دراسة تأثير المصدر الكربوني والنتروجيني في إنتاج حامض الجبرليك بوساطة عزلات برية من العفن *Fusarium moniliforme*

يونس علي يونس المشهداني نهان بهاء الدين جعفر البياتي
قسم علوم الأغذية والتقانات الإحيائية / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل

الخلاصة

تم الحصول على اثنين من العزلات المحلية للعفن *Fusarium moniliforme* المعزولة من أوراق نبات الذرة وجذوره وتمت المقارنة بين العزلتين من حيث إنتاج حامض الجبرليك، فوجد أن إنتاج حامض الجبرليك بوساطة العزلة المحلية (١) للعفن *F. moniliforme* فاق ما أنتجته العزلة (٢)، وقد اختيرت العزلة (١) للتجارب اللاحقة إذ درس تأثير تغير مكونات الوسط الغذائي بهدف تحسين إنتاجية العفن للحامض، فكانت أفضل فترة تحضين لأقصى إنتاجية لحامض الجبرليك (٩) أيام وأعطى الكلوكوز بوصفه مصدراً كربونياً عند تركيز ٢٪ أقصى إنتاجية من الحامض بلغت ٩١.١٣ ملغم/لتر وأعطت نترات الأمونيوم عند تركيز ٣ غم/لتر أقصى إنتاجية للحامض بلغت ٩٤.٥٥ ملغم/لتر. وقد استخدمت تقنية المطياف الضوئي للتقدير الكمي الحامض في العينات عند طول موجي ٢٥٤ نانوميتر.

المقدمة

بات الإنسان يسعى في خطى حثيثة ومستمرة لإنتاج مركبات مفيدة بوساطة الأحياء المجهرية. ومن هذه المركبات الجبرلينات وخاصة حامض الجبرليك (Arteca، ١٩٩٥ و MacMillan، ١٩٩٧). والجبرلينات عبارة عن أحماض كاربوكسيلية رباعية الحلقة قسم منها لها وظيفة هرمونات نمو في النباتات الراقية والقسم الآخر يفرز من قبل الأحياء المجهرية وتعد الفطريات المنتج الرئيسي للجبرلينات وخاصة جنس العفن Fusarium كما أن النوع *F. moniliforme* القابلية على إنتاج كميات عالية من GA_3 وعلى أوساط غذائية مختلفة (Avinash وآخرون، ٢٠٠٣) ولحامض الجبرليك مدى واسع من الاستخدامات خاصة في مجال الصناعات الغذائية وخاصة البيرة لاستنبات الشعير (malting) كما استخدم في الزراعة لزيادة نمو النباتات وإنتاج بذور هجينة وفي عملية التزهير وزيادة تركيز أنزيم الفا–اميليز (Qian وآخرون، ١٩٩٤). ويعد المصدر الكربوني من العوامل المهمة في إنتاج حامض الجبرليك ويعتبر الكلوكوز من أفضل المصادر الكربونية (Vass و Jefferys، ١٩٧٩) فقد استخدم Nava-Saucedo وآخرون (١٩٨٩) الكلوكوز بتركيز ٥٪ . وأنتج Deconejos و Decampo (١٩٧٥) من المولاس بتركيز ٤٪ لإنتاج حامض الجبرليك كما استخدم Khalon و Malhotra (١٩٨٦) الشرش لإنتاج الحامض حيث أعطى ٧٥٠ ملغم/لتر خلال ١٢ يوماً واستخدم Bruckner و Blechsmidt (b ١٩٩١) الكليسرول بتركيز ٨٪ وأعطى إنتاج وصل إلى ١٧٥ ملغم/لتر خلال سبعة أيام. ودرس Qian وآخرون (١٩٩٤) إنتاج حامض الجبرليك باستخدام النشا بطريقة المزارع الصلبة واستخدم Machado وآخرون (٢٠٠٢) قشور القهوة في إنتاج حامض الجبرليك واستخدم Vass و Jefferys (١٩٧٩)خلات الأمونيوم كمصدر نتروجيني في إنتاج حامض الجبرليك وأكد Joshi و Mather (١٩٨٨) أن أفضل مصدر نتروجين لإنتاج حامض الحبرليك هي نترات الأمونيوم ونترات الصوديوم ووجد Bruckner و Blechsmidt (١٩٩١) أن استخدام وسط تركيبي مكون من ٨٠ غم/لتر كليسرول وكبريتات الأمونيوم أعطى أعلى كمية من الحامض بلغت ٦٣٠ ملغم/لتر. وأكد Bulock وآخرون (١٩٧٤) أن أفضل مصدر نتروجيني لإنتاج حامض الجبرليك كان الحامض الأميني اللايسين.

