تأثير تراكيز مختلفة من ثلاثة انواع من الزيوت النباتية ولفترات تحضين مختلفة على نمو عزلة الفطر *Aspergillus niger* (2) وإنتاجها لأنزيم اللايبيز

زكريا سامي عبد الرزاق و رياض خليل البرهاوي

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

(تاريخ الاستلام: / /٢٠٠٧ ، تاريخ القبول: / /٢٠٠٧)

الملخص

اختيرت عزلة الفطر(٢)*Aspergillus niger* المعزولة من ثمار الزيتون كأفضل عزلة محلية لأنتاج انزيم اللايبيز .تم دراسة تأثير ثلاثة انواع من الزيوت النباتية زيت الذرة،زيت زهرة الشمس، زيت الزيتون على نمو الفطر وانتاجيته للانزيم باستخدام الاوساط الزرعية السائلة واستخدمت عدة تراكيز لكل نوع ولفترات تحضين مختلفة. وجد ان التركيز ٢% حجم / حجم من زيت الزيتون وفترة التحضين ٤ ايام حققت افضل نمو واعلى انتاجية لأنزيم اللايبيزحيث وصلت الى ٢,٤٨٢ غرام / ١٠٠مل و ٢٥,٥٦ وحدة/ مل على التوالي.

المقدمة

أبدى الباحثون اهتماماً ملحوظاً بأنزيمات اللايبيز (الأنزيمات المحللة للدهون والزيوت) وذلك للدور الذي تؤديه في العديد من المجالات وأهمها لصناعات الغذائية فهي المسؤولة عن النكهة الخاصة في العديد من منتجات الألبان واللحوم والأسماك وغيرها ، كما إنها ضرورية لإنتاج نكهة مرغوبة ومفضلة في منتجات غذائية أخرى، فضلاً عن ذلك يمكن ان تستخدم في صناعة المنظفات والآيس كريم وانتاج البروتين أحادي الخلية (27,6) وتستخدم كذلك في الصناعات الجلدية من خلال مقدرتها على ازالة الشحوم (14)

وتستخدم كمواد مساعدة للهضم والتحري عن مركبات ثلاثي اسيل الكليسيرول (TAG) الموجودة في الدم، وفي بناء استرات للعديد من المواد الكيميائية، وتدخل في صناعة مستحضرات التجميل (29).

تنتج اللايبيزات من قبل العديد من الأحياء منها الفطريات والبكتريا، اما الأحياء المجهرية المستعملة للإنتاج التجاري للايبيزات فتشمل الفطريات *Rhizopus, Mucor, Aspergillus* والخميرة *Candida* وانواع مختلفة من البكتريا (٢،١٢،١٥،١٨،٢٤).

تختلف الأحياء المنتجة لأنزيم اللايبيز في قابليتها لأستهلاك انواع مختلفة من المصادر الكربونية (٢) ، كما ان للعديد منها القدرة على استهلاك الجزيئات غير المستقطبة للدهون والزيوت (٩،١٣،٢١،٢٢).

بعد إختيار عزلة الفطر(2) *Aspergillus niger* كأفضل عزلة محلية لانتاج انزيم اللايبيز (٥) هدفت الدراسة الحالية الى بيان تأثير ثلاثة انواع من الزيوت النباتية بوصفها مصدراً كاربونياً ومادة اساس (Substrate) لانزيم اللايبيز على نمو عزلة الفطر وانتاج انزيم اللايبيز.

المواد و طرق العمل

حفظت عزلة الفطر المستخدم على وسط اكارالبطاطا والسكروز (PSA) داخل قناني زجاجية وبشكل مائل في ثلاجة بدرجة حرارة ٥ °م و تم تنشيط العزلة الفطرية باعادة زراعتها (subculture) على وسط اكار البطاطا و السكروز(PSA) كل أسبوعين وحضنت عند درجة (٢٨ ± ١) م لمدة أسبوع، ثم حفظت في الثلاجة.

حُضر عالق السبورات من مستعمرة فطرية نقية وبعمر أسبوع وتحت ظروف معقمة بإضافة ماء مقطر معقم واجري التخفيف المطلوب للوصول إلى تركيز العالق السبوري ١٠x٥ ° سبور/ مل و بالاستعانة بشريحة العد Haemocytometer (٣٠،٣١).

تم استخدام الاوساط السائلة وباستخدام المزارع ذات الدفعة الواحدة Batch culture وبواسطة الحاضنة الهزازة من نوع (New Braunswick Scientific, USA) وبمعدل ١٢٠ دورة /دقيقة حيث استخدم الوسط الغذائي الخاص لانتاج اللايبيز والموصوف من قبل (٧) والذي يتركب مما ياتي (غم/ لتر):

ببتون٥،كبريتات الامونيوم١ ، كبريتات المغنسيوم المائية ١ ، فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين١ ،كما تم اضافة الزيوت النباتية بانواعها الثلاثة وبالتراكيز (٥،٢،٣،٥،١،٢، ١)%حجم/حجم كل على حدى وحيث فترة التحضين الخاصة بكل تجربة.

بعد انتهاء كل فترة تحضين مطلوبة((١،٢،٣،٤،٥)يوم) سحبت الدوارق من الحاضنة الهزازة بصورة عشوائية وتم تقدير الوزن الجاف للفطر واستخدم راشح المزرعة الفطرية لتقدير فعالية انزيم اللايبيز بأستخدام طريقة التسحيح Titration الموصوفة من قبل (١٤) ويعتمد مبدأ هذه الطريقة على تسحيح الاحماض الدهنية الناتجة بفعل انزيم اللايبيز ضد محلول NaOH لبيان فعالية الانزيم والتي عبر عنها بمقدار الوحدة الانزيمية Unit التي عرفها (٧) على انها كمية الانزيم التي تحرر ١ مايكرومول من الاحماض الدهنية خلال دقيقة واحدة. اخذ الراشح واجريت له عملية الطرد المركزي باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد من نوع MSE بدرجة حرارة ٤ مْ وبسرعة ١٠٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٥ دقائق(١٤) للتخلص من بقايا كتلة الفطر والمواد غير الذائبة، واستعمل الراشح(Supernatant) بوصفه محلولا انزيميا وقسم هذا الراشح الى جزئين جزء تم غليه لفترة قصيرة لتحطيم الانزيم والجزء الاخر استعمل مباشرة لتقدير الفعالية الانزيمية كما ياتي:

