قابلية الفطر*Aureobasidium pullulans* على انتاج السكرالمتعدد(البوليولان) بوجود مصادر كاربونية ونايتروجينية مختلفة

Ability of the fungus *Aureobasidium pullulans* to produce polysaccharide (pullulan) with presence of different Carbon and Nitrogen sources

زهراء ابراهيم محمد الدباغ محمد بشير اسماعيل قاسم*
الشركة العامة لصناعة الادوية والمستلزمات الطبية في نينوى
قسم علوم الحياة/كلية التربية/جامعة الموصل*
Zahraa Ibraheem Muhammed Al_dabbagh Muhammed Basheer Ismaeil Kassim*
The state company for Drug and Medical appliances/Ninavah
*College of Education/Mosul University

المستخلص
درس تأثير مدة الحضانة وأستخدام مصادر كاربونية ونايتروجينية مختلفة في أنتاج السكر المتعدد البوليولان بواسطة سلالة الفطر *Aureobasidium pullulans* NRRL58560 بينت النتائج أن أقصى أنتاج للبوليولان كان 23.76غم/لتر تم الحصول عليها بعد 96 ساعة من التحضين. وأعطى السكروز أعلى أنتاجية من البوليولان 31.92غم/لتر عند أستخدامه مصدرا ً كاربونيا ً بينما تم الحصول على أقصى انتاجية من الكتلة الحيوية 16.30غم/لتر عند أستخدام النشا . وأعطى الحامض الاميني الكلا يسين أقصى أنتاجية من البوليولان 34.61غم/لترعند أستخدامه مصدرا ً نايتروجينيا ً كما تم الحصول على أقصى أنتاجية من الكتلة الحيوية 14.49غم /لتر عند أستخدام كلوريد الامونيوم .

الكلمات المفتاحية : البوليولان ، السكريات المتعددة ، *Aureobasidium pullulans*

Abstract
The effect of incubation period, different carbon and nitrogen sources on the production of the extracellular polysaccharide pullulan by Aureobasidium pullulansNRRL58560 was examined. The results showed that the maximum production of pullulan was obtained 13.76 after 96 hours of incubation. Sucrose as a carbon source gave the highest production of pullulan 31.92 g/l while the highest biomass was obtained when starch was used as a carbon source 16.30 g/l. The amino acid glycine as a nitrogen source gave the highest production of pullulan 34.61 g/l and the highest production of biomass 14.49 g/l was obtained when ammonium chloride was used.

Key words: *Aureobasidium pullulans*, polysaccharide

المقدمة

البوليولان عبارة عن سكر متعدد خارج خلوي خطي يتكون من وحدات المالتوترايوز (ثلاثية سكر الكلوكوز) المرتبطة بالاصرة الكلايكوسيدية ألفا1_6 [1] ولهذا السكر المتعدد استخدامات كثيرة حيث يستخدم في الصناعات الغذائية ومواد التجميل وصناعات أخرى كثيرة[2]. ينتج البوليولان بواسطة الفطر شبيه الخميرة *Aureobasidium pullulans* عند زراعته في مصادر كاربونية معينة مثل سكر الكلوكوز والسكروز والنشا وغيرها من السكريات [3،4،5] .

الفطر *A.pullulans* هو من صنف الفطريات الكيسية Ascomycete وتحت رتبة Dothideales وذات انتشار عالمي حيث يستعمر مدى واسع من البيئات وخاصة سطوح أوراق النباتات المختلفة كذلك يوجد في دبال الاوراق والجدران المصبوغة وسقوف المنازل وعادة مايسمى بالخمائر السوداء وذلك لانه ينتج صبغة الميلانين السوداء وتوجد سلالات من هذا الفطر ذات ألوان مختلفة وتسمى بالضروب الملونة حيث يكون ذات لون أصفر وبرتقالي ووردي [6،7،8] كذلك أشارت البحوث ان بعض عزلات الفطر *A.pullulans* تنتج اضافة الى البوليولان أنزيمات مختلفة كأنزيم الاميليز والزايلينيز والبكتنيز وبروتين أحادي الخلية [9،10] كما أن بعض سلالات الفطر *A.pullulans* ينتج كميات كبيرة جدا من حامض الكلوكونيك قد تصل الى أكثر من 400غم/لتر اعتمادا على تركيز سكر الكلوكوز المستخدم في الوسط الغذائي [11،12]. أُستخدم في هذا البحث سلالة من الفطر *A.pullulans* NRRL58560 في أنتاج البوليولان عند تنميتها في عدة مصادركاربونية ونايتروجينية.