هدفت هذه الدراسة إنتاج حامض الجبرليك (GA_3) بوساطة عزلات محلية من العفن *F. moniliforme* من أوراق نبات الذرة وجذوره وايجاد أفضل فترة تحضين وأفضل مصدر كربوني ونتروجيني.

مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني
تاريخ تسلم البحث ٢٣ / ١٠ / ٢٠٠٧ وقبوله ٢٠٠٧/١٢/١٤

مواد البحث وطرائقه

الكائن المجهري: تمت دراسة اثنين من العزلات البرية للعفن *F. moniliforme* والتي عزلت من أوراق نبات الذرة وجذوره وحفظت العزلات بعد تنميتها على وسط آكار البطاطا والدكستروز على درجة حرارة ٣٠°م مدة أسبوع ثم حفظت في الثلاجة على درجة حرارة ٤° م وتم تجديد المزارع كل أسبوعين.

وسط مستخلص البطاط والدكستروز: تم تحضير هذا الوسط حسب ما ذكر في Harrigan و MacCance (١٩٧٦) وعقم الوسط بوساطة جهاز الموصدة على درجة حرارة ١٢١° م لمدة ٢٠ دقيقة.

وسط إنتاج حامض الجبرليك: استخدم هذا الوسط لتنمية عزلة العفن *F. moniliforme* بهدف التعرف على قابليتها لإنتاج حامض الجبرليك كما استخدم في تحضير اللقاح ويتكون من (غم/لتر من الماء) ٢٠ كلوكوز و ٢٥ منقوع شراب الذرة و ٢.٦ غم نترات الأمونيوم و ٠.٥ فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) و ٠.٢ كبريتات البوتاسيوم وضبط الأس الهيدروجيني عند ٥.٥ ثم عقم الوسط على درجة ١٢١° م لمدة ٢٠ دقيقة (Sanchez-Marroquin،١٩٦٣).

عزل السلالة المحلية للعفن *F. moniliforme*: تم الحصول على السلالة المحلية للعفن من نبات الذرة إذ جمعت أوراق وجذور ذرة مصابة ثم قطعت كل منها إلى قطع صغيرة ١/٢ سم ووضعت القطع داخل شاش طبي نظيف داخل بيكر يحتوي على ماء معقم لمدة ١/٢ ساعة ثم غمست القطع المغسولة في محلول قاصر ١:٢ ولمدة دقيقتين وزرعت في أطباق بتري معقمة حاوية على وسط البطاطا والدكستروز الصلب ووضع في كل طبق أربعة قطع وحضنت الأطباق على درجة ٢٨±١° م لمدة ٥–٧ أيام إذ ظهرت مستعمرات العفن *F. moniliforme* بلون وردي مائل إلى البنفسجي ثم تم تنقيتها بإعادة زراعتها ثانية لحين الحصول على مستعمرات نقية من العفن. وتم تشخيص العفن حسب ما ذكر في Barnett و Hunter (١٩٧٢).

استخلاص وتنقية حامض الجبرليك: تم استخلاص حامض الجبرليك وتقديره حسب ما ورد في Rachev وآخرون (١٩٩٣) إذ أخذ ١٠مل من رائق المزرعة الخالي من خلايا العفن بعد ترشيحه بوساطة ورق ترشيح واتمان رقم (١) وتم تحميض الراشح إلى أس هيدروجيني ٣.٠–٣.٥ بوساطة حامض الهيدروكلوريك ١٨٪ (وزن/حجم)واستخلص مرتين مع كميات متساوية من خلات الاثيل وركزت الطبقات العضوية المندمجة إلى ١/٣ من الحجم الأصلي بوساطة تفريغ تحت ضغط مخلخل وعلى درجة ٣٥° م وأعيد الاستخلاص بـ ١ ع من محلول هيدروكسيد الأمونيوم كما أعيد التحميض بـ HCl (pH = ٢–٢.٥)واستخلص ثانية بخلات الاثيل بإضافة نفس الكمية ثم جفف الطور العضوي باستخدام كبريتات الصوديوم اللامائية وركز إلى ١/٤ الحجم البدائي وتم التقدير الكمي لحامض الجبرليك باستخدام جهاز المطياف الضوئي طراز Shimadzu–UV–160A U.V وعلى طول موجي ٢٥٤ نانوميتر وتم حساب تراكيز حامض الجبرليك في العينات الاعتماد على المنحنى القياسي باستخدام حامض الجبرليك النقي. إذ تم تحضير المنحنى القياسي بعمل تراكيز مختلفة من حامض الجبرليك (١٠–١٠٠ ملغم/مل) وتم تطبيق الطريقة هذه للحصول على قيم الكثافة الضوئية للتراكيز المختلفة من حامض الجبرليك (Unyayar وآخرون، ١٩٩٦).