أضيف ٧٥ مل من محلول ٢% من Poly Vinyl Al-cohol (PVA) الى ٢٥ مل من زيت الزيتون وتم مزجهما باستخدام خلاط Blendor من نوع ULTRA-TURAX لمدة ٥ دقائق لتكوين مستحلب زيت الزيتون، بعدها اخذ دورقين حجم ١٠٠ مل واضيف لكل دورق ٥ مل من مستحلب زيت الزيتون ثم اضيف لكل دورق ٤ مل من المحلول المنظم صوديوم فوسفيت بفر (pH=7) بتركيز ٠,١ مولر ووضع الدورقان في

الحاضنة الساكنة بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ١٠ دقائق ثم اخرج الدورقان من الحاضنة واضيف لاحدهما ١ مل من الراشح الانزيمي المغلي واعتبر كدورق سيطرة واضيف للاخر ١ مل من الراشح الاعتيادي ثم وضع الدورقان في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة ٣٧ مْ وبسرعة ١٢٠ دورة/ دقيقة ثم اخرج الدورقان واضيف لكل واحد ٢٠ مل من الاسيتون لغرض ايقاف التفاعل، ثم اجرى تسحيح لمكونات كل دورق ضد محلول NaOH بتركيز ٠,٠٥ N بعد اضافة قطرتين من الفينولفثالين (١ غم/ ٥٠٠ مل من ٥٠% ايثانول) (٢٠) لمكونات كل دورق، بعدها طرحت قيمة NaOH المستهلكة للتسحيح في دورق السيطرة من قيمة NaOH المستهلكة للتسحيح في حالة الراشح الانزيمي الاعتيادي وادخلت القيمة الناتجة (حجم NaOH المستهلك) في حساب قيمة فعالية اللايبيز باستخدام المعادلة الاتية:

$$\text{الفعالية الانزيمية (وحدة/مل)} = \frac{\dfrac{\text{حجم NaOH المستهلك} \times \text{عيارية NaOH}}{1000}}{\text{وقت التفاعل (20 دقيقة)}} \times 1000000$$

نفذت تجربة عاملية بأستخدام التصميم العشوائي الكامل (CRD) وحللت النتائج احصائياً واختبرت بطريقة Duncan لمعرفة فيما اذا كان هناك فرق معنوي بين المعاملات عند مستوى احتمال 0.05 (28) . .

النتائج والمناقشة

بعد إختيار عزلة الفطر (2) *Aspergillus niger* كأفضل عزلة محلية منتجة لانزيم اللايبيز(٥) صممت تجربة لبيان تأثير ثلاثة انواع من الزيوت النباتية بوصفها مصدراً كاربونياً ومادة اساس (Substrate) لانزيم اللايبيز على نمو عزلة الفطر وانتاجها للأنزيم وهذه الانواع هي :
زيت الذرة و زيت زهرة الشمس و زيت الزيتون واستخدمت عدة تراكيز لكل نوع كالاتي : (3,2.5, 2, 1.5, 1) % حجم /حجم ولفترات تحضين مختلفة (5,4,3,2,1) يوم.

ويتضح من نتائج الجدول (١) ان هناك زيادة معنوية في معدل النمو وفعالية اللايبيز بزيادة التركيز وفترة التحضين الى حد معين وبلغت اعلى قيم للوزن الجاف والفعالية الانزيمية عند التركيز ٢% حجم/حجم والى حد فترة التحضين ٤ ايام ولجميع انواع الزيوت المستخدمة فقد بلغ الوزن الجاف(١,٥٩٤، ٢,٠٢٠، ٢,٤٨٢) غم/١٠٠ مل والفعالية الانزيمية (25.56,20.43,14.76) وحدة / مل عند استخدام زيت الذرة، زيت زهرة الشمس ، زيت الزيتون على التوالي. ولوحظ إن هناك تناقصاً في قيم الوزن الجاف والفعالية الانزيمية في التركيزين (٢,٥و٣)% حجم/حجم ولجميع انواع الزيوت المستخدمة مما يدل على ان التركيز ٢% حجم /حجم هو افضل تركيز مستخدم للحصول على أفضل نمو لعزلة الفطر واعلى فعالية انزيمية ، ونلاحظ من الشكلين ١و٢ ان زيت الزيتون عمل على تحقيق أفضل المستويات بالنسبة لنمو عزلة الفطر و أفضل فعالية انزيمية عند التركيز ٢% حجم/حجم ولجميع فترات التحضين تلاه زيت زهرة الشمس ثم زيت الذرة.

كما لوحظ أيضاً تناقص في قيم الوزن الجاف والفعالية الانزيمية للزيوت المستخدمة في اليوم الخامس من التحضين مؤشراً الى ان فترة التحضين ٤ أيام هي أفضل فترة تحضين للحصول على أفضل نمو للفطر واعلى فعالية لأنزيم اللايبيز ، ونلاحظ من الشكلين ٣و٤ ان زيت الزيتون عمل على تحقيق افضل المستويات بالنسبة لنمو عزلة الفطر و فعالية انزيم اللايبيزعند فترة التحضين ٤ ايام وعند جميع التراكيز تلاه زيت زهرة الشمس ثم زيت الذرة.

