تحديد الظروف الزرعية المثلى لإنتاج أنزيم الانيولينيز من الفطر *Alternaria alternate* المعزول محليا

أ.م. ولاء حمدون شكر

جامعة الموصل / كلية التربية الأساسية/ قسم العلوم العامة

(قدم للنشر في ٢٠١٩/٢/٢٥ ، قبل للنشر في ٢٠١٩/٤/٢)

ملخص البحث:

درست الظروف الزرعية المختلفة لإنتاج أنزيم الانيولينيز من عزلة محلية للفطر *Aternaria alternate* والمعزول من مصادر نباتية مختلفة .أوضحت النتائج إن أفضل هذه الظروف تمثلت بالسكروز بوصفه مصدرا كاربونيا بينما أعطى الببتون أعلى إنتاجية للأنزيم كمصدر نتروجيني. وبرقم هيدروجيني(6.5) . أما فيما يخص فترات الحضانة فاظهر اليوم السادس من الحضانة هو الأفضل لإنتاجه للأنزيم.

Determining the Typical Cultural Conditions for Production of Inulinase Enzyme from Local Isolate of *Alternaria alternate*

Abstract:

The cultural conditions for inulinase enzyme production from local isolate of *Alternaria alternate* were studied isolated from different plants sources .the results showed that the optimum conditions were using gloucose as a carbon source while peptone gave the highest production of enzyme as a nitrogen source ,and gave hydrogen number (6.5) as a best from others, the sixth day was the best incubate to product enzyme

المقدمة:

"يتزايد الطلب على سكر الفركتوز باستمرار وذلك لما يتمتع به من ميزات غذائية وصحية إذ يعد من المواد مأمونة الاستخدام من الناحية الصحية وهو يتميز بارتفاع درجة حلاوته لتصل إلى (170) مقارنة بالسكروز حلاوته (100) ويستخدم في صناعة الأغذية الخاصة بالمرضى المصابين بداء السكر وذلك لحلاوته وقلة السعرات التي تعطيها كمية معينة منه بسبب انخفاض الكمية اللازمة للتحلية فضلا عن تباطؤ امتصاصه نسبيا في الأمعاء وإمكانية تايضه دون الحاجة إلى الأنسولين وهو ذو درجة ذوبان عالية ومحاليله ذات لزوجة منخفضة مقارنة بالسكروز أو الكلوكوز" (Bajpai وآخرون,2011)

"هناك نوعان من أنزيم الانيولينيز احدهما خارجي (Exoinulinase) وهو يقوم بإنتاج سكر الفركتوز من الانيولينيز الأخر داخلي (Endoinulinase) وهو يعمل على إنتاج السكريات الفركتوزية قليلة التعدد والتي تمتلك خصائص وقائية وغذائية يمكن استخدامها في علاج الإمساك وتخفيض الكولسترول (Baysal وآخرون,2000). أنزيم الانيولينيز من الأنزيمات المحللة يختص بتحلل الآصرة الكلايكوسيدية (2-1) β .وكذلك (2-6) β .الموجودة في الفركتانات ليعمل على تحرر سكر الفركتوز". (Balayan وآخرون,2011).

"يعمل أنزيم الانيولينيز على تحلل جزيئة الانيولين لإنتاج الفركتوز فضلا عن القليل من جزيئات الكلوكوز ويمكن الحصول على الأنزيم من مصادر ميكروبية مختلفة (البكتريا والخمائر والاعفان) مثل "*Aspergillus spp., Saccharomyces spp.*,و *Penicillium spp.Fusarium spp.*, و فطر *Alternaria alternate* وفي بكتريا *Bacillus subtilus* فضلا عن بعض المصادر النباتية ويتميز الأنزيم بصفات فيزيائية وحيوية متميزة فقد تستخدم في العديد من الاستخدامات الصيدلانية والصناعات الغذائية حيث يتميز بثباته الحراري ولفترات زمنية طويلة وله درجة حرارة مثلى عالية نسبيا وبسبب هاتين الميزتين جعلت هذا الأنزيم ملائم بالتطبيقات الصناعية". (Artanوآخرون, 2013).

