دراسة تأثير الضغط الأزموزي والتحضين وبعض المواد المضافة إلى الوسط الغذائي على إنتاج السكر المتعدد" السكليروكلوكان" بوساطة إحدى عزلات الفطر *Sclerotium rolfsii*

عبد الكريم سليمان حسن ألنعيمي

علوم الحياة، كلية التربية للبنات، جامعة تكريت، تكريت، جمهورية العراق

الملخص:

تم إنتاج السكر المتعدد" السكليروكلوكان" بوساطة احدى عزلات الفطر *S.rolfsii* والتي تم الحصول عليها من مركز الثروة الميكروبية(المرسين) من جامعة عين شمس في مصر، باستخدام احد الأوساط الزرعية وتحت ظروف زرعية معينة حيث لوحظ ان اضافة الملح (NaCl) إلى الوسط الزرعي أدى إلى زيادة في انتاج السكر المتعدد " السكليروكلوكان" وذلك نتيجة للضغط الازموزي الناشئ من إضافة الملح (NaCl) وبتراكيز معينة .

المقدمة:

السكليروكلوكان نوع من السكريات المتعددة المكروبية الخارج خلوية Extra polysaccharides التي تنتج من خلايا الفطر *Sclerotium rolfsii* وأنواع أخرى للجنس *Sclerotium* مثلِ*S.gluconicum* [١٢و٦]" السكليروكلوكان " عبارة عن سكر متجانس (كلوكان) يتكون من وحدات متشابة Monomers من الكلوكوز فقط ؛ ترتبط مع بعضها بوساطة آصرة كلايكوسيديةنوع بيتا(*B*). يتميز هذا السكر المتعدد بصفات ريولوجية نوعية تعزز من استخدامه في الصناعات النفطية والدوائية والغذائية وينتج بشكل تجاري (تحت اسم Polytran) [4]يستخدم كذلك لمعالجة حالات الاصابات الملتهبة وله فعالية ضد الخلايا السرطانية (Antitumor Activity) [٧و١٥و ١٠ و٨] نتج هذا السكر بواسطة المزارع الهوائية المغمورة لأنواع الفطر *Sclerotium* في درجة حرارة ٢٨ ±١م وفي أوساط غذائية تحتوي على الكلوكوز او السكروز كمصدر للكربون وعلى النترات كمصدر للنتروجين [٦و١٢و ٩] ولازالت الدراسات على السكليروكلوكان قليلة بشكل عام ومن اجل ذلك هدفت الدراسة إلى تحديد بعض العوامل المؤثرة على زيادة الإنتاج في الوسط الغذائي .

مواد وطرائق العمل:

الكائن المجهري وتحضير اللقاح :

تم حفظ عزلة الفطر *S. rolfsii* بعد تنميتها على وسط (بطاطا دكستروز أكار) Potato Dextros Agar (P D A) داخل أنابيب اختبار في الثلاجة على درجة حرارة ٤ م وتم تجديد المزارع كل خمسة أيام . استخدم الوسط (P D A) لتحضير لقاح الفطر وذلك بنقل جزء من مستعمرة الفطر الى أطباق بتري (قطر ٩ سم) حاوية على الوسط المعقم ووضعت الأطباق في حاضنة عند درجة حرارة ٢٨ ±١م بعدها تم تهيئة أقراص من الفطر كلقاح بواسطة ثاقب فلين بقطر (٥ ملم) من حافة مزرعة الفطر بعمر (٧ أيام) .

الوسط الغذائي: لتنمية الفطر وإنتاج السكليروكلوكان استخدم الوسط الغذائي المتضمن ما يلي:

كلوكوز (Glucose)	٥٠
نترات الصوديوم (NaNO٣)	٢,٥
كبريتات المغنيسيوم (MgSo4.7H2O)	٠,١
فوسفات البوتاسيوم (KH2PO4)	٠,٥
مستخلص الخميرة(Yeast extract)	٢

غرام / لتر ماء وتم ضبط الرقم الهيدروجيني الى (pH=٧).

