- - - - مجلة علوم الرافدين، المجلد 19، العدد 3، ص 97-103، 2008 - - - -

تاثير عدة حوامض امينية كمصادر نيتروجينية على انتاج السكر المتعدد (البوليولان) بوساطة الفطر *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023

شمال يونس عبد الهادي

قسم علوم الحياة

كلية التربية

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام2002/6/15 ؛ تاريخ القبول 2002/10/1)

الملخص

درس تاثير عدة حوامض امينية كمصادر نيتروجينية في وسط تركيبي اساس على انتاج البوليولان بوساطة الفطر *Aureobasidium pullulan*s ATCC 42023. اظهرت النتـائج ان الحـامض الامينـي الكلايسين كان الاحسن من بين الاحماض الامينية التي اختبرت كمصادر نيتروجينية فـي تحفيـز انتـاج البوليولان. اقصى انتاج للبوليولان (21.16) غم/لتر تم الحصول عليه عند اسـتخدام الوسـط التركيبـي الاساس المجهز بـ 0.05% كلايسين كمصدر نيتروجيني.

Effect of Different Amino Acids as Nitrogen Sources on Polysaccharide Production (Pullulan) By *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023

Shimal y. Abdul – Hadi

Department of Biology

College of Education

Mosul University

ABSTRACT

The effect of different amino acids as nitrogen sources in a basal synthetic medium on the production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023 was investigated. The results showed that glycine was the best nitrogen source among anthor amino acids tested in stimulating pullulan production . Maximum production of pullulan (21.16) g/L was obtained when basal synthetic supplements with 0.05% glycin as a nitrogen source.

المقدمة

يمثل السكر المتعدد البوليولان احد انواع السكريات المتعددة الخارج خلوية الذي ينتج من قبل الفطر شبيه الخميرة *Aureobasidium pullulans*. والبوليولان عبارة عن سلسلة خطية من وحدات المالتوترايوز Maltrtriose ثلاث وحدات من سكر الكلوكوز مرتبطة مع بعضها بالاصرة الكلايكوسيدية (1–4) وترتبط وحدات المالتوترايوز مع بعضها بالاصرة الكلايكوسيدية (1–6), (Bouveng *et al.*, 1962 ; Catley, 1971 ; Whellan and Catley, 1971). للبوليولان استخدامات متعددة في المجالات الصناعية والطبية بسبب خواصه الكيميائية والفيزيائية الجيدة (Whellan *et al.*, 1965) حيث يستخدم كمثبت ومثخن في الصناعات الغذائية وكذلك في تحضير الرقائق وبعض المركبات الدوائية (; Yamaya *et al.*, 1990 ; Sunamoto and Yamaguchi, 1991 Gibbs and Seviuor, 1996).

ينتج البوليولان من سلالات مختلفة للفطر *A. Pullulans* كما ان هناك اختلاف واضح في كمية انتاج هذا السكر المتعدد بحسب سلالة الفطر المستخدمة (Sandford, 1979). يستطيع هذا الفطر *A. Pullulans* من النمو وانتاج البوليولان في مدى واسع من المركبات الكاربوهيدراتية كالسكريات الاحادية والثنائية والسكريات المتعددة عند استخدامها كمصادر كاربونية (; Bouveng *et al.*, 1962 Behrens and Lohse, 1977). كما تم تحضير اوساط خاصة لتنمية الفطر وانتاج البوليولان مثل وسط مولاس البنجر السكري (Kassim and Sultan, 1997) ونواتج التحلل الحامضي للخث (LeDuy and Boa, 1983) ومستخلص قرنات الخرنوب (Roukas and Billiaderis, 1995).

في اكثر البحوث التي درست انتاج البوليولان من الفطر *A. Pullulans* استخدمت كبريتات الامونيوم كمصدر نيتروجيني في الوسط الغذائي ولا توجد أي دراسة في استخدام انواع مختلفة من الحوامض الامينية كمصادر نيتروجينية في الاوساط المحضرة لانتاج البوليولان. وعلى هذا الاساس فقد تم استخدام انواع مختلفة من حوامض امينية معينة ودراسة تاثير هذه الحوامض الامينية على انتاج البوليولان.

المواد وطرائق العمل

الفطر:-

استخدم الفطر *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023 تم حفظ الفطر على وسط اكار البطاطا والدكستروز Potato Dextrose Agar (PDA) بشكل مائل داخل انابيب اختبار Slants في الثلاجة بدرجة 4 سيليزية. تم تنشيط الفطر وذلك باعادة زراعته كل اسبوعين.

