التحري عن عزلة منتجة لأنزيمات اللايبيز من الفطريات النامية على ثمار الزيتون

زكريا سامي عبد الرزاق رياض خليل البرهاوي

قسم علوم الحياة - كلية العلوم

جمهورية العراق- جامعة الموصل

تاريخ الاستلام 2005/9/25 تاريخ القبول 2006/3/7

Summary

Several fungi were isolated from infected olive fruits. The isolates fell into seven genera *Aspergillus, Cladosporium, Penicillium, Phoma, Rhizoctonia, Rhizopus, Stemphylium.* The efficiency of these isolates to produce lipases was tested on solid media containing Tween 80 or Tributyrin. Similar results were obtained from both tests. Isolates of the species *Aspergillus niger* gave the highest production of the enzyme.

الخلاصة

تم عزل الفطريات المصاحبة لثمار الزيتون وظهر العديد من الانواع الفطرية من اجزاء الثمار وتمثلت بسبعة اجناس هي:

Aspergillus, Cladosporium, Penicillium, Phoma, Rhizoctonia, Rhizopus, Stemphylium.

تم التعرف على كفاءة الفطريات المعزولة وقدرتها على افراز انزيم اللايبيز واستخدمت طريقة الاوساط الصلبة لهذا الغرض وتم الكشف بواسطة تحلل مادة Tween 80 وتحلل ثلاثي البيوترين Tributyrin كلا على حدة وكانت للطريقتين نتائج متماثلة واتضح ان عزلة الفطر (2) *Aspergillus niger* حققت أعلى معدل للنمو وافضل افراز لأنزيم اللايبيز.

المقدمة

للانزيمات أهمية كبيرة في العمليات التصنيعية المختلفة (1) وتستخلص الانزيمات بكميات كبيرة من المصادر الميكروبية لمقدرتها على افراز عدد كبير من الانزيمات ولإمكان تكاثرها بسرعة وسهولة وتفرز معظم الانزيمات ذوات الاهمية التجارية خارج الخلايا (وسط النمو) وتعد الفطريات مصدراً متميزاً لانتاج الانزيمات (2،3).

حضيت انزيمات اللايبيز Lipases بأهتمام كبير في الاونة الأخيرة وذلك للدور الذي تؤديه في العديد من المجالات واهمها الصناعات الغذائية (4) والصناعات الجلدية (5) وتستخدم بوصفها موادا مساعدة على الهضم كما تستخدم للتحري عن Tri acyl Glycerol (TAG) الموجودة في الدم فضلا عن انها تستخدم في بناء استرات لمركبات كيمياوية مختلفة، وتدخل في صناعة مستحضرات التجميل بشكل عموما بسبب مقدرتها على ازالة الشحوم (6).

وتنتج اللايبيزات من قبل العديد من الفطريات
Geotrichum candidum, Aspergillus niger, Rhizopus arrhizus, Mucor spp., Penicillium spp. أما الخمائر المنتجة للايبيز فتتمثل في انواع متعددة من جنس *Candida,Torulopsis* أما البكتريا فتشمل على نحو رئيس الاجناس , *Staphylococcus, Achromobacter, Pseudomonas, Bacillus,* (7،8) .

تم اختيرت ثمار الزيتون بوصفها مصدراً لعزل الفطريات المنتجة للايبيز لاحتوائها على كميات من الزيت ترجح احتمال قدرة الفطريلت المصاحبة لها على افراز اللايبيز بكميات كبيرة لذا تهدف الدراسة الى اختبار قابلية الفطريات المعزولة من ثمار الزيتون على افراز أنزيم اللايبيز واختيار عزلة محلية كفوءة في انتاجها لهذا الانزيم.