"الانيولين هو سكر متعدد متجانس صيغته الجزئية ($(5n+O_{10}\ n+H_{6n}\ C)$) ووزنه الجزئي يعتمد على عدد ذرات الكاربون في السلسلة فتحتوي على حوالي (30) وحدة سكر فركتوز كحد أدنى وتنتهي السلسلة بوحدة كلوكوز ويمكن الحصول

على الانيولين من عدة مصادر نباتية مثل التفاح الأرضي والقمح والثوم والموز". (Cazetta وآخرون, 2017).

"والانيولين يعد من الألياف الغذائية القابلة الذوبان في الماء والتي تستعمل في علاج عسر الهضم وكذلك لتقليل نسبة الكولسترول وكمادة مضادة لإمراض السرطان المختلفة وخاصة سرطان القولون فضلا عن استخدامه في المجال الطبي كأداة تشخيص مشاكل أمراض الكلى". (Gupta وآخرون, 2017).

هدفت الدراسة الحالية إلى دراسة بعض الظروف المناسبة لإنتاج أنزيم الانيولينيز من فطر *Alternaria alternate* المعزول من الفواكه والخضروات المصابة.

المواد وطرائق العمل:

١- الكائن المجهري الفطري المستخدم:

تم استخدام في هذه الدراسة الحالية فطر (*Alternaria alternate*) من بعض الفواكه والخضروات المصابة والتي تم جمعها من أسواق محافظة نينوى (البطاطا, الطماطة, البصل, الخيار, التفاح, البرتقال) وتم عزل الفطر على وسط (PDA) المعقم وحضنت بدرجة (30)م ولمدة (6) أيام وشخص الفطر باستخدام الصفات المظهرية والتشريحية وتم تنشيط الفطر كل (10) في أنابيب مائلة حاوية على وسط (PDA) وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

٢- تحضير اللقاح:

"يتكون الوسط المستخدم غم/لتر: من (10) انيولين, (20) ببتون, (10) مستخلص الخميرة, أذيبت المكونات في الماء المقطر وتم ضبط درجة الرقم الهيدروجين عند (6) وزعت في دوارق سعة (250) مل وبمعدل (100) مل لكل منها ومن ثم عقم الوسط باستخدام جهاز الاوتوكليف ويستخدم الوسط لتنمية وإكثار الفطر وتم نقل حملة من المزرعة الفطرية المائلة وحفظت بدرجة (30) م^0 ولمدة (6) أيام". (Ohta وآخرون, 2013).

٣- وسط إنتاج الأنزيم:

يتكون الوسط الإنتاج غم/لتر: (10), (5) ببتون, (2) مستخلص خميرة (0.5) كبريتات المغنيسيوم, (2.5) يوريا, (0.5) كاربونات الكالسيوم. أذيبت المكونات في الماء المقطر وتم ضبط الرقم الهيدروجيني عند (6), ثم وزع في دوارق سعة (250) مل وبمعدل 100) مل لكل دورق وعقمت وحفظت بدرجة حرارة (4) م^0 لحين الاستعمال وباستخدام ماصة معقمة تم

نقل (1) مل من المزرعة النامية في اللقاح إلى وسط الإنتاج وحضنت بدرجة حرارة (30) م^0 ولمدة (6) أيام.

٤- إنتاج الأنزيم:

"باستخدام ماصة معقمة تم نقل (1) مل من المزرعة المحضرة من الخطوة (3) إلى دوارق زجاجية سعة (250) مل محتوية على (100) مل من وسط إنتاج الأنزيم وبعدها حضنت بدرجة حرارة 3 أيام ولمدة (6) أيام . وبعد انتهاء فترة التحضين تم ترشيح المزرعة الفطرية باستخدام ورق ترشيح للتخلص من الخلايا وبإجراء الطرد المركزي بسرعة (3000) دورة/ دقيقة ولمدة (15) دقيقة ورسب الأنزيم باستخدام الأسيتون المبرد (-20) م^0 والذي أضيف إلى راشح المزرعة الخام تدريجيا مع التحريك المستمر ويترك المزيج لمدة ساعة في حمام ثلجي وتعاد إجراء عملية الطرد المركزي وتم فصل الراسب عن الراشح ومن ثم أذيب الراسب بمحلول خلات الصوديوم وبعدها قدرت الفعالية الأنزيمية". (Yokota وآخرون, 2013).

