الأسواق المحلية في مدينة الموصل) . وهي بذور الحنطة والشعير والعدس والرز والحمص والفاصوليا وحبوب الذرة . وقد تم الحصول على أكثر من عينة من هذه البذور من محلات مختلفة. أخذت البذور وعقمت سطحيا بغمرها في محلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز(0.5 %) لمدة (1–2) دقيقة وغسلت بالماء المقطر المعقم ثم جففت بواسطة أوراق الترشيح المعقمة ونقلت بواسطة ملقط معقم إلى أطباق بتري معقمة بقطر (9) سم حاوية على وسط مستخلص البطاطا والدكستروز والاكار (PDA) مضاف إليه المضاد الحيوي كلورامفينيكول بتركيز (10) مايكروغرام/مل لمنع نمو البكتريا بمعدل (7 بذور/طبق) ووضعت الأطباق في حاضنة عند درجة (27 1 ± م) ولمدة (3-10) أيام ثم فحصت نموات الفطرية الناتجة من البذور المعقمة وعزلت الفطريات النامية (8) .

العزل من الأجزاء النباتية

تم الحصول على ثمار كل من (التمر ، الكمثرى ، التين ، أوراق البصل) التي تبدو عليها الإصابات الفطرية غسلت في البداية تحت تيار الماء الجاري لإزالة الاوساخ العالقة بها ثم أخذت القطع المصابة وقطعت إلى قطع صغيرة متساوية الأبعاد وغمرت في محلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز (0.5 %) لمدة (1–2) دقيقة. بعد ذلك غسلت القطع في الماء المقطر المعقم وجففت بين أوراق الترشيح المعقمة ونقلت بواسطة ملقط معقم إلى أطباق بتري معقمة بقطر (9) سم حاوية على وسط (PDA) المضاف إليه المضاد الحيوي كلورامفينيكول بتركيز (10) مايكروغرام/مل وبمعدل (5 قطع / نبات) وزرعت بصورة منتظمة لكل طبق حضنت الأطباق عند درجة حرارة (27 ± 1م) لمدة (2-8) أيام بعدها فحصت ثم عزلت النموات الفطرية من القطع المصابة .

العزل من التربة

أخذت عينات من التربة من مناطق مختلفة من مدينة الموصل وتم تنظيفها جيدا من الاوساخ والشوائب ثم نخلت بواسطة منخل ذي ثقوب ناعمة وجففت في فرن كهربائي عند درجة حرارة (50 م) ثم اخذ (1غم) من العينة وأضيف إلى دورق بحجم (250) مل يحتوي

على (99) مل من الماء المقطر المعقم ورجت العينة بشكل جيد لمدة (3) دقائق بعد ذلك اخذ (1) مل من المزيج بواسطة ماصة معقمة ونقل إلى أنبوبة اختبار معقمة تحتوي على (9) مل من الماء المقطر المعقم ثم أجريت بعد ذلك تخافيف أخرى لغاية (10000/1) بعد ذلك اخذ (1) مل من التخفيف الأخير وفرش في طبق بتري يحتوي على وسط (PDA) المعقم مضاف إليه المضاد الحيوي كلورامفينيكول بتركيز (10) مايكروغرام/مل وبواقع (3) مكررات/عينة. وضعت الأطباق في حاضنة عند درجة حرارة (27 ± 1 م°) لمدة (2-8) أيام بعدها فحصت المستعمرات النامية ثم أجريت عملية نقل الفطريات النامية .

العزل من كالس بعض النباتات الملوثة

تم الحصول على مزارع كالس بعض النباتات من مختبر زراعة الأنسجة في قسم علوم الحياة/ كلية التربية / جامعة الموصل والتي تظهر عليها نموات بعض الفطريات بشكل واضح نقلت هذه الفطريات إلى انابيب اختبار تحتوي على الوسط الغذائي (PDA) بشكل مائل مضاف إليه المضاد الحيوي كلورامفينيكول بتركيز (10) مايكروغرام/مل. وفحصت الفطريات النامية .

العزل من الهواء

أخذت أطباق بتري بقطر (9) سم تحتوي على الوسط الغذائي المعقم (PDA) وفتحت هذه الأطباق لمدة (10) دقائق في مناطق مختلفة (مختبر ، منزل) بعد ذلك حضنت الأطباق في حاضنة عند درجة حرارة (27 ± 1 م°) لمدة (2-8) أيام وبعدها تم عزل وفحص الفطريات النامية .

اللقاح

حضر اللقاح بنقل جزء من مستعمرة الفطر المنماة على وسط (PDA) وبعمر أسبوع واحد وأضيف إليها (5)مل من الماء المقطر المعقم المضاف إليه Tween 80بتركيز (1%) حركت الأنابيب بشكل قوي لغرض فصل الاسبورات (الكونيدات) الفطر بشكل جيد وجمعت في دورق زجاجي معقم بحجم 250مل تم تحديد تركيز السبورات في اللقاح بواسطة شريحة تحديد عدد كريات الدم Haemocytometer x 1 10^6 سبور/ مل .