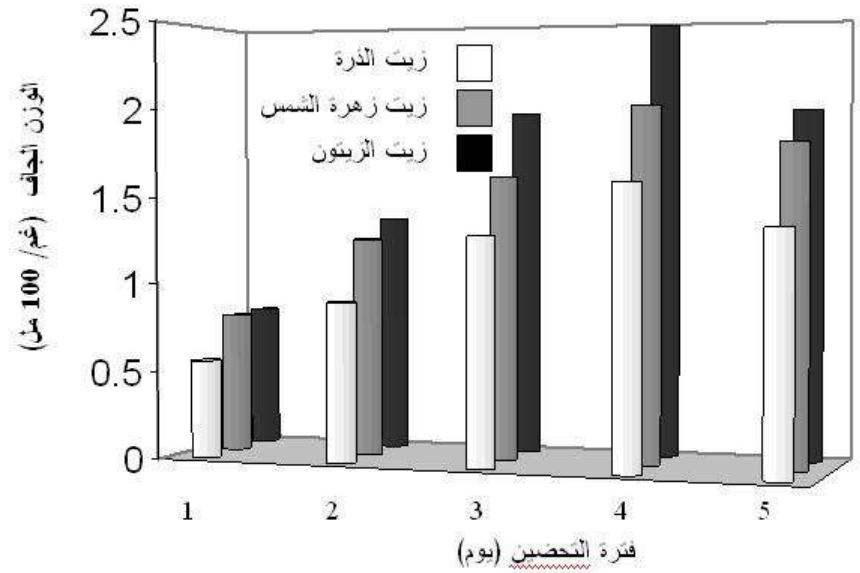
يتضح من الجدول ٢ ان قيم متوسطات الوزن الجاف والفعالية الانزيمية حققت زيادة معنوية بزيادة تراكيز الزيوت الى حد التركيز ٢ % حجم / حجم حيث بلغت ١,٤٥٤ غم/١٠٠ مل و ١٣,٥٩ وحدة/مل على التوالي ثم اتجهت تلك القيم الى النقصان بزيادة التركيز الى (٣،٢,٥) % حجم/حجم حيث بلغت (١,٢٦٧، ١,٠٤٦) غم/١٠٠ مل و (١١,٣٠، ٩,١٠) وحدة/مل على التوالي. إن معدل نمو عزلة الفطر وكفائته في افراز انزيم اللايبيز كانت منخفضة عند التركيزين ١و١,٥ % حجم / حجم من الزيوت المستخدمة وهذا يعزى الى ان كمية الزيت عند هذا التركيز تكون منخفضةلاتكفي لسد حاجة عزلة الفطر من الغذاء كما إن هذين التركيزين الواطئين من الزيوت

الجدول(1) تاثير تراكيز مختلفة من ثلاثة انواع من الزيوت النباتية كمصدر كاربوني ولعدة فترات تحضين على نموعزلة *Aspergillus niger(2)*وفعالية انزيم اللايبيز