٥- تقدير الفعالية الأنزيمية:

تم تقدير الفعالية الأنزيمية للانيولينيز والمنتج من الفطر *A. alternate* وبذلك بتقدير كمية السكريات المختزلة بالطريقة المتبعة من قبل (Ertan واخرون, 2011) وذلك بمزج (0.1) ملي لتر من المستخلص الأنزيم والذي تم الحصول علية من الخطوة (4) مع إضافة (0.9) مل من المحلول المنظم لخلات الصوديوم تركيز (0.1) مولر ورقم هيدروجيني (4.8) الحاوي على (1%) من مادة التفاعل (الانيولين أو سكروز) وحضن المزيج في حمام مائي بدرجة (40) م^0 ولمدة (15) دقيقة , بعدها تم إيقاف التفاعل وذلك بإضافة (1) ملي لتر من محلول (3-5 dinitro salicylic acid) لكل اختبار ووضعت الأنابيب في حمام مائي بدرجة غليان لمدة (5) دقائق ومن ثم بردت إلى درجة حرارة الغرفة وأضيفت (10) مل من ماء مقطر وبعدها تم قياس الامتصاصية عند طول موجي (450) نانوميتر.

٦- تحديد بعض الظروف المثلى لإنتاج أنزيم الانيولينيز من فطر *Alternaria alternate*.

A. تأثير فترات حضانة مختلفة على إنتاج الأنزيم:

تم دراسة تأثير فترة التحضين على إنتاجالأنزيم ولمدة (8) أيام عند درجة حرارة (30) م^0 مع متابعة إنتاج الأنزيم بقياس الفعالية الأنزيمية في راشح المزرعة كل (24) ساعة من التحضين.

B. تحديد المصدر الكاربوني الأمثل لإنتاج الأنزيم:

اختبرت كفاءة المصدر الكاربونية والتي شملت (السكروز, الفركتوز, الكلوكوز, النشا, كالكتوز) وباستبدال المصدر الكاربوني في وسط إنتاج الأنزيم بأحد المصادر المذكورة.

C . تحديد المصدر النتروجيني الأمثل لإنتاج الأنزيم :

اختبرت كفاءة المصادر النتروجينية المختلفة والتي اشتملت (فوسفات الامونيوم , كبريتات الامونيوم, نترات الصوديوم, اليوريا, الببتون) وتم استبدال المصدر النتروجيني في وسط الإنتاج بأحد المصادر النتروجينية المذكورة.

D . تقدير الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل لفعالية الأنزيم:

تم توزيع الوسط الإنتاجي في دوارق سعة (250) مل وعدل الرقم الهيدروجيني في الدوارق جميعها إلى (4.0,4.5,5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5,8.0) لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الأنزيم ولقحت تلك الأوساط بمعلق لفطر ألـ *A. alternate* .

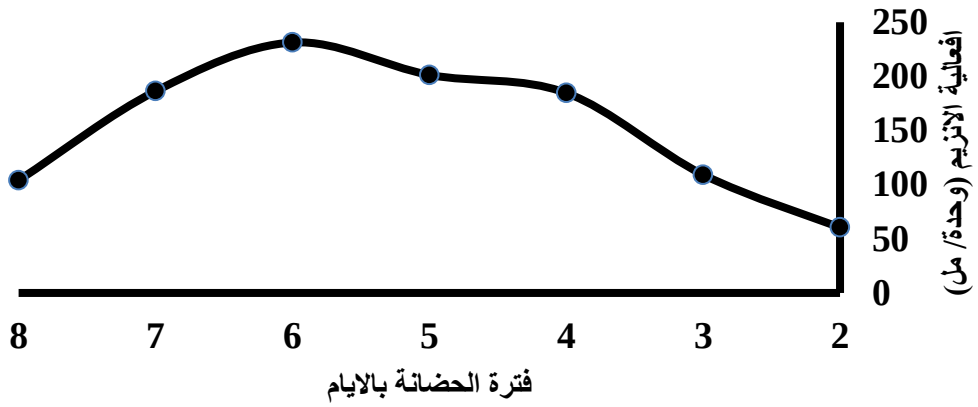
النتائج والمناقشة:

١- تحديد مدة التحضين المثلى لإنتاج الأنزيم:

توضح النتائج المبينة في شكل وجدول (1) ,إن زيادة إنتاج الأنزيم بتقدم مدة حضن الفطر (*A. alternate*) إذ كانت (60) وحدة/ مل بعد (24) ساعة من التحضين ووصلت إلى الإنتاجية للأنزيم (231.6) وحدة/ مل في اليوم السادس من التحضين وبعها بدء الانخفاض التدريجي في الإنتاج إلى إن وصل (109.3) وحدة / مل في اليوم الثامن من التحضين وقد يكون سبب ذلك يعود إلى تناقص المواد الغذائية في الوسط الغذائي وتراكم النواتج الايضية , وعلية تم اعتماد هذه المدة من التحضين في التجارب اللاحقة.

جدول (1):تأثير فترات حضانة مختلفة على إنتاج أنزيم الانيوليز من الفطر *A. alternate*

فترة الحضانة (بالأيام)	فعالية الأنزيم (وحدة /مل)
2	60.4
3	190.1
4	184.6
5	201.3
6	231.2
7	168.3
8	104.0



شكل(١): تأثير فترات حضانة مختلفة على فعالية أنزيم الانيوليز من فطر *A. alternate*

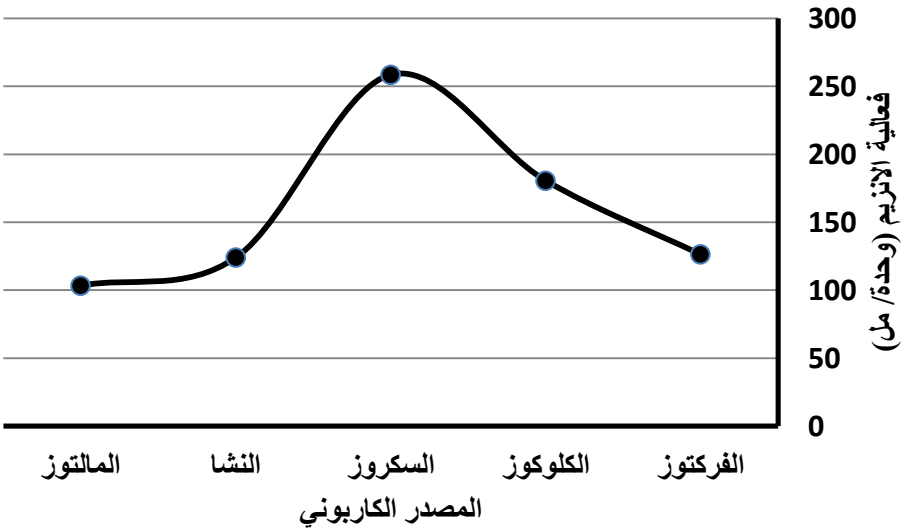
إن هذه النتيجة تتفق مع ما توصل آلية(Ertan , وآخرون 2011) حيث حصل على أعلى إنتاجية لنفس الأنزيم خلال اليوم السادس من الحضانة عند تحضين فطر *Aspergillus niger* وتمكن (الموسوي وآخرون,2011) من إنتاج امثل للأنزيم من فطر (*A.alternatia*) وبعد مرور ستة أيام من التحضين فقد وصلت الإنتاجية إلى (290) وحدة/ مل وقد تمكن (Nidhisingh, 2013) من الوصول إلى الإنتاج الأمثل للأنزيم (320) وحدة / مل وبعد مرور خمسة أيام من تحضين فطر (*.Pencillium spp*) بينما كانت النتائج الحالية متباينة مع ما توصل آلية (Harisingh وآخرون 2008) الذي أشار إلى إن اليوم التاسع من التحضين كان الأمثل للوصول إلى الإنتاج الأفضل للأنزيم حيث وصل إلى (389) وحدة/مل من فطر(*Aspergillus famigatus*) .