الظروف الزراعية :

أجريت هذه التجارب باستخدام ثلاث مكررات لكل معاملة وذلك باستخدام دوارق مخروطية سعة ٢٥٠مل حيث وزع الوسط الغذائي بمعدل ١٠٠مل /دورق سدت الدوارق بالقطن وعقمت باستخدام جهاز المعقام تحت ضغط ١ كغم / سم٣ ودرجة حرارة ١٢١م لمدة ١٥دقيقة بعد التعقيم تركت الدوارق لتبرد ثم لقحت تحت ظروف معقمة بخلايا الفطر من اللقاح المحضر بوضع قرص واحد (قطر ٥ ملم) لكل دورق وبعدها وضعت الدوارق في حاضنة هزازة عند درجة حرارة ٢٨ + ١مْ وبمعدل ١٥٠دورة / دقيقة لمدة ٧ أيام .

عزل وتقدير السكر المتعدد :

اخذ (١٠)مل من الراشح الخالي من خلايا الفطر وتم ترسيب السكر المتعدد باضافة ثلاثة حجوم من الايثانول (٩٦%) واجريت عملية الطرد المركزي ٩٠٠٠ دورة /دقيقة لمدة ١٥ دقيقة لفصل السكر [٥].

١ . تأثير الضغط الأزموزي :

تم إضافة ملح الطعام NaCl إلى وسط النمو والإنتاج وذلك لدراسة تأثير الضغط الازموزي على إنتاج السكليروكلوكان بتراكيز مختلفة وبفترة تحضين ٧ أيام وعلى النحو التالي [١٦] : .

(١٢٥)٥٠NaCl غم = ٥٠ غم كلوكوز + ٨,٣ NaCl

(١٢٥)٧٥NaCl غم =٧٥ غم كلوكوز + ٥,٦ NaCl

(١٥٠) ٥٠NaCl غم =٥٠ غم كلوكوز + ١١,٣ NaCl

(١٥٠)٧٥NaCl غم =٧٥ غم كلوكوز + ٨,٦ NaCl

كذلك تأثر إنتاج " السكليروكلوكان" بفترات التحضين المختلفة وكان أعلى إنتاج له عند فترة تحضين سبعة ايام حيث بلغ (٥,٦ غم/لتر) كما إن إضافة بعض المواد الى الوسط مثل (Thioamine hyddrochloride (ZnSO4.7H2O; Cellibiose;; Olive oil ;Ascorbic acid ; لم تؤدي إلى أي زيادة تذكر في إنتاج " السكليروكلوكان" من قبل عزلة الفطر *S.rolfsii* .

وهكذا كلما زاد تركيز المصدر الكربوني ازداد الضغط الأزموزي بوجود الملح ويلاحظ أيضا" إن زيادة تركيز المصدر الكربوني في الوسط الغذائي يصاحبه انخفاض نسبي في تركيز الملح المضاف .

٢ . فترة التحضين :

حددت فترات تحضين مختلفة لنمو الفطر وإنتاج السكليروكلوكان(بالأيام) وعلى النحو التالي:(٢، ٣، ٥، ٧و ١٠).

٣. تأثير إضافة بعض المواد إلى الوسط الغذائي :

توصف بعض المواد عند اضافتها للوسط الغذائي بانها عوامل نمو وتحفيز لانتاج مركبات مهمة من قبل الفطر ومن اجل زيادة إنتاج السكليروكلوكان من قبل عزلة الفطر *S. rolfsii* . تم إضافة عدد من المواد إلى الوسط الغذائي وبالتراكيز التالية :

Thiamine hydrochloride	٠,٠٠٠١ ملغم
Ascorbic acid	2 غم
Olive oil	2 غم
$ZnSO_4\ 0.7H_2O$	0.002 ملغم
Cellibiose	10 ملغم

النتائج والمناقشة :

١. تأثير الضغط الأزموزي :