مواد وطرق العمل

أُستخدمت سلالة الفطر *A.pullulans* NRRL58560 والذي تم الحصول عليها من مختبرات بحوث المنطقة الشمالية (Nothern Reginal Research Laboratories) في المركز الوطني لبحوث الأستفادة الزراعية الولايات المتحدة الامريكية U.S.A./Peoria/USDA.

وتم حفظ السلالة بتنميتها في وسط مستخلص البطاطا والدكستروز والاكار Potato Dextrose Agar(PDA) وحفظها في الثلاجة عند درجة حرارة 4 مئوية وتم تجديدها كل أسبوعين.

انتاج السكر المتعدد الخارجي البوليولان

تحضير اللقاح

تم تحضير اللقاح الفطري عند تنمية الفطر في دوارق مخروطية تحتوي على 50 مل من الوسط الغذائي الذي يتكون من : غم/لتر من الماء المقطر [13]

50	كلوكوز
5	K_2HPO_4 فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين
1	NaCl كلوريد الصوديوم
0.2	$MgSO_4.7H_2O$ كبريتات المغنيسيوم المائية
0.6	$(NH_4)_2SO_4$ كبريتات الامونيوم
2.5	Yeast extract مستخلص الخميرة

وعُدل الاس الهيدروجيني عند 6.5 ولُقحت الدوارق بعد تعقيمها بجهاز الموصدة عند درجة حرارة 121 مئوية وضغط 1 جو لمدة 15 دقيقة بعروة ناقل 2-3 من موائل الفطر النامي على وسط PDA بعمر 5 أيام ووضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند سرعة180دورة/دقيقة عند درجة حرارة 27±2 مئوية لمدة 3 أيام وأُستخدمت ه ذه المزارع لقاحا ً لزراعة الفطر في وسط الانتاج الذي يتكون من نفس مكونات وسط اللقاح ماعدا أستخدام السكروز مصدرا ً كاربونيا ً بدلا عن الكلوكوز وعُدل الاس الهيدروجيني عند 6.5، حيث وُزع الوسط في دوارق حجم 250 مل لكل دورق 48 مل وعقمت بجهاز الموصدة وبعد ذلك لقحت با للقاح الفطري بنسبة 4% ووضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 27±2 مئوية .

تأثير مدة الحضانة في أنتاج البوليولان

وُزع الوسط الانتاجي في دوارق مخروطية حجم 250 مل بواقع 48 مل من وسط الانتاج وعقمت بجهاز الموصدة بعد ذلك لقحت الدوارق بلقاح الفطر بنسبة 4% ووضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 27±2 مئوية وبعد كل 24 ساعة من التلقيح سُحب دورقين لغرض تقدير الكتلة الحيوية والبوليولان المنتج والى نهاية اليوم الخامس من التلقيح.

تأثير أضافة مصادر كاربونية ونايتروجينية مختلفة في أنتاج البوليولان

حُضر وسط الانتاج السابق الذكر بكافة مكوناته ماعدا أضافة سكريات مختلفة بتركيز 5% وهي سكر الكلوكوز والسكروز والارابينوز والمانوز والفركتوز واللاكتوز والكلاكتوز والنشا كل على حدى ً وتم توزيع الوسط لكل نوع من أنواع المصدر الكاربوني بدورقين بحجم 250 مل (مكررين لكل حالة) وبنفس ماذُكر أعلاه كما أضيفت مصادر نايتروجينية مختلفة الى وسط الانتاج الحاوي على سكر الكلوكوز وأُضيفت المصادر النايتروجينية كل على حدى ً وبتراكيز متساوية بالنسبة للمحتوى النايتروجيني 0.013% نايتروجين وكالتالي: كبريتات الامونيوم 0.06%- نترات الامونيوم 0.036%- يوريا 0.027%- نترات الصوديوم 0.08%- نترات البوتاسيوم 0.086%- الانين 0.076%- كلايسين 0.064%- كلوريد الامونيوم 0.05%-وحضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 27±2 مئوية لمدة 96 ساعة.