الاوساط والظروف الزرعية:-

استخدم الوسط القياسي (Ono *et al.*, 1977) كوسط لتحضير لقاح الفطر وايضا كوسط لانتاج السكر المتعدد البوليولان. يتكون هذا الوسط من كل مما ياتي, غم/لتر:-

50 سكروز, 5 K_2HPO_4, 1 NaCL, 0.2 $MgSO_4 .7H_2O$ و2.5 مستخلص الخميرة. ضبط الرقم الهيدروجيني عند 6.5.

تم تحضير لقاح الفطر وذلك باخذ جزء من مستعمرة الفطر النامية على وسط (PDA) بعمر اسبوع الى دورق مخروطي يحتوي 50 مل من الوسط القياسي المعقم وتم تحضينه لمدة 5 ايام في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 28 ± 1 سيليزية وبمعدل رج 200 دورة/دقيقة. لتحديد انتاجية البوليولان حضر الوسط القياسي كما في اعلاه ووزع في دوارق مخروطية سعة 250 مل بمعدل 50 مل/دورق. عقمت الدوارق في المؤصدة عند ضغط 1 جو ودرجة حرارة 121 سيليزية لمدة 20 دقيقة. بعد التعقيم لقحت الدوارق بلقاح الفطر بمعدل 2%. حضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 28 ± 1 سيليزية وبمعدل رج 200 دورة/دقيقة لفترة زمنية محددة.

وتم الاستعاضة بالمصدر النتروجيني كبريتات الامونيوم $(NH4)_2 SO_4$ بانواع مختلفة من الحوامض الامينية والتي اضيفت بتراكيز لنفس المحتوى النتروجيني لكبريتات الامونيوم المضاف الى الوسط القياسي.

طرائق التحليل:

بعد قياس الرقم الهيدروجيني النهائي للمزارع, عزلت خلايا الفطر من المزرعة باستخدام جهاز النبذ المركزي عند 6000 دورة/دقيقة ولمدة 20 دقيقة وبعد ذلك جففت الخلايا في الفرن عند 80 درجة سيليزية لمدة 24 ساعة ثم تم تحديد وزن الخلايا باستخدام الميزان الحساس. وبالنسبة للسكر المتعدد البوليولان فقد تم ترسيبه من راشح المزرعة بعد عزل خلايا الفطر باضافة حجمين من الايثانول او الاسيتون وعزل البوليولان باستخدام النبذ المركزي عند 9000 دورة/دقيقة ثم جفف البوليولان في الفرن الكهربائي عند درجة حرارة 60 سيليزية لمدة 24 ساعة. تم تحديد السكر المتبقي في المزارع بعد انتهاء فترة الحضانة بطريقة الفينول وحامض الكبريتيك (Dubois *et al.*, 1956) باستخدام الكلوكوز كسكر قياسي.

النتائج والمناقشة

1- تاثير انواع مختلفة من الحوامض الامينية كمصادر نيتروجينية:-

لغرض اختبار تاثير عدة انواع من الحوامض الامينية كمصادر نيتروجينية على انتاج البوليولان زرع الفطر *A. Pullulans* ATCC 42023 في الوسط القياسي واضيفت الحوامض الامينية كل على

حدة بتركيز نيتروجين لنفس المحتوى في 0.6, $(NH4)_2$ SO4). الحـوامض الاميني ـة المسـتخدمة هـي غـ ـم/لتـ ـر:- Glysin (0.5), Serine (0.95), Asparatic acid (1.2), Glutamic acid (1.33), Arginin (0.34), Phenylalanine (1.45), Cysteine (1.09).

