مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية المجلد(12) العدد(4)–(2012)
ISSN-1813-1646

دراسة ظروف إنتاج السكر المتعدد من إحدى العزلات المحلية للفطر *Cladosporium herbarum* وتوصيفه الجزئي

هوازن احمد عبد الجبوري وعبد الكريم سليمان حسن النعيمي
كلية التربية للبنات جامعة تكريت–العراق

الخلاصة

تم دراسة إنتاج السكر المتعدد من إحدى العزلات المحلية للفطر *Cladosporium herbarum* والتي تم الحصول عليها من جامعة الموصل\كلية التربية .وتم دعم النمو وتحفيز انتاج السكر المتعدد باستخدام وسط غذائي شبه تركيبي مناسب(Potato Dextros) (P.D) ،ووجد بان أفضل إنتاج من السكر المتعدد من قبل الفطر بعد 7 ايام من التحضين في الحاضن الهزاز في الوسط الغذائي (P.D) ،وعند دراسة قابلية نمو الفطر في الوسط السائل (P.D) في ظروف الضوء والظلام فان الضوء ادى إلى تباطؤ أو تثبيط نمو الفطر وإنتاج السكر المتعدد مقارنة مع حالة التحضين في ظروف الظلام ،وفي حالة دراسة تأثير الضوء في المزارع المستقرة والمزارع في حالة الرج على انتاج السكر المتعدد ,تبين من النتائج أن الضوء سبب تثبيط نمو الفطر وإنتاج السكر المتعدد في المزارع المستقرة إذ بلغ أقصى إنتاج للسكر المتعدد في ظروف الضوء والظلام في المزارع المستقرة (0.67 و 1.0غم/لتر)على التوالي بعد 8ايام من التحضين في حين في حالة الرج كان انتاج السكر التعدد (1.01 و 2.74غم/لتر) على التوالي .كما ان بزيادة حجم الوسط 50 مل لكل دورق بحجم 250 مل إلى 150مل و 200 مل لكل دورق حجم 500 مل عززت إنتاجية عالية من السكر المتعدد إذ بلغت على التوالي (3.97 و4.58 غم/لتر).أما عند التحليل الحامضي للسكر المتعدد المنتج باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC فقد تم الحصول على بقعة واحدة فقط تمثل سكر الكلوكوز بوصفها وحدة أساسية مكونة للسكر المتعدد المنتج . كما بين طيف الأشعة تحت الحمراء (IR) حزمة امتصاص عند (850سم$^{-1}$)وهذه الحزمة تعد صفة مميزة للسكريات المتعددة من نوع ألفا α .وكما بين الدوران البصري النوعي انعكاسا قيمته $^{\circ}30 = \alpha/_{D}$ والتي تعد صفة مميزة أيضا لانواع ألفا،وكانت اللزوجة المحددة (الحقيقية) للسكر المنتج(1.5) =[η] . وأعطى تفاعل المنتوج مع اليود نتيجة سالبة

الكلمات الدالة : انتاج السكر ، عزلات محلية ، توصيف جزئي

للمراسلة : هوزان أحمد عبد كلية التربية للبنات–جامعة تكريت

الاستلام: 2–9–2009
القبول : 2–5–2009

A Study of Production Condition of the Polysaccharide from a Local Isolates of the fungus *Cladosporium herbarum* and Its Partial Identification

Hawazin Ahmed Abid Al Juboory and Abid Al kareem Sulaiman Hassan Al noaimy
Education for Women \ University of Tikrit Dep.of Biology

KeyWords: Production Condition, Local Isolates , Partial Identification

Correspondence: Hawazin A. A Al Juboory

Education for Women \ University of Tikrit Dep.of Biology

Received: 2-9-2009
Accepted: 5-2-2009

Abstract

In this study , the production of polysaccharide from one of the local *Cladosporium herbarum* had been studied . and obtained from Mousel University / College of Education . At the beginning , we studied the preparation & selection of nutrient semi-synthetic media for the growth of the fungus , and facilitation of its production of polysaccharide The best production was obtained after 7 days of incubation in shaker incubator via (A) prepared medium which represents (P.D) medium . Then we studied the ability of the fungus to grow in liquid medium (P.D) in light and dark conditions . The growth of the fungus and the production of polysaccharides had been decreased in light compared with dark incubation conditions . Its effect had been studied in two types of media , stable media and media in shaking condition .Results showed that light decreased the growth of the fungus *C. herbarum* and The polysaccharides production in stable medium conditions , as the maximum production of polysaccharides in light and dark conditions were (0.67 gm / l and 1 gm / l) respectively after 8 days of incubation while the Maximum production of polysaccharides in light and dark conditions in shaker incubation circumstances were (1.01 gm / l and 2.74 gm / l) respectively .. On increasing the size of the medium from 50 ml for each 250 ml – flask To 150 ml and 200 ml for each 500 ml – flask , the production of Polysaccharides was increased to (4.58 gm / l) . On acidic analysis of polysaccharides that produced using thin layer chromatography technique (TLC), we obtained only one patch resembling glucose as an essential component of polysaccharides . Also infrared light (IR) showed absorption band at (850 cm^{-1}), and this band was considered as a Characteristic feature of polysaccharides type Alpha (α). The estimation of the specific optical rotation showed a reflection of the value /α / ^{20} = 30 which was also considered a characteristic feature of polysaccharides type alpha (α) . The limited viscosity (Real) for the produced sugar was (η=1.5) . The reaction of polysaccharides with Iodine was negative .