طرق التحليل:

تقدير الكتلة الحيوية للفطر و البوليولان

بعد انتهاء مدة الحضانة المعينة سحبت الدوارق من الحاضنة الهزازة وتم قياس الرقم الهيدروجيني النهائي بعد ذلك تم اجراء النبذ المركزي للمزارع عند سرعة 9000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة لترسيب خلايا الفطر ووضعت الكتلة الحيوية بأطباق زجاجية معلومة الوزن و وضعت في الفرن الكهربائي لغرض التجفيف عند درجة حرارة 60 مئوية لمدة 24 ساعة بعد ذلك تم تحديد وزن الكتلة الحيوية[14].

وتم ترسيب البوليولان من رائق المزرعة بأضافة حجمين من الاسيتون لكل حجم من الراشح وتم اجراء النبذ المركزي عند سرعة 9000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة وجُمع الراسب في أطباق زجاجية معلومة الوزن ووضعت في الفرن الكهربائي لغرض التجفيف عند درجة حرارة 60 مئوية لمدة 24 ساعة بعد ذلك تم تحديد وزن البوليولان[15].

النتائج والمناقشة

تأثير مدة الحضانة المختلفة في أنتاج الكتلة الحيوية والبوليولان

بينت نتائج تنمية سلالة الفطر *A.pullulans* NRRL58560 في الوسط الانتاجي بعد تحضينه لمدة معينة جدول (1) ان أقصى انتاجية من البوليولان تم الحصول عليها بعد مرور 96 ساعة هي 23.76غم/لتر) بعدها بدأ الانتاج في الانخفاض وربما يعود السبب الى نفاذ المغذيات من الوسط الانتاجي وقد يتحلل البوليولان المنتج بواسطة بعض الانزيمات التي ينتجها الفطر مثل أنزيم glucoamylase-A الداخلي المنشأ الذي يتحرر من قبل الكائن الحي في المراحل الاخيرة من التخمير [16] لذا فقد أُعتمدت مدة الحضانة المثلى 96 ساعة في التجارب اللاحقة. في حين أستمرت الزيادة في الكتلة الحيوية للفطر باستمرار أيام التحضين والى اليوم الخامس حيث تم الحصول على أقصى أنتاجية من الكتلة الحيوية للفطر13.63غم/لتر.

انخفض الاس الهيدروجيني النهائي عن الاولي قبل الحضن 6.5 ويعزى هذا الانخفاض الى تراكم بعض الحوامض العضوية أثناء فترة التخمر التي ينتجها الفطر *A.pullulans* [11].

جدول (1):تأثير مدة الحضانة المختلفة في نمو الفطر وانتاج البوليولان*

فترة التحضين (بالساعة)	الكتلة الحيوية غم/ لتر	البوليولان غم/ لتر	الرقم الهيدروجيني النهائيpH
24	4.30(0.00)	2.73(0.01)	6.36(0.04)
48	9.40(0.00)	7.85(0.02)	5.19(0.11)
72	10.85(0.04)	12.93(0.04)	4.87(0.10)
96	12.16(0.05)	23.76(0.00)	4.67(0.14)
120	13.63(0.23)	12.2(0.08)	4.91(0.01)

*** كل قيمة هي معدل لمكررين ... اما النتائج بين القوسين فتمثل الانحراف المعياري (S.D.)**

تأثير اضافة مصادر كاربونية مختلفة في أنتاج الكتلة الحيوية والبوليولان

بينت نتائج هذه التجربة جدول(2) أنه بعد مرور 96ساعة من تحضين الفطر تم الحصول على أقصى انتاجية من البوليولان 31.92 غم/لتر عند أستخدام السكروز مصدرا ً للكاربون وهذا يتفق مع نتائج [17] حيث أعطى السكروز أعلى انتاج من البوليولان عند استعماله سلالة الفطر *A.pullulans* ATCC 42023.