المواد وطرائق العمل

1- عزل الفطريات المصاحبة لثمار الزيتون وتشخيصها. بعد جمع ثمار الزيتون المتساقطة على التربة تلك التي ظهرت عليها اعراض الاصابة غسلت بالماء للتخلص من الشوائب ثم عُقمت الاجزاء المصابة بمحلول هايبوكلورات الصوديوم (NaOCl 1%) مدة دقيقة واحدة وفي ظروف معقمة ثم غُسلت القطع بالماء المقطر المعقم ووزعت على اطباق بتري حاوية لوسط اكار، بطاطا، وسكروز(9) (PSA) المعقم والمضاف اليه المضاد الحيوي Streptomycin (100 جزء بالمليون) وحضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة

حرارة (28 ± 1) م مدة 7 ايام. بعد التحضين استخدمت طريقة السبور المفرد للحصول على انواع نقية من العزلات ثم شخصت الفطريات بالاستعانة بطريقة Slide Culture التي وصفها (10) وبالاعتماد على المفاتيح التصنيفية التي وردت في المصادر الاتية (11،12،13).

2- ظروف حفظ العزلات: حُفظت العزلات على وسط (PSA) داخل قنان زجاجية ويشكل مائل في ثلاجة بدرجة حرارة 5 م واستخدم هذا الوسط كذلك لعزل الفطريات وتشخيصها وتنشيطها. نشطت العزلات الفطرية بأعادة زراعتها على وسط (PSA) كل اسبوعين وحضنت عند درجة (28± 1) م لمدة اسبوع.

3- اختبار نقاوة المزرعة: اختبرت نقاوة المزرعة وخلوها من الكائنات الملوثة بملاحظة النمو على الوسط الزرعي واعتماد الشكل الظاهري للمستعمرة واجراء الفحص المجهري قبل البدء بكل تجربة.

4- دراسة النشاط الانزيمي للفطريات المعزولة:

أ. اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل (Sierra 1957) (14) للكشف عن افراز انزيم اللايبيز بواسطة تحلل المادة Tween 80 .

ب. اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل (15) للكشف عن افراز انزيم اللايبيز بأستخدام طريقة تحلل المادة Tributyrin .

النتائج والمناقشة

عزلت الفطريات المصاحبة لثمار الزيتون وظهر عدد من الانواع الفطرية من اجزاء الثمار تمثلت بسبعة اجناس وتضمن قسم منها انواعا مختلفة وعزلات تعود للنوع نفسه حيث كان من بين العزلات الفطرية (5) عزلات تابعة للجنس *Aspergillus* و(3) منها تعود للنوع *Aspergillus niger* وعزلة للنوع *spergillus flavus* وعزلة للنوع *Aspergillus fumigatus* كما ظهرت عزلتان للنوع *Rhizopus stolonifer* وعزلتان للجنس *Stemphylium sp* وعزلة واحدة للجنس *Phoma sp* كما موضح في الجدول (1)

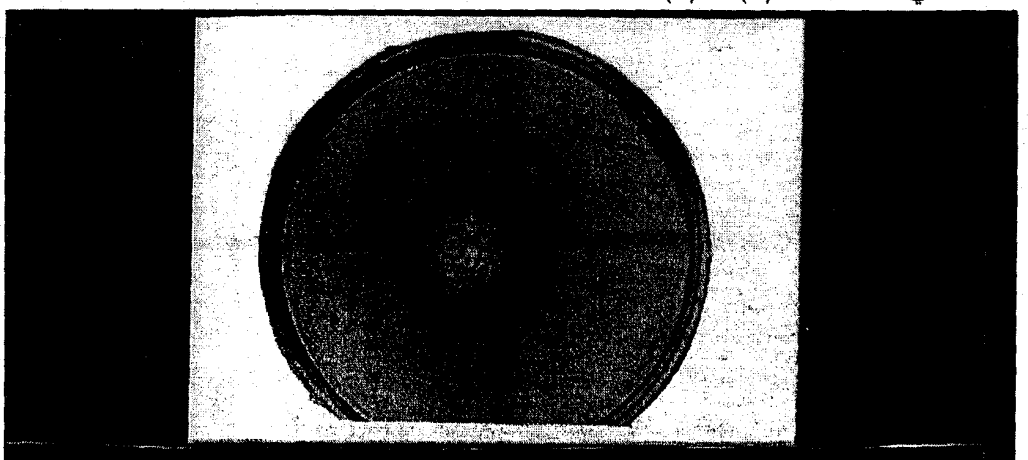
الجدول (1): الفطريات المعزولة من ثمار الزيتون على وسط اكار البطاطا والسكروز (PSA)