المقدمة

لعبت الإحياء المجهرية دورا هاما في حياة الإنسان وبمرور الزمن بحيث أزالت الحواجز بين العلوم فعند اكتشاف مضادٍ حيويٍ جديدٍ يسعى علماء الوراثة لإعادة صياغة الحامض النووي للكائن المجهري (الهندسة الوراثية) لكي يتم الحصول على أعلى إنتاجية من المضاد الحيوي ،ويهتم علماء الكيمياء الحيوية بالتركيب الكيمياوي للمضاد الحيوي . وكذلك الطبيب بفاعليته والمهندس بخط الإنتاج التجاري وهكذا (احمد،1999).وقد نجح العاملون في مجال التصنيع الحيوي في اكتشاف عدد من الإحياء المجهرية في النصف الثاني من القرن العشرين لها القابلية على إنتاج العديد من المركبات وإحداها هي السكريات المتعددة الميكروبية Microbial Polysaccharides إذ تتمكن هذه الإحياء من إنتاج السكريات تحت ظروف يمكن السيطرة عليها باستخدام السلالات المنقاة من تلك الإحياء (Karin وأخرون ، 2000) . تمتلك السكريات المتعددة الميكروبية مدى واسعا من التطبيقات فهي تستخدم في الصناعات الغذائية والدوائية لأنها غير سامة ، كما تستخدم في العديد من الصناعات المختلفة بوصفها مثبتات stabilizer ، ومعلقات ، ومواد استحلاب Emulsifers ، وفي صناعة المنسوجات وتعزيز استخراج النفط Enhanced Oil Recovery (EOR) وكذلك في صناعة الورق والأحبار والسيراميك والأصباغ والأصماغ (Ellwood and Sutherland 1979, وJohn ،2004) .وإن بعض السكريات المتعددة الميكروبية تسهم في إدامة صحة الإنسان إما بسبب كونها جزءا من الغذاء غير المهضوم أو بسبب فعاليتها المضادة للأورام السرطانية anti tumeral والمضادة للقرحة Antiulcer , كما تستخدم بوصفها معدلات مناعية Immuno Modulators , وفي تقليل فعالية الكوليسترول في جسم الانسان (Devuyst وDegeest ، 1999 ؛Farina ،2001 و Rau ،2004). وفي مجال التلوث البيئي تعد السكريات المتعددة الميكروبية بوليمرات غير ملوثة للبيئة لكونها قابلة للتحلل الحيوي Biodegradable في حين يعد إنتاج البوليمرات البتروكيمياوية الصناعية تخريب للبيئة فضلا عما يطرح خلال تصنيعها من غازات مؤذية .

ومن أهم السكريات المتعددة الميكروبية التي تنتج على نطاق تجاري وعالمي هي الزانثان Xanthan الذي ينتج من قبل البكتريا *Xanthomonas campestris* ، والدكستران Dextran الذي ينتج من قبل البكتريا *Leuconostoc mesenteroides* ، والبوليولان Pullulan الذي ينتج من قبل الفطر *Aeurobasidium pullulans* ،والسكليروكلوكان Scleroglucan الذي ينتج من قبل الفطر *Sclerotium glucanicum*، وفي دراسة قام بها (NaoiوMiyazaki) عام (1973) تم عزل سكريات متعددة داخل خلوية وخارج خلوية من الفطر *Cladosporium herbarum* ويضم جنس *Cladosporium spp.* أكثر من 30 نوعاً وأكثرها شيوعا الفطر *Cladosporium herbarum* (Ellis ،1971 ؛ البوني ،1990) ويعد الفطر من أكثر الأنواع الفطرية شيوعا في الفضاءات خارج المنازل والبنايات .