أما انتاج الكتلة الحيوية كان منخفضا ً الى حد ما حيث تم الحصول على 1.14 غم/لترعند أستخدام سكر السكروز أي ان الزيادة في كتلة البوليولان كانت على حساب انتاج الكتلة الحيوية , وقد تباينت السكريات الاخرى المستخدمة كمصادر كاربونية جدول (2) في انتاج كل من السكر المتعدد والكتلة الحيوية وقد تم الحصول على اقل انتاجية من السكر المتعدد 4.99 غم /لتر عند أستخدام الكلاكتوز واعلى كتلة حيوية 16.30غم/لتر تم الحصول عليها عند أستخدام النشا كمصدر كاربوني، انخفض الرقم الهيدروجيني بسبب انتاج الفطر لبعض الحوامض العضوية في معظم السكريات المستخدمة ماعدا سكر اللاكتوز حيث كان الا س الهيدروجيني النهائي8.54 مرتفعا عن الاس الهيدروجيني الاولي 6.5 وقد يعود السبب الى قلة أستغلال الفطر لسكر اللاكتوز كونه سكر ثنائي لعدم قابلية الفطر على أنتاج الانزيمات الخاصة بتحليل سكر اللاكتوز الى كلاكتوز وكلوكوز[18].

جدول (2): تأثير أضافة مصادر كاربونية مختلفة في نمو الفطر وانتاج البوليولان*

نوع المصدرالكاربوني وزن/حجم	الكتلة الحيوية غم/ لتر	البوليولان غم/ لتر	الرقم الهيدروجيني النهائيpH
سكروز	1.14(0.07)	31.92(0.03)	4.47(0.00)
كلوكوز	4.57(0.03)	30.77(0.05)	4.40(0.00)
أرابينوز	0.80(0.01)	29.01(0.03)	4.18(0.04)
فركتوز	5.81(0.10)	27.92(0.01)	4.23(0.07)
مانوز	10.11(0.02)	21.22(0.06)	4.57(0.31)
نشا	16.30(0.01)	8.89(0.03)	4.70(0.08)
لاكتوز	2.57(0.01)	8.14(0.00)	8.54(0.09)
كلاكتوز	7.89(0.12)	4.99(0.00)	7.21(0.13)

*** كل قيمة هي معدل لمكررين ... اما النتائج بين القوسين فتمثل الانحراف المعياري (.S.D).**

تأثيرأضافة مصادر نايتروجينية مختلفة في أنتاج الكتلة الحيوية والبوليولان

بينت نتائج هذه التجربة جدول(3) انه تم الحصول على أقصى انتاجية من السكر المتعدد البوليولان 34.61 غم/لترعند أستخدام الحامض الاميني كلايسين فيما أعطت كبريتات الامونيوم 28.95 غم/لترمن البوليولان وتباينت باقي المصادر النايتروجينية المستخدمة في أنتاج البوليولان وقد تم الحصول على أقل انتاجية من البوليولان 19.62غم/لتر عند أستخدام كلوريد ألامونيوم.

أن سبب دعم الحامض الاميني في انتاج البوليولان قد يعود الى كون هذا الحامض أُستغل بشكل جيد في انتاج البوليولان .

فيما يخص الكتلة الحيوية هي الاخرى تباينت مع اختلاف المصادر النايتروجينية المستخدمة في الوسط الغذائي وأعطت الكتلة الحيوية 14.49 غم/لتر تم الحصول عليها عند استخدام كلوريد الامونيوم كمصدر نايتروجيني فيما كانت أقل كتلة حيوية 6.06 غم/لتر تم الحصول عليها عند أستخدام كبريتات الامونيوم كمصدر نايتروجيني . انخفض الرقم الهيدروجيني النهائي بسبب تراكم بعض الاحماض العضوية التي ينتجها الفطر خلال فترة التخمير[8].

جدول (3): تأثير إضافة مصادر نايتروجينية مختلفة على نمو الفطر وإنتاج البوليولان*

المصادر النايتروجينية	التركيز % وزن/ حجم	الكتلة الحيوية غم/ لتر	البوليولان غم/ لتر	الرقم الهيدروجيني النهائي pH
كلايسين	0.064	8.36(0.03)	34.61(0.01)	4.29(0.01)
كبريتات الأمونيوم	0.06	6.06(0.06)	28.95(0.01)	4.12(0.01)
الانين	0.076	11.03(0.11)	27.69(0.00)	4.49(0.04)
نترات الامونيوم	0.036	9.39(0.09)	25.82(0.01)	4.42(0.04)
يوريا	0.027	8.14(0.02)	24.69(0.04)	4.35(0.13)
نترات البوتاسيوم	0.086	8.30(0.04)	21.66(0.02)	4.61(0.00)
نترات الصوديوم	0.08	10.27(0.01)	20.70(0.01)	4.44(0.06)
كلوريد الامونيوم	0.05	14.49(0.04)	19.62(0.02)	3.76(0.02)

كل قيمة هي معدل لمكررين... أما النتائج بين القوسين فتمثل الانحراف المعياري (.S.D).

المصادر

1. Yatmaz, E. and Turhan, I. (2012). Pullulan production by fermentation and usage in food industry. Food. 37(2): 95-102.
2. Choudhury, A.R., Saluj, P. and Prasa, G.S. (2011). Pullulan production by an osmotolerant *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3 isolated from flowers of *Caesulia axillaris*.Carbohydr. Polymer. 83:1547-1552.
3. Leathers,T.D. (2002). Pullulan. In: Vandamme EJ, De Bates S, Steinbuchel A (eds) Biopolymers. PolysaccharidesII: polysaccharides from eukaryotes, vol 6.pp1_35.Wiley_VCH,Weinheim .
4. Cheng, K.C., Demirci, A., Catchmark, J.M. and Puri,V.M. (2010). Modeling of pullulan fermentation by using a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*.J.Food Eng.98:353-359.
5. Xiao, Q., Lim, L.T. and Tong, Q. (2012). Properties of pullulan-based blend films as affected by alginate content and relative humidity.Carbohydr. Polymer.87:227-234.

6. Leathers,T.D., Nofsinger, G.W., Kurtzman, C.P. and Bothast, R.J. (1988). Pullulan production by color variants of *Aureobasidium pullulans*.J Ind Microbial 3:231-239.

7. Wu, S., Chen, J. and Pan, S. (2012). Optimization of fermentation conditions for the production of pullulan by a new strain of *Aureobasidium pullulans* isolated from sea mud and its characterization.Carbohydr. Polymer. 87:1696-1700.

8. Oguzhan, P. and Yangilar, F. (2013). Pullulan: Production and usage in food industry. Afri.J. of Food Sci. and Technol.vol.4(3)pp.57-63.

9. Deshpande, M.S., Rale, V.B. and Lynch, J.M. (1992). *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report. Enzyme Microbiol. Technology. Vol.14.

10. Leathers, T.D. (2003). Biotechnological production and applications of pullulan. Applied Microbiology and Biotechnology. 62: 468-473.

11. Anastassiadis, S. and Rehm, H. (2006). Continuous gluconic acid production by the Yeast- like *Aureobasidium pullulans* in a cascading operation of two bioreactors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 73: 541-548.

12. Anastassiadis, S., Kamzolova, S.V., Morgunov, I.G. and Rehm, H. (2008). The effect of Iron on Gluconic acid production by *Aureobasidium pullulans*.The open Biotechnology Journal. 2, 195-201.

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

14. Lacroix, C., LeDuy, A., Noel, G. and Choplin, L. (1985). Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium. Biotechnol. Bioeng. 27:202-207.

15. الدباغ، زهراء أبراهيم محمد . (2012). أنتاج السكر المتعدد (بيتا_د_كلوكان) بوساطة العزلة المحلية من الفطر *Aureobasidium pullulans*. أطروحة ماجستير، كلية التربية/ جامعة الموصل/ العراق .

16. West, T.P., and Strohfus, B.H. (1996). A pullulan_degrading enzyme activity of *Aureobasidium pullulans.* Journal of Basic Microbiology. 36:377-380.

17. West,T.P. and Reed_Hamer, B. (1991). Ability of *Aureobasidium pullulans* to synthesis pullulan upon selected sources of carbon and nitrogen. Microbios. 67:117-124.

18. LeDuy, A.,Yarmoff, J.J. and Chagraoui, A. Enhanced production of pullulan from lactose by adaptation and by mixed culture techniques, Biotechnol. Lett. 5:49.