جدول رقم (١) يوضح أن إنتاج السكليروكلوكان تأثر بشكل مباشر بالضغط الأزموزي ومن خلال الحجم المكافئ للأزموزية في الوسط الغذائي الحاوي على(١٢٥غم)أو(١٥٠غم) من الكلوكوز قد تم التوصل إليه وذلك بإضافة كميات ملائمة من الملح (NaCl) للوسط الحاوي على (٥٠غم و٧٥غم) من الكلوكوز على الترتيب ؛ وهذه النسب من الملح والمصدر الكربوني المضافة إلى الوسط الغذائي تستغل من قبل الفطر لإنتاج السكليروكلوكان حيث أنه عند تركيز(١٥٠غم) كلوكوز في الوسط الغذائي يتمثل بالنسبة التالية (٧٥غم كلوكوز + ٦و٨غم NaCl) .وهذا يشير إلى الضغط الأزموزي الحاصل في الوسط الغذائي . إن تأثير الملح NaCl هو نفسه عند اضافة KCl إلى وسط الإنتاج لمستوى إنتاج السكليروكلوكان [١٦]. وبهذا فقد تم الحصول على أن أعلى إنتاج للسكر المتعدد "السكليروكلوكان " والبالغ (١٠,٥غم / لتر) بإضافة الملح تركيز ٥،٦غم /لتر و الذي عكس أعلى نسبة مئوية للإنتاج بلغت ١٤% إلى وسط الإنتاج بالقياس لمعاملة المقارنة والبالغ (٧,٦ غم / لتر) سكليروكلوكان عند نفس تركيز المصدر الكربوني بغياب الملح NaCl وعلى هذا فان بعض الخمائر الشبيهة بالفطريات يلاحظ فيها الضغط الأزموزي بأنه من العوامل المحفزة لإنتاج السكر المتعدد الطبيعي الخارج خلوي [٤] .

وقد اشار الباحث [٦] ان هنالك عزلة من الفطر *S.rolfsii* تبدى مدى واسع فيما يتعلق بانتاج السكليروكلوكان من خلال النمو تحت ظروف الضغط الأزموزي العالي وهو جزء من الميكانيكية المنتظمة . ان وجود كلوريد الصوديوم (NaCl) له تأثير ايجابي على تحفيز انتاج السكر المتعدد (البوليولان) بوساطة الفطر *Aeurobasidium pullulan* وغيابه أثر سلبيا على الانتاج [٣] كما يضاف الكلور الى الوسط الغذائي للمحافظة على التوازن الآيوني في داخل الخلية اثناء انتاج الطاقة بالمساعدة مع الصوديوم والكالسيوم[١] .

جدول(١): تأثير الضغط الازوموزي على نمو الفطر وإنتاج السكر المتعدد (السكليروكلوكان) من إحدى عزلات الفطر *S. rolfsii*

تركيز المصدر الكاربوني كلوكوز غم / لتر	تركيز NaCl غم / لتر	الكتلة الحيوية Biomas غم/ لتر	السكر المتعدد Scleroglucan غم/ لتر	النسبة المئوية للتحول % Conversion	النسبة المئوية للإنتاج % Yield	السكر المتبقي غم/ لتر Res. Sugar
50	0	6.5	6.1	17.03	12.2	14.2
$50\ (125)_{Na}$	8.3	5.8	9.8	31.71	19.6	19.1
$50\ (150)_{Na}$	11.3	6.1	10.0	24.69	13.33	24.5
75	0	5.0	7.6	14.33	10.31	22.0
$75\ (125)_{Na}$	5.6	6.8	10.5	22.53	14.0	28.4
$75\ (150)_{Na}$	8.6	6.0	9.4	20.0	12.53	28.0

$$\text{التحويل \%} = \frac{\text{السكلير و كلوكان المنتج غم / لتر}}{\text{تركيز السكر المستهلك غم / لتر}} \times ١٠٠$$

$$\text{الانتاج \%} = \frac{\text{السكلير و كلوكان المنتج غم / لتر}}{\text{تركيز السكر المستهلك غم / لتر}} \times ١٠٠$$

٢– تأثير فترة التحضين:

جدول رقم (٢) يوضح أن فترات التحضين المختلفة اثرت على انتاج السكليروكلوكان وكان أكثر منه على نمو الفطر وان أعلى إنتاج للسكر المتعدد كان (٥,٦ غم / لتر) عند فترة تحضين ٧ أيام وكذلك ازدادت الكتلة الحيوية Biomass الى(٦,٠ غم / لتر) بالقياس للفترات السابقة ومن هذا يستدل على اقل نسبة من السكر المتبقي في وسط النمو (١٠,١غم/ لتر)[11] أشار إلى أن الكتلة الحيوية للفطر وصلت الى حالة من الاستقرار في الزيادة او النمو عند٧ أيام من التحضين وقد تزداد عند قلة انتاج السكر المتعدد . ويلاحظ ان الفطر اظهر فترة تكيف Lag-phase طويلة نسبيا لانتاج السكر المتعدد حيث بلغ ٢,١ غم /لتر بعد ثلاثة ايام ليصل اقصاه بعد ٧ ايام من التحضين اذ بلغ ٥,٦ غم /لتر .وهذا يتفق مع ما اشار اليه [٢] بان اعلى انتاج من للسكر المتعدد من الفطر *Alternaria alternate*