هنالك العديد من العزلات الفطرية التي لها القدرة على إنتاج السكر المتعدد الميكروبي ومن ضمنها جنس *Cladosporium* الذي يعد من أكثر مجاميع الفطريات شيوعا في الطبيعة ، ونظرا لأهمية هذا السكر المتعدد فقد هدفت الدراسة إنتاج السكر المتعدد الميكروبي من الفطر *Cladosporium herbarum* وإلى تحديد وسط غذائي شبه تركيبي ودراسة تاثير بعض الظروف الزرعية لاسيما تأثير الأضاءة والأشعة فوق البنفسجية والرقم الهيدروجيني الأولي وحجم الوسط الغذائي في نمو الفطر *Cladosporium herbarum* وإنتاج السكر المتعدد ودراسة عدد من الخواص الكيميائية والفيزيائية للسكر المتعدد المنتج .

المواد وطرائق البحث

الكائن المجهري وتحضير اللقاح : استخدمت إحدى عزلات الفطر *Cladosporium herbarum* المحلية التي تم الحصول عليها من مختبر بحوث الأحياء المجهرية في قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة الموصل / الموصل .وحفظت العزلة بعد تنميتها على وسط Potato Dextrose Agar (PDA) على شكل مائل داخل أنابيب اختبار (Slants) في الثلاجة بدرجة حرارة 4° م وتم تجديد المزارع على الوسط نفسه كل اسبوعين . واستخدم وسط PDA لتحضير لقاح الفطر وذلك بنقل جزء من مستعمرة الفطر إلى أطباق بتري (قطر 9 ملم) حاوية على الوسط ووضعت الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة 26±1 بعدها تم تهيأة أقراص من الفطر كلقاح بواسطة ثاقب فلين بقطر 5 ملم من حافة المزرعة النامية بعمر 7 أيام.

الوسط الغذائي : الوسط الغذائي الذي استخدم لنمو الفطر *C. herbarum* وإنتاج السكر المتعدد يتضمن ما يلي : غرام / لتر ماء مقطر ، دكستروز 20 ، مستخلص البطاطا 200 . وضبط الرقم الهيدروجيني عند 6.5 ويعد وسط مثالي لانتاج السكر المتعدد (Pitt و Hocking, 1985) .

الظروف الزرعية : أجريت التجارب بثلاث مكررات بدوارق زجاجية مخروطية بحجم 250 مل ووزع الوسط بمعدل 50 مل / دورق . تم إحكام إغلاق فوهات الدوارق بسدادات قطنية وغلفت بأوراق الألمنيوم وعقمت بجهاز المعقام (الموصدة) عند الضغط 1كغم/سم3 ودرجة حرارة 121° م ولمدة 15 دقيقة . بعد التعقيم تركت الدوارق لتبرد ثم لقحت في ظروف معقمة بخلايا الفطر من اللقاح المحضر بوضع قرص واحد لكل دورق بعدها وضعت الدوارق في حاضنة هزازة عند درجة حرارة 28±1 وبمعدل هز

150 دورة / دقيقة ولفترات مختلفة من التحضين (5،8،11،14) يوم .

طرق التحليل

تقدير الكتلة الحيوية : بعد انتهاء فترة التحضين أخرجت الدوارق من الحاضنة تم قياس الرقم الهيدروجيني النهائي لكل دورق ثم رشح ميسيليوم الفطر باستخدام عدة طبقات من قماش الشاش وغسل الميسيليوم بالماء المقطر بصورة جيدة لإزالة بقايا السكر المتعدد ثم أضيفت رواشح الغسل إلى الراشح الأولي لتقدير السكر المتعدد ، وجمعت خلايا الفطر المترشحة في أطباق زجاجية صغيرة معلومة الوزن وجففت في فرن كهربائي عند درجة 80°م لمدة 24 ساعة وبعد ذلك قيست الكتلة الحيوية بفارق الوزنين وباستخدام ميزان حساس (Mettler من طراز PC 180) .

عزل وتقدير السكر المتعدد : تم اخذ 10حجم واحد 10 مل من رائق المزرعة وأضيف إليه حجمان 20مل من الاسيتون 99,6 % ، وحرك المزيج بقوة بوساطة قضيب زجاجي (Glass rod) لحين ترسب السكر ثم أجريت عملية الترشيح بوساطة طبقات من قماش الشاش ، بعدها جمع السكر المتعدد في أطباق زجاجية معلومة الوزن وجففت محتوياته في الفرن الكهربائي عند درجة حرارة 60 م لمدة 24 ساعة .بعدها حسب وزن السكر المتعدد بفارق الوزنين باستخدام الميزان الحساس . إن السكر المتعدد الذي أجريت عليه كافة التحاليل تمت تنقيته وذلك بإذابته بالماء ثم إعادة ترسيبه بالاسيتون وبما لا يقل عن ثلاث مرات (Kassim و Sultan, 1997) .