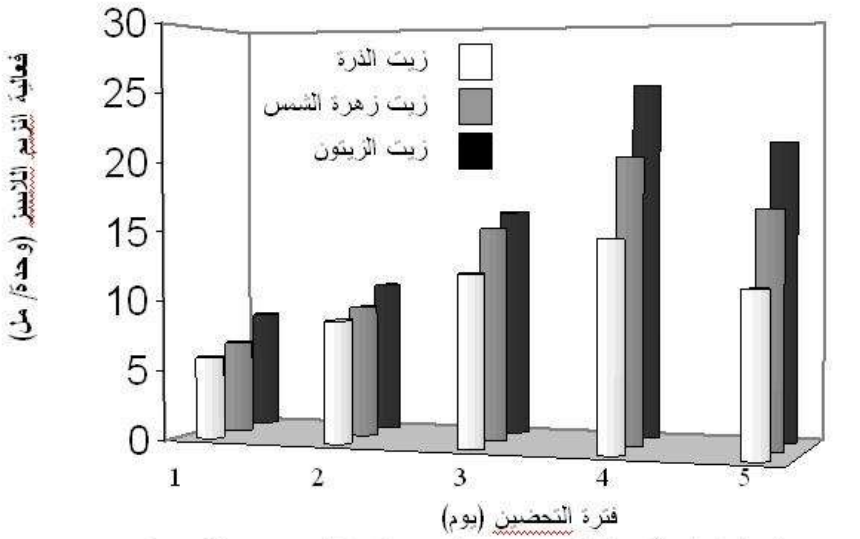
نوع الزيت		زيت الذرة		زيت زهرة الشمس		زيت الزيتون	
تركيز الزيت % حجم/ حجم	فترة التحضين بالايام	الوزن الجاف غم/100مل	فعالية إنزيم اللايبيز وحدة/ مل	الوزن الجاف غم/100مل	فعالية إنزيم اللايبيز وحدة/ مل	الوزن الجاف غم/100مل	فعالية إنزيم اللايبيز وحدة/ مل
1	1	(0.016 ± 0.380) ا د	(0.31 ± 3.63) ا د	(0.013 ± 0.476) ا ث	(0.17 ± 4.20) ا ح ا د	(0.005 ± 0.408) ا ح ا د	(0.14 ± 4.56) ا ح ا ج
	2	(0.008 ± 0.515) ا ت	(0.29 ± 5.06) ا ج ا ث	(0.021 ± 0.742) و ى	(0.23 ± 6.33) آ ب ا	(0.014 ± 0.836) م	(0.23 ± 6.50) ى آ ب ا
	3	(0.019 ± 0.738) وى	(0.24 ± 6.56) ى آ ا	(0.009 ± 1.158) غ	(0.21 ± 8.53) ل م ن هـ	(0.006 ± 1.161) غ	(0.14 ± 9.76) غ
	4	(0.006 ± 0.902) ل	(0.23 ± 9.73) غ	(0.006 ± 1.442) ز	(0.18 ± 11.7) ش ص ض ط	(0.021 ± 1.535) ر	(0.17 ± 14.96) خ وز
	5	(0.006 ± 0.715) ى آ ا	(0.20 ± 7.16) وى	(0.011 ± 1.107) ف	(0.20 ± 8.13) هـ	(0.010 ± 1.371) س	(0.20 ± 11.36) ض ط
1.5	1	(0.013 ± 0.425) ا ج ا ح	(0.30 ± 5.10) ا ث ا ج	(0.020 ± .556) ب ا	(0.17 ± 5.40) ا ت ا ث	(0.007 ± 0.690) آ ا	(0.14 ± 6.56) ى آ ا
	2	(0.012 ± 0.793) ن هـ	(0.23 ± 7.30) و	(0.010 ± 1.209) ظ ع	(0.20 ± 7.40) و	(0.014 ± 1.241) ض ط ظ	(0.20 ± 7.43) و
	3	(0.026 ± 1.046) ق	(0.23 ± .9.20) غ ف ق ك ل	(0.012 ± 1.368) س	(0.26 ± 9.03) ف ق ك ل م	(0.011 ± 1.448) ز	(0.12 ± 12.03) س ش ص ض
	4	(0.007 ± 1.286) ش ص	(0.26 ± 12.36) ز ش س	(0.008 ± 1.589) ذ	(0.17 ± 15.53) خ	(0.004 ± 1.871) ج	(0.18 ± 17.43) ج
	5	(0.012 ± 1.008) ق ك	(0.26 ± 8.40) م ن هـ	(0.009 ± 1.259) ش ص ض ط	(0.12 ± 12.16) س ش ص	(0.006 ± 1.608) ذ	(0.20 ± 14.73) د ذ ر
2	1	(0.016 ± 0.557) ب ا	(0.31 ± 5.83) ب ا ت ا	(0.015 ± 0.790) ن هـ	(0.15 ± 6.50) ى آ ب ا	(0.013 ± 0.801) م ن	(0.17 ± 8.30) ن هـ
	2	(0.010 ± 0.904) ك	(0.37 ± 8.73) ك ل م ن هـ	(0.008 ± 1.246) ص ض ط ظ	(0.17 ± 9.36) غ ف ق ك	(0.006 ± 1.361) س	(0.20 ± 10.70) ظ ع
	3	(0.016 ± 1.289) ش	(0.26 ± 12.23) س ش	(0.012 ± 1.619) د ذ	(0.20 ± 15.23) خ د ذ	(0.012 ± 1.980) ت	(0.14 ± 16.33) ح
	4	(0.009 ± 1.594) ذ	(0.20 ± 14.76) د ذ ر	(0.006 ± 2.020) ب	(0.24 ± 20.43) ت	(0.005 ± 2.482) أ	(0.17 ± 25.56) أ
	5	(0.014 ± 1.254) س	(0.20 ± 11.53) ص ظ ط	(0.011 ± 1.817) ح	(0.17 ± 16.83) ج ح	(0.008 ± 1.994) ب ت	(0.26 ± 21.50) ب
2.5	1	(0.011 ± 0.421) ج ا ح ا خ ا	(0.20 ± 4.46) ج ا ح ا خ ا	(0.011 ± 0.681) آ ا	(0.15 ± 6.50) ت ا ث ا	(0.008 ± 0.758) هـ و	(0.19 ± 6.31) آ ب ا
	2	(0.014 ± 0.896) ك	(0.21 ± 6.53) ى آ ا	(0.008 ± 1.086) ف	(0.14 ± 8.16) هـ	(0.019 ± 1.195) ع غ	(0.17 ± 9.43) غ ف ق
	3	(0.012 ± 1.274) ش ص ض	(0.17 ± 9.56) غ ف	(0.015 ± 1.462) ز	(0.23 ± 12.66) ز س	(0.007 ± 1.610) ذ	(0.26 ± 14.50) ر
	4	(0.027 ± 1.478) ز	(0.34 ± 12.96) ز	(0.020 ± 1.857) ج	(0.14 ± 18.66) ث	(0.017 ± 1.918) ث	(0.18 ± 20.83) ث
	5	(0.012 ± 1.186) ع غ	(0.27 ± 8.93) ف ق ك ل م ن	(0.017 ± 1.462) ز	(0.14 ± 14.63) ذ ر	(0.011 ± 1.718) خ	(0.23 ± 16.66) ح
3	1	(0.006 ± 0.384) خ ا د ا	(0.23 ± 3.86) خ ا د ا	(0.020 ± .452) ث ا ج	(0.17 ± 4.60) ا ج ا ح	(0.020 ± 0.551) ب ا ت ا	(0.20 ± 5.46) ت ا ث ا
	2	(0.015 ± 0.874) ل	(0.26 ± 5.63) ت ا ث ا	(0.008 ± 0.988) ك	(0.23 ± 6.96) و ى آ ا	(0.009 ± 0.996) ك	(0.12 ± 8.26) ن هـ
	3	(0.011 ± 1.027) ق ك	(0.29 ± 8.76) ق ك ل م ن هـ	(0.016 ± 1.276) ش ص ض	(0.17 ± 11.20) ط ظ	(0.009 ± 1.291) ش	(0.14 ± 12.56) ز س
	4	(0.007 ± 1.216) ظ ع	(0.32 ± 11.86) ش ص ض ط	(0.007 ± 1.544) ر	(0.15 ± 14.90) خ وز	(0.012 ± 1.653) ذ	(0.23 ± 15.33) خ ذ
	5	(0.016 ± 0.904) ل	(0.24 ± 8.13) هـ	(0.013 ± 1.223) ط ظ ع	(0.14 ± 8.66) ل م ن هـ	(0.008 ± 1.301) ش	(0.20 ± 10.40) ع

درجة حرارة التحضين (28 ± 1) م°، الاس الهيدروجيني الابتدائي 6، معامل الارتباط (r)= 0.952 (P<0.0001).

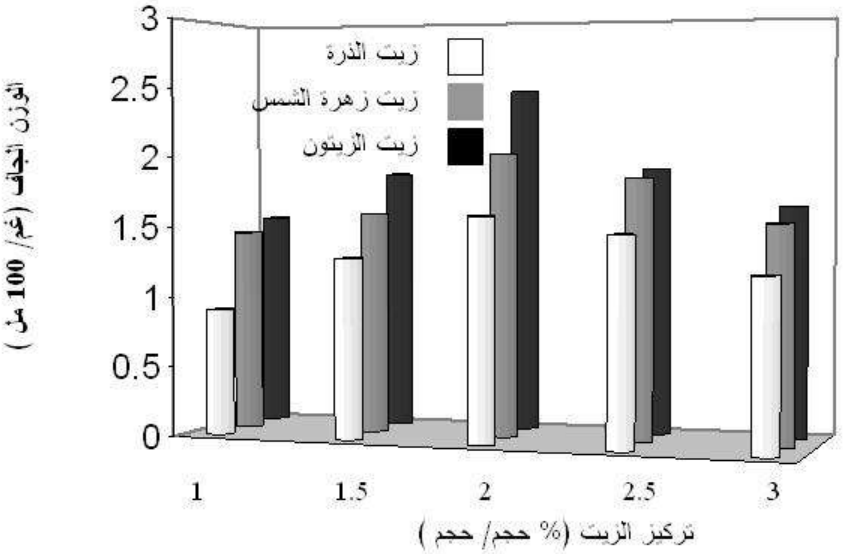
الارقام المتبوعة باحرف مختلفة عموديا تدل على وجود فروقات معنوية بينها عند مستوى احتمال (**0.05**) حسب اختبار دنكن متعدد المدى، كل رقم يمثل معدل ثلاث مكررات ± الخطأ القياسي (**S.E.**)