بينت نتائج الجدول (1) ان الحوامض الامينية المستخدمة تباينت في دعمها لانتاج البوليولان وقد تم الحصول على اعلى انتاجية للبوليولان باستخدام الحامض الاميني الكلايسين كمصدر نيتروجينـي حيـث كانت كتلة البوليولان (21.10) غم/لتر بعد خمسة ايام من التحضين. وكان حامض الكلوتاميك في المرتبة الثانية في دعمه لانتاج البوليولان حيث تم الحصول على (15.30) غم/لتر بعد نفس فترة الحضانة. بينما تم الحصول على اقل انتاجية للبوليولان عند استخدام الحامض الاميني السستين كمصدر نيتروجيني (5.0) غم/لتر. انتاج الكتلة الحيوية كان موازيا لانتاج البوليولان ففي الوقت الذي كان انتاج البوليولان في اقصاه كان هناك انتاجية عالية من الكتلة الحيوية للفطر وعلى هذا الاساس فقد تم الحصول على اقصى انتاجيـة للكتلة الحيوية (16.5) غم/لتر عند استخدام الحامض الاميني الكلايسين. وكانت الصـورة نفسـها عنـد استخدام حامض الكلوتاميك كمصدرا نيتروجينيا فيما تباينت انتاجية الكتلة الحيوية عند استخدام الحوامض الامينية الاخرى. استهلاك السكر خلال فترة التخمير كان موازيا بدرجة كبيرة لانتاج البوليولان والكتلـة الحيوية حيث كان هناك استهلاكا عاليا من السكر انعكس على الكمية الضيئلة للسكر المتبقي بعـد فتـرة التحضين في المزارع التي تم الحصول فيها على انتاجية عالية لكل من البوليولان والكتلة الحيوية. الرقم الهيدروجيني النهائي انخفض بشكل واضح جدا عن الرقم الهيدروجيني الاولي (6.5) ولجميـع المـزارع التي استخدمت فيها الحوامض الامينية المختلفة كمصادر نيتروجينية. ويمكن ان يعزى هذا الانخفاض في الرقم الهيدروجيني بعد انتهاء فترة التخمير الى تراكم الحوامض العضوية في سـائل التخميـر كنتيجـة للفعاليات الايضية المختلفة. ان انخفاض الرقم الهيدروجيني النهائي عـن الـرقم الهيـدروجيني الاولـي معـروف جـدا بالنسـبة للفطـر *A. Pullulans* وخاصـة عنـد اسـتخدام الاوسـاط القياسـية (Lacroix *et al.*, 1985). ان الانتاجية العالية من البوليولان عند استخدام الحامض الاميني الكلوتاميـك كانت متقاربة بشكل كبير الى ما تم الحصول عليه من قبـل (Seviour and Kristiansen, 1983). امـا بالنسبة للانتاجية القصوى من البوليولان والتي تم الحصول عليها عند استخدام الحامض الاميني الكلايسين (21.10) غم/لتر قد تفسر الى ان هذا الحامض كان افضل من الحامض الاميني الكلوتاميك فـي تنشـيط وتحفيز المسارات الايضية الخاصة بانتاج البوليولان. وعلى هذا الاساس فقد تم اختيار الحامض الامينـي الكلايسين كمصدر نيتروجيني في التجربة اللاحقة.

2- تاثير تراكيز مختلفة من الحامض الاميني الكلايسين:-

اعتمد المصدر النيتروجيني الكلايسين بموجب نتائج التجربـة السـابقة بوصـفه احسـن مصـدر نيتروجيني لدعم انتاجية البوليولان وقد تم استخدام عدة تراكيز من هذا الحامض لغرض تحديـد افضـل

تركيز منه لادعم انتاجية عالية من البوليولان. بينت نتائج الجدول (2) ان اقصى انتاجية للبوليولان والكتلة الحيوية (21.16 و17.2) غم/لتر على التوالي تم الحصول عليها عند استخدام الكلايسين بتركيـز (0.5) غم/لتر من الوسط. فيما ان التراكيز الواطئة والعالية من الكلايسين (0.2 و0.7) غم/لتر لم تدعم او كانت مثبطة لكل من انتاج البوليولان والكتلة الحيوية. وقد يكون السبب في هذا ان التركيز الواطئ من المصدر النيتروجيني كان غير كافيا لادعم انتاجية عالية من البوليولان والكتلة الحيوية. في حين كان التركيز العالي من الكلايسين (0.7) غم/لتر مثبط لكل من البوليولان والكتلة الحيوية. استهلاك السكر في الوسط الغذائي كان انعكاسا لانتاج البوليولان والكتلة الحيوية ففي الوقت الذي كان هناك انتاجية عالية مـن البوليـولان والكتلة الحيوية كان هناك استهلاكا عاليا للسكر. وعلى العكس من ذلك كان استهلاك السـكر قلـيلا فـي المزارع التي كان فيها انتاجية واطئة من البوليولان والكتلة الحيوية. الرقم الهيدروجيني النهائي كالمعتـاد انخفض عن الرقم الهيدروجيني الاولي (6.5) ولجميع المزارع والتي قد يكون بسبب تـراكم الحـوامض العضوية خلال فترة التخمير. من النتائج اعلاه يبدو ان الحامض الاميني الكلايسين عنـد تركيـز (0.5) غم/لتر افضل حامض اميني (كمصدر نيتروجيني) لادعم انتاجية عالية من البوليولان.

الجدول 1: تاثير انواع مختلفة من الحوامض الامينية على نمـو الفطـر *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023 وانتاج البوليولان بعد 5 ايام من التحضين.