تقدير الدوران البصري النوعي للسكر المتعدد : قيست درجة الدوران البصري النوعي للسكر المتعدد المنتج بإستخدام جهاز الاستقطاب Polarimeter من طراز 47283 وبإستخدام محلول مكون من السكر المنتج مذاب في DMSO (Dimethyl Sulfoxide) بتركيز1.0 % .

قياس اللزوجة الحقيقية للسكر المتعدد : تم قياس اللزوجة الحقيقية للمنتوج بإستخدام جهاز قياس اللزوجة Ostwald-Fenske Visscometer . وذلك بتحضير محاليل مائية من السكر المتعدد وبتراكيز (غم/ 100 مل ماء مقطر) هي (0.4,0.3,0.2,0.1) واحتسبت اللزوجة الحقيقية بحساب زمن نزول المحلول (بالثواني) (Santamaria وآخرون 1978) .

التحليل الطيفي للسكر المنتج بالأشعة تحت الحمراء : تم إجراء التحليل الطيفي للمنتوج (السكر) بالأشعة تحت الحمراء وذلك بعمل أقراص من المنتوج مع ألKBR ووضعت في جهاز IR لقياس الطيف من طراز Unicam sp 1100 Infrared Spectrophotometer .

النتائج والمناقشة

تأثير الضوء في نمو الفطر *Cladosporium herbarum* وإنتاج السكر المتعدد :

لقحت الدوارق الحاوية على الوسط الزرعي السائل P.D وذلك بوضع قرص من الفطر *C. herbarum* في كل دورق . حضنت الدوارق في كل من ظروف الضوء والظلام وسجل نمو الفطر (جدول1) بينت النتائج بان الضوء أدى إلى تباطؤ أو تثبيط نمو الفطر وإنتاج السكر المتعدد مقارنة مع حالة الظلام وكذلك تأثيره في ظروف السكون عنه في ظروف الرج اتفقت النتائج مع (Lynch،1975) الذي ذكران للضوء تاثيرعلى نمو عدد من سلالات الفطر *Cercospora beticola* كما بين بعض الباحثين أن الضوء قد يثبط أو يحفز نمو الفطريات اعتمادا على نوع الوسط الغذائي المعتمد في تنميتها (Page؛1975 , Cochrane ،1985 و Carlile،1965) .

تأثير الضوء في نمو الفطر *C. herbarum* وإنتاج السكر المتعدد في الوسط السائل للمزارع المستقرة :

أوضحت النتائج من الجدول (1) بأن الضوء لم يعمل على تحفيز الفطر لإنتاج السكر المتعدد مقارنة مع المزارع المستقرة المحضنة في الظلام والتي حفزت الفطر لإنتاج السكر المتعدد وكان معنويا (عند مستوى احتمال 0.01) اذ كان أقصى إنتاج للسكر المتعدد (1.0غم/لتر) في ظروف الظلام ، بينما كان الإنتاج أقل في ظروف الضوء وبلغ (0.67غم/لتر)بعد 8 أيام من التحضين ، في حين كانت النسبة المئوية للإنتاج في ظروف الضوء والظلام بعد 8 أيام من التحضين (3.35 و 5.0%)على التوالي بينما كانت النسبة المئوية النوعية (88.91 و 88.23%) على التوالي . أما فيما يتعلق بالكتلة الحيوية للفطر فقد كانت عالية في المزارع المستقرة المحضنة في ظروف الظلام عنها في ظروف الضوء إذ تم الحصول على كتلة حيوية تحت ظروف الضوء والظلام (5.37 و 7.5غم/لتر)على التوالي بعد 8ايام من التحضين واتفقت هذه النتائج مع ما أشار إليه كل من Kassim وآخرون (1987) أن الضوء أدى إلى تثبيط نمو الفطر *Cercospora beticola* والعكس كان في ظروف الظلام . وأيضا كان أقصى إنتاج للكتلة الحيوية في ظروف الضوء اقل مما هي عليه في الظلام في المزارع المستقرة إذ بلغت الكتلة الحيوية في ظروف الضوء والظلام (7.3 و 8.83 غم/لتر) على التوالي بعد 14 يوماً من التحضين . بصورة عامة كان إنتاج السكر المتعدد في هذه التجربة اقل مما هو في التجارب الأخرى وقد يكون السبب المباشر هو استخدام المزارع الثابتة المستقرة ،إذ إن في المزارع الثابتة يعيش الفطر في ظروف ضعيفة التهوية فضلا عن عدم تجانس المزرعة بأكملها بما تتضمنه من خلايا الفطر والمكونات الغذائية إذ تكون الدقائق الغذائية البعيدة عن خلايا الفطر غير متيسرة له كتلك التي تكون بتماس مع خلايا الفطر

أما السكر المستهلك من قبل الفطر فكان انعكاسا للنمو ولإنتاج السكر المتعدد وتبين النتائج أن استهلاك السكر في فترات التحضين الأولى (5 و 8 أيام) اقل من استهلاكه في فترات التحضين اللاحقة أي بعد (11 و 14) يوماً في ظروف الضوء والظلام ويعزى هذا إلى فترة تأقلم الفطر مع السكر المستخدم بوصفه مصدرا كاربونيا للوسط الغذائي . وانخفض الرقم الهيدروجيني النهائي للوسط الغذائي عن الرقم الهيدروجيني الأولي (6.5) وقد وصل الانخفاض إلى (4.11) في بعض الحالات أن هذا الانخفاض في الرقم الهيدروجيني يمكن ان يعود إلى استخدام السكريات البسيطة كمصادر كاربونية للأوساط التركيبية كما أشار كل من (Lacroix وآخرون ،19852) وانعكست الحالة إذ ارتفع الرقم الهيدروجيني عند استخدام أوساط غذائية خاصة كوسط ناتج التحلل الحامض (Boa وLeDuy ،1984) ووسط مولاس البنجر السكري (Kassim و Sultan ،1997) .

تأثير الضوء في نمو الفطر *C. herbarum* وإنتاج السكر المتعدد في المزارع المهزوزة(الرج) :

بينت النتائج من (جدول1) بان الضوء ثبط إنتاج السكر المتعدد عنه في ظروف الظلام في حالة الرج وكانت هذه النتائج معنوية عند مستوى احتمال (0.01) إذ كان أقصى إنتاج للسكر المتعدد (2.8غم/لتر) في ظروف الظلام بعد 8 أيام من التحضين، أما المزارع المحضنة في الضوء فقد كان أقصى إنتاج للسكر المتعدد (1.01غم/لتر) بعد فترة التحضين نفسها . وكانت النسبة المئوية لإنتاج السكر المتعدد في ظروف الضوء اقل مما هي عليه في ظروف الظلام بحيث بلغت (5.05 و14.0%)على التوالي أما النسبة النوعية المئوية للسكر المتعدد في ظروف الضوء والظلام بلغت (83.47% و77.78%) على التوالي . أما فيما يتعلق بالكتلة الحيوية للفطر فقد كانت عالية في المزارع المحضنة في الظلام عنها في ظروف الضوء إذ تم الحصول على كتلة حيوية تحت ظروف الضوء والظلام بلغت (5.1 و9.8 غم/لتر) على التوالي بعد 8 أيام من التحضين ، بينما كان أقصى إنتاج للكتلة الحيوية في ظروف الضوء و الظلام بلغت (5.6 و 10.5 غم/لتر) على التوالي بعد 14 يوماً من التحضين . وهنا لوحظت زيادة استهلاك السكر في ظروف الظلام عنه في الضوء وكذلك للمزارع المهزوزة عنها في المستقرة مع زيادة إنتاج السكر المتعدد والكتلة الحيوية للفطر وانخفض الرقم الهيدروجيني النهائي للوسط الغذائي عن الرقم الهيدروجيني الأولي (6.5) وقد وصل الانخفاض إلى الرقم (5.12) في ظروف الضوء ، بينما بلغ (4.06) في ظروف الظلام بعد 14 يوماً من التحضين وكما في باقي التجارب الأخرى.

جدول (1) تأثير الضوء في نمو الفطر *C. herbarum* وانتاج السكر المتعدد في المزارع المستقرة والمهزوزة (الرج)

التحضين في الضوء في حالة السكون						التحضين في الظلام في حالة السكون					
الرقم الهيدروجيني النهائي Final PH	السكر المتبقي Resildual suger g/l	النسبة المئوية النوعية %	مجموع الكتلة الحيوية والسكر المتعدد & Biomass Polysaccharaide	النسبة المئوية لانتاج Yeild %	السكر المتعدد غم/لتر Poly saccharaide g/l	الكتلة الحيوية غم/لتر Biomass g/l	فترة التحضين (يوم)	الرقم الهيدروجيني النهائي Final PH	السكر المتبقي Resildual suger g/l	النسبة المئوية النوعية %	مجموع الكتلة الحيوية والسكر المتعدد & Biomass Polysaccharaide	النسبة المئوية لانتاج Yeild %	السكر المتعدد غم/لتر Poly saccharaide g/l	الكتلة الحيوية غم/لتر Biomass g/l	فترة التحضين (يوم)
5.03	17.39	88.49	4.52	2.6	b 0.52	4.0	5	5.01	18.03	94.14	5.63	1.65	c 0.33	5.3	5
4.71	16.62	88.91	6.04	3.35	a 0.67	5.37	8	4.90	17.24	88.23	8.5	5	a 1.0	7.5	8
4.60	17.02	93.71	7.15	2.25	ab 0.45	6.7	11	4.82	17.51	89.58	8.93	4.65	a 0.93	8.0	11
4.55	16.48	95.05	7.68	1.9	b 0.38	7.3	14	4.66	16.93	92.36	9.56	3.65	b 0.73	8.83	14
التحضين في الضوء في حالة الرج						التحضين في الظلام في حالة الرج									
5.12	12.37	86.74	6.32	3.6	c 0.72	5.6	14	4.06	13.85	91.22	11.51	5.05	d 1.01	10.5	14
5.61	13.21	83.80	6.37	4.35	b 0.87	5.5	11	4.82	14.22	84.49	11.8	9.15	c 1.83	9.97	11
5.92	13.42	83.47	6.11	5.05	a 1.01	5.1	8	5.33	14.83	77.78	12.6	14	a 2.8	9.8	8
6.26	16.88	91.67	4.8	2	d 0.40	4.4	5	6.01	15.42	79	9.05	9.5	b 1.9	7.15	5

• متوسطات المعاملات ذات الحرف المتشابهة لاتختلف فيما بينها معنويا عند مستوى احتمال 0.01 حسب اختبار دنكن متعدد المدى .

تأثير حجم الوسط الزرعي المنتخب في نمو الفطر *C. herbarum* وإنتاج السكر المتعدد:

لقد كانت كمية الوسط الغذائي الذي استخدم لتنمية الفطر *C. herbarum* لمتابعة السكر المتعدد وفي جميع التجارب السابقة بحجم (50) مل وزع في دوارق مخروطية حجم (250) مل وبهدف الحصول على كمية كبيرة من السكر المتعدد ولاستخدامها في التحليلات المختلفة فقد استخدم الوسط الغذائي المنتخب بحجم (150 و 200)مل وزعت في دوارق مخروطية حجم (500)مل ، وقد كان نمو الفطر متشابه ولم يختلف عما ظهر في التجارب السابقة جميعها إذ نمى الفطر بشكل مايسيليوم كثيف منتشر في الوسط وبشكل متجانس . كما انعكس النمو في الدوارق المخروطية على لزوجة الوسط وأصبحت المزرعة أكثر لزوجة وبشكل كبير عن التجارب السابقة وتعكس هذه الإنتاجية العالية للسكر المتعدد بالمشاهدة العينية . لقد تبين من متابعة نتائج هذه التجربة جدول (2) أن إنتاج السكر فاق ما تم الحصول عليه من أقصى كمية للسكر المتعدد في التجارب السابقة ، بحيث عند الحجم 150 مل بلغ إنتاجه (3.97 غم/لتر) والنسبة المئوية والنسبة النوعية للإنتاج بلغت(19.85 ،67.82%) على التوالي ،بينما بلغت الكتلة الحيوية (8.37 غم/لتر) . في حين بلغ إنتاج السكر المتعدد (4.58غم/لتر) والنسبة المئوية والنسبة المئوية النوعية للإنتاج بلغت (22.9%، 67.77%) على التوالي عند الحجم 200 مل ، وكان هناك أيضا زيادة في الكتلة الحيوية للفطر إذ بلغت (9.63غم/لتر) ، وانعكس الإنتاج العالي للسكر المتعدد بشكل ملحوظ على استهلاك كبير في المصدر الكاربوني (الكلوكوز) من الوسط الغذائي من خلال كمية السكر المتبقي إذ بلغت (4.88،6.96غم/لتر) عند الحجمين 150 و200 مل على التوالي . وكذلك الرقم الهيدروجيني النهائي انخفض كالعادة كما في جميع التجارب السابقة إذ بلغ(3.63،3.78) على التوالي عند الحجمين 150 ، 200 مل . إن هذه النتيجة المتميزة التي تم الحصول عليها من الإنتاج الزائد للسكر المتعدد تشير إلى أن زيادة حجم الوسط الغذائي أدى إلى زيادة انتشار خيوط الفطر في الوسط الغذائي بصورة متجانسة مما زاد من معدل التهوية وساعدت الفطر في اخذ المغذيات بسهولة من الوسط الغذائي نتيجة لتوفرها بصورة امثل عما في التجارب السابقة . ففي هذه الحالة كان نمو الفطر منتشراً ومتجانساً وانعكس ذلك في سهولة توزيع المغذيات والاوكسجين وبصورة متجانسة في الوسط الغذائي . وانعكس بالتالي على إنتاج السكر المتعدد العالي في هذه التجربة (النعيمي ،2001) .

جدول (2) تأثير حجم الوسط الزرعي المنتخب في نمو الفطر *C. herbarum* وإنتاج السكر المتعدد بعد 8 أيام من التحضين

حجم الوسط مل	الكتلة الحيوية غم / لتر Bio mass g / L	السكر المتعدد غم / لتر Poly saccharide g/L	النسبة المئوية للإنتاج Yeild%	مجموع الكتلة الحيوية والسكر المتعدد &poly Biomass saccharide	النسبة المئوية النوعية %	السكر المتبقي Residual sugur g / L	الرقم الهيدروجيني النهائي Final PH
150	8.37	3.97	19.85	12.34	67.82	6.96	3.63
200	9.63	4.58	22.9	14.21	67.77	4.88	3.87

تشخيص السكر المتعدد :

الصفات الفيزياوية Physical Properties

الدوران البصري النوعي Specific optical rotation :تبين من خلال قياس الدوران البصري النوعي لمحلول السكر المتعدد D/ α/ كانت (30) عند درجة حرارة (25)سيليزية إذ كان تركيز محلول السكر المتعدد (0.1%).

اللزوجة المحددة Intrinsic viscosity :كانت اللزوجة المحددة (الحقيقية)لمحلول السكر (1.5) كما في شكل (1) .

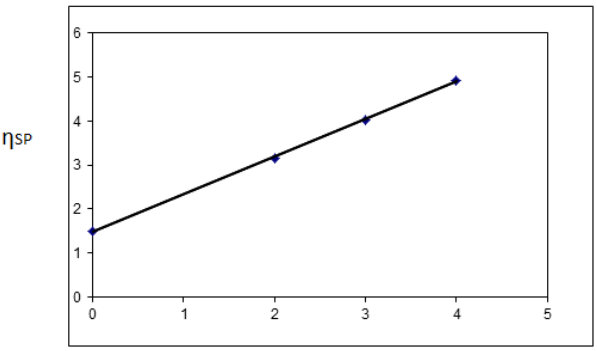
طيف الأشعة تحت الحمراء : لقد أوجد منظار طيف الأشعة تحت الحمراء توقعات مهمة في دراسة بنية السكريات ومن الأمثلة العديدة للامكانات الجديدة يمكن الإشارة لإمكانية تعيين الأشكال الانوميرية والترتيبات المحورية أو الأفقية للمجاميع التعويضية . كما أن طيف الأشعة تحت الحمراء حساس للتفاعل بين المجموعات , ومن الأمثلة الشائعة سلوك المجموعات الهيدروكسيلية بالنسبة إلى ذبذبات الامتصاص . (الركابي ومهدي ،1987) .

وبينت نتيجة التحليل بطيف الأشعة تحت الحمراء للسكر المتعدد [شكل(2)] وجود امتصاص عند (850سم−1) ،وعدم وجود امتصاص عند(890سم−1) وهذا يشير إلى أن السكر المنتج هو من نوع (ألفا α) وهذا يتفق مع ما أشار إليه(Barker و آخرون ،1956) .

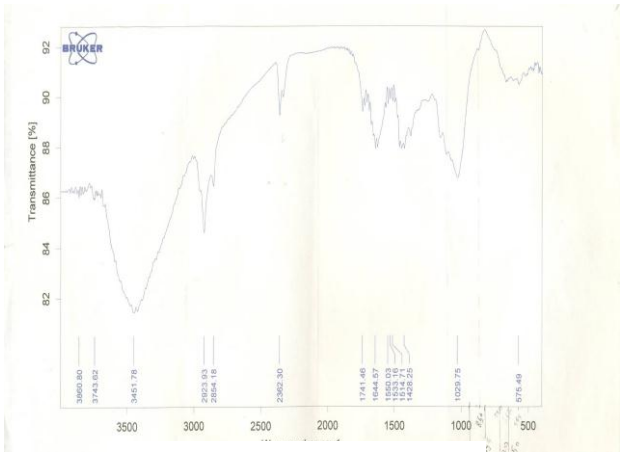
أن نتيجة الدوران البصري لعينة السكر المنتج من سلالة الفطر *C. herbarum* كما مبينة أعلاه هي (30) ، وكما مبين أيضا عن ظهور امتصاص في طيف الأشعة تحت الحمراء عند (850 سم−1) يعطي دلالة قطعية على أن السكر المتعدد المنتج من قبل هذه العزلة هو من نوع (α) .

تحديد التركيب السكري للمنتوج (السكر المتعدد)

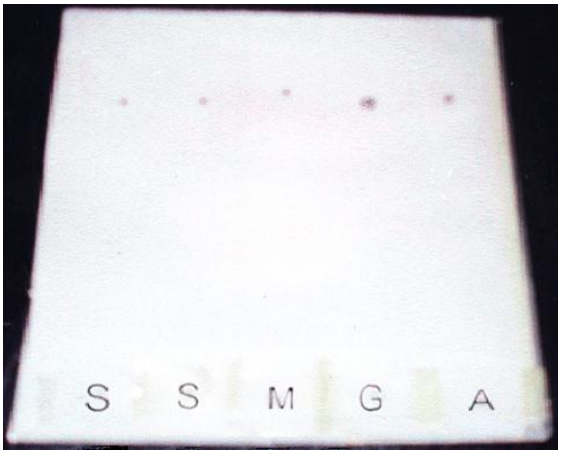
بينت نتائج التحليل الحامضي التي أجريت على السكر المتعدد المنتج من الفطر *C. herbarum* وباستخدام تقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin layer Chromatography (TLC) . أن الوحدات السكرية المكونة للسكر المتعدد المنتج هي عبارة عن وحدات الكلوكوز ، حيث تساوت المسافة النسبية Relatave Front (RF) على طبقة (TLC) مع المسافة النسبية للهجرة مع الكلوكوز القياسي وهذا ما يلاحظ خلال الشكل (3) .



شكل (1) قياس اللزوجة المحددة
Interinsic Viscosity



شكل (2) طيف الأشعة تحت الحمراء
(IR) للسكر المتعدد المنتج



شكل (3) كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) للسكر المتعدد المنتج

المصادر

احمد،محمد علي (1999) . عالم الفطريات . الدار العربية للنشر والتوزيع .

البوني، عبد العزيز محمد (1990) . أساسيات الفطريات العملي . جامعة الفاتح . طرابلس . ليبيا .

دنحا ، رياض والخزرجي ،طالب عويد (1990) تغذية و علم وظائف الفطريات ، مطابع التعليم العالي في الموصل /العراق .

الركابي، كامل حمود ومهدي،جاسم غالب(1987) . كيمياء الكربوهيدرات مع التركيز على الكيمياء الحيوية . مطابع جامعة صلاح الدين .

النعيمي ،عبد الكريم سليمان حسن سيدان (2001) .ظروف إنتاج وتوصيف السكر المتعدد (السكليروكلوكان) من إحدى عزلات الفطر *Sclerotium rolfsii* . اطروحة دكتوراه /كلية التربية /جامعة الموصل . 129 ص .

Barker, S. A. ; E. J. Bourne and D. H. Whiffen (1956). Use of infrared analysis in determination of carbohydrate structure Methods of Biochem. Analysis . 3 : 213-216 .

Boa, J. M. and LeDuy (1984). Peat hydrolyzate medium optimization for pullulan production Appl. Environ. Microbiol. , 48: 26-30.

De Vuyst, L. and B. Degeest (1999) . Heteropolysaccharides from lactic acid Bacteria . FEMS. Microbiol . Rev .23 : 153-356.

Ellis, M. B. (1971). Dematiaceous hyphomycetes. Common wealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England . U.K.

Farina, J. I., F. Sineriz., O. E. Molina, and N. I. Perotti. (2001) . Isolation and polysicochemical characterization of soluble scleroglucan from *Sclerotium rolfsii* . Rheological Properties, molecular weight and conformational characteristics. Carbohydr. Polym. 44: 41-50.

John, E. S., (2004). Biotechnology . appl. Microbiol. 226-227.

Karin, B. ; V. Langendorff and P. Boulenguer (2000) . Xanthan http://www.wiley-rch.de/books/biopoly/pdf vol 5/b pol 5011-259-269.

Kassim, M. B. I., C. Balis and M. polyssiou (1987). Isolation and Partial characterization of an extracellular D-glucan from *Cercospora beticola* Presented to the Third Panhellenic Conference of Biolgy and Production . Athens 7-10 October Greece.

Kassim , M. B. I. and R. H. Sultan (1997) . Pullulan Production from Sugar beet molasses . Qatar University. Sci. J. 17 : 313-320.

Lacroix. C., A. LeDuy ; G. Noil and L. Choplin (1985). effect of pH on The batch fermentation of pullulan from Sucrose medium Biotechnol. Bioeng. 927 : 202-207 .

Lynch, I. J. (1975). The variation, regulation and siginificance of Toxin synthesis in the genus Cercospora with particular Refrence to *Cercospora beticola*. Ph.D. Thesis, National University of Ireland, Dublin . U. K. Cited from Ref. No. 83 .

Miyazaki, T. and Y. Noi (1975).Extracellular Heteroglycan of *Cladosporium tricoides*. Studies on fungul polysaccharide Chem.Bull.23: 157-162 .

Pitt , J.I. and Hocking, A.D. 1985 . Fungi and food spoilage Academic Press, London.

Rau, U. (2004) . Glucans secreted by fungi .Turkish Electronic Journal of Biotechnology . Vol 2,P:30-36 .

Sutherland ,I. W. and D.C. Elwood (1979) . Microbial Polysaccharides ,Industrial Polymers of current and future prospect 107-150 .Baal, A. T Elwood, D.C.and Ratledge. C.EDS., Cambrige University Press U. K.