دراسة الظروف المثلى لانتاج أنزيم السليلوز باستخدام الفطر *Aspergillus niger* من مسحوق نوى التمر

علاء كريم نعيمة علاء جبار آل منهل

قسم علوم الاغذية والتقانات الاحيائية – كلية الزراعة – جامعة البصرة
البصرة – العراق

الخلاصة

درست الفعالية الأنزيمية لخمسة عزلات من فطر *Aspergillus niger* على الوسط السليلوزي الصلب ووجد أن افضل عزلة هي A٥ ثم درست الظروف المثلى لانتاج الانزيم من العزلة حيث كان أفضل pH هو ٥ أذ بلغت الفعالية الأنزيمية (٢,٨ u / ml) مقارنة بفعالية الأنزيم عند pH (٣ , ٤ , ٦ , ٧) أما بالنسبة لدرجة الحرارة فكانت افضل درجة عند ٢٢ م° حيث وصلت فعالية الأنزيم إلى (٢,٣ u/ml) بينما كانت افضل فترة تخمر هي ٨ أيام حيث أزدادت فعالية الأنزيم من (٠,٦٥ u/ml إلى ٣,٣ u/ml ، واستخدمت هذه الظروف المثلى لانتاج السليليز من الوسط السليلوزي الذي استبدل به مصدر السليلوز بمسحوق نوى التمر وبنسب استبدال , ٥٠ , ٦٠ , ٧٠ , ٨٠ % ١٠ , ٢٠ , ٣٠ , ٤٠ وكانت افضل نسبة استبدال هي % ٥٠ حيث كان قطر التحلل ٤,٢ cm ومقدار الفعالية الانزيمية هي ٣,٥ u/ml .

١ – المقدمة

يعد السليلوز المادة الاساسية المكونة للنباتات حيث يدخل كمركب أساسي في الجدار الخلوي لها ويعتبر مصدر لمعظم الأخشاب الموجودة في الطبيعة ، وهو يتكون من سلسلة من السكريات الأحادية (كلوكوز) مرتبطة مع بعضها بواسطة أواصر بيتا Beta linkage و أذا ما تعرض السليلوز إلى تحلل مائي كامل Complete hydrolysis فينتج عنه السكر الأحادي كلوكوز أما اذا تعرض إلى تحلل مائي جزئي Partial hydrolysis فينتج عنه السكر الثنائي السلبيايوز Cellbios (العكيدي وأحمد ، ١٩٨٥) ، أن السليلوز مادة متبلورة (Polymer) غير ذائبة في الماء ولا يمكن استخدامها كمادة غذائية إلا بعد تحويلها إلى مادة ذائبة وذلك بمعاملتها حامضياً وتحليله إلى وحداته التركيبية البسيطة من السكريات الأحادية والتي تشكل مصدراً كاربونياً جيداً لعدد كبير من الأحياء المجهرية المحللة للسليلوز من الفطريات والبكتريا (عبد النور وآخرون ، ١٩٨٦) .

فقد قام كل من (١٩٨٩) Al-Ani and Sultan بأنتاج أنزيم السليلوز باستخدام نخالة الحنطة كوسط غذائي لتنمية الفطر *Trichoderma reesei* بطريقة تخمرات الحالة الصلبة ودراسة الظروف المثالية لانتاج الأنزيم ، كما درس كل مـــن Abdul kadir and Al- habbeb ١٩٩٣)) النشاط الأنزيمي السليلوزي لثلاثون عزلة من الفطريات الخيطية الراقية تعود إلى ١٠ أنواع فطرية مصاحبة لنبات القصب *Phragmites australis* في العراق حيث كانت اعلى قيم للفعالية الأنزيمية من قبل النوعين *Penicillium frequentans* و *Acremonium bactrocephallum* في حين انتجت الحبيب (١٩٨٨) انزيم السليلوز من الفطريات المحبة والمصاحبة لروث الحيوانات آكلة الاعشاب ، أما Ghazi *etal.* (٢٠٠٢) فقد استخدموا أربعة عزلات فطرية لانتاج أنزيم السليلوز من المخلفات السليلوزية وتم تنميتها على بيئة سائلة تحتوي على تركيزات كربون مختلفة من مخلفات الرز وسيقان زهرة الشمس ، ووجدوا أن سلالة *Aspergillus niger* أظهرت نشاطاً أنزيمياً في البيئة المحتوية على الكربوكسي مثيل السليلوز والبيئة المحتوية على مخلفات الرز .