الظروف الزرعية

تم توزيع وسط الإنتاج في دوارق مخروطية سعة 250مل بمقدار 100مل /دورق وبمعدل (3) مكررات /معاملة . سدت الدوارق بإحكام بسدادات قطنية عقمت بجهاز المعقم عند الضغط 1كغم /سم^2 ودرجة حرارة 120 سيليزية ولمدة 20 دقيقة . بعد التعقيم تركت الدوارق لتبرد ثم لقحت في ظروف معقمة بسبورات الفطر من اللقاح المحضر سابقا وبنسبة

(1%) بعد التلقيح وضعت الدوارق في حاضنة هـزازة بدرجـة (27 ±1 °م) وبمعـدل رج 140دورة /دقيقة لفترة 10أيام من التحضين.

طرائق التحليل

تقدير الكتلة الحيوية

بعد انتهاء فترة التحضين سحبت الدوارق من الحاضنة وتم قياس الأس الهيـدروجيني النهائي (Final pH) لكل مزرعة بعدها تم ترشيح مزرعة الفطر بواسطة عدة طبقـات مـن الشاش غسل الغزل الفطري بماء مقطر لإزالة أي اثر من الوسط الزرعي وتم جمع الراشـح وأكمل حجمه إلى (100) مل . جمعت خلايا الفطر في أطباق زجاجية صغيرة معلومة الوزن ووضعت في فرن كهربائي عند درجة حرارة (80 °م) لمدة (24) ساعة بعدها وزنت الأطباق مع الخلايا بميزان حساس وقيست الكتلة الحيوية بفارق الوزنين .

تقدير حامض ألستريك

تم تقدير حامض ألستريك المنتج بواسطة الفطر *A.niger* في راشح المزرعة الفطرية بحسب طريقةMarier وBoulet (9) بالاعتماد على المنحني القياسي المحـضر باسـتخدام حامض ألستريك النقي.

النتائج والمناقشة

تشخيص عزلة الفطر *A. niger*

تم تشخيص الفطر *A.niger* بالاعتماد على شكل الفطر ولون المـستعمرة والاعتمـاد على مصادر مفاتيح تشخيص الفطريات (11، 12،13) .

مقارنة العزلات المختلفة للفطر *A.niger* من حيث قابليتها على إنتاج حامض ألستريك .

أظهرت نتائج مقارنة إنتاجية حامض ألستريك للعزلات المختلفة بعد تنميتهاعلى وسـط الإنتاج بعد 10 أيام من التحضين كما مبين في الجدول(1). إن إنتاج العزلة المحلية من بذور الحمص فاق بدرجة كبيرة من إنتاج العزلات المحلية الأخرى . إذ بلغ أقصى إنتاجية لحامض ألستريك في 10أيام من التحضين (20.41غم /لتر) للعزلات المعزولة من بذور الحمص في حين كان اقل إنتاجية لحامض ألستريك المعزولة من بذور الحنطة والتي بلغت (3.29غم /لتر) وعند مدة التحضين نفسها .أما نمو الفطر فقد كان للعزلة المعزولة من أوراق البصل اقـصى إنتاجية للكتلة الحيوية حيث بلغت (24.9غم /لتر) واقل إنتاجية للكتلة الحيوية بلغت (8.20غم /لتر)لعزلة الفطر المحلية المعزولة من الهواء وخلال فترة التحضين نفسها .إن إنتاج حامض ألستريك ليس بضروري إن يكون متساويا من قبـل جميـع عـزلات الفطـر *A.niger*اذان الإنتاجية تعتمد بالدرجة الأولى على نوع وطبيعة العزلة إذ أن هنالك عزلات منتجة وعزلات

غير منتجة للحامض ألستريك (14) وان الكتلة الحيوية قد تباينت أيضا بالاعتماد على نـوع العزلة المستخدمة إذ أن هناك عزلات تعطي إنتاجية عالية من الكتلة الحيوية والعكـس مـن ذلك عزلات تعطي إنتاجية واطئه من الكتلة الحيوية باستخدام وسط غذائي معين (15) الأس الهيدروجيني النهائي للمزارع الفطرية كان في مديات الأوساط الحامضية وقد يبدو واضح إن إنتاج حامض ألستريك ولو حتى بكميات قليلة كان السبب في هبوط الأس الهيدروجيني أو عدم ارتفاعه بشكل كبير عن الأس الهيدروجيني الأولي 2.5.