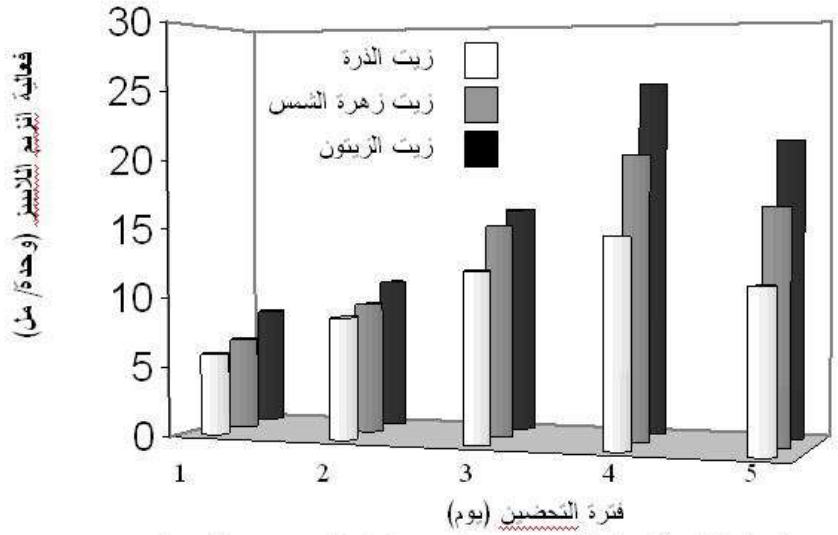
الشكل (1): تأثير ثلاثة انواع من الزيوت النباتية بتركيز 2% حجم/ حجم ولفترات تحضين مختلفة على نمو عزلة الفطر (2) *Aspergillus niger*



الشكل (2): تأثير ثلاثة انواع من الزيوت النباتية بتركيز 2% حجم/ حجم ولفترات تحضين مختلفة على فعالية انزيم اللايبز المنتج بواسطة عزلة الفطر *Aspergillus niger* (2)



الشكل (3): تأثير ثلاثة انواع من الزيوت النباتية بتراكيز مختلفة وعند فترة التحضين 4 ايام على نمو عزلة الفطر *Aspergillus niger* (2)



الشكل (4): تأثير ثلاثة انواع من الزيوت النباتية بتركيز 2% حجم/ حجم ولفترات تحضين مختلفة على فعالية انزيم اللايبيز المنتج بواسطة عزلة الفطر *Aspergillus niger* (2)

المستخدمة جعلت المواقع الفعالة Active site في الانزيم غير مشبعة بمادة التفاعل التي يعمل عليها الانزيم وبناءاً على ذلك لا تكون سرعة عمل الانزيم عند الفعالية القصوى (٣) وبالتالي فأن النمو لا يكون في اقصاه على العكس مما حدث عند التركيز ٢ % حجم/حجم حيث تشبعت المواقع الفعالة للانزيم بالمادة الاساس مما ادى الى زيادة سرعة عمل الانزيم الى سرعته القصوى وبالتالي بلغ الوزن الجاف اقصاه عند هذا التركيزوقد اشار(١٦)الى ان التركيز ٢ % من زيت الذرة هو أفضل تركيز للحصول على اقصى انتاج للايبيز المرتبط بالمايسيليوم من العزلة المحلية للفطر *Aspergillus flavus* ، بينما وجد كل من Chenواخرون(١٩٩٢) و Ohnishiواخرون(١٩٩٤) ان التركيز ٣ % من زيت الزيتون وزيت فول الصويا حققا افضل نمو وانتاج للايبيز من كل من الخميرة *Trichosporon fermentants* WU-C12 والفطر *Aspergillus oryzae* على التوالي.

الجدول (٢) : تأثير تراكيز مختلفة من الزيوت على متوسطات الوزن الجاف لعزلة الفطر (2) *Aspergillus niger* وفعالية انزيم اللايبيز ومعامل الانتاج الكلي

تراكيز الزيوت % حجم /حجم	متوسطات الوزن الجاف غم /100ملم	متوسطات فعالية انزيم اللايبيز وحدة / ملم	متوسطات معامل الإنتاج الكلي وحدة / ملغم
1	ت (0.055±0.899)	ت (0.46±7.88)	أ (0.01±0.89)
1.5	ب ت (0.059 ±1.160)	ب ت (0.55±10.00)	أ (0.02±0.88)
2	أ (0.079±1.454)	أ (0.84±13.59)	أ (0.01±0.93)
2.5	ب (0.064±1.267)	ب (0.73±11.30)	أ (0.01±0.87)
3	ت ث(0.054±1.046)	ت ث(0.52±9.10)	أ (0.01±0.87)

المتوسطات المتبوعة بأحرف مختلفة عمودياً تدل على وجود فروقات معنوية فيما بينها عند مستوى احتمال (0.05) حسب اختبار دنكن متعدد المدى، كل رقم يمثل معدل لثلاث مكررات± الخطأ القياسي (S.E.)

اما عند التركيزين الاعلى (٢,٥و٣) % حجم / حجم فقد حصل كبح لانتاجية الانزيم بسبب زيادة التركيز عن الحد الامثل (1). ان النقصان الملحوظ في فعالية اللايبيز في التراكيز العالية من المادة الاساس يعود الى تثبيط الانزيم بالاحماض الدهنية الحرة(١٠،١١) .