جدول (٢): تأثير فترة التحضين (بالأيام) على نمو الفطر وإنتاج السكر المتعدد (السكليروكلوكان) من إحدى عزلات الفطر *S. rolfsii*

فترة التحضين (بالأيام)	الكتلة الحيوية Biomas غم/ لتر	السكر المتعدد Scleroglucan غم/ لتر	النسبة المئوية للتحول % Conversion	النسبة المئوية للإنتاج % Yield	السكر المتبقي غم/ لتر Res. Sugar
2	٢,٣	٠,٩	٣,٠	١,٨	٢٠,١
٣	٣,٢	٢,١	٦,٤	٤,٢	١٧,٢
٥	٥,٦	٣,٥	٩,٥	٧,٠	١٣,٤
٧	٦,٠	٥,٦	١٤,٠	١١,٢	١٠,١
١٠	٦,٢	٤,٤	١١,١٦	٨,٨	١٠,٦

$$\text{التحويل \%} = \frac{\text{السكلير و كلوكان المنتج غم / لتر}}{\text{تركيز السكر المستهلك غم / لتر}} \times ١٠٠$$

$$\text{الانتاج \%} = \frac{\text{السكلير و كلوكان المنتج غم / لتر}}{\text{تركيز السكر المستخدم غم / لتر}} \times ١٠٠$$

٣- تأثير إضافة بعض المواد :

اظهر جدول (٣) ان المواد المضافة الى الوسط لم تغير من النمو والانتاج مما يشير الى عدم قدرة الفطر على استغلالها لزيادة انتاج السكر المتعدد او الكتلة الحيوية كما ان هذه المواد لم تحفز الفطر ليبدي فعالياته الايضية والتي تعكس زيادة او خفض انتاج السكر المتعدد علما" أن هنالك دراسات تشير إلى تأثر كائنات مجهرية مختلفة من حيث النمو والانتاج باضافة (Ascorbic acid; Olive oil ;Sunflower oil) [١٧و٩].

جدول (٣): المواد المضافة إلى وسط الإنتاج على زيادة السكلير والكلوكان بعد (٧) ايام من التحضين

المواد المضافة / المقارنة	الكتلة الحيوية Biomas غم/ لتر	السكر المتعدد Scleroglucan غم/ لتر	النسبة المئوية للتحول % Conversion	النسبة المئوية للإنتاج % Yield	السكر المتبقي غم/ لتر Res. Sugar
Control	5.8	5.2	15.43	10.4	16.3
Thioamine Hydrochloride	6.0	5.5	14.10	11.0	14.4
Ascorbicacid	5.9	5.2	15.24	10.2	15.9
Olive Oil	6.2	5.4	15.21	10.8	14.5
$ZnSo_4. 7H_2O$	5.8	5.4	15.42	10.8	15.0
Cellibiose	5.6	5.0	15.77	10.0	18.3

$$\text{التحويل \%} = \frac{\text{السكلير و كلوكان المنتج غم / لتر}}{\text{تركيز السكر المستهلك غم / لتر}} \times ١٠٠$$

$$\text{الانتاج \%} = \frac{\text{السكلير و كلوكان المنتج غم / لتر}}{\text{تركيز السكر المستهلك غم / لتر}} \times ١٠٠$$

المصادر :

١. الخفـاجي، زهـرة محمـود (١٩٩٦). التقنيــة الحيويــة ، مطبعــة دار الحكمة للطباعة والنشر ، الموصل – جمهورية العراق.

٢. الراوجي،عصـام داود (٢٠٠٥). دراسـة انتـاج بعـض نـواتج الايـض الثانوي لفطريـات معزولـة محليـا وفعاليتهـا الحيويـة ،اطروحـة دكتوراه /كلية التربية /جامعة الموصل ص ٧٠.