٣- تحديد المصدر الكاربوني الأمثل لإنتاج الأنزيم :

تشير نتائج الجدول وشكل (2) وجود تباين في تأثير نوع المصدر الكاربوني في إنتاج أنزيم الانيولينيز حيث تم الحصول على أعلى فعالية نوعية باستخدام السكروز حيث بلغ فعالية الأنزيم(258.5) وحدة/مل وقد يعود سبب الزيادة عند استخدام السكروز إلى كونه من الركائز التي يعمل عليها الأنزيم حيث يعمل كمادة حاثة لتحفيز خلايا الفطر على إنتاج الأنزيم بالمقارنة مع النشا والمالتوز والتي كان الإنتاج فيها منخفض عند استخدامها فقد وصل الإنتاج إلى (103.4,124.0) وحدة/ مل على التوالي وقد يكون وجودهما في وسط النمو عاملا على كبح إنتاج الأنزيم من قبل خلايا الفطر , وتتفق هذه النتائج التي تم توصل إليها في هذه الدراسة مع ما ذكره (Harising ,وآخرون2008) في دراستهم لتحديد المصدر الكاربوني الأمثل لإنتاج الأنزيم من فطر (*Aspergillus niger*) فقد وجد إن السكروز كان أفضلهم حيث وصلت فعالية الأنزيم إلى (480) وحدة/مل وتلاه الكلوكوز (429) وحدة/ مل, وفي دراسة (Nirobol , وآخرون 2012) لإنتاج الأنزيم من فطر (*A. tamari*) باستخدام مصادر كاربونية مختلفة فقد كان الكلوكوز مفضلا للوصول إلى الإنتاج الأمثل من الأنزيم (382) وحدة/مل بينما كان المالتوز اقل المصادر الكاربونية إنتاج أللأنزيم فقد بلغ (80.9) وحدة / مل.

جدول (٢) :تأثير مصادر كاربونية مختلفة على إنتاج وفعالية ألأنزيم من فطر *A. alternate* عند اليوم السادس من الحضانة.

المصدر الكاربوني	فعالية الأنزيم(وحدة/ مل)
الفركتوز	**126.3**
الكلوكوز	**180.6**
السكروز	**258.5**
النشا	**124.0**
المالتوز	**103.4**



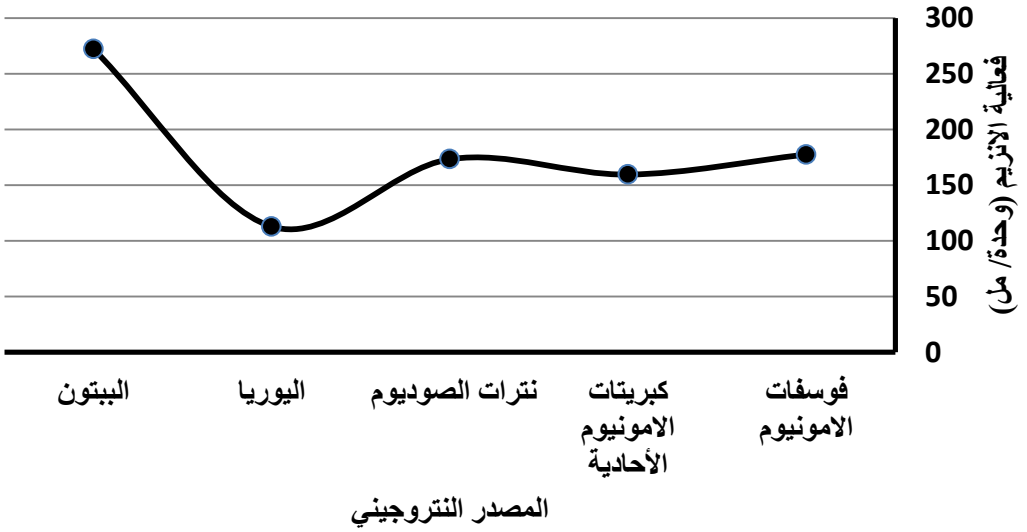
شكل (٢): يوضح تأثير مصادر كاربونية مختلفة على انتاج الأنزيم.

٤- تحديد المصدر النتروجيني الأمثل لإنتاج الأنزيم:

تم اختيار عدد من المصادر النتروجينية منها عضوية وأخرى غير عضوية لدراسة تأثيرها في إنتاج أنزيم الانيولينيز من فطر (*A.altrnatia*), فقد تبين النتائج الموضحة في الجدول والشكل (3) إن الببتون كان أفضل المصادر النتروجينية استخداما من قبل الفطر للوصول إلى الإنتاجية المثلى من الأنزيم والتي كانت (272) وحدة/مل حيث يعد الببتون احد المركبات المهمة المحفزة لانتاج الانزيم ثم تلتها فوسفات الامونيوم وبفاعلية أنزيم بلغت (177.5) وحدة/مل بينما كان اقل إنتاجية للأنزيم في الوسط الحاوي على اليوريا فقد بلغت فعالية الأنزيم (112.9) وحدة/مل.وان هذه النتايح مشابهة لما توصل آلية (Abdullah وآخرون,2015) في دراستهم لتحديد المصدر النتروجيني الأمثل لإنتاج الأنزيم من الفطر .*Penicillium spp* () من بين عدة مصادر نترو جينية فقد كان الببتون أفضلهم وقد *وصلت* فعالية الأنزيم (333) وحدة/مل وكانت كبريتات الامونيوم اقل المصادر النتروجينية إنتاج للأنزيم فقد منحت (59.8) وحدة / مل.

جدول (٣): تأثير مصادر نتروجينيه مختلفة على إنتاج ألأنزيم من فطر *A. alternate* عند اليوم السادس للحضانة وبوجود السكروز كمصدر كاربوني.

المصدر النتروجيني	فعالية الأنزيم (وحدة /مل)
فوسفات الامونيوم	177.5
كبريتات الامونيوم الأحادية	159.5
نترات الصوديوم	173.3
اليوريا	112.9
الببتون	272.1



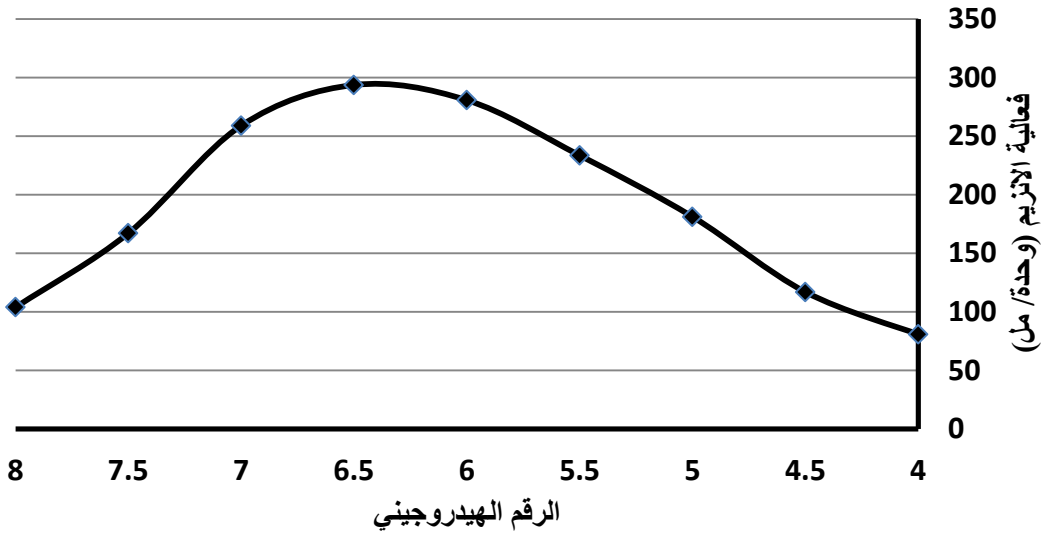
شكل (٣): يوضح تأثير مصادر نيتروجينية مختلفة على إنتاج الأنزيم.

٥- تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الأنزيم:

قدرت الفعالية الأنزيمية لأنزيم الانيولينيز في الدراسة الحالية بمدى من الأرقام الهيدروجينية وقد أظهرت النتائج الموضحة في جدول وشكل (4). إن الأس الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الأنزيم كان (6.5) ,ويعد تحديد الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج عاملا مهما لإنتاج الأنزيمات الميكروبية وفي فاعلية هذه الأنزيمات لكونها تتأثر بشكل مباشر بتركيز ايونات الهيدروجين لوسط الإنتاج ووسط التفاعل وعند الأس الهيدروجيني (6.5) كان أعلى فعالية للأنزيم و بلغت (293.6) وحدة/مل وهذه النتيجة مشابهة لدراسة (El-hersh وآخرون, 2012) فقد أشار للرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج أنزيم الانيولينيز من فطر (*Aspergillus niger*) هو (6.5). وكذا الحال بالنسبة لما توصل آلية (Park وآخرون, 2001) عند استخدامهم لخميرة (*Saccharomyces cerevisiae)* .