اما بالنسبة لتأثير فترة التحضين فقد لوحظ ان الفطر قد حقق اقل وزن جاف واقل انتاجية لأنزيم اللايبيز عند فترة التحضين ١ يوم وعند جميع التراكيز للزيوت المستخدمة ويعزى ذلك الى ان الفطر يحتاج الى فترة للتأقلم على الوسط الغذائي وقيامه بالنمو وافراز انزيم اللايبيز لتحليل الزيوت والاستفادة من الاحماض الدهنية المتحررة للنمو وتحفيز البناء الانزيمي ونلاحظ ان بمرور فترة التحضين الى حد ٤ ايام (نهاية طورالنمو اللوغارتمي) حد ث زيادة في قيم الوزن الجاف والفعالية الانزيمية وهذا يمكن ان يعزى الى وفرة المصدر الكربوني وبقية المغذيات. وقد أشار Pereira-Meirelles واخرون(٢٠٠٠) الىانه بمرور فترة التحضين تفرز المواد الفعالة سطحياً (Surfactant) الى الوسط والتي يمكن ان تتداخل مع الانزيم والمادة الاساس مما يزيد من كفاءة التحلل وبما ان التخمر مستمر فأن المادة الاساس تبدأ بالتناقص فيصبح تحرر الانزيم الى وسط النمو ضروري لانجاح اخذ المادة الاساس وضمان بقاء الكائن، وذكر Rio واخرون(١٩٩٠) ان نمو الخميرة *Candida rugosa* على زيت الزيتون يبدو بمرحلتين الاولى اقل انتاجا بالنسبة لإنزيم اللايبيز بينما المرحلة الثانية تبدي زيادة معنوية في انتاج اللايبيز توازي الزيادة في الكتلة الحيوية واستنتج انه في المرحلة الاولى يتم انتاج كمية قليلة من اللايبيز تكفي لتحليل الكليسيريدات الثلاثية المكونة لزيت الزيتون لإنتاج الكليسيرول والأحماض الدهنية ثم يتم استهلاك الكليسيرول الذي يكبح استخدام الاحماض الدهنية ثم تبدأ المرحلة الثانية التي يتم فيها انتاج اللايبيز بمستويات عالية والتي يتم فيها استهلاك الاحماض الدهنية.

تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه Chen واخرون(١٩٩٢) و Maia واخرون(٢٠٠١) إذ وجدا إن فترة التحضين ٤ أيام هي الأفضل في تحقيق النمو الأمثل وفعالية اللايبيز القصوى المنتجة من كل من الخميرة *Trichosporon fermentants* WU-C12 والفطر *Fusarium solani* على التوالي، بينما أشار(٢١) إن الدهون المستخدمة لتحفيز إنتاج اللايبيز الخارج خلوي من الفطر *Aspergillus oryzae* هي ٤٨ ساعة.

بعد فترة التحضين ٤ أيام يبدأ طور الموت كما يتبين من الجدولين ١و٣ حيث يبدأ الوزن الجاف للفطر وفعالية إنزيم اللايبيز بالنقصان حيث يكون المصدر الكربوني وبقية مكونات الوسط الغذائي قد استهلكت وتبدأ نواتج الفعاليات الايضية للفطر بالتراكم ويحصل بالتالي تحلل ذاتي لخلايا الفطر وهذا التحلل يؤدي إلى انخفاض الوزن الجاف وبالتالي انخفاض فعالية إنزيم اللايبيز وهذا ما حدث عند فترةالتحضين٥أيام.وقدذكر Rottem و Razin(١٩٦٤)إن نقصان فعالية التحلل ألدهني بعد الطور اللوغارتمي يوازي التحلل السريع للكائنات في الوسط وان الفعالية يمكن إن تنقص نتيجة هضم اللايبيز بواسطة إنزيمات التحلل الذاتي واشار Freire واخرون(١٩٩٧) إن هنالك علاقة مباشرة بين معدل تحلل الخلايا ومعدل الزيادة في فعالية إنزيم البروتييز في نهاية مرحلة التخمر مشيراً إلى ان زيادة فعالية إنزيم البروتييز كان نتيجة لتحرر البروتييز الداخل خلوي وان النقصان في فعالية اللايبيز في نهاية التخمر يمكن إن يفسر بتحلل اللايبيز بواسطة البروتييز او حدوث تغيير في الأس الهيدروجيني للوسط مؤثراً على فعالية اللايبيز الخارج خلوي وهذا يتفق مع ما ذكره Ohnishi واخرون(١٩٩٤) حول تحلل اللايبيز بواسطة إنزيم البروتييز، أما Gardillo واخرون(١٩٩٥) فقد ذكروا إن بناء اللايبيز من الخميرة *Candida rugosa* توقف في بداية طور الثبات نتيجة استهلاك المواد الغذائية في الوسط.

الجدول (٣) : تأثير فترات التحضين على متوسطات الوزن الجاف وفعالية إنزيم اللاييز ومعامل الإنتاج الكلي

فترات التحضين بالأيام	متوسطات الوزن الجاف غم / 100 مل	متوسطات فعالية إنزيم اللاييز وحدة / مل	متوسطات معامل الإنتاج الكلي وحدة / ملغم
1	(0.555) ± (0.022)ت	(5.34±0.18)ت	(0.97±0.01)أ
2	(0.992±0.033)ت	(7.58±0.22)ت	(0.77±0.01)ت
3	(1.316±0.042)ب	(11.21±0.40)ب	(0.85±0.01)ب
4	(1.626±0.054)أ	(15.80±0.61)أ	(0.96±0.01)أ
5	(1.335±0.050)ب	(11.95±0.60)ب	(0.88±0.01)ب

المتوسطات المتبوعة بأحرف مختلفة عمودياً تدل على وجود فروقات معنوية فيما بينها عند مستوى احتمال (0.05) حسب اختبار دنكن متعدد المدى، كل رقم يمثل معدل لثلاث مكررات± الخطأ القياسي (S.E.)

أما بالنسبة لقيم متوسطات معامل الإنتاج الكلي(Overall yield coefficient)الذي عرفه Freire واخرون(١٩٩٧) بأنه عدد وحدات اللاييز المنتج لكل ملغرام من الوزن الجاف فتبين إن اعلى قيمة لها تحققت عند التركيز ٢ % من الزيوت المستخدمة حيث بلغت ٠,٩٣ وحدة / ملغم ولم يكن هناك فروقات معنوية بين هذه القيمة وبقية القيم الأخرى لبقية متوسطات المعاملات الأخرى (جدول٣).