3. Boa, J.M. &Leduy, A. (1984). Peathy drolly save medium Optimization for pullulan production Appl. Environm. Microbiol., 48: 26-30.
4. Breievora, E., Strutilora, E &Sajbidor, J. (1996).Polysaccharides and meth , Folia Microbiol. 41: 257-263.
5. Cerning, J.; Renard, C.M.G.; Thibault, J.F.; Bouillanne, C.; London,M.; Desman-Zeaud,M. and Topisirovic,L. (1994).Carbon Source requirement for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* and partial structure analysis of plymer .Appl. Enviro.Microbiol. 60:3914-3919.
6. Farina, J.I., Sineriz., F.; Molina,O.E. &Perotti.,N.I. (1998). High scleroglucan Production by *Sclerotium rolfsii* Influence of Medium Composition .Biotechnology Letters vol.2, No.9, P.825-831.
7. McNeil, B., & Harvey,L.M. (1993). Viscous fermentation products , Crit. Rev. Biotechnol. 13: 275-304.
8. Muller, A., Ensley.,H.; Pretus.,H.; McNamee., R.; James.,E.; Mclanghlin.,E.; Chandley.,W.; Browder.,W.; Lowman.,D. & Williams,D. (1997). The application of various protic acids in extraction of (1-3) –B-D-glucan from *Saccharomyces Crevisiae*.Carbohydrate research 299,23-28.
9. Pilz, F., Auling.,G.; Stephen.,D.; Ran.,R.& Wanguer,F. (1991). A high-affinty Zn uptalee system controls growth & biosynthesis of an extrcellular branched B-1, 3-B-1, 6 glucan in *Sclerotium rolfsii* ATCC 1505 Exp. Mycol. 15: 181-192.
10. Pretusz , H.A., Ensley.,H.E.; McNamee.,R.B.; Jones., E.L.. Browder.,I.W. & Williams,D.L. (1991). Isolation physiochemical characterization & pre-clinical efficely evaluation of soluble Scleroglucan. J. Pharmacol. Exp. Ther. 257: 500-510.
11. Rupp, P. (1989) 1, 3, B- glucanase, 1, 6, B-glucanase & B- glucanase activities of *Scllerotium glucanicum*, Synthesis & properties. J. Gen. Microbiol., 135: 2847-2885.
12. Taurhesia, S. &. McNeil, B. (1994). Production of scleroglucan by *Sclerotium glucanicum* in batch and supplemented batch Cultures. Enzyme Microbial. Technol. 16: 223-228.
13. Tsiapali, E., Whaley.,S., Kalbfleisch.,J.; Ensley.,H.E.; Browder,I.W.& Williams,D.L.(2001). Glucan exhibits weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. Free radical Biology & Medicine. 30: 393-402.
14. Wang. Y. & McNeil, B. (1996). Scleroglucan. Critic. Rev. Biotech. 16: 185-215.
15. Whistler, R.L., Bushway., A.A.; Singh., P.P.; Nakahara,W. & Tokuzan,R. (1976). Noncytotoxic antiturnor polysaccharides Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 32: 235-274.
16. Wolf, A.V., Brown.,M.G. & Prentiss,O.G. (1986). Concentrative properties of aqueous solution: Convwesion table. In: CRC Handbook of chemistry & physics, Rcweast, MJ Astle & WH Beyer, eds PP D-219-271, USA: CRC press Inc.
17. Kritzman, G., Okon ,Y;Chet, I. & Henis, Y. (1976). Effect of Carbon dioxide on growth & Carbohydrate metabolism in *S. rolfsii*. J. Gen. Microbial. 95, 78 – 86.

Influence of Osmotic Pressure & Incubation & some Material on the Production of " Scleroglucan " from *Sclerotium rolfsii*.

Abdul- Karim Sulyman Al- Noimi

Department of Biology, College of Education for Women, University of Tikrit, Tikrit Iraq

Abstact:

The production of Polysaccharine (Scleroglucan) has been completed by one of the strain of fungus *S. rolfsii* and by using one of the cultivate media under an incubation cultivate state, when the salt (NaCl) added to this media led to high increase the Sclerogan production as a result for increasing the osmotaic pressure which is raised from adding the salt with incubation concentrations.

As well as the production effect of Sclerogan was on the difference incubation terms and it's high production was on the five days which reached (16gm / 1). So as adding some materials such as Thiamine hydrochloride, ascorbic,ZnSO4, 7H2O Olive oil and Cellibios did not lead to any increase of Sclerogan production by the fungus *S. rolfsii.*