الفطريات	العدد	النسبة المئوية للعزل
Aspergillus flavus	4	7.017
Aspergillus fumigatus	3	5.263
Aspergillus niger (1)	8	14.035
Aspergillus niger (2)	7	12.280
Aspergillus niger (3)	9	15.789
Cladosporium cladosporoides	2	3.508
Penicillium spp.	4	7.017
Phoma sp.	3	5.263
Rhizoctonia solani	4	7.017
Rhizopus stolonifer (1)	5	8.771
Rhizopus stolonifer (2)	3	5.263
Stemphylium sp. (1)	3	5.263
Stemphylium (2)	2	3.508
المجموع	57	99.994

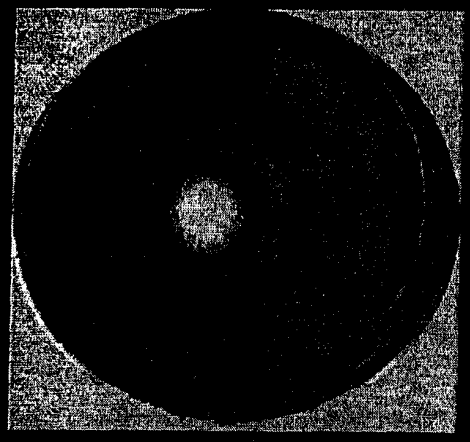
يبين الجدول (2) كفاءة الفطريات المعزولة على افراز انزيم اللايبيز بواسطة تحلل مادة Tween 80 اذ ان المستعمرة النامية في هذا الوسط تحلل مادة Tween 80 ويتكون راسب ابيض حول المستعمرة النامية وتحتها نتيجة تكوين ملح الكالسيوم لحامض الاوليك وذلك دليل على افراز اللايبيز فكلما ازداد قطر هالة التحلل ازداد تركيز اللايبيز المفرز. كما ان الفطريات النامية على الوسط الحاوي Tributyrin تتمكن من ازالة عتمة الوسط الناتجة عن وجود قطيرات من هذه المادة وتحرير حامض البيوترك الذائب بالماء فكلما ازداد قطر هالة التحلل دلّ ذلك على زيادة تركيز اللايبيز المفرز.

ويتضح من هذا الجدول ان النتائج كانت متماثلة لكلتا الطريقتين، وان عزلة الفطر *Aspergillus niger* تميزت في نشاطها الانزيمي وفي قدرتها على النمو على كلا الوسطين واختلفت هذه العزلة ايجابياً عن قريناتها من انواعها وبقية انواع الاجناس الاخرى وكانت الاكفأ في افراز انزيم اللابيز.

ويتضح كذلك ان العزلات الفطرية جميعا اعطت كشفاً موجباً لانزيم اللايبيزفقد ذكر (16) ان انزيم اللايبيز ينتج في معظم انواع الفطريات وقد تباينت قدرة هذه العزلات (عدا عزلة الفطر*Aspergillus niger (2)*) على افراز انزيم اللايبيز بين متوسطة وضعيفة، وكما ملاحظ في الصورتين (1) و (2) أظهرت



الصورة (1) إفراز عزلة الفطر *Aspergillus niger (2)* لأنزيم اللايبيز وظهور الراسب الأبيض حول المستعمرة الفطرية النامية على وسط تحلل Tween 80



الصورة (2) إفراز عزلة الفطر *Aspergillus niger (2)* لأنزيم اللايبيز وظهور المنطقة الرائقة حول المستعمرة الفطرية النامية على وسط تحلل Tributyrin

عزلة الفطر (2) *Aspergillus niger* اظهرت افضل نشاط انزيمي في كفاءتها في افراز انزيم اللايبيز بأستخدام Tween 80 وكانت كفائتها في افراز انزيم اللايبيز= 1.65 بأستخدام وسط تحلل ثلاثي البيوترين Tributyrin، اما العزلات *Aspergillus fumigatus* و(3) *Aspergillus niger* و*Rhizoctonia solani* و (1) *Rhizopus stolonifer* و (2)، (1) *Stemphylium* فقد اظهرت نشاطاً متوسطاً بأستخدام وسط تحلل Tween 80 وكانت كفاءتها على الافراز انزيم اللايبيز (1.21,1.41,1.38,1.36,1.345,1.32) على التوالي بأستخدام وسط تحلل Tributyrin اما العزلات *Aspergillus flavus Aspergillus*, *niger(1)* , *Cladosporium cladosporoides* , *Phoma sp.* *Penicillium spp* , *Rhizopus stolonifer(2)* فقد اظهرت نشاطاً انزيمياً ضعيفاً بأستخدام وسط تحلل Tween 80 وكانت كفاءتها في الافراز قليلة بأستخدام وسط تحلل Tributyrin مقارنة ببقية العزلات الفطرية. وبصورة عامة يمكن القول أن كفاءة الفطريات على افراز انزيم اللايبيز كانت متشابهة الى حد كبير عند استخدام كلا الوسطين.

الجدول (2) : كفاءة الفطريات المعزولة من ثمار الزيتون على افراز انزيم اللايبيز

الفطريات	*كفاءة الفطريات على افراز انزيم اللايبيز	
	باستخدام وسط تحلل Tween80	باستخدام وسط تحلل Tributyrin
Aspergillus flavus	0.02±1.03 جـ	0.01±1.01 جـ
Aspergillus fumigatus	0.04±1.26 ب	0.05±1.32 ب
Aspergillus niger (1)	0.02±1.03 جـ	0.02±1.12 جـ
Aspergillus niger (2)	0.10±1.73 أ	0.15±1.65 أ
Aspergillus niger (3)	0.07±1.30 ب	0.04±1.34 ب
Cladosporium cladosporoides	0.01±1.05 جـ	0.02±1.06 جـ
Penicillium spp.	0.02±1.03 جـ	0.01±1.02 جـ
Phoma sp.	0.02±1.03 جـ	0.02±1.03 جـ
Rhizoctonia solani	0.05±1.30 ب	0.06±1.36 ب
Rhizopus stolonifer (1)	0.06±1.31 ب	0.05±1.38 ب
Rhizopus stolonifer (2)	0.02±1.04 جـ	0.02±1.07 جـ
Stemphylium sp. (1)	0.06±1.3 ب	0.04±1.41 ب
Stemphylium (2)	0.05±1.20 ب	0.05±1.21 ب

- جـ يمثل كفاءة الفطر على إفراز أنزيم اللايبيز وتكوين هالة التحلل بقطر (2-6) ملم
- ب يمثل كفاءة الفطر على إفراز أنزيم اللايبيز وتكوين هالة التحلل بقطر (8-14) ملم
- أ يمثل كفاءة الفطر على إفراز أنزيم اللايبيز وتكوين هالة التحلل بقطر اكبر من 16 ملم
- كل رقم يمثل معدل لثلاث مكررات ± الانحراف القياسي

$$\text{* كفاءة الفطر لافراز انزيم اللايبيز} = \frac{\text{قطر هالة التحلل (ملم)}}{\text{قطر المستعمرة الفطرية(ملم)}}$$

ويمكن تفسير ضعف قدرة عدد من العزلات على افراز انزيم اللايبيز واعطاء نتيجة مرئية واضحة بأن وقت التحضين غير كاف لتحفيز العزلات على تكوين اللايبيز (14) فقد ذكر Sierra عام 1957 ان مجموعة من الاحياء المجهرية تحتاج الى حوالي 10 ايام لانتاج اللايبيزات ويمكن القول أن معظم الكائنات وعلى نحو عام تحتاج الى 5 ايام لكي تنتج اللايبيزات وتعطي تحللاً مرئياً واضحاً للدهون. كما تبين ان قطر هالات التحلل كان اعلى عند استخدام وسط تحلل Tween 80 مما في وسط تحلل Tributyrin والعزلات جميعا ويمكن ان يعزى ذلك الى ان حامض الاوليك المحتوى في مادة Tween 80 له القابلية على تحفيز تكوين اللايبيز اكثر من حامض البيوترك (قصير السلسلة) الموجود في ثلاثي البيوترين او لعل ذلك يعود الى ان مادة Tween 80 تسهل حدوث افضل تلامس بينها وبين الانزيم وذلك لسهولة امتزاجها مع مكونات الوسط الزرعي (17) على العكس من الكلسيريد الثلاثي Tributyrin غير الذائب بالماء.

ان الغرض من استخدام الطريقتين هو تأكيد صحة اختيار العزلة الاكفأ في افرازانزيم اللايبيز. ولابد من الاشارة الى ان اقطار هالات التحلل بأستخدام كلتا الطريقتين قد ظهرت في اليوم الثاني من التحضين وازدادت بأزدياد مدة التحضين الى حد اليوم الرابع ولوحظ أن كفاءة العزلات في افراز اللايبيز إزدادت بازدياد أقطار المستعمرات. لذلك اختيرت عزلة الفطر *Aspergillus niger* بوصفها أفضل عزلة فطرية منتجة لانزيم اللايبيز لغرض اجراء سلسلة من التجارب من اجل قياس انتاجيتها من هذا الانزيم وتحسينها.

شكر وتقدير:

يشكر الباحثون الدكتور نديم أحمد رمضان لمساعدته في تشخيص النماذج الفطرية الموصوفة في هذا البحث.

المصـــادر:

1. دلالي، باسل كامل والركابي، كامل حمودي (1988). كيمياء الاغذية. دار الكتب للطباعة والنشر. مطبعة جامعة الموصل/ العراق.

2. دلالي، باسل كامل (1983). فهم الانزيمات. دار الكتب للطباعة والنشر. مطبعة جامعة الموصل/العراق.

3. ابو هيلة، عبد الله بن ناصر (1987). اساسيات علم الفطريات. مطابع جامعة الملك سعود، المملكة العربية السعودية.

4. Benjamin, S. and Pandy, A.(2000).Optimization of liquid media for lipase production by *Candida rugosa*. Bioresource Technology.55 (2): 167-170.

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

6. Thomson, C. A.; Delaquis, J. and Mazza , G. (1999). Detection and measurement of microbial lipase activity: Areview Critical review in food science and nutrition . 39 (2): 165-187.

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

8. Gardillo, M. A; Montesinos, J. L.; Casas, C.; Valero, F.; Lafuento, J. and Sola C. (1998). Improving lipase production from *Candida rugosa* by a biochemical enginnering approach. CPL.93 (1-2):131-142.

9. Dhingra, O. D.; Sinclair,, J. B. (1983). Basic Plant Pathology Methods. CRC press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.

10. Booth, C. (1971). Methods in Microbiology. Commonwealth mycological Institute. Kew, Surrey, England.

11. Barnett, H. L and Hunter, B. B. (1972) Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company, Minnesota. 241 pp.

12. Pitt, J. I. and Hocking, A. D. (1985). Fungi and Food Spoilage Academic press, London, 405 pp.

13. Ellis, M. B.(1971). Dematacious Hyphomycetes. Commonweealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England .

14. Trigiano, R. N. (1979). Extracellular enzymes of some fungi associated with Mushroom culture. Mycologia. 71: 908-917.

15. Cruickshank, R.; Duguid, J. P.; Marmion, B. P. and Swain, R. H. A. (1975). Medical Microbiology 12th, ed, V2. The Practice of Medical Microbiology . T. and A. Constable Ltd., Edinburgh.

16. Cochrane, V. W. (1958). Physiology of Fungi. John Wiley and Sons, Inc., New York.

17. الرفاعي، فاتن نوري (1999). الفطريات المعزولة من بذور بعض المحاصيل المخزونة والمنتجة للانزيمات (السليوليز). رسالة ماجستير، كلية العلوم/جامعة الموصل.