جدول (٤): تأثير الرقم الهيدروجيني على فعالية الأنزيم من فطر *A. alternate* عند اليوم السادس للحضانة.

الرقم الهيدروجيني	فعالية الأنزيم (وحدة /مل)
4.0	80.70
4.5	116.8
5.0	181.0
5.5	233.4
6.0	280.6
6.5	293.6
7.0	258.9
7.5	167.1
8.0	103.8



شكل (4): تأثير أرقام هيدروجينية مختلفة على إنتاج الأنزيم.

References:

1- Abdullah, A.L; R,P Tengerdyand Murphy, V.G. (2015). "Production of inulinase by a new mold of *Penicillium rugulosum* .j. of environ biology". vol. (23).

2- Artan, F; T.A. Aktac; A.C. Kaboglu. (2013). "Determination of optimum cultivation on condition on the production of inulinase from *Rhizactonia solani*." Pakistan journal of bio . sci. vol. (11).

3- Bajpai, P. and A. Margaritis. (1996). "Improvement of inulinase stability of calcium alginate immobilized kluyveromyces marxianus cells by treatment eith hardening agents." enzyme. microb. technol.

4- Baysal, G.O.; S.S. Sukan. (2000). "Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger*." biotechnology letlers.vol. (51).

5- Balayan, L.M; I.A. Pivazian. (2011). "Inulinases from *Penicillium palitans* and *Penicillium cyclopium*," J. biochemistry, vol. (21).

6- Cazetta, M.L.; Monti, R. and Contier. J. (2017). "Effect of conditioning on the production of inulinase by *Aspergillus niger* using factorial design". appl. biochem, vol. (54).

7- El-hersh, S.I.; Saber, W.I, Land-Noura, E. (2012). "Production strategy of inulinase by *Penicillium citrinum*". j. agricultural by produ. Micro, vol. (15).

8- Ertan, F. and Ekinci, T.G. (2011). "The production of inulinase from *Alternaria alternate*, *Aspergillus niger*, and *Trichoderma harzianum*". jo. of marmara for pure and app. science. vol. (1).

9- Gupta, A.K.; P. Rathore and R. Singh. (2010). "Production thermal stability and immobilization of inulinase from *Fusarium oxysporum*". j. of chemical technology and biotechnology. Vol. (31).

10- Harisingh, G. and Naveen, k. (2008). "Production of inulinase using tap root of dandelion by *Aspergillusniger*". j. food engineering. Vol. (7).

11- Nidhisingh and J,A. Braham. (2013). "Isolation of inulinase production fungus from compost soil and partial characterization of inulinase". advances in appl. sciencerise. Vol. (10).

12- Nirobol, l.k.; Rungtrakarn, C.P. (2012). "Production, purification and characterization of inulinase from a newly isolated". J. Microbial, vol. (3).

13- Ohta, K.S.Hamada and T.Nakamura. (2013). "Production of high concentration of ethanol from inulin by simultaneous fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cervisiae*". appl. environ. microbial. Vol. (14).

14- Park, S.; Jeong, H.Y.; Kim, H.S.; Yang, M. S. and Chae, K.S. (2001). "Enhanced production of *Aspergillus ficium* endoinlinase in *Saccharomyces Cerevisiae* by using the SUC2-deletion mutation". Enzyme and Microbiol. Vol. (9).

15- Yokota, A.; O. Yamauchi and F. Tomita. (2013). "Production of inulotriose from inulin by degrading enzyme from *Alternaria alternatia*". Appl. microbial, vol. (21).

١٦-الموسوي أم البشير حميد جابر, وعلي عبد الكاظم الغانمي. (2011). "الفطريات المنتجة لأنزيم الانيولينيز وتحديد الظروف البيئية المثلى لإنتاج الأنزيم من الفطر *Aspergillus niger*". مجلة البصرة للعلوم الزراعية. جمهورية العراق. البصرة.