وجاءت هذه الدراسة من أجل أنتاج أنزيم السليلوز من نوى التمرالمطحون لاستخدام هذا الأنزيم في التحلل البايلوجي للنوى وأدخال نواتج التحلل في الصناعات الغذائية مثل صناعة الخل وغيرها وذلك بأستخدام الفطر *Aspergillus niger* .

٢- المواد وطرائق العمل

٢-١ عزلات الفطر :

أخذت (٥) عزلات من فطر *Aspergillus niger* من مختبرات كلية العلوم والتربية / قسم البايلوجي وقد أعطيت لها رموز (A٥ , A٤ , A٣ , A٢ , A١) ونميت هذه السلالات على وسط PDA (Potato Dextrose Agar) بدرجة ٢٥ م° ولمدة ٣ – ٥ أيام ونشطت ثلاث مرات على نفس الدرجة ولنفس الفترة الزمنية وحفظت على ٤ م° لحين الأستعمال .

٢-٢ وسط إنتاج السليليز :

أستعمل الوسط الغذائي الخاص لانتاج السليليز حسب ما ذكره (Mandels *etal.* ١٩٧٥) حيث حضر من المكونات التالية (Urea ٠,٣ gm , (NH٤)٢So٤ ١,٤ gm , CoCl٢ ٢ , MgSo٤,٧H٢O , CaCl٢ ٠,٣ gm , FeSo٤,٧H٢O ٥ mg , KH٢Po٤ ٢ gm , Cellulose (CMC) ٨ gm , MnSo٤.H٢O ١,٦ mg , ZNSo٤,٧H٢O ١,٤mg , mg Pepton ٠,٨ mg , Tween-٨٠ ٢ ml) / ١ لتر ماء مقطر ، فعند استبدال (CMC) المصدر السليلوزي بنوى التمر المطحون بالنسب التالية (١٠ , ٢٠ , ٣٠ , ٤٠ , ٥٠ , ٦٠ , ٧٠ , ٨٠ %) وعند استخدام الوسط الصلب يضاف ٢٠ gm من الآكار Agar ويتم تلقيح هذا الوسط باستخدام أقراص من المزرعة الفطرية وبقطر (٥ mm) في مزرعة هزازة .

٢-٣ مسحوق نوى التمر :

جففت نوى التمر المستحصل عليه من مكبس التمور الكائن في كرمة علي / شمال مدينة البصرة على درجة حرارة (٤٥ م°) ولمدة ٤٨ ساعة ثم سحق بآلة طحن من نوع Retscyh KG الألمانية المنشأ .

٢-٤ تقدير pH :

تم قياس pH باستخدام جهاز pH meter أيراني المنشأ .

٢-٥ الاستدلال على انتاج الأنزيم :

يستدل على انتاج الأنزيم حسب طريقة (الحبيب , ١٩٨٨) باستخدام كاشف اليود – حامض الهيدروكلوريك HCl – I ويحضر هذا الكاشف بأخذ ١٠٠ مل من (٠,١NHCl) + ٥٠٠ مل مـــــــن (٢ % KI+١/I٢) يضاف هذا الكاشف إلى الطبق الحاوي على المستعمرة الفطرية النقية ويترك لمدة ٥ دقائق ثم يسكب المحلول ويترك الطبق لمدة ١٠ دقائق ثم يلاحظ ظهور هالة صفراء فاتحة اللون حول المستعمرة تدلل على تحول السليلوز إلى سكريات بسيطة وفي حالة انتاج الفطر للأنزيم ، ويزداد قطر الهالة بزيادة فعالية الفطر لانتاج هذا الأنزيم .

٢-٦ تقدير الفعالية الأنزيمية :

تم تقدير فعالية أنزيم السليليز المعقد الذي يتكون من ثلاثة انزيمات تعمل بصورة مشتركة وتعاونية حسب طريقة (Takao *etal.* , ١٩٨٥) .