تقدير السكر المتبقي: قدر السكر المتبقي حسب ما ورد في Dubios وآخرون (١٩٥٦).

الكتلة الحيوية: تم تقدير الكتلة الحيوية حسب ما ورد في AOAC (١٩٨٠).

التحليل الإحصائي: تم تحليل البيانات وفق نظام التجارب العاملية والبسيطة باستخدام التصميم العشوائي الكامل (CRD) وتمت المقارنة بين المتوسطات وفق اختبار دنكن المتعدد المدى (١٩٥٥) وتم تحليل البيانات باستخدام نظام SAS (٢٠٠١)حيث ميزت المعاملات المختلفة فيما بينها بأحرف مختلفة.

النتائج والمناقشة

المقارنة بين عزلتي العفن *F. moniliforme* من حيث القابلية على إنتاج حامض الجبرليك وتأثير فترات التحضين في إنتاج الحامض والكتلة الحيوية: أظهرت نتائج مقارنة إنتاجية حامض الجبرليك بين العزلتين المحليتين للعفن *F. moniliforme* بعد تنميتهما في وسط الإنتاج يبين الجدول (١)، ان إنتاج حامض الجبرليك من العزلة (١) فاق إنتاج العزلة (٢) إذ بلغ أقصى إنتاج (٩٦.٥٥ ملغم/لتر) عند فترة تحضين (٩) أيام في حين كان إنتاج العزلة (٢) (٧١.٧٧ ملغم/لتر) فيما يتعلق بالكتلة

الحيوية فقد أعطت العزلة (١) أعلى كتلة حيوية إذ بلغت ٣.٧١غم/لتر عند فترة تحضين (٥) أيام بينما أعطت العزلة (٢) أعلى كتلة حيوية بلغت ٣.٤٤ غم/لتر عند فترة التحضين نفسها. اما فيما يتعلق بكمية السكر المتبقي لكلتا العزلتين بلغ ٢.٨٢، ٢.٩٢ غم/لتر على التوالي عند فترة تحضين (٩) أيام. وانخفض الأس الهيدروجيني الأولي لكلتا العزلتين إذ بلغ ٤.٥٢ و ٤.٧١ على التوالي عند فترة التحضين نفسها وسبب ذلك يعود إلى تكوين حامض الجبرليك وبعض الحوامض العضوية الأخرى التي أدت إلى خفض الأس الهيدروجيني للوسط الغذائي وهذا يتفق مع كل من Darken وآخرون (١٩٥٩) و Vass و Jefferys (١٩٧٩) و Qian وآخرون (١٩٩٤). ولهذا اختيرت العزلة (١) وفترة تحضين (٩)أيام في التجارب الـ حقة.

الجدول (١): تأثير فترة التحضين على درجة حرارة ٢٨° م في إنتاج حامض الجبرليك لعزلتي العفن *F. moniliforme* .