الجدول (1)

إنتاج حامض ألستريك والكتلة الحيوية والأس الهيدروجيني للعزلات المختلفة من الفطر *A.niger* لمدة (10) أيام من التحضين

	مصدر العزلة	الكتلة الحيوية Biomass (غم / لتر)	تركيز حامض ألستريك Citric acid غم/لتر	الأس الهيدروجيني النهائي Final pH
1	بذور الحمص	20.60 (2.11)	20.41 (1.69)	2.2
2	حبوب الذرة	23.24 (0.48)	14.41 (0.84)	2.35
3	حبوب الذرة	17.85 (1.34)	10.97 (0.96)	2.05
4	بذور الرز	22.25 (2.89)	12.81 (1.30)	2.4
5	بذور الرز	17.0 (2.12)	13.5 (0.82)	3.3
6	بذور الرز	9.85 (1.63)	12.37 (0.57)	2.35
7	بذور الرز	22.6 (3.25)	7.15 (1.02)	2.75
8	بذور الفاصوليا	14.05 (2.47)	9.2 (0.76)	1.89
9	بذور العدس	15.6 (0.82)	4.54 (0.82)	3.1
10	بذور الحنطة	13.7 (2.26)	15.45 (1.51)	2.36
11	بذور الحنطة	11.5 (1.97)	3.29 (0.45)	2.7
12	بذور الحنطة	10.55 (0.77)	5.0 (0.86)	2.75
13	ثمار الكمثرى	16.23 (2.21)	10.57 (0.93)	2.4
14	أوراق البصل	24.9 (4.52)	7.12 (1.74)	2.4

15	أوراق البصل	8.85 (1.90)	8.68 (0.95)	2.7
16	ثمار التين	23.82 (1.52)	4.9 (0.98)	2.6
17	ثمار التمر	22.8 (0.42)	13.14 (0.31)	2.5
18	كالس نبات القرنفل	10.2 (0.84)	8.66 (0.92)	3.05
19	كالس نبات الثوم	9.85 (1.76)	11.55 (2.35)	2.5
20	كالس نبات عباد الشمس	19.9 (1.41)	7.31 (0.99)	2.15
21	كالس نبات العرعر	10.68 (1.01)	4.62 (0.98)	2.2
22	كالس نبات اليانسون	23.95 (1.76)	7.49 (0.74)	3.3
23	التربة	15.55 (1.20)	9.96 (1.05)	2.35
24	التربة	19.1 (0.28)	9.23 (0.28)	1.95
25	التربة	13.66 (0.62)	6.87 (1.21)	2.35
26	التربة	15.75 (2.61)	3.62 (0.40)	2.7
27	الهواء	18.3 (1.69)	13.58 (0.86)	2.6
28	الهواء	8.20 (1.83)	8.52 (0.95)	1.95
29	الهواء	11.85 (1.76)	8.00 (1.13)	1.95
30	الهواء	19.2 (1.41)	6.10 (1.29)	2.94
31	الهواء	18.0 (1.13)	4.11 (1.26)	3.09
32	الهواء	13.0 (0.42)	7.35 (1.22)	3.3

كل قيمة معدل لمكررين . أما النتائج ما بين الأقواس تمثل الانحراف المعياري ± (S.D)

المصادر

1.Anon P. Biological Sciences , 40 : 9080-9082(1975) .

2.Rajoka M. I ,Ahmed M. N.,Shahid R. ,Latif f. and parvez S. Biologia., 44 : 241-253(1998).

3.الزبير، مفاخر عبد السلام ، العاني فائز عزيز و دلالي ، باسل كامل . مجلة زراعة الرافدين ، 23: 139 (1991).

4.BrownC.M.,Campbell I. C., Priest F. C. "Blackwell Scientific Publications". London , U.K., 89-117(1987).

5.UL-Haq I.,Ali S.,Qadeer M.A. and Iqbal J. Biotechnol. , 5 : 1- 6(2002).

6.BoothC."In Methods In Microbiology" Edited by Booth,C. Academic press New York , U.S.A , p 49-94(1971) .

7.Jernejc K.,Cimerman A. and Perdih A . Appl. Microbiol. Biotechnol. , 14 : 29-33 (1982) .

8.الراوجي، عصام داؤد سليمان. اطروحة دكتوراه ،كلية التربية،جامعة الموصل،العراق(2005).

9.Kundu S. ,Panda T. , Mujiumdar S. K. ,Guha B. and Bandyopadhyay K. K. Biotechnol. Bioeng. 26 : 1114-1121(1984).

10.Marier J. R. and Boulet M. J. Dairy Science. , 41: 1683 –1688(1958) .

11.Ellis M. B . kew. Surrey , Endland (1971) .

12.Barnett H. L. and Hunter B. B. "Illustrated Genera of Imperfect Fungi" 3rd Ed. Burgress. Publishing Company Minnesota. 241 : P. U.S.A(1972).

13.Pitt J. T. and Hocking A. D. "Fungi and Food Spoilage Academic Press" London, U.K. 13-405(1985).

14.Daniel G. V.,Darias N. , Torres V. Elect. J. of Biotechnol.,4:1- 2 (2001).

15. النعيمي ، هناء نجم عبد الله . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، العراق(1997) .