٣- النتائج والمناقشة

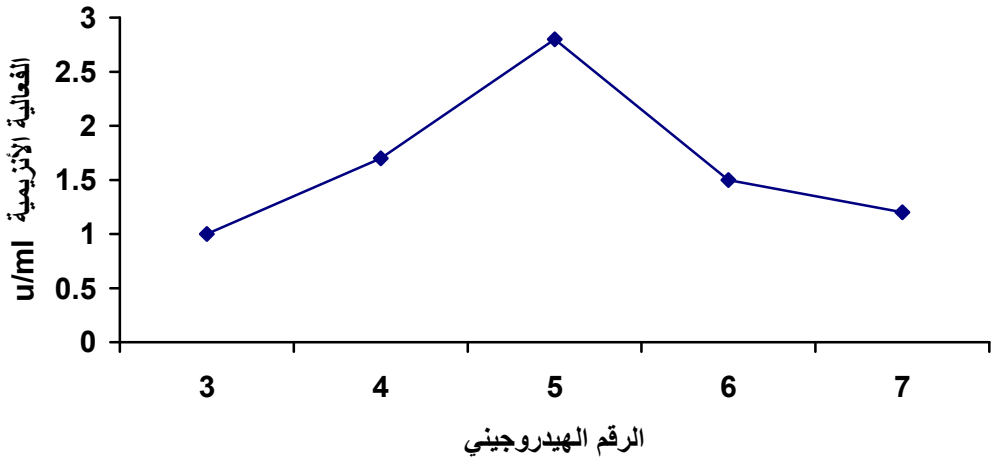
أن الجدول (١) والذي يمثل اقطار هالة التحلل في الوسط الصلب لعزلات الفطر الخمسة يبين ان افضل عزلة هي العزلة ذات الرمز A٥ حيث وصل قطر الهالة لها ٣,٩ cm مقارنة بالعزلة ذات الرمز A٤ والتي أعطت أقل تحلل في الوسط الصلب ١,٩ cm ، لذلك أختيرت العزلة الخامسة لانها أكثر تحلل للوسط السليلوزي الصلب .

جدول (١) اقطار هالة التحلل في الوسط الصلب للعزلات الـ (٥) للفطر A. niger

العزلة	قطر الهالة (cm)
A١	٢,٣
A٢	٢,٥
A٣	٣
A٤	١,٩
* A٥	٣,٩

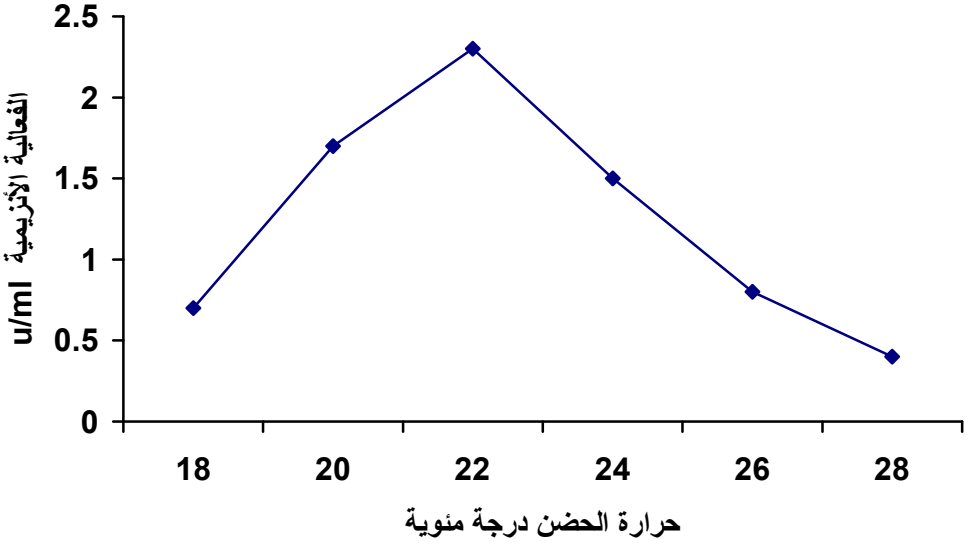
* اختيرت العزلة الخامسة لانها اكثر تحلل للوسط السليلوزي الصلب .

أما الشكل (١) فيبين تاثير pH على التحلل السليلوزي ، حيث أظهرت النتائج بان الفعالية الأنزيمية قد ازدادت وصلت إلى ٢,٨ u/ml عند pH ٥ مقارنة بالفعالية الأنزيمية على pH (٣ , ٤ , ٦ , ٧) ، أن هذه النتائج جاءت متفقة مع نتائج (١٩٨٩) Al – Ani and Sultan حيث وجدا أن أفضل فعالية انزيمية لانزيم السليلوز المنتج من فطر Trichoderma reesei عند pH ٥ حيث وصلت الفعالية الأنزيمية إلى ٢,١ u/gm .



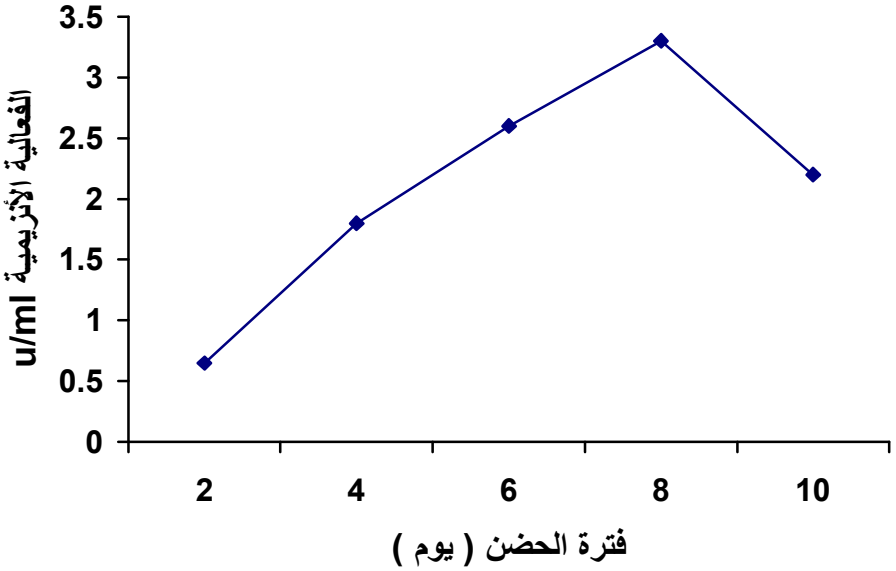
شكل (١) تاثير PH على التحلل السليلوزي

اما بالنسبة لتأثير درجة حرارة الحضن في تحلل السليلوز فيلاحظ من شكل (٢) أن أفضل فعالية انزيمية ظهرت عند الحضن على درجة حرارة ٢٢ م° حيث وصلت إلى ٢,٣ u/ml في حين كانت اقل فعالية للأنزيم عند درجة حرارة ٢٨ م° اذ بلغت ٠,٤ u/ml ، أن هذه النتائج جاءت مقاربة لنتائج العكيدي وآخرون (١٩٨٥) حيث وجدوا أن افضل درجة حرارة حضن لتنمية فطر Aspergillus oryaze كانت عند ٢٤ م° في حين اختلفت مع نتائج العبيدي وآخرون (١٩٨٥) عند تنمية فطر A. niger على عصير التمر حيث وجدوا أن افضل درجة حرارة حضن هي ٢٨ م° .



شكل (٢) تاثير درجة حرارة الحضن في تحلل السليلوز

أما شكل (٣) فيوضح تأثير فترة الحضن في التحلل السليلوزي حيث لوحظ أن افضل فترة حضن كانت لمدة ٨ ايام حيث وصلت الفعالية الأنزيمية خلال هذه الفترة إلى ٣,٣ u/ml في حين كانت ٠,٦٥ u/ml عند الحضن لمدة يومين ، أن هذه النتائج جاءت متفقة مع نتائج (١٩٨٩) Al- Ani and Sultan حيث وجدا أن احسن فترة للتخمر هي ٧ ايام اذ ازدادت فعالية الانزيم من ٠,٩٣ إلى ٢ u/gm بعد فترة الحضن من ٢-٧ أيام .



شكل (٣) تأثير فترة الحضن على التحلل السليلوزي

أما جدول (٢) والذي يمثل قياس اقطار هالة التحلل والفعالية الأنزيمية للوسط السائل والصلب ، حيث لوحظ أن افضل نسبة استبدال كانت عند مستوى ٥٠ % حيث وصلت اقطار هالة التحلل ٤,٢ cm والفعالية الأنزيمية قد ازدادت اذ بلغت ٣,٥ u/ml ، أن سبب ذلك يعود إلى أن مسحوق نوى التمر يوفر النسبة المطلوبة من العناصر الغذائية ويعطي فرصة افضل للفطر للنمو وبالتالي انتاج انزيم السليلوز وهذا ما اكده العكيدي وآخرون (١٩٨٥) عند تنميتهم لفطر Aspergillus Oryzae بأستخدام مسحوق نوى التمر .

جدول (٢) قياس أقطار هالة التحلل والفعالية الأنزيمية للوسط السائل والصلب لنسب الأستبدال عند الظروف المثلى .

نسبة الأستبدال %	قطر هالة التحلل (cm)	قيـــــــــاس الفعالية الأنزيمية (u/ml)
١٠	٢,٩	٢,٢
٢٠	٣,٢	٢,٦
٣٠	٣,٣	٢,٨
٤٠	٣,٦	٣,١
٥٠	٤,٢	٣,٥
٦٠	٣,٨	٣,٢
٧٠	٣,١	٢,٩
٨٠	٢,٢	١,٥

المصادر

الحبيب ، اخلاص كاظم جبار (١٩٨٨) . دراسة تصنيفية للفطريات المحبة والمصاحبة لروث الحيوانات ونشاطها الأنزيمي السليلوزي . رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة البصرة .

عبد النور ، باسمة ايوب وباصات ، فاروق فرج وعطية ، سهام سوادي والعاني ، مدحت سلمان (١٩٨٦) . استغلال الفضلات السليلوزية (أقماع وعرانيص الذرة) بتحويلها بالطرق الكيمياوية إلى سكريات . مجلة بحوث علوم الحياة ، ١٧ (١) : ٤٧ – ٥٧ .

العبيدي ، زهير سلمان والعكيدي ، حسن خالد وجاسم ، محمد عبد الصاحب وجعفر ، ثريا صادق (١٩٨٥) . إنتاج البروتين الفطري باستخدام عصير التمر بواسطة الفطر *Aspergillus niger* . مجلة البحوث الزراعية والموارد المائية ، ١ (٤) : ٢٣٧ – ٢٤٧ .

العكيدي ، حسن خالد حسن وأحمد ، عبد المنعم عارف (١٩٨٥) . تصنيع التمور ومنتجات النخيل السليلوزية . الأتحاد العربي للصناعات الغذائية .

العكيدي ، حسن خالد وخليفة ، صالح وهادي ، حمود مطلك والنقاش ، شفاء (١٩٨٥) . إنتاج البروتين بواسطة الفطر *Aspergillus Oryzae* بأستخدام مسحوق نوى التمر . مجلة البحوث الزراعية والموارد المائية ، ٤ (٣) : ١٩٧ – ٢٠٦ .

Al-Ani , F. and Sultan , M. Y. (1989) . production of extracellular cellulase and SCP from *Trichoderma reesei* by solid substrate fermentation . Iraqi Journal of microbiology , 1(1) : 79 – 87 .

Abdlkadir , M. A. and Al- habbeb , E.K , (1993) . Cellulytic activity of fungi associated with Phremites . Iraqi Journal of Microbiology . 5 (1) : 28 – 37 .

Ghazi , I. M. , Abdlla , M.S. and saodi , O.A. (2002) . Bioconversion of Cellulosic wastes by certain fungi . Arab Univ. J. Agric. Sci. Ain Shams Univ. , Cairo , 10 (2) , 589 – 606 .

Mandels , H. , Sternberg , D. and Andereotti , R.(1975) . In (Symposium on enzymetic hydrolysis of cellulose) , (Eds Enori , T. M. and linko , E.) Denver Book binding Co. , Denver .

Takao , S. , komagate , Y. and Sasaki , H. (1985) . Cellulase production by *Penicillum purpurogenum* . J. Ferment. Technol. , 63 : 127 – 134 .

Study of Optimum Conditions for the Cellulose Production Using *Aspergillus niger* from Date Pits Powder

Alaa K. Nueama **Alaa J. Al-Manhal**

Food Science and Biotechnology dept. College Agriculture , Basrah Univ.
Basrah – Iraq

Summary

The enzyme activity for five fungal isolates from *Aspergillus niger* growth on a solid substrate was studied and it was found that best isolate (A5) . The optimum conditions for the enzyme production was studied. It was found that the enzyme activity (2.8 u/ml) was obtained at PH 5 as compared with these pH (3 , 4 , 6 and 7) . while that optimum temperature at 22 Cº as the enzyme activity increased (2.3 u/ml) Compared with these (18 , 20 , 24 , 26 and 28 Cº) and the optimum incubation time was 8 days as the enzyme activity increased from 0.65 to 3.3 u/ml after (2, 4 , 6 and 8 days) of incubation . The optimum conditions was using for production cellulase from substitution a cellulosic solid substrate as date pits powder for the growth at levels (10 , 20 , 30 , 40 , 50 , 60 , 70 and 80 %) and best substitution at 50 % it was found that hydrolysis diameter 4.2 cm and the enzyme activity (3.4 u/ml) .