عزلات الفطر	فترة التحضين (يوم)	الكتلة الحيوية غم/لتر	حامض الجبرليك ملغم/لتر	السكر المتبقي غم/لتر	الأس الهيدروجيني النهائي
عزلة ١	٢	١.٨٧ ± ٠.٠٠٧ ل	٣٠.٩٥ ± ٣.٤٦٤ ط ي	٦.٢٤ ± ٠.٠٤٩ أ	٥.٠٢ ± ٠.٠١٤ أ ب
	٣	٢.٤٧ ± ٠.٠٢٨ ز	٣٨.٤٥ ± ١.٢٠٢ ز ح	٥.٨٨ ± ٠.٠٣٥ ب	٤.٨٤ ± ٠.٠١٤ أ ب
	٤	٣.٣٢ ± ٠.٠٥٦ ج	٤٢.١٥ ± ١.٢٠٢ ز	٣.٧٤ ± ٠.٠٤٢ ز	٤.٨٢ ± ٠.٠١٤ أ ب
	٥	٣.٧١ ± ٠.٠٦٣ أ	٤٩.٨٠ ± ٠.٩٨٩ و	٣.٢٢ ± ٠.٠١٤ ح	٤.٧٩ ± ٠.٠١٤ أ ب
	٦	٣.٤٣ ± ٠.٠٥٦ ب	٦٢.٦٠ ± ١.١٣١ هـ	٣.١٤ ± ٠.٢٢٦ ح	٤.٧٢ ± ٠.٠٠٧ أ ب
	٧	٢.٨٩ ± ٠.٠٤٢ هـ	٧٦.٥٥ ± ٠.٩١٩ د	٢.٩٣ ± ٠.٠٥٦ ط	٤.٦٤ ± ٠.٠٢١ أ ب
	٨	٢.٢٨ ± ٠.٠٣٥ ح	٨٣.٤٠ ± ١.٢٧٢ ج	٢.٨٩ ± ٠.٠٤٩ ط	٤.٦١ ± ٠.٠٢١ أ ب
	٩	٢.٢٠ ± ٠.٠٣٥ ط ي	٩٦.٥٥ ± ٠.٠٦٠ أ	٢.٨٢ ± ٠.٠٤٢ ط	٤.٥٢ ± ٠.٠٢١ أ ب
	١٠	٢.١١ ± ٠.٠٠٧ ك	٩١.٠٧ ± ٣.٤٢٩ ب	٢.٦٧ ± ٠.٠٤٢ ي	٤.٦٠ ± ٠.٠١٤ أ ب
عزلة ٢	٢	٢.١٨ ± ٠.٠١٤ ط ي ك	١٠.٢٠ ± ١.٢٧٢ ل	٥.٩٥ ± ٠.٠٤٩ ب	٥.٣٤ ± ٠.٠٠٧ أ
	٣	٢.٢٥ ± ٠.٠٣٥ ح ط	٢٢.١٥ ± ١.٧٦٧ ك	٥.٥٢ ± ٠.٠٤٢ ج	٤.٣٣ ± ١.٤٤٢ ب
	٤	٢.٣٠ ± ٠.٠١٤ ح	٢٩.١٠ ± ١.٨٣٨ ك	٤.٨٧ ± ٠.٠٤٢ د	٥.٢٨ ± ٠.٠٢١ أ
	٥	٣.٤٤ ± ٠.٠٤٢ ب	٣٥.٧٥ ± ٠.٦٣٦ ح ط	٤.٣٢ ± ٠.٠٤٢ هـ	٥.٢٠ ± ٠.٠٢١ أ
	٦	٣.٢٣ ± ٠.٠٣٥ د	٤٠.٣٥ ± ١.٩٩٠ ز ح	٣.٩٠ ± ٠.٠٧٧ و	٤.٩٤ ± ٠.٠٠٧ أ ب
	٧	٢.٧٦ ± ٠.٠٢٨ و	٤٩.٥٠ ± ٠.٩٨٩ و	٣.٦٥ ± ٠.٠٥٦ ز	٤.٨٢ ± ٠.٠٢١ أ ب
	٨	٢.٤٢ ± ٠.٠٢١ ز	٥١.٩٠ ± ٠.٨٤٨ و	٣.١٢ ± ٠.٠٤٢ ح	٤.٧٧ ± ٠.٠٢٨ أ ب
	٩	٢.١٢ ± ٠.٠٢٨ ي ك	٧١.٧٧ ± ٢.٠٣٦ د	٢.٩٢ ± ٠.٠٤٩ ط	٤.٧١ ± ٠.٠٢١ أ ب
	١٠	١.٩١ ± ٠.٠٢٨ ل	٦٠.٣٠ ± ١.١٣١ هـ	٢.١٦ ± ٠.٠٥٦ ك	٤.٧٨ ± ٠.٠٣٥ أ ب

الأرقام تمثل معدل مكررين ± الخطأ القياسي

الأحرف المتشابهة في العمود الواحد لاتختلف معنويا حسب اختبار دنكن متعدد المدى عند مستوى احتمال ٠.٠٥ .

تأثير مصادر كربونية مختلفة في إنتاج حامض الجبرليك: استخدمت مصادر كربونية مختلفة (كلوكوز وسكروز وفركتوز وكالاكتوز ومالتوز ولاكتوز) وبتركيز ٢٪ لإنتاج حامض الجبرليك إذ يبين الجدول (٢) ان أفضل مصدر كربوني كان الكلوكوز إذ بلغت كمية حامض الجبرليك والكتلة الحيوية ٨٩.٠٠ ملغم/لتر و ٢.٣٧ غم/لتر على التوالي بعد ٩ أيام من التحضين درجة حرارة ٥٢٨ م وهذا مطابق لما أشار إليه كل من Darken وآخرون (١٩٥٩) و Sanchez-Marroquin (١٩٦٣) و Holme و Zacharias (١٩٦٥)