الاحماض الامينية	PH النهائي	الكتلة الحيوية غم/لتر	السكر المتبقي غم/لتر	البوليولان غم/لتر
مقارنة	(0.03) 3.82	(0.18) 9.1	(0.00) 3.54	(0.53) 10.0
Arginine	(0.72) 4.06	(0.03) 12.48	(0.07) 3.13	(0.42) 8.44
Asparatic acid	(1.01) 2.25	(0.14) 11.68	(0.28) 20 .3	(0.02) 11.58
Cysteine	(0.01) 3.08	(1.01) 12.0	(0.06) 8.48	(42 . 1) 5.00
Glutamic acid	(0.03) 3.21	(0.14) 14.84	(0.21)3.67	(0.12) 10 .21
Glysin	(0.17) 4.02	(0.02) 16.5	(0.06)1.20	(0.12) 21.10
Phenylalanine	(1.21) 4.23	(0.26) 10.43	(0.50) 2.21	(0.12) 8.65
Serin	(0.07) 3.81	(0.05) 14.5	(1.20) 2.55	(0.82) 12.07

كل قيمة هي معدل لثلاثة مكررات. اما الارقام بين القوسين فتمثل الانحراف المعياري (S.D).

الجدول 2: تاثير تراكيز مختلفة من الكلايسين على نمو الفطر Aureobasidium pullulans ATCC 42023 وانتاج البوليولان بعد 5 ايام من التحضين.

التركيز غم/لتر	PH النهائي	الكتلة الحيوية غم/لتر	السكر المتبقي غم/لتر	البوليولان غم/لتر
0.2	(0.03) 5.92	(0.70) 10.51	(0.00) 4.74	(0.17) 6.33
0.3	(0.07) 5.68	(0.62) 11.52	(0.92) 3.83	(0.32) 6.98
0.4	(1.02) 4.31	(0.02) 13.85	(0.16) 2.94	(0.50) 10.05
0.5	(0.00) 4.09	(0.55) 17.20	(0.73) 1.14	(0.02) 21.16
0.6	(0.62) 3.76	(0.21) 15.64	(0.11) 1.36	(0.45) 19.15
0.7	(1.10) 2.23	(0.06) 11.27	(0.42) 4.28	(0.28) 6.23

كل قيمة هي معدل لثلاثة مكررات. اما الارقام بين القوسين فتمثل الانحراف المعياري (S.D).

المصادر الأجنبية

Bouveng, H.O.; H. Kielling; B. Linberg, and J. Mckay. 1962. Polysaccharides elaborated by *Pullularia pullulans*. Part I the neutral glucan synthesised from sucrose solution. Acta. Chem. Scand., 16: pp.615-622.

Behrens, U., and R. Lohse, 1977. Untersuchungen zur enzeugung von pullulan. Die. Nahrung., 3: pp.199-204.

Catley, B.J., 1971. Utilization of carbon sources by *Pullularia pullulans* for the elaboration of extracellular polysaccharides. Appl. Microbiol., 22: pp.641-649.

Catley, B.J., and W.J. Whelan, 1971. Observation on the structure of pullulan. Arch. Biochem. Biopgy., 14: pp.138-142.

Dubois, M.K.; A. gilles; J.K. hamilton; P.A. Robers, and F. Smith, 1956. Colorimetric method for the determination of sugar. Anal. Chem., 28: pp.350 – 356.

Gibbs, P.A., and R.J. Seviour, 1996. Pullulan in polysaccharides in Medicinal Applications, Edited by Dumitriu, S. P. 59, Marcel. Inc. New York.

Kassim, M.B., and R.H. Sultan, 1997. Pullulan production from sugar beet molasses. Qatar Univ. J. Sci., 17 (2): pp.313-320.

Lacroix, C.; A. LeDuy; G. Noel, and N. Choplin, 1985. Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium. biotechnol. Bioeng., 27: pp.202-207.

LeDuy, A., and J.A. Boa, 1983. Pullulan production from peat hydrolysate. can. J. Microbiol., 29: pp.143-146.

Ono, K.; N. yassuda, and S. Ueda, 1977. Effect of pH on pullulan elaboration by *Aureobasidium pullulans*. S-I. Agric. Biol. Chem., 41: pp.2113-2118.

Roukas, T., and C.G. Billiadris, 1995. Evalution of carb pods as a substrats for pullulan production by *Aureobasidium pullulans.* Appl. Biochem. Biotech. 55: pp.27-30.

Sandford, P.A., 1979. Exocellular. Microbial polysaccharides, Adv. carb. Chem. Biochem., 36: pp.265-270.

Seviour, R.J., and B. Kristiansen, 1983. Effect of ammonium ion concentration of by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. Eur. J. Appl. Biotechnol., 17: pp.178-181.

Whellan, L.L.; R.A. Rhodes, and H.R. Shulke, 1965. physical properties and chemical composition of B- glucans from fleshy fungi., Appl. Microbiol., pp.272-278.

Yamaguchi, S., and J. Sunamoto, 1991. Fatty emulsion stabilized by a polysaccharide derivative, U. S. Patent., 4: pp.819-822.

Yamaya, S.; A. Yamamoto; T. Komiya; Mizuguchi, and T. Matuhasi, 1990. Preparation of a diptberia toxin – pullulan conjugate that elicits good IgG antibody production with poor IgG synthesis, vaccine., 8: pp.65-70.