بالنسبة لتأثير نوع الزيت المستخدم فيوضح الجدول ٤ إن أعلى قيم لمتوسطات الوزن الجاف تحققت عند استخدام زيت الزيتون تلاه زيت زهرة الشمس ألا إن الاختلافات لم تكن معنوية لكنها اختلفت معنوياً بالنسبة لقيم متوسطات الفعالية الإنزيمية ،اما بالنسبة لزيت الذرة فقد اعطى اقل متوسطات للوزن الجاف والفعالية الانزيمية واختلفت معنوياً عما حققه كل من زيت الزيتون وزيت زهرة الشمس، وقد يعود هذا الانتاج المتميز لانزيم اللاييز من عزلة الفطر *Aspergillus niger*(2) عند استخدام زيت الزيتون الى محتواه من الفيتامينات والعناصر المغذية المفيدة التي يمكن ان تكون اكثر مما هي عليه في زيت زهرة الشمس وزيت الذرة مما ادى الى تنشيط نمو العزلة وتحقيق اعلى فعالية لانزيم اللاييز، اوقد يعود ذلك الى محتوى زيت الزيتون العالي من حامض الاوليك (اكثر من ٧٠%) والذي يعد محفزاً جيداً لانتاج اللاييز (١٩). اما بالنسبة للقيم المنخفضة للوزن الجاف والفعالية المؤشرة في الجدولين 1و٤ عند اضافة زيت الذرة الى مكونات الوسط الغذائي فربما يعود ذلك الى احتواء هذا النوع من الزيوت على بعض العناصر المعدنية او المكونات المثبطة لنمو الفطر مما اعاقه من استغلال زيت الذرة وبالتالي انخفض نمو العزلة وانخفضت كفاءتها في افراز اللاييز الى الوسط بكمية كبيرة.

كما يتضح من الجدول ٤ انه لم يكن هناك فروقات معنوية بين قيم متوسطات معامل الانتاج الكلي عند استخدام زيت الذرة وزيت الزيتون،وبالنظر للقيم المتميزة لمتوسطات الوزن الجاف والفعالية الانزيمية المتحققة بأستخدام زيت الزيتون لذلك اختير كأفضل نوع من الزيوت في تحفيزه لاقصى نمو لعزلة الفطر واقصى فعالية انزيمية، وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه(٣٢،١٤،١٠،٧) حيث وجدوا ان زيت الزيتون يعد افضل مصدر كربوني للنمو وانتاج انزيم اللاييز وتختلف مع ما توصل اليه Maiaواخرون(٢٠٠١) حيث وجد ان زيت السمسم وزيت الذرة كانت افضل المصادر الكربونية المستخدمة لتنمية الفطر *Fusarium solani* وانتاجه لانزيم اللاييز وان زيت الزيتون حقق اقل فعالية انزيمية واقل فعالية نوعية وان انتاج اللاييز يتغير تبعاً لنقاوة الزيوت والتي نشأت من عمليات كميائية مختلفة.

الجدول (٤) : تأثير نوع الزيت على متوسطات الوزن الجاف لعزلة الفطر *Aspergillus niger*(2) وفعالية إنزيم اللاييز ومعامل الإنتاج الكلي

نوع الزيت	متوسطات الوزن الجاف غم / 100مل	متوسطات فعالية إنزيم اللاييز وحدة / مل	متوسطات معامل الإنتاج الكلي وحدة / ملغم
زيت الذرة	(0.926±0.040)ب	(8.33±0.34)ب	(0.91±0.01)أ
زيت زهرة الشمس	(1.217±0.048)أ	(10.50±0.52)ب	(0.85±0.01)ب
زيت الزيتون	(1.351±0.057)أ	(12.30±0.61)أ	(0.90±0.01)أ

المتوسطات المتبوعة بأحرف مختلفة عمودياً تدل على وجود فروقات معنوية فيما بينها عند مستوى احتمال (0.05) حسب اختبار دنكن متعدد المدى، كل رقم يمثل معدل لثلاث مكررات± الخطأ القياسي (S.E.)

من مجمل النتائج الموضحة في الجدول ١ يتبين ان هناك علاقة طردية بين نمو الفطر وفعالية انزيم اللايبيز ويؤكد ذلك قيمة معامل الارتباط التي قدرت (٠,٩٥٢) وتتفق هذه النتيجة مع كل من (٨،١٠،٢٣،٣٢).
ويتضح ايضاً ان استخدام زيت الزيتون لانتاج اللايبيز من عزلة الفطر *Aspergillus niger*(2) وبتركيز ٢ % حجم / حجم حقق نمواً جيداً لعزلة الفطر وفعالية قصوى لأنزيم اللايبيز خلال فترة تحضين ٤ أيام واختلفت هذه القيمة معنوياً عن جميع قيم الوزن الجاف وفعالية إنزيم اللايبيز المتحققة في الظروف الاخرى لذلك اختيرت كأمثل الظروف واعتمدت في تجارب لاحقة.

المصادر

١.الجلبي، قصي عبد القادر (١٩٨٧). الكيمياء الحيوية. دار الكتب للطباعة والنشر مطبعة جامعة الموصل/ العراق.

٢.الخفاجي، زهرة محمود(١٩٩٠).التقنية الحيوية. مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر، الموصل /العراق.

٣.دلالي،باسل كامل(١٩٨٣).فهم الانزيمات. دار الكتب للطباعة والنشر.مطبعة جامعة الموصل / العراق.

٤.الشمري، الهام اسماعيل طامي، الراوي، اكرم ثابت وعزيز، عامر خلف (٢٠٠٠). عزل لاييزات الفطر *Aspergillus niger* ودراسة بعض خصائصها. مجلة الزراعة العراقية. ٥ (١): ٩٥- ١٠٢.

٥.عبد الرزاق،زكريا سامي والبرهاوي، رياض خليل (٢٠٠٦). التحري عن عزلة منتجة لانزيمات اللايبيز من الفطريات النامية على ثمار الزيتون.مجلة التربية والعلم. ١٨(٣):٦٥.٥٧

6.Benjamin ,S.and Pandy, A.(1996).Optimization of liquid media for lipaseproduction by *Candida rugosa* . Bioresource Technology. 55 (2): 11-14.

7.Chen.J.; I shii, T.; shimura, S., Kirimura, K. and Usami, K. (1992).Lipase Production by *Trichosporon fermentants* Wu-C12 a newly isolated Yeast .J. Ferment. bioeng.73 (5) : 412-414.

8.Corzo,G. and Revah, S (1999). Production and characteristic of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681.Bioresource Technology. 70 (2): 173-180.

9.Dalmau,E.;Montesions,J.L.;lotti,M.and Casas,C.(2000) .Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. Enzyme and Microbial Technology 26: 657-663

10.Freire,D.M.; Teles, E.M.F.; Bon, E.P.S. and Anna, G.L.S(1997). Lipase production by *Penicillium restrictum* in Bench Scale fermenter. Effect of carbon and nitrogen nutrition , agitation and aeration. Appl. Biochem. 63(65): 409-421.

11.Gardillo.M.A.; Obradors, N,; Montesinos, J.L. and Valero, F. (1995). Stability studies and effect of the initial oleic acid- concentration on lipase production by *Candida rugosa*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:38- 41.

12.Gardillo, M.A.; Montisinos, J.L.; Casas, C.; Valero, F; Lafuento, J. and Sola C. (1998). Improving Lipase production from *Candida rugosa* by a biochemical engineering approach.Chemical and physics of lipids. 93 (1-2) : 131-142.

13.Haas, J.M.; Bailey, D.G.; Baker, W.; Berka, T.R. Cicho. Wicz, D.J.; Derewenda , Z.S; Genuario, R.R.; Jeorger, R.D.; Klein , R.R.; Scoott , K.; Woof D.J. (1999). Biochemical and molecular biological Characterization of a Lipase produced by the fungus *Rhizopus delemar* . Fett- Lipid .101(10):364-370.

14.Kamini, N. R.; Mala, J. G. S and Puvankrishnan, R. (1997). Prpduction and characterization of an extracellular lipase from *Aspergillus niger*. Ind. J. Microbiol. 37:85-89.

15.Kumura, H.; Mikawa, K. and Saito, Z. (1993). Purification and characterization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* No.33. Milchwissenschaft. 48(8): 431- 434.

16.Long, K. (1997). Production, properties and applications of mycelium-bound lipase of a locally isolated strain of *Aspergillus flavus* Link.

17.Maia, M.M. D.; Heasley, A.; Demorais, M.M.C.; Morais, M. A.; Ledingham, W.M. and Lima, J. L. (2001). Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. Bioresource Technology. 76 (1): 23-27.

18.Nardini, M.; Long, D.A.; Liebeton, K., Jaeger, K.E. and Dijkstra B.W. (2000). Crystal structure of *Pseudomonas aeroginosa* lipase in the open conformation. J. Biol. Chem.. 275(40): 31219- 31225.

19.Obradors, N.; Montesinos, J. L., Valero, F.; Lafuento, F. J. and Sola, C. (1993). Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. Biotech. Lett. 15 (4): 357-360.

20.Ogundero, V. W. (1980). Lipase activity of thermophilic fungi from mouldy groundnuts in Nigeria. Mycologia. 72: 118-126.

21.Ohnishi, K.; Yoshida, Y. and Sekiguchi, J. (1994). Lipase production of *Aspergillus oryzae*. J. Ferment. Bioeng. 77 (5): 490-495.

22.Palma, M. B.; Pinto, A.L.; Gombert, A. K.; Seitz, K. H.; Kivatinitz, S.C. and Castilho, L.R. (2000). Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid wastes of industrial babassu oil production as substrate. Appl. Biochem. Biotech. 84 (6): 1137-1145.

23.Pereira-Meirelles, F.V.; Rochaleao, M. H. M. and Anna, G.L.S. (2000). Lipase location in *Yarrowia lipolytica*. Biotech. Lett. 22: 71 – 75.

24.Pouderoyen, G.V.; Eggert, T.; Jaeger, K.E. and Dijkstra, B.W. (2001). The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: Aminimal α/ß hydrolase fold enzyme. J. Mol. Biol. 309: 215-226.

25.Rio, D. J. L.; Valero, F.; Serra, P.; Poch, M. and Sola, C. (1990). Reaction scheme of lipase production by *Candida rugosa* growing on olive oil. Biotech. Lett. 12 (11): 835-838.

26.Rottem, S. and Razin, S. (1964). Lipase activity of Mycoplasma. J. Gen. Microbiol. 37: 123-134.

27.Satsuki, T. and Watanabe, T. (1990).Application of lipase to detergents. Bio. Industry. 7: 501-507.

by zinc of growth and acidogenesis. Can.J. Microbiol. 22: 1083-1092.
31.William, S. M.; Wold and Isamu Suzuki. (1976b). Regulation by zinc and adenosine 3,5-cyclic monophosphate of growth and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. Can.J. Microbiol.22: 1093-1.
32.Yoshida, F.; Motal, H. and Ichishima, E. (1968). Effect of lipid materials on the production of lipase by *Torulopsis ernobii*. Appl. Microbiol. 16(6): 845- 847.
28.Steel, R. G.D. and Torrie, J. H. (1980). Principles and procedures of statistics. 2nd ed., McGraw-Hill Company, Inc., London.
29.Thomson, C. A.; Delaquis, J. and Mazza, G. (1999). Detection and measurement of microbial lipase activity: Areview. Critical reviews in food science and nutrition. 39 (2): 165-187.
30.William, S. M.; Wold and Isamu Suzuki (1976a). The citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Regulation

The efficacy of different concentrations of three kinds of vegetable oils under different incubation periods on growth and lipase productivity of *Aspergillus niger*(2)

Z.S.abdulrazzaq & R.K.Al-barhawi
Univ. of Mosul, Coll. Of Science, Dept. of Biology –Iraq.
(Received / / 2007, Accepted / / 2008)

Abstract
Aspergillus niger (2) isolate was selected as the best lipase producing fungus.The effect of three kinds of vegetable oils (olive oil , sun flower oil ,corn oil) with different concentrations and different incubation periods, on fungus growth and lipase productivity using liquid media were studied . 2% v/v of olive oil after 4 days of incubation achieved best growth with highest lipase productivity (2.482gm/100ml & 25.56 unit/ml respectively)