و Vass و Jeffereys (١٩٧٩) و Nava-Saucedo (١٩٨٩) وهذا لايتفق مع ما وجده Fuska وآخرون (١٩٦١) إذ أعطى السكروز أعلى كمية من الحامض ويلاحظ من الجدول أيضاً ان السكروز أعطى أعلى قيمة للكتلة الحيوية بلغت ٣.٨٢ غم/لتر أما سكر الكتوز فقد أعطى أقل كمية من الحامض والكتلة الحيوية إذ بلغتا ١١.٢٧ ملغم/لتر و ١.٣١ غم/لتر على التوالي مقارنة بالمصادر الأخرى وهذا يعود إلى ان العفن لايمتلك أنزيم (β-galactosidase) الذي يعمل على تحليل سكر الكتوز اما فيما يتعلق بسكر الكلوكوز المتبقي فقد بلغ ٣.٣٧ غم/لتر وهذا يدل على استهلاك العفن لهذا السكر في إنتاج الكتلة الحيوية والحامض.

كما بين الجدول ان هناك انخفاضاً في الأس الهيدروجيني إذ بلغ ٤.٥٠ عند استخدام الكلوكوز مصدراً كربونياً. وبسبب إعطاء الكلوكوز أعلى كمية من الحامض فقد استخدم مصدراً كربونياً في التجارب اللاحقة.

الجدول (٢): تأثير مصادر كربونية مختلفة في إنتاج الكتلة الحيوية وحامض الجبرليك بعد (٩) أيام من التحضين.

أنواع المصدر الكربوني (السكريات) ٢٪ وزن/حجم	الكتلة الحيوية غم/لتر	حامض الجبرليك GA_3 ملغم/لتر	السكر المتبقي غم/لتر	الأس الهيدروجيني النهائي
كلوكوز	٢.٣٧ ± ٠.٠٤٩ ب	٨٩.٠٠ ± ٣.٦٠٦ أ	٣.٣٧ ± ٠.٣٠٤ هـ	٤.٥٠ ± ٠.٠١٤ د
سكروز	٣.٨٢ ± ٠.٠٤٢ أ	٦٤.٨٧ ± ٢.٠٢٢ ب	٢.٩٧ ± ٠.٠٥٦ و	٥.٢٠ ± ٠.٠٢١ ب
فركتوز	٢.١٢ ± ٠.٠٤٩ ج	٣٥.٤٦ ± ٢.٩٧٦ ج	١٢.٥٩ ± ٠.٠٤٩ ج	٥.٢٠ ± ٠.٠٢١ ب
كالاكتوز	١.٤١ ± ٠.٠٤٩ د	٢١.٨٦ ± ٢.٠٥٧ د	١٢.٩٣ ± ٠.٠٣٥ ب	٥.٣٦ ± ٠.٠٣٥ أ
مالتوز	٢.٠٠ ± ٠.٠٧٠ ج	٣٦.٦٣ ± ٢.١٤٩ ج	١٠.٠٤ ± ٠.٠٤٩ د	٥.٠٥ ± ٠.٠٢١ ج
لاكتوز	١.٣١ ± ٠.٠٢٨ د	١١.٢٧ ± ١.٨١٠ هـ	١٥.٢٦ ± ٠.٠٥٦ أ	٥.٤٠ ± ٠.٠٢٨ أ

الأرقام تمثل معدل مكررين ± الخطأ القياسي

الأحرف المتشابهة في العمود الواحد لاتختلف معنويا حسب اختبار دنكن متعدد المدى عند مستوى احتمال ٠.٠٥ .

تأثير تراكيز مختلفة من سكر الكلوكوز في إنتاج حامض الجبرليك: في هذه التجربة تمت تنمية العفن *F. moniliforme* في وسط الإنتاج المزود بتراكيز مختلفة من سكر الكلوكوز (١ و ٢ و ٣ و ٤ و ٥ و ٦٪) بوصفه مصدراً كربونياً وحيداً ويبين الجدول (٣) ان أفضل تركيز لإنتاج الحامض بعد (٩) أيام من التحضين كان ٢٪ إذ بلغ الإنتاج ٩١.١٣ ملغم/لتر بينما كانت كمية الكتلة الحيوية ٢.٣٥ غم/لتر وأعطى تركيز ٤٪ أعلى كتلة حيوية إذ بلغت ٢.٦١ غم/لتر ولكن لم يدعم هذا النمو إنتاج كمية عالية من الحامض، وعند زيادة التركيز عن ٤٪ حصل انخفاض في كمية الحامض والكتلة الحيوية وجاءت هذه النتائج مطابقة لما ذكره كلاً من Sanchez-Marroquin (١٩٦٣) و Borrow وآخرون (١٩