إنتاج البكتينيز بواسطة بعض الفطريات الخيطية متأثرًا بالعوامل المزرعية والعناصر الصغرى

رسالة مقدمة لاستكمال متطلبات الحصول على درجة الماجستير في العلوم
تخصص ميكروبيولوجي (علم الأحياء الدقيقة)

للباحثة :

بسنت محمد عبد العزيز محمد علي

تمت الموافقة على الرسالة لتقديمها من قبل المشرفين:

أ.د. ثروت السيد الدسوقي رضوان

أستاذ الميكروبيولوجيا
كلية العلوم - جامعة الفيوم

أ.م. نبيل ابو القاسم ابو القاسم (رحمه الله)

أستاذ مساعد ميكروبيولوجي
كلية العلوم - جامعة الفيوم

د. مي علي مصطفى مواهب

مدرس الميكروبيولوجي
كلية العلوم - جامعة الفيوم

قسم النبات

كلية العلوم

جامعة الفيوم

(2024)

الملخص العربى

أجريت هذه الدراسة في معمل الأبحاث بقسم النبات كلية العلوم / جامعة الفيوم ، و تضمنت جمع عينات تربة زراعية من أماكن مختلفة بمحافظة الفيوم وتم عزل 60 نوع من الفطريات المختلفة للكشف عن إنتاجها لإنزيم البكتينيز الشائع استخدامه في الصناعات المختلفة ، قد تم هذ الفحص بأكثر من طريقة (وصفية وكمية) ألا وهي:

الطريقة الأولى وصفية وهي باستخدام كاشف Lugol's Iodine Solution الذي يتفاعل مع مادة التفاعل (pectin) ويعطي لون بني محمر في منطقة تواجد المادة في حين لا يحدث تفاعل في المنطقة التي بها المادة متحللة بفعل الانزيم و تتكون هالة نقية حول المستعمرة.

الطريقة الثانية كمية وهي عن طريق تفاعل كاشف Dinitrosalicylic Acid (DNS) وتتم عن طريق قياس كثافة اللون الناتج عن تفاعل الاختزال والأكسدة بين ناتج التفاعل الانزيمي (D-galacturonic acid) مع الكاشف بجهاز مقياس الطيف الضوئي (spectrophotometer).

و تم اختيار أفضل العزلات انتاجًا لإنزيم البكتينيز ومن ثم إجراء التجارب عليهم لتحديد العوامل البيئية المثلى الهامة والمؤثرة في غزارة إنتاج الإنزيم وتأثير تباينها ومنها درجة الحرارة و درجة الأس الهيدروجيني وأيام التحضين و العناصر الصغرى.

وتمت الدراسة على درجات الحرارة (30-55) و درجات الأس الهيدروجيني (3.4 -7.4) وأيام تحضين من 3 -11 بفارق زمني 48 ساعة

وقد أظهرت النتائج الآتي:-

أولا: نتائج العزل الفطري وإنتاج الإنزيم وصفيًا وكميًا.

استخلاص عزلة 20 من أصل 60 عزلة و التي أظهرت نتيجة إيجابية لاختبار إنتاج البكتينيز على الوسط الصلب من خلال القياس باستخدام كاشف (Lugol's Iodine Solution).

ومن خلال نتائج القياس الوصفي تم قياس إنتاج الإنزيم كميًا للعشرين عزلة المنتجة للبكتينيز على المرق المغذي وأظهرت 9 عزلات من ال20 عزلة المختبرة إنتاج عالي وتم إختيار أفضل ثلاث عزلات وهم (*A. niveus*، *A.niger*، *A. brasiliensis*) (وكان إنتاجهم (51.40 ± 1311.22, 23.94 ± 1264.83, 84.53 ± 1603.67) وحدة / مل على التوالي وسجلت العزلة *A. brasiliensis* تفوقا على باقي العزلات بفارق كبير ذات دلالة معنوية $P < 0.01$.

ثانيا : تقدير إنتاج إنزيم البكتينيز تحت الظروف البيئية المختلفة (درجة حرارة التحضين -درجة الأس الهيدروجيني للوسط – فترة التحضين)

- درجة الحرارة : أظهرت النتائج أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم تختلف بإختلاف نوع الفطر فكانت 45°C ل *A. niveus* و*A. niger* (2840.19 ± 460.487±250.223,3027.859) وحدة/مل على التوالي و كانت عند 40 °C ل *A. brasiliensis* (3033.072684 ± 88.9269100) وحدة / مل.
- الأس الهيدروجيني : بينت النتائج أن الأس الهيدروجيني 5.4 هو الأفضل بالنسبة *A. niveus* و *A. niger* والأس الهيدروجيني الأمثل *A. brasiliensis* هو 4.4 وتم تسجيل فوارق معنوية

عالية عند P = 0.000. كذلك بينت النتائج استخدام بيئة غذائية لها أس هيدروجيني 7.4 يتسبب في انخفاض بفارق معنوي P = 0.000في إنتاج الإنزيم في العزلة *A. brasiliensis*.

- فترة التحضين : وجد أن أفضل تحضين لزيادة إنتاج الإنزيم عند خمس أيام للعزلة A. *niveus* (1745.4647 ± 164.76668) وحدة / مل ومن التحليل الإحصائي اتضح وجود فوارق معنوية p = 0.000 والتحضين لمدة سبعة أيام للعزلات *A. niger*, *A. brasiliensis* (3040.8922 ± 223.14087 , 2389.2686 ± 305.83801) وحدة / مل بفارق ذات دلالة معنوية p < 0.01 للعينة *A. niger*.

ومن ثم تم تنقية الإنزيمات الناتجة من الثلاث فطريات الأعلى انتاجًا تنقية جزئية بواسطة طريقة ترسيب كبريتات الأمونيوم بتركيزات (20-60%) و الأسيتون و الإيثانول المطلق ومعرفة الوزن الجزيئي للانزيم عن طريق اختبار السريان الكهربي على الجل والذي ظهر بخط عند 30 كيلو دالتون.

تم استخدام كروماتوجراف الغاز –مطياف الكتلة لمعرفة وتحديد كمية المواد الناتجة عن التفاعل الإنزيمي وأظهر اختبار السمية الخلوية أن التركيز المثبط النصفي يساوي 151.86 ميكروجرام

وبحساب النشاط النوعي اتضح ان التنقية بواسطة الإيثانول هي الأفضل في حالة *A. niger*, *A. brasiliensis* بقيمة 1277 U/mg, 3254.42 U/mg على التوالي والأسيتون في حالة *A. niveus* بقيمة 943.14 U/mg.وكان أعلى معدل إثراء لنشاط إنزيم (PG) تم الحصول عليه من فطر*A. niger* بعد التنقية الجزئية بالإيثانول بزيادة 14 ضعفاً.

وإدراكًا لأهمية معرفة خصائص هذا الإنزيم من فطر*A. niger* اللازم توافرها ليحافظ على استقراره وتركيبه ويعطى أعلى نشاط تحفيزي تم قياس تأثير درجات الحرارة (من 30-70 ° م) و الحموضة (من 3-8) وتأثير العناصر الصغرى مثل Mn, Zn, Co, Fe بتركيزات 0.1, 0.4, 0.1, 1 ملجرام/لتر على التوالي. وأضهرت النتائج أنه عند درجة حرارة 60°م و درجة حموضة 7 كان أعلى نشاط للفطر على الرغم من أنه تم الحفاظ على الاستقرار الإنزيمي عند درجات حرارة (40 – 70 ° م) بنسبة (90.6- 99.9) % وعند درجات حموضة (5 - 8) بنسبة (93 - 99.6) %.

دراسة تأثير العناصر الصغرى على إنتاجية الأنواع الفطرية للإنزيم :

- من فطر *A. niveus* كان لعنصر الحديد أفضل تأثير على إنتاج البكتينيز بالنسبة لباقي العناصر المختبرة (729.97 ± 73.75) بفارق معنوي P< 0.05 ولكن لا توجد فروق معنوية بين باقي العناصر من زنك ومنجنيز وكوبلت.
- بالنسبة للعزلة *A. brasiliensis* أعطى عنصر الزنك أعلى إنتاج إنزيمي بالنسبة لبقية العناصر (1470.218 ±462.945[a]) .
- كما أنتج عن إضافة الحديد في العينة *A. niger* أعلى إنتاج إنزيمي ولكن لا توجد فروق معنوية بين تأثيره على الإنتاج وتأثير باقي العناصر.

وبمعرفة هذه الصفات تم تطبيق الإنزيم كمادة حيوية لتنظيف قطعة قماش من أصل طبيعي مثل القطن من مادة البكتين العالقة بها و التي أظهرت نسبة 20% من فقدان وزن القماش.

في الختام إن هذه الدراسة توضح إنتاج البكتينيز بواسطة عزلات فطرية مختلفة، مؤكداً أهمية تحسين العوامل البيئية لزيادة إنتاجية الإنزيم.