إنتاج إنزيم اللايبيز من عزلة محلية للفطر *Penicillium* معزولة من بذور المكسرات

نور عامر محمد علي العبيدي

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

(تاريخ الاستلام: 28 / 3 / 2011 ---- **تاريخ القبول:** 13 / 3 / 2012)

الملخص:

تم عزل وتشخيص ثلاث عزلات فطرية محلية تعود الى جنس *Penicillium*هي : *Penicillium waksmanii , Penicillium rugulosum , Penicillium islandicum* من بذور المكسرات .,والكشف عن قابليتها على افراز انزيم اللايبيز باستخدام طريقة الاوساط الصلبة الحاوية على مادة Tributyrin و80 Tween.واتضح ان عزلة الفطر *P.rugulosum* اعطت اعلى كفاءة في انتاج انزيم اللايبيز وانتخبت كافضل عزلة فطرية .وعند استخدام ثلاث انواع من الزيوت النباتية كمصادر كاربونية وهي(زيت فول الصويا وزيت الزيتون وزيت السمسم) اعطت العزلة المنتجة انتاجية بلغت (20.56)وحدة /مل باستخدام الاوساط السائلة الحاوية على زيت السمسم كمصدر كاربوني بعد 6 ايام من التحضين .ووجد ان التركيز 2%حجم/حجم من زيت السمسم حقق اعلى نمو وافضل انتاجية لانزيم اللايبيز بلغت (22.50)وحدة/مل في حين اعطى المصدر النتروجيني اليوريا انتاجية وصلت الى (27.38)وحدة /مل.

المقدمة :

ازدادت الاهمية الصناعية للانزيمات بشكل واضح خلال العشرين سنة الاخيرة وقد حظي انزيم اللايبيز باهمية كبيرة وبمدى واسع اكثر من انزيمات البروتييز والاميليز خاصة في مجال الصناعات العضوية[1].

انزيم اللايبيز (Triacyl glycerol acylhydrolases EC 3.1.1.3)انزيم محلل للكليسيرات الثلاثية Triglycerides الى كليسيريدات الثنائية Diglycerides واحادية Monoglycerides والكلسيرول Glycerol واحماض دهنيةacid Fatty [2-5].

تتواجد هذه الانزيمات في الحيوانات بصورة واسعة في القناة الهضمية والانسجة المختلفة وفي النباتات تتوزع في البذور والثمار اما في الاحياء المجهرية فتفرز اللايبيزات الى وسط النمو[6-8].ان استعمال كل من الانزيمات المستخدمة من المصادر الحيوانية والنباتية يواجه عدد من المشاكل منها ان كمية الانزيمات في هذه المصادر قليلة ولا تسد حاجة الاسواق المحلية [9] .كما ان عملية استخلاص هذه الانزيمات وتنقيتها صعبة جدا لانها تمثل انزيمات داخل خلوية ،لذلك كانت الاحياء المجهرية هي الوسيلة البديلة لسد حاجة الاسواق العالمية من هذه الانزيمات وذلك لان هذه الانزيمات يتم افرازها خارج الوسط وبذلك تسهل عملية عزلها من وسط النمو[10-11].

تنتج اللايبيزات من قبل العديد من الاحياء المجهرية منها الفطريات التابعة للاجناس *Geotrichum ,Aspergillus ,Mucor ,Penicillium ,Fusarium ,Rhizopus ،Trichoderma* [12-17]اما البكتريا فتشمل الاجناس *Alcaligenes ,Arthrobacter, Pseudomonas* وفي السنوات الاخيرة تم استخدام البكتريا *Serratia sp.* لقابليتها على انتاج انزيم اللايبيز[2،18-21].

ان انزيمات اللايبيز متعددة الاستعمالات وقد اظهرت خصائص مهمة في التطبيقات الصناعية .وتستخدم انزيمات اللايبيزفي الوقت الحاضر في صناعة الاغذية حيث يدخل في صناعة الاجبان وتحضير بدائل زبدة الكاكاو وتحسين الطعم او النكهة وفي صناعة المعجنات .كما تستخدم في صناعة المنظفات لازالة الصبغات الدهنية وفي صناعة الادوية والاسمدة والمبيدات ومستحضرات التجميل[22,2].

تم في هذا البحث استغلال بذور المكسرات لعزل الفطريات واختبار قابلية هذه الفطريات المعزولة على افراز انزيم اللايبيز ومعرفة العزلة الكفؤة في انتاجها لهذا الانزيم من خلال تغيير بعض الظروف الزرعية للاوساط الغذائية .

المواد وطرائق العمل :

1- عزل الفطريات المصاحبة للبذور وتشخيصها :

لعزل الفطريات استخدمت الطريقة المعتمدة من قبل الجمعية العالمية لفحص البذور [23]. وهي طريقة اطباق الاكار (Method Agar Plate) وفي هذه الطريقة تم تعقيم 100 بذرة سطحيا بغمرها بمحلول 1% هايبوكلورايت الصوديوم (NaoCl)لمدة ثلاث دقائق،ثم وزعت بمعدل 5بذور/طبق من الاطباق الحاوية على وسط اطباق البطاطا والسكروز Potato Sucrose Agar المضاف اليه المضاد الحيوي Streptomycin (100 جزء بالمليون) وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 28±1م^0 ولمدة اسبوع [23] وقد تم العزل من الفستق ، والفستق عبيد والكازو.

2- تشخيص انواع جنس *Penicillium* :

شخصت الأنواع التابعة لهذا الجنس بعد تنميتها على وسط PDA الصلب ونقلها باستخدام ثاقب فلين بقطر(5) ملم على الأوساط التشخيصية التالية:

أ - وسط زابك ومستخلص الخميرة الصلب(CYA) Czapek Yeast Extract Agar

يتكون من (غم/لتر) :

K_2HPO_4 1,Czapek concentrate 10ml,Yeast extract powdered 5,Sucrose 30

Agar 15 واكمل الحجم الى اللتر بالماء المقطر ونحضر Czapek concentratesمن المواد التالية :

$NaNo_3$ 30g، KCl 5g، $MgSo_4.7H_2O$ 5gm، $FeSO_4.7H2O$ 0.1gواكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

ب – وسط اكارمستخلص الشعير Malt Extract Agar (MEA) ويتكون مما ياتي (غم/لتر):

20 كلوكوز و1ببيتون و20مسحوق مستخلص الشعير و20اجار واكمل الحجم بالماء المقطر إلى اللتر .تم تحضينها في درجة حرارة-25م و37م لمدة 7 ايام بعدها تم تشخيص الأنواع التابعة لهذا الجنس بالاعتماد على شكل ولون المستعمرة وقطرها ووجود او عدم وجود الصبغات والافرازات وكذلك بالفحص ألمجهري للمستعمرات وشخصت الانواع بالاعتماد على المفتاح التشخيصي [24–27].

3– الأوساط الزرعية :

2–1–وسط اكار البطاطا والسكروز (PSA) :

استخدم هذا الوسط لعزل الفطريات وحفضها وتنشيطها ،تم تحضير هذا الوسط من 200 غم من البطاطا و 20 غم من السكروز و 20 غم من الاكار ،ثم اكمل الحجم الى اللتر .وتم تنشيط العزلات الفطرية باعادة زراعتها (Subculture)على وسط PSA كل اسبوعين وحضنت عند درجة 25 ±1م لمدة اسبوع ثم حفضت في الثلاجة .

2–2–وسط الكشف عن افراز انزيم اللاييز :

1–باستخدام طريقة تحلل مادة Tween 80 :

اعتمدت الطريقة الموصوفة [28–29] لتحضير الوسط الزرعي الخاص والذي يتكون من المكونات التالية (غم / لتر):

ببتون(8)،كلوريد الكالسيوم المائي $CaCl_2.2H_2O$(0.1) ،اكار(20) و Tween 80 (Poly oxyethylene monooleite)(10مل) .تم اذابة الببتون وكلوريد الكالسيوم المائي والاكار في كمية من الماء المقطر باستخدام خلاط مغناطيسي مع رفع درجة حرارة المزيج ثم اكمل الحجم الى اللتر ،وضبط الاس الهيدروجيني الابتدائي عند 5.8 وعقم الوسط ، وتم تعقيم مادة التفاعل Tween 80بصورة منفردة في قنينة زجاجية ، ثم صب الوسط في اطباق بتري نظيفة ومعقمة ثم وزعت مادة التفاعل Tween 80 بالتساوي على الاطباق باستخدام ماصة معقمة مسدودة الفوهة بالقطن ، وتركت الاطباق لحين تصلب الوسط .

ثم اخذ اللقاح الفطري باقطار متساوية من مزارع نقية وفتية وذلك باستخدام ثاقب فلين cork borerوبقطر 6 ملم وثقبت المستعمرات الفطرية النامية على وسط (PSA) ونقل اللقاح باستخدام ابرة تلقيح (Needle)الى الاطباق الحاوية على الوسط المذكور وبثلاث مكررات لكل عزلة ،بعدها حضنت الاطباق بدرجة (28م±1) لمدة 5 ايام ، وفي هذه الطريقة [28] ان الكشف عن افراز انزيم اللاييز يتم بتكوين راسب ابيض تحت المستعمرة الفطرية النامية وحولها .

2– الكشف عن افراز انزيم اللاييز باستخدام طريقة تحلل ثلاثي البيوترين :

اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل Cruickshank [30] باستخدام وسط تحلل ثلاثي البيوترين ويتركب هذا الوسط من المكونات التالية (غم /لتر).

مستخلص الخميرة 3،ببيتون 5 ،اكار 20 و Tributyrin 10 مل.تم اذابة جميع المكونات (عدا ثلاثي البيوترين)في الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى لتر وضبط الاس الهيدروجيني الابتدائي عند 5.8 ثم عقم الوسط ،اما مادة التفاعل (Tributyrin) فقد عقمت بصورة منفردة ، بعدها صب الوسط في اطباق بتري نظيفة ومعقمة ثم وزعت مادة التفاعل على الاطباق بالتساوي باستخدام ماصة معقمة وتركت الاطباق لحين تصلب الوسط .

تم تلقيح الاطباق وتحضينها .ويتم الكشف عن افراز انزيم اللاييز بواسطة تكون هالة رائقة حول المستعمرة الفطرية النامية ، وتتكون هذه الهالة نتيجة تحلل ثلاثي البيوترين وتكوين حامض البيوترك الذائب بالماء . تم قياس قطر المستعمرة الفطرية النامية وقطر هالة التحلل المتكونة لايجاد نسب قدرة الفطريات على افراز انزيم اللاييز لمعرفة الفطر الاكفأ باستخدام المعادلة الاتية :–

$$\text{كفأة الفطرعلى افراز انزيم اللاييز} = \frac{\text{قطر هالة التحلل (ملم)}}{\text{قطر المستعمرة الفطرية (ملم)}}$$

2–3–وسط انتاج الانزيم :–

استخدم الوسط الغذائي الخاص لانتاج اللاييز والموصوف من قبل Chen[31] والذي يتركب مما ياتي (غم / لتر):

ببتون 5 ، كبريتات الامونيوم 1 ، فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجينK_2HPO_4 1 وكبريتات المغنيسيوم المائية 1 .وتم اضافة المصدر الكاربوني الى مكونات الوسط الغذائي (الزيوت النباتية المستخدمة) في التجربة الاولى . ثم ضبط الاس الهيدروجيني عند 5.8 باستخدام محلولي هيدروكسيد الصوديوم 1 ع وحامض الهيدروكلوريك 1 ع .ثم وزع الوسط في دوارق مخروطية سعة 250 مل وبواقع 50 مل لكل دورق وبمعدل مكررين لكل معاملة وسدت الدوارق باحكام باستخدم سدادات قطنية وغلفت برقائق الالمنيوم ثم عقمت بجهاز المؤصدة عند ضغط 1 كغم / سم^2 ودرجة حرارة 121 م لمدة 20 دقيقة ، بعد التعقيم تركت الدوارق لتبرد ثم لقحت بعالق سبورات الفطريات بتركيز 5×10^{5}بوغ / مل من مستعمرة بعمر اسبوع . بعد التلقيح وضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند معدل رج 150 دورة / دقيقة حسب مدة الحضن المطلوبة بعد التحضين.

4– تحضير العالق السبوري :

تم تحضير عالق سبورات الفطر من مستعمرة فطرية نقية وبعمر اسبوع وتحت ظروف معقمة حيث اضيف الماء المقطر المعقم الى المزرعة الفطرية النامية في قنينة زجاجية حاوية على وسط PSA بشكل مائل ، بعدها تم رج القنينة الزجاجية للحصول على السبورات ثم رشح المعلق من خلال قطعة شاش معقمة وجمع الراشح في فلاسك نظيف

ومعقم ،ثم اجري التخفيف المطلوب للوصول الى تركيز العالق السبوري 5×10^5 بوغ / مل ، الذي استخدم في جميع التجارب بالاستعانة بشريحة العد المجهريHaemocytometer [32] .

5–طرائق التحليل :

4–1–تقدير الوزن الجاف

بعد انتهاء مدة الحضن سحبت الدوارق من الحاضنة الهزازة بصورة عشوائية واجريت للمزرعة الفطرية عملية ترشيح باستخدام ورقة ترشيح مجففة وموزونة من نوع (Whatman NO.1) مثبتة على قمع بخنر المجهز بمفرغ هوائي كهربائي ،حيث استخدم راشح المزرعة فيما بعد لقياس النشاط الانزيمي لانزيم اللايبيز . اما ورقة الترشيح وما عليها من المزرعة الفطرية فقد تم نقعها بالاسيتون وبعدها رشحت ورقة الترشيح مرة اخرى في فلاسك اخر واهمل هذا الراشح ثم جففت ورقة الترشيح في فرن كهربائي من نوع (Memmert (Germany عند درجة حرارة 70م^{o} لمدة 24 ساعة بعدها تم قياس الوزن الجاف بين كتلة الورقة المجففة مع محتوياتها بعد الترشيح وكتلة ورقة الترشيح وهي مجففة قبل الترشيح استخدمت هذه الطريقة لتقدير الوزن الجاف للفطر في جميع التجارب .

4–2–قياس فعالية انزيم اللايبيز :

تم تقدير فعالية انزيم اللايبيز باستخدام طريقة التسحيح Titration الموصوفة من قبل [33] ويعتمد مبدأ هذه الطريقة على تسحيح الاحماض الدهنية الناتجة بفعل انزيم اللايبيز ضد محلول (NaoH) لبيان فعالية الانزيم والتي عبر عنها بمقدار الوحدة الانزيمية Unite التي عرفها Chen[30] على انها كمية الانزيم التي تحرر 1 مايكرومول من الاحماض الدهنية خلال دقيقة واحدة ،بعد عملية الترشيح المذكورة في الفقرة السابقة اخذ الراشح واجريت عليه عملية الطرد المركزي باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد (4 ^{0}م) وبسرعة 1000 دورة لمدة خمس دقائق [34] للتخلص من بقايا كتلة الفطر والمواد غير الذائبة واستعمل الراشح بوصفه محلول انزيمي وقسم هذا الراشح الى جزئين جزء تم غليه لفترة قصيرة لتحطيم الانزيم وجزء اخر استعمل مباشرة لتقدير فعالية الانزيم .

النتائج والمناقشة :

1– عزل الفطريات :

عزلت فطريات من بذور المكسرات ، وظهرت انواع فطرية تعود الى جنس *Penicillium*، حيث تم تشخيص الانواع التالية : , *Penicillium islandicum, Penicillium waksmanii* , *Penicillium rugulosum*.والمعزولة من الفستق والفستق عبيد والكازو على التوالي. تم تشخيص الانواع التابعة لهذا الجنس بالاعتماد على شكل ولون المستعمرة وقطرها ووجود او عدم وجود الصبغات والافرازات وكذلك بالفحص المجهري للمستعمرات باستخدام المجهر الضوئي وذلك طبقا للمفاتيح التصنيفية المعتمدة**[24–27].**

2– كفاءة الفطريات المعزولة على افراز انزيم اللايبيز :

تم استخدام طريقة الاوساط الصلبة لغرض التعرف على كفاءة الفطريات المعزولة من بذور المكسرات وقدرتها على افراز انزيم اللايبيز باستخدام تحلل مادة Tween 80 و Tributyrin اذ لوحظ ان المستعمرة الفطرية النامية في وسط تحلل مادة Tween 80 تكون راسب ابيض حول المستعمرة النامية وتحتها نتيجة تكون ملح الكالسيوم لحامض الاوليك وهذا دليل على افراز انزيم اللايبيز من قبل العزلة الفطرية . كما ان الفطريات المعزولة النامية على الوسط الزرعي الصلب الحاوي على Tributyrin تتمكن من ازالة عتمة الوسط الناتجه عن وجود قطيرات من هذه المادة بواسطة افراز انزيم اللايبيز الذي يحلل هذه المادة ويحرر حامض البيوترك الذائب بالماء وكلما ازداد قطر هالة التحلل كلما ازداد تركيز انزيم اللايبيز المفرز .

وتظهر النتائج في الجدول (1) كفأة الفطريات المعزولة على افراز انزيم اللايبيز باستخدام الطريقتين ولوحظ ان جميع العزلات الفطرية اعطت نتيجة موجبة بقدرتها على افراز انزيم اللايبيز مع وجود اختلافات فيما بينها . وتميزت عزلت الفطر *P. rugulosum* في نشاطها الانزيمي وفي قدرتها على النمو . اذ اعطت افضل نشاط انزيمي في كفاءتها على افراز انزيم اللايبيز باستخدام وسط Tween80 واعطت نشاط انزيمي بلغ 1.62ملم باستخدام وسط تحلل ثلاثي البيوترين . في حين اعطت عزلة الفطر *P.islandicum* نشاط انزيمي متوسط باستخدام وسط تحلل Tween 80 وكانت كفاءتها لافراز انزيم اللايبيز 1.38ملم باستخدام وسط تحلل البيوترين . وكانت عزلة الفطر *P.waksmanii* ذات نشاط انزيمي ضعيف باستخدام وسط تحلل Tween 80 وبلغت كفاءتها في افراز الانزيم قليلة وبلغت 1.17ملم باستخدام وسط تحلل البيوترين مقارنة ببقية العزلات .

ويمكن تفسير ضعف قدرة بعض العزلات على افراز انزيم اللايبيز بان مدة الحضن غير كافية لتحفيز العزلات الفطرية على افراز انزيم اللايبيز . ولوحظ ان قطر هالة التحلل كان اعلى عند استخدام وسط تحلل Tween 80 مما في وسط تحلل Tributyrin ولجميع العزلات ويعزى ذلك الى ان حامض الاوليك الموجود في مادة Tween 80 له القابلية على تكوين اللايبيز اكثر من حامض البيوتريك الموجود في ثلاثي البيوترين او ربما يعود الى ان مادة Tween 80 تسهل حدوث تلامس بينها وبين الانزيم وذلك لسهولة اقترابها مع مكونات الوسط الزرعي [35] على العكس من Tributyrin غير الذائب بالماء .

ان النتائج التي تم الحصول عليها مشابه لما توصل اليه المولى [36] اذ ان الفطريات المعزولة من مصادر مختلفة تختلف في قابليتها على افراز انزيم اللايبيز وعلى ضوء النتائج تم اختيار *P. rugulosum* كافضل عزلة فطرية منتجة لانزيم اللايبيز في التجارب اللاحقة .

جدول (1): كفاءة العزلات الفطرية في انتاج انزيم اللايبيز .

الفطريات	كفاءة الفطريات على افراز انزيم اللايبيز	
	وسط تحلل Tween 80	وسط تحلل Tributyrin(ملم)
P. waksmanii	+	1.17
P. islandicum	++	1.38
P. rugulosum	+++	1.62

+ تمثل كفاءة الفطر على افراز انزيم اللايبيز وتكوين هالة التحلل بنصف قطر (1–3) ملم

++ تمثل كفاءة الفطر على افراز انزيم اللايبيز وتكوين هالة التحلل بنصف قطر (4–7) ملم

+++ تمثل كفاءة الفطر على افراز انزيم اللايبيز وتكوين هالة التحلل بنصف قطر اكبر من 8 ملم

3– تاثير ثلاث انواع من الزيوت النباتية كمصدر كاربوني ولفترات تحضين مختلفة على نمو عزلة الفطر *P.rugulosum* وانتاج انزيم اللايبيز:

استخدمت ثلاث انواع من الزيوت النباتية وهي (زيت فول الصويا ،زيت الزيتون ،زيت السمسم)1%حجم/حجم بوصفها مصدر كاربوني لانتاج انزيم اللايبيز من عزلة الفطر *P.rugulosum* .

اظهرت نتائج الجدول (2) ان هناك زيادة في الوزن الجاف لعزلة الفطر وزيادة في انتاج انزيم اللايبيز بزيادة مدة الحضن الى حد معين وبلغت اعلى قيمة للوزن الجاف عند مدة الحضن 6 ايام باستخدام زيت السمسم كمصدر كاربوني اذ بلغ الوزن الجاف 17.63غم/لتر اما الفعالية الانزيمية فقد بلغت اقصاها 20.56 وحدة/مل عند نفس مدة الحضن . في حين اعطت الزيوت الاخرى (زيت فول الصويا وزيت الزيتون)فعالية انزيمية اقل مما اعطى زيت السمسم اذ بلغت 15.65 ، 16.95 غم/مل لكل من زيت فول الصويا وزيت الزيتون على التوالي في اليوم السادس من التحضين اما قيم الوزن الجاف فقد بلغت13.74، 15.46 غم/لتر لكل منهما على التوالي وهي اقل مما تم الحصول عليه من وزن الجاف باستخدام زيت السمسم .

كما لوحظ ان هناك تناقص في الوزن الجاف وانتاج انزيم اللايبيز لكل الزيوت المستخدمة باستمرارمدة الحضن مما يعطي مؤشرا ان مدة الحضن 6 ايام هي افضل تحضين للحصول على افضل نمو لعزلة الفطر واعلى انتاجية لانزيم اللايبيز اما بالنسبة لقيم الاس الهيدروجين النهائي فقد انخفضت عن الرقم الهيدروجيني الاولي ولجميع الزيت المستخدمة ويرجع السبب الى انتاج حوامض عضوية اثناء التخمر وتؤدي الى رفع حموضة الوسط الغذائي.

ان النتيجة التي تم التوصل اليها مشابهة لما توصل اليه Lima [37] حيث وجدوا ان زيت السمسم وزيت الذرة افضل المصادر الكاربونية لتنمية الفطر *Fusarium solani* وانتاجه لانزيم اللايبيز وان زيت الزيتون حقق اقل فعالية انزيمية وان انتاج اللايبيز يتغير تبعا لنقاوة الزيوت والتي نشات من عمليات كيميائية مختلفة . وتختلف عما توصل اليه Kamini[34] حيث وجدوا ان زيت الزيتون افضل مصدر كاربوني لانتاج انزيم اللايبيز . في حين اكد Gulati واخرون [16]ان زيت الخروع يليه زيت الزيتون افضل المصادر الكاربونية لتنمية عزلة الفطر *Fusarium globulosum* .وتوصلAbbas [1] عند استخدام عدة عزلات فطرية معزولة من التربة الى اختلاف في قابلية هذه العزلات على انتاج انزيم اللايبيز باستخدام انواع مختلفة من الزيوت النباتية .

اما بالنسبة لمدة الحضن فنلاحظ ان انتاج انزيم اللايبيز قد ازداد بزيادة مدة الحضن عند استخدام الزيوت المختلفة ويعزى ذلك الى ان الفطر يحتاج الى مدة للتاقلم على الوسط الغذائي وقيامه بالنمو وافراز انزيم اللايبيز لتحليل الزيوت وقد حققت مدة الحضن 6 ايام زيادة في انتاج انزيم اللايبيز بسبب وفرة المصدر الكاربوني والمغذيات الاخرى اما سبب انخفاض الكتلة الحية والفعالية الانزيمية فيعود الى نفاذ المغذيات من الوسط وتراكم المواد الايضية السامة . ان هذه النتيجة اتفقت مع ما توصل اليه Ogundero [38]حيث ان اقصى انتاجية لانزيم اللايبيز سجلت في اليوم السادس من التحضين للفطريات *Humicola grisea* في حين اكد Leona [14] ان مدة الحضن 5 أيام اعطت افضل انتاجية لانزيم اللايبيز باستخدام زيت عباد الشمس كمصدر كاربوني لتنمية عزلة الفطر *Fusarium oxysporum* .

جدول (2): تاثير ثلاث انواع من الزيوت النباتية كمصدر كاربوني على نمو عزلة الفطر *P.rugulosum* وانتاج انزيم اللايبيز .

مدة الحضن بالايام	زيت فول الصويا 1%			زيت الزيتون 1%			زيت السمسم 1%		
	الكتلة الحيوية غم/لتر	الفعالية وحدة/مل	pH النهائي	الوزن الجاف غم/لتر	الفعالية وحدة/مل	pH النهائي	الوزن الجاف غم/لتر	الفعالية وحدة/مل	pH النهائي
2	2.95	3.72	5.53	3.25	5.82	5.34	4.12	6.30	6.66
3	5.86	6.73	5.24	5.58	7.22	5.12	7.57	9.62	5.29
4	8.16	10.42	4.75	8.49	10.65	4.72	10.92	12.55	5.01
5	10.54	13.11	4.60	11.25	14.66	4.25	13.20	17.77	4.87
6	13.74	15.56	4.43	15.46	16.95	4.10	17.63	20.56	4.72
7	12.38	14.27	4.30	13.57	16.27	3.94	16.53	18.45	4.55
8	9.04	11.55	4.11	12.63	15.58	3.78	14.54	16.27	3.70

4- تاثير تراكيز مختلفة من زيت السمسم على انتاج انزيم اللايبيز من العزلة *P. rugulosum* :

تم اختبار تراكيز مختلفة من زيت السمسم على انتاج الكتلة الحيوية وانتاج انزيم اللايبيز بعد 6 ايام من التحضين . يتضح من الجدول (3) ان الكتلة الحيوية وانتاج الانزيم قد ازداد بزيادة تركيز الزيت المستخدم والى حد التركيز (2%)حجم/حجم حيث بلغ الوزن الجاف 23.14غم/لتر واعطى هذا التركيز كمية من الانزيم بلغت 22.50 وحدة/مل .ثم اتجهت قيم الوزن الجاف وانتاج الانزيم نحو النقصان بزيادة التركيز عن 2.0% حيث وصل النقصان في الوزن الجاف الى 18.23 غم/لتر وانتاج الانزيم الى 15.92وحدة/مل ويمكن ان يعزى سبب النقصان في التركيز الاعلى 2.5% الى حصول تثبيط للفعالية الانزيمية بسبب زيادة التركيز عن الحد الامثل [39] وان النقصان الملحوظ في فعالية اللايبيز في التركيز العالية من المادة الاساس يعود الى تثبيط الانزيم بالاحماض الدهنية الحرة [40] . اما في حالة التركيز الواطئة 1و1.5 %حجم/حجم فقد اعطت اقل كمية من الوزن الجاف وهذا يعزى الى ان كمية الزيت عند هذا التركيز تكون منخفضة نوعا ما لسد حاجة عزلة الفطر من الغذاء كما ان التركيز الواطئة تجعل المواقع الفعالة في الانزيم غير مشبعة بمادة التفاعل التي يعمل عليها الانزيم وبالتالي فان النمو لايكون في اقصاه على العكس مما يحدث عند التركيز 2%حجم/حجم حيث تشبعت المواقع الفعالة للانزيم بالمادة الاساس مما ادى الى زيادة سرعة عمل الانزيم الى السرعة القصوى وبالتالي زيادة الوزن الجاف وانتاج الانزيم.

اما بالنسبة لقيم الرقم الهيدروجيني النهائي فقد انخفضت لجميع التركيز المستخدمة في التجربة عن الرقم الهيدروجيني الاولي .

ان النتيجة التي تم الحصول عليها مشابهة لما توصل اليها Leong[41]حيث بين ان التركيز 2%من زيت الذرة هو افضل تركيز للحصول على اقصى انتاجية للايبيز المرتبط بالمايسيليوم من العزلة المحلية للفطر *Aspergillus flavus* .وان النقصان الملحوظ في فعالية اللايبيز في التراكيز العالية من المادة الاساس يعود الى تثبيط الانزيم بالاحماض الدهنية الحرة[42،44].

جدول (3): تاثير تراكيز مختلفة من زيت السمسم على انتاج الكتلة الحيوية وانزيم اللايبيز بعد مرور 6 ايام من التحضين .

تركيز الزيت %حجم/حجم	الكتلة الحيوية غم/لتر	فعالية انزيم اللايبيز وحدة/مل	الاس الهيدروجيني النهائي pH
1	20.45	18.57	5.44
1.5	21.79	20.33	5.25
2.0	23.14	22.50	4.89
2.5	18.25	15.92	4.63

5- تاثير مصادر نيتروجينية مختلفة على انتاج الكتلة الحيوية وانزيم اللايبيز بعد مرور 6 ايام من التحضين :

ان النيتروجين من العناصرالاساسية لبناء ونمو الخلايا ،ويدخل في تركيب البروتينات والحوامض النووية وبعض التراكيب الاخرى وتم استخدام مصادر نيتروجينية مختلفة على اساس المحتوى النيتروجيني لكبريتات الامونيوم 0.2غم نتروجين/لتر من الوسط والمصادر النيتروجينية التالية (غم/لتر) من الوسط هي كبريتات الامونيوم1،نترات الامونيوم 0.5،كلوريد الامونيوم0.7،نترات الصوديوم 1.، اليوريا 0.4،فوسفات الامونيوم الحامضية 1.6. وتشير الدراسات الى ان المصادر النيتروجين تستغل بشكل اكفأ من غيرها من قبل نوع معين

من الفطريات [45].لذا صممت هذه التجربة لدراسة تاثير مصادر مختلفة من النتروجين على نمو وانتاج عزلة الفطر *P.rugulosum*. بينت نتائج الجدول(4) ان المصدر النتروجيني اليوريا كان الامثل من بين المصادر النتروجينية الاخرى اذ بلغت انتاجية انزيم اللايبيز 27.38 وحدة /مل .يليه المصدر النتروجيني كبريتات الامونيوم والذي اعطى انتاجية بلغت 23.99 وحدة /مل .اما اقل قيمة تحققت عند استخدام المصدر النيتروجيني فوسفات الامونيوم اذ كانت انتاجية الانزيم منخفضة بالمقارنة بالمصادر النيتروجينية الاخرى حيث بلغت 13.69 وحدة /مل .

اما بالنسبة للوزن الجاف فقد اعطت اليوريا على قيمة للوزن الجاف وكانت 23.06 غم/لتر في حين اعطى كل من المصدر النيتروجين كبريتات الامونيوم وكلوريد الامونيوم قيم للوزن الجاف بلغت (20.82 و19.84)غم/لتر على التوالي . اما قيم الرقم الهيدروجيني النهائي فقد انخفضت عن الرقم الهيدروجيني الاولي ولجميع المصادر النيتروجينية المستخدمة في التجربة. ان هذه النتائج تؤكد ما توصل اليه Montesines واخرون [44] من ان مصادر النيتروجين الشائعة الاستخدام لنمو الفطريات هي الببتون واليوريا واملاح الامونيوم وان انتخاب مصدر النيترجين الملائم لانتاج اللايبيز يعتمد على الكائن المجهري المستخدم .

ان النتائج التي تم التوصل اليهااختلفت عما توصل اليه Miadenoska[45] اذ كانت كبريتات الامونيوم افضل مصدر نيتروجيني لتنمية عزلة الفطر *Geotrichum candidum* باستخدام زيت زهرة الشمس كمصدر كاربوني. كما توصل Ogundero [38] ان كبريتات الامونيوم افضل مصادر النيتروجينية لتنمية عزلة الفطر *P.aurantiogriseum* لانتاج انزيم اللايبيز.

جدول (4): تاثير مصادر نيتروجينية مختلفة على انتاج الكتلة الحيوية وانزيم اللايبيز بعد مرور 6 أيام من التحضين.

مصدر النيتروجين	الكتلة الحيوية غم/لتر	فعالية انزيم اللايبيز وحدة / مل	الاس الهيدروجيني النهائي PH
NH4cl	19.84	18.50	4.35
NaNo3	18.19	15.62	4.03
NH4No3	16.61	18.57	4.67
*Urea	23.06	27.38	4.15
(NH4)2So4	20.82	23.99	4.82
NH4H2Po4	11.55	13.69	4.22

*اعلى قيمة

شكر وتقدير:الى كل من د. نديم احمد رمضان وشمال يونس لمساندتي وكانا خير مشجعين لي.

References:

1-Savitha, J . Srividya, S. Jagat, R. Payal, P. Priyanki, T, Identification of potential fungal strain (s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase (2007).

2-Gao X.G.,GAO S.G., Zhang K.C. Production, properties and application to non aqueous enzymatic catalysis of lipase from anewly isolated *Pseudomonas* strain . Enzyme Microb . Technol (2000). 27,74-82.

3-Burkert, T.F. , Maugeri, F. and Rodrigues, M.I. Optimization of extra cellular lipase production by *Geotrichum* sp. Using factorial design Bioresource Technology , (2004).910:77-84.

4-Shafei-M.S.and Abd – Elsalam, I.S.,Natural and Microbial Products chemistry Department , National Research center(NRC) ,Ddokki, Cairo, Egypt(2005).

5- Kashmiri, M.Akram., Adnan, Ahmad. and Beenish Waseem Butt. Production , purification and partial characterization of lipase *Trichoderma Viride* . G.C. lahor , Pakistan, Accepted 14 February , 2006.

6- Elibol M., Ozer D. Influense of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. Process Biochem .(2000). 36,325-329.

.7-Pandy A, Soccol CR and Mitchell D. New developments in solid state fermentation :1-bioprocesses and products. Proc. Biochem (2000) .35, 1153 -1169.

8- Shukla, Pratyoosh., Garai, Debabrata. Zafar, Mahd., Gupta, Kshitiz. and Smriti, shrivastava. Process parameters optimization for lipase production by *Rhizopus oryzae* KG-10 under submerged Fermentation using Respones surface Methodolgy . (2008). 93-103.

9- Benjamin, A. Pandey, C.R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger,, V.T. Soccol, The realm of microbial lipases in biotechnology, Biotechnol. Appl. Biochem. 29 (1999) 119-131.

10–الخفاجي،زهرة محمود.التقنية الحيوية ،مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر ،الموصل العراق. (1990).

11-Abbas,H.Hiol,Deyris,V.and Comeau,L.Isolation and characterization of an extracellular lipase from *mucor* spp. Strain isolated from plam fruit. Enzyme Micob., .(2002)31:968-975.

species .CRC Press ,Boca Raton London New York-Washington,D.C.2nd ed.2002.
28-Sierra G.. Asimple method for the detectron of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates . Antonie van Leeuwenhoek, (1957). 23:15-22.
29--Trigiano, R.N. Extracellular enzymes of some fungi associated with *Mushroom* culture . Mycologia. (1979).71:908-917.
30-Cruickshank, R.; Duguid, J.P.; Marmion, B.P. and Swain, R.H.A.. Medicaln Microbiology 12th,ed, V2. The Practice of Medical Microbiology. T. and A. Constable Ltd., Edinburgh.(1975).
31-Chen, j., Ishii, T.;Shimura, S.;Kirimura,K.and Usami, S. Lipase production by Trichosporon fermentants Wu-C12 anewly isolated yeast. J.Ferment . Bioeng . (1992).73(5):412-414.
32-William, S.M.; Wold and Isamu Suzuki. The citric acid fermentation by *Aspergillus niger* . Rgulation by zinc of growth and acidogenesis. Can. J. Microbiol. (1976) 22:1083-1092.
33-Kamini , N.R.; Mala, J.G.S. and Puvankrishnan , R. production and characterization of an extracellular lipase from *Aspergillus niger*. Ind. J. Microbiol. (1997). 37:85-89.
34-Kamini,N.R.;Mala,J.G.S.and Puvankrishnan, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid state fermentation using solid gingelly oil cake.process biochemistry (1998)..33(5):505-511.
35–الرفاعي،فاتن نوري. الفطريات المعزولة من بذور بعض المحاصيل المخزونة والمنتجة للانزيمات (السليوليز).رسالة ماجستير ، كلية العلوم / جامعة الموصل(1999) .
36– المولى ،زكريا سامي عبد الرزاق احمد .التحري عن عزلة فطرية منتجة لانزيمات اللايبيز من ثمار الزيتون .مطبعة جامعة الموصل /العراق.(2003).
37Maia,M.M.D.;Heasley,A.;Demorais,M.M.C.;Morais,M.A.;Ledingham,W.M.and Lima, J.L. Effect of culture condition on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. Bioresource Technology . (2001).76(1):23-27.
38-Ogundero,V.W.Lipase activity of thermephilic fungi from mouldy groundnuts in Nigeria.Mycologia. .(1980).72:118-126
39– الجلبي،قصي عبد القادر (1987).الكيمياء الحيوية.دار الكتب للطباعة والنشر.مطبعة جامعة الموصل / العراق.
40- - Freire,D.M.G.,Gomes , P.M. , Bon , E.P.S. and Sant Anna , G.L.Jr. Lipase Production by anew promising strain of *Penicillium restrictum* . Revista de Microbiologia (1997).28,6-12.
41-Long , K.. Production , properties and application of mycelium . bound lipase of alocally isolated strain of *Aspergillus flavus* Link . Thesis . Universiti Putra Malaysia. (1997)
42- Gardillo,M.A; Montesinos, J.L.; Casas, C.; Valero, F.; Lafuento, J. and Sola C.. Improving Lipase production from *Candida rugosa* by
12-Saad, Moataza, M. Kansoh, Amany, L. and Gadallah, M.A.. Optimization of extracellular lipase production by *Fusarium oxysporum*. .(2004)
13-Shiao Pauand Ibrahim Che Omar.Fermentation and Enzyme Technology Leboratory ,school of Biological scinces univirsiti sains Malaysia, Minden, 11800, penang,Malaysia.
14- Leong, S.Y. and Ibrahim, C.O.. Optimization of asolid state fermentation for benzyldehyde production by a locally isolated, *Penicillium diversum* using palm kernel cake (PKC) as substrate Pak .J. Bio. Sci. (2000),:1752-1754.
15-Ginalska G, Bancrez R, Kornillowicz- Kowalska TA thermostable lipase produced by anewly isolated *Geotrichom* like strain, R29. J. Indus .Microbiol. Biotechnol. (2004)31(4):177-182.
16- Ruchi, Gulati., Jasmine, Isar. Vineet,Kumar . Ashok, Parsad. K. virinder, Pamar. S. Rajendra, Saxena. K. Production of a novei alkaline lipase by *Fusarum globulosum* using Neem oil, and application pure and Appi chem. , (2005)77(1):251-262.
17- Iftikhar,Tehreema. Niaz, Mubashir. Afzal, Munazza. Ikram-ul Haq and Ibrahim, Muhammad – Rajoka Maximization of Intracellular lipase Production in alipase – Over producing Mutant Derivative of *Rizopus oligosporus* . (2008)
18-C.Marcin,L.Katz, R. Greasham, M. Chartrain, Optimization of lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001 in batch cultivation, J. Ind. Microbiol. Biotechnol (1993)..1229-34.
19-
Grasian,Immanuel.Palanichamy,Esakkiraj.Austin,Jebadhas. Palanisamy Iyapparaj and Palavesam Arunachalam.Investigation of lipase production by milk isolated *Serratia rubidaea*.India.(2008).
20-Donsanih NS,Kaur J.Immobilization,Stobility and esterification studies of alipase from a *Bacillus* sp. Biotechnol. And Appi Biochem . (2002)vol.36 pp 7-12.
21-Adham M.Abdou, Purification and partial Characterization of Psychrotrophic *Serratia morcescens* lipase, 2003.j.Dairy Sci .86:127-132.
22-Lima,V.M.G., Krieger, N. Sarquis, M.I.M., Mitchell, D.A., Ramos,L.P. and Fontana, J.D. Effect of Nitrogen and Carbon Sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum.* Food Technol. Biotechnol . (2003).41(2),105-110.
23- I.S.T.A.proceeding of the international seed testing. International Rules of seed testing. Wogeningen , Nether Lands. .(1976).
24- Yang,S.M.and Thomas,C.A..Comparision of tenchniques for inoculating sunflower heads with three species . of *Rizopus* phytopathology (1981). 71: 458- 460.
25-Pitt ,I.I. and Hocking ,A.D. Fungi and Food spoilage . University Press Cambridge, (1997)P.593.
26- Pitt ,I.I. and Hocking ,A.D. Fungi and Food spoilage . University Press Cambridge, (2005)P.501.
27-Tsuneo Watanabe. Pictorial Atlas of soil and seed fungi Morphologies of cultured fungi and key to

nitrogen sources in batch and continous cultures lipase production by *Candida rugosa* Human press Inc . 25-37 (1996).
45-MIadenoska, Irina. And Dimitrovski, Aco. Lipase Production by *Geotrichum candidum* – M2. (2001). Vol.20,No.1,pp.39-43.
abiochemical enginnering approach. CPL. (1998).. 93 (1-2) :131-142
43- دنحا، رياض فرنسيس والخزرجي ، طالب عويد. تغذية وعلم وظائف الفطريات . مطابع التعليم العالي في الموصل. (1990).
44-Montesines,J.L;Obradors , N . ; Gardillo , M . A . ; Valero, F.; Lafuento, J. and Sola, C.. Effect of

Production of lipase from local isolated of *Penicillium* isolated from the seeds of nuts

Noor Amir Alubeidi
Biology Dept. , College of Education , Mosul University , Mosul , Iraq
(Received: 28 / 3 / 2011 **---- Accepted:** 13 / 3 / 2012**)**

Abstract
Three local fungal isolates were isolated and identified from nuts that belong to *Penicilliu waksmanii P. islandicum and P.rugulosum* . The study was secreened the ability of fungal isolates to produce lipase using the method of solid media containing Tween -80 Tributyrin substance. The results showed that *P. rugulosum* was highest efficieny in excreting lipase. Therefor it was selected the plant oils are used as carbon source include (soy bean oil , olive oil and seasame oil).
The enzyme activity reached to 20.56 U \ ml after 6 day when using seasame in medium. The best concentration of seamame in medium was 2 % U\V (22.5U \ ml).
The enzyme activity reached to 27 U \ ml after adding urea to the production medium as nitrogen source .