إنتاج السكريات المتعددة وبروتين الخلية الواحدة بوساطة بعض أنواع الفطر *Penicillium*

رياض خليل البرهاوي **نجلاء طارق التكريتي**

قسم علوم الحياة / كلية العلوم

جامعة الموصل

الاستلام **القبول**

٠٩ / ٠٥ / ٢٠٠٧ ٠٣ / ٠٦ / ٢٠٠٨

Abstract

The study was conducted to show the ability of three species of *Penicillium*; *P. roquiforti*, *P. camemberti* and *P. viricosum* for single cell protein and polysaccharides production. The results indicated that *P. viricosum*, *P. camemberti*, *P. roquforti* achieved highest figures in polysaccharides (0.21 gm/100ml), dry weight (1.8 gm/100ml) and protein content (0.72 gm/100ml) respectively.

The effect of different nitrogen sources were studied. Ammonium phosphate gave maximum productivity in polysaccharides, protein content and biomass production, (0.23, 0.86 and 2.65 gm/100ml) respectively. At the same time 0.4% Ammon. Phoph. showed highest productivity in polysaccharides production (0.235 gm/100ml) while 0.6% of the same nitrogen source gave maximum growth and protein content, (2.8 & 1.1 gm/100ml) respectively.

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة للتعرف على قابلية ثلاث عزلات من فطر البنيسليوم وهي *Penicillium viricosum* ، *P. camemberti* ، *P. roquiforti* على انتاج بروتين الخلية الواحدة والسكريات المتعددة، وقد بينت النتائج ان العزلة *P. viricosum* كانت الأفضل لإنتاج السكريات المت عددة حيث بلغ (٠.٢١ غم /١٠٠ مل) بينما كانت العزلة *P. camemberti* الأفضل في الوزن الجاف حيث بلغ (١.٨ غم/١٠٠ مل) وأعطت العزلة *P. roquiforti* اعلى محتوى بروتيني بلغ (٠.٧٢ غم/١٠٠ مل).

تمت دراسة تأثير اضافة مصادر نترويجينية مختلفة بهدف تحسين الانتاج ، اعطى المصدر النتروجيني (فوسفات الامونيوم) اقصى انتاجية من السكريات المتعددة حيث بلغ (٠.٢٣٦ غم /١٠٠ مل) واعطى اعلى نمو ومحتوى بروتيني حيث بلغ (٢.٦٥ و ٠.٨٦ غم/١٠٠ مل) على التوالي. وقد حقق التركيز (٠.٤غم/١٠٠مل) من فوسفات الامونيوم اعلى انتاجية من السكريات المتعددة (٠.٢٣٥غم/١٠٠ مل) بينما حقق التركيز (٠.٦ غم /١٠٠مل) أعلى نمو ومحتوى بروتيني حيث بلغ (٢.٨٠ و ١.١٠ غم /١٠٠ مل) على التوالي.

المقدمة

ان الزيادة المضطردة في عدد سكان العالم وكذلك نقص الغذاء والتباين في مستويات المعيشة بين الشعوب كان لها اثر كبير في ان تتجه الانظار نحو التخمير لانتاج اغذية ومواد اقتصادية من مواد قليلة الكلفة، ان هذه الطريقة تستخدم بالدرجة الاساس لانتاج مدعمات العل ف الحيواني ويتوقع امتدادها لصناعة مواد غذائية للاستهلاك البشري (١). ان هذه الامور اسهمت في الاهتمام بمواصفات الاحياء المجهرية وكفاءتها في ا نتاج مواد نافعة للانسان كبروتين الخلية الواحدة والسكريات المتعددة (٢، ٣، ٤، ٥).

تنتج العديد من السكريات المايكروبية في الوقت الحاضر ومنها الزانثان الذي ينتج من البكتريا *Xanthomonas campestris* وصمغ الجيلان الذي ينتج من البكتريا *Pseudomonas elodea* والبوليولان الذي ينتج من الفطر *Auerobasidium pullulans* اما السكريات المتعددة المنتجة من *Penicillium vermiculatum* فتدعى Talaron (٦، ٧، ٨، ٩) كما تنتج السكريات المتعددة من البكتريا Bacillus Spa 12 (١٠) وبكتريا حامض اللاكتيك (١١).

ان استخدامات السكريات المتعددة Exo-Poly-Saccharides واسعة جداً فهي تشمل مجالات صناعية وطبية وصيدلانية (٤، ١٢، ١٣).

تهدف الدراسة الى اجراء مقارنة لبعض انواع الفطريات العائدة للجنس *Pencillium* من حيث قابلياتها على انتاج السكريات المتعددة وبروتين الخلية الواحدة وكذلك دراسة تأثير اضافة مصادر نتروجينية مختلفة بهدف تحسين الانتاج.

المواد وطرائق العمل

ظروف حفظ العزلات:

حفظت العزلات الفطرية من فطر البنيسليوم داخل قناني زجاجية بدرجة حرارة ٥°م حاوية على وسط PDA المائل.

الأوساط الزرعية:

١- وسط مستخلص البطاطا والدكستروز والاكار (PDA):

استخدم هذا الوسط لعزل وتشخيص ولحفظ وتنشيط الفطريات وقد حضر هذا الوسط من ٢٠٠ غم بطاطا، ٢٠ غم كلوكوز، ٢٠ غم اكار ثم اكمل الحجم الى لتر بالماء المقطر (١٤).

٢- وسط زابك القياسي:

استخدم هذا الوسط لتنمية الفطريات اثناء التجارب ويتكون هذا الوسط من المواد الاتية:

أ. وس ط زابك ا لمركز : $NaNO_3$ (٣٠ غم)، KCl (٥ غم)، $MgSO_4.7H_2O$ (٥ غم) ، $FeSO_4.7H_2O$ (٠.١ غم) ماء مقطر (١٠٠ مل).

ب. $KHPO_4$ (١ غم)، وسط زابك المركز (١٠٠ مل)، مستخلص الخميرة (٥ غم)، سكر السكروز ماء مقطر (واحد لتر).

بعدها عقم الوسط بجهاز الموصدة عند الضغط ١ كغم/سم^2 ودرجة حرارة ١٢١°م لمدة ٢٠ دقيقة (١٥).

تحضير اللقاح:

حضر عالق الفطريات المستعملة في التجارب من مستع مرات فطرية نقية بعمر اسبوع وتحت ظروف معقمة اضيف الماء المقطر المعقم الى المستعمرة الفطرية النامية في قناني زجاجية حاوية على وسط (PDA) المائل، وبعدها قشطت المزرعة الفطري ة باستخدام قضيب زجاجي معقوف وتم اضافة اللقاح بنسبة ١% الى الوسط الزرعي (زابك).

ايجاد الفطر الاكفأ لانتاج السكريات المتعددة وانتاج بروتين الخلية الواحدة:

لاستكشاف كفاءة انواع البنيسليوم المستخدمة تم زر اعة الفطريات على وسط زابك القياسي بعد إذابة جميع المكونات بالماء المقطر وضبط الاس الهيدروجيني عند ٦.٠ . بعد التعقيم بجهاز الموصدة وزع المعلق السبوري في الدوارق المخروطية سعة ٢٥٠ مل، بعدها وزع الوسط الغذائي في دوارق سعة ٥٠ مل وبمعدل ثلاث مكررات لكل معاملة ثم وضعت الدوارق

في الحاضنة عند درجة (٢٨±١)°م ولمدة ستة ا يام ثم سحبت الدوارق من الحاضنة بصورة عشوائية وتم تقدير الوزن الجاف للفطر وكمية البروتين الكلية والسكريات المتعددة في الوسط الزرعي.

طرائق التحليل:

١- تقدير الوزن الجاف:

بعد انتهاء فترة التحضين المقررة سحبت الدوارق واجريت عملية النبذ المركزي لمحتوى كل دورق وبمعدل ٦٠٠٠ دورة/دقيقة ولمدة ١٠ دقائق . اخذ المحلول الرائق لتقديرالسكريات المتعددة وجمعت خلايا الفطر باطباق صغيرة معلومة الوزن ووضعت في فرن كهربائي عند درجة ٧٠°م ولمدة ٢٤ ساعة بعدها قدر الوزن الجاف باستخدام ميزان حساس وقيست الكتلة الحيوية بفارق الوزنين.

٢- عزل وتقدير السكريات المتعددة (EPS):

اخذ ١٠ مل من الراشح المزال منه خلايا الفطر واضيف له اربع ة حجوم من المذيب العضوي (ايثانول ٧٠% حجم/حجم) وحرك المزيج بقوة لترسيب السكر المتعدد ثم اجريت عملية النبذ المركزي بمعدل ٩٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٣٠ دقيقة، بعدها جمع الس كر المتعدد في اطباق معلومة الوزن وجففت في فرن كهربائي عند ٧٠°م لمدة ٢٤ ساعة بعدها تم تقدير وزن السكر المتعدد بفارق الوزنين (١٦).

٣- استخلاص وتقدير البروتين:

قدرت كمية البروتين في الوزن الجاف في جميع التجارب باستخدام طريقة Lowry واخرون (١٧) والمحورة من قبل Pollak, Schacterle (١٨).

التحليل الاحصائي:

نفذت التجربة العاملية باستخدام التصميم العشوائي الكامل وحللت النتائج إحصائياً واختبرت بطريقة دنكن واختبار (F) (١٩).

النتائج والمناقشة

تظهر النتائج في الجدول (١) ان هناك تبايناً معنوياً واضحاً في معدلات النمو بين انواع البنيسليوم المزروعة في وسط زابك القياسي ومن ملاحظة النتائج نجد ان اعلى انتاجية من السكريات المتعددة قد تحققت في الفطر *P. viricosum* حيث بلغت (٠.٢١ غم/ ١٠٠ مل) كما يلاحظ تبايناً واضحاً في الوزن الجاف والمحتوى البروتيني في الانواع المختلفة حيث كان اعلى وزن جاف (١.٨ غم/ ١٠٠ مل) حققه الفطر *P. camemberti* واعلى محتوى بروتيني (٠.٧٢ غم /١٠٠ مل) حققه الفطر *P. roquiforti* ، وعليه فقد تم اختيار الفطر *P. viricosum* على اساس انتاجيته العالية من السكريات المتعددة لاجراء التجارب اللاحقة .

عند استخدام مصادر نتروجينية متنوعة لتنمية الفطر *P. viricosum* تبين النتائج في الجدول (٢) ان هناك فروقات معنوية في معدل النمو للفطر المستخدم ولوحظ ان المصدر النتروجيني فوسفات الامونيوم اعطت اقصى انتاجية في السكريات المتعددة واعلى نمو ومحتوى بروتيني حيث بلغت ٠.٢٣٦ ، ٢.٦٥ ، ٠.٨٦ غم/١٠٠ مل) على التوالي.

وقد اعطى المصدر النتروجيني (اسبارجين مائي) اقل كمية من السكريات المتعددة (٠.٢٠٨ غم/١٠٠ مل) بينما اعطى كلوريد الامونيوم اقل نمو ومحتوى بروتيني حيث بلغت (١.٨٥ و ٠.٦٧ غم/١٠٠ مل) على التوالي.

ان فوسفات الامونيوم يعتبر مصدر نايتروجيني لاعضوي ل هـ دور منظم للعديد من انظمة الهكشف في الفطريات فضلا عن احتوائه على نسبة جيدة من النتروجين الذي يعد من العناصر الاساسية لبناء الخلايا ونموها بالاضافة الى انه يدخل في تركيب البروتينات والحوامض النووية وغيرها وهذه النتيجة تتفق مع عدد من الباحثين (٢٠، ٢١، ٢٢).

اعتمد المصدر النتروجيني (فوسفات الامونيوم) بموجب نتائج التجربة السابقة كافضل مصدر نتروجيني وعليه فقد تم استخدام تراكيز مختلفة منه وكما موضح في الجدول (٣) حيث بينت النتائج ان تركيز (٠.٤%) حقق أعلى كمية من السكريات المتعددة (٠.٢٣٥ غم / ١٠٠ مل) في حين اعطى الت ركيز (٠.٦%) اعلى نمو انتاجية للبروتين حيث بلغت (٢.٨ و ١.١٠ غم/١٠٠ مل) على التوالي.

ان مجمل النتائج تتفق مع عدد من الباحثين (٢٠، ٢٣، ٢٤) وان النتائج المستحصلة تشير الى امكانية تحسين انتاجية الفطر المستخدم من السكريات المتعددة وبروتين الخلية الواحدة باتباع الاساليب المدرجة في الادبيات العلمية على الرغم من النتائج المتواضعة التي تم الحصول عليها من الانواع المستخدمة.

شكر وتقدير : يتقدم الباحثان بالشكر والتقدير للدكتور مازن فضيل لاهدائه انواع الفطريات المستخدمة في البحث والتي تم حصوله عليها اثناء دراسة الدكتوراه في جامعة الموصل /كلية العلوم/قسم علوم الحياة.

الجدول (١): كفاءة عزلات البنسيليوم (المنماة على وسط زابك القياسي) لانتاج الوزن الجاف وبروتين الخلية الواحدة والسكريات المتعددة.

الانواع الفطرية	الوزن الجاف غم/١٠٠ مل	المحتوى البروتيني غم/١٠٠ مل	السكريات المتعددة (غم/١٠٠ مل)
P. viricosum	١.٣٩ (٠.١٥) جـ	٠.٦٩ (٠.٠٢) ب	٠.٢١٠ (٠.٠٣) أ
P. camemberti	١.٨٠ (٠.٢٠) أ	٠.٦٧ (٠.٠٢) ب جـ	٠.١٢٥ (٠.٠٢) جـ
P. roquiforti	١.٧ (٠.١٠) ب	٠.٧٢ (٠.٠٣) أ	٠.١٨٧ (٠.٠١) ب

- الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة عموديا تدل على وجود فروقات معنوية بينها عند مستوى احتمال (٠.٠٥) حسب اختبار دنكن متعدد المدى.
- كل رقم يمثل معدل لثلاث مكررات.
- الارقام بين الاقواس تمثل الانحراف القياسي (±S.D.).
- فترة التحضين (٦) أيام، درجة حرارة التحضين ± ٢٨°م.
- الرقم الهيدروجيني الابتدائي ٦.٠.

الجدول (٢): كفاءة مصادر نتروجينية مختلفة على النمو والمحتوى البروتيني الكلي وانتاج السكريات المتعددة من قبل عزله الفطر *P. viricosum*.

المصادر النتروجينية	الوزن الجاف غم/١٠٠ مل	المحتوى البروتيني غم/١٠٠ مل	السكريات المتعددة (غم/١٠٠ مل)
٠.٠	٢.٥٠ (٠.٢٠) ب	٠.٧٢ (٠.٠١) هـ	٠.٢١٥ (٠.٠٢) ب جـ
يوريا	٢.٠٣ (٠.٣٠) جـ	٠.٤٢ (٠.٠٣) ب	٠.٢٠٩ (٠.٠٣) جـ د
كبريتات الامونيوم	١.٩٩ (٠.١٠) جـ	٠.٥٧ (٠.٠٢) و	٠.٢١٥ (٠.٠١) ب جـ
فوسفات الامونيوم	٢.٦٥ (٠.٢٠) أ	٠.٨٦ (٠.٠٣) أ	٠.٢٣٦ (٠.٠٠) أ
اسبارجين مائي	٢.٠٠ (٠.٣٠) جـ	٠.٨٥ (٠.٤) جـ	٠.٢٠٨ (٠.٠٣) د
كلوريد الامونيوم	١.٨٥ (٠.٢٠) د	٠.٦٧ (٠.٠١) د	٠.٢١٩ (٠.٠٣) ب

- الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة عمودياً تدل على وجود فروقات معن وية بينها عند مستوى احتمال (٠.٠٥) حسب اختبار دنكن متعدد المدى.
- كل رقم يمثل معدل لثلاث مكررات.
- الارقام بين الاقواس تمثل الانحراف القياسي (±S.D.).
- فترة التحضين (٦) ايام، درجة حرارة التحضين ± ٢٨°م.
- الرقم الهيدروجيني الابتدائي ٦.٠.

الجدول (٣): تأثير تراكيز مختلفة من فوسفات الامونيوم على النمو وانتاج البروتين والسكريات المتعددة بوساطة الفطر *P. viricosum*.

تركيز فوسفات الامونيوم غم/١٠٠ مل	الوزن الجاف غم/١٠٠ مل	المحتوى البروتيني غم/١٠٠ مل	السكريات المتعددة (غم/١٠٠ مل)
٠.٠	٢.٤٨ (٠.٢٠) جـ	٠.٧ (٠.٠١) هـ	٠.٢١٣ (٠.٠٢) ب جـ
٠.٢	٢.٤٩ (٠.٣٠) جـ	٠.٧٥ (٠.٠٢)د	٠.٢١ (٠.٠١) جـ
٠.٤	٢.٦١ (٠.١٠) ب	١.٠٢ (٠.٠٢)ب	٠.٢٣٥ (٠.٠٣) أ
٠.٦	٢.٨٠ (٠.١٠) أ	١.١٠ (٠.٠١)أ	٠.٢١٧ (٠.٠٢) ب
٠.٨	٢.٠٥ (٠.٢٠) د	٠.٨ (٠.٠٣)جـ	٠.٢١٥ (٠.٠٢) ب جـ
١.٠	١.٠٣ (٠.٣٠) هـ	٠.٧٥ (٠.٠٢)د	٠.٢٠٩ (٠.٠١) جـ

- الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة عمودياً تدل على وجود فروقات معنوية بينها عند مستوى احتمال (٠.٠٥) حسب اختبار دنكن متعدد المدى.
- كل رقم يمثل معدل لثلاث مكررات.
- الارقام بين الاقواس تمثل الانحراف القياسي (±S.D.).
- فترة التحضين (٦) أيام، درجة حرارة التحضين ± ٢٨°م.
- الرقم الهيدروجيني الابتدائي ٦.٠.

المصادر

١) محي الدين، محمد علي وناصر، نزار ادوار . التطبيقات الصناعية لعلم الاحياء المجهرية. مطبعة التعليم العالي/اربيل (١٩٩٠).

٢) دلالي، باسل كامل. بروتينات الخلية الاحادية. مجلة الزراعة والتنمية في الوطن العربي . ١٣ (٤): ١٢-١٥ (١٩٩٤).

3) Bouzar, F; Cerning, J. and Desmazeand, M. Exopolysaccharide production in milk by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*. CNRZ1187. J. Diary Sc. 79: 205-211 (1996).

4) Duenas-Chasco, M. T.; Rodriguez-Carvajal, M. A.; Tejero-Mateo, P.; Franco-Rodriguez, G.; Espartero, J. L.; Irastorza-Iribas, A. and Gil-Serrano, A. M. Structural analysis of the exoploysaccharide

produced by *Lactobacillus* spp. G.77. Carbohydr. Res. 307. 307: 125-133 (1998).

5) Frenando, Ferreira; Lennart, Kenne; Michael, Cotta and Robert, Stack. Structural studies of the extracellular polysaccharide from *Butyyibirio finrisdvens* strain CF_3. Agric. Res. Service. Ncuar, 1815 N. (1998).

6) Dalmini, A. M. and Peiris, P. S. Production of exopolysaccharide by *Pseudomonas* sp. ATCC31461 (*Pseudomonas elodea*) using whey as Fermentation substrate. Appl. Microbial. Biotechnol. 47: 52-57 (1997).

7) Becker, A.; Katzen, F. Pühler, A. and Ielpi, L. 1998. Xanthan gum biosynthesis and application: A biochemical/genetic perspective. Appl. Microbial. Biotechnol. 50: 145-152 (1998).

8) Adamcova, J.; Proska, B. and Fuska, J. Regulation of biosynthesis of vermiculin & vermistatin in *Penicillium vermiculatum*. Folia Microbiol. 37: 50-52 (1992).

٩) التكريتي، نجلاء طارق . انتاج بروتين الخلية الواحدة والسكريات المتعد دة من شرش الجبن باستخدام المزارع المفردة والمختلطة من الاحياء المجهرية . رسالة ماجستير، كلية العلوم/جامعة الموصل (٢٠٠١).

10) Wei, Geuro-Jen, Song, Shuh-Chyung; Lin, Liang-Ping and Her, Guor-Rong, Structural studies of extra cellular poly saccharide produced by *Rhizobium fredii* T46, apolysaccharide with non-asscharide repeating units. Bot. Bull. Acad. Sin. 37: 127 (1996).

11) Yun, U. J. and Park, H. D. Physical properties of an extra cellular poly saccharide produced by *Bacillus* sp. CP912. Applied Microbiology. (36): 5, 282 (2003).

12) Earnshaw, R. G. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. In: The Lactic acid Bacteria in Health and Disease. ed. Wood, B.J.B. PP. 211-232. Elsivier Applied Science, London and New York (1992).

13) Forsen, R.; Heiska, E.; Herva, E. and Arvilommi, H. Immunobiological effects of *Streptoccocus cremoris* from cultured milk viili, application of human lymphocyte culture techniques. Int. J. Food Microbiol. 5, 41-47 (1987).

14) Dhingra, O. D. and Sinclair, J.B. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA (1983).

15) Pitt, J. I. and Hocking, A. D. Fungi and Food Spoilage. 2nd edition. Blackie academic and professional. London. Weinheim. New York, Tokyo. Melbourne. Madras. (1997).

16) Kogan, Grigori, J.; Matulova, Maria and Michalkova, Eva. Extra cellular Polysaccharides of *Penicillium vermiculatum*. Verlag der zeitschirift für Natur. For schung, Tü bingen. 57c, 452-458 (2002).

17) Lowry, O. H.; Roserough, N. J.; Farr, A.L. and Randall, R. J. Protein measurements with folin reagent J. Biol. Chem. 193: 265 (1951).

18) Schaterle, G. R. and Pollak. "A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biologic material. Anal. Biochem. 51: 654-655 (1973).

19) Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. Principle and Procedure of statistics. 2nd ed., McGraw-Hill Company, Inc., London (1980).

٢٠) الجبوري، شمال يونس عبد الهادي . التحليل الحامضي لمسحوق نبات الكلغان (*Silybum marianum*) لانتاج بروتين احادي الخلية بوساطة الخميرة (*Caudida utilis*). رسالة ماجستير، كلية التربية/جامعة الموصل (١٩٩٧).

٢١) العبيدي، صفاء إسماعيل رشيد. ظروف انتاج وطبيعة السكر المتعدد (البوليولان) المنتج بوساطة احدى العزلات المحلية للفطر *Auerobasidium pullulans*. رسالة ماجستير، كلية التربية/جامعة الموصل (١٩٩٨).

٢٢) الطائي، ورقاء سعيد قاسم . التحلل السليل وزي لمسحوق نبات الكلغان *Silybum mariamnum* (L) Gaerth لانتاج بروتين الخلية الواحدة بوساطة عزلة الفطر (3) *Fusaium solani*. رسالة ماجستير، كلية العلوم /جامعة الموصل (٢٠٠٠).

23) El-Refai, A. H.; Ghanem, K. M. and El-Gazaerly, M. A. Optimization of the production of single cell protein by *Saccharmyces* uvarum Y-1347 from beet molasses. Chem. microbial. Technol. Lebensm, 9: 105-112 (1985).

٢٤) المشهداني، يونس علي يونس . انتاج بروتين احاديات الخلية من مخلفات صناعة البيرة باستخدام العفن *Trichoderma reesie* وخميرة *Candida utilis*. اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، العراق (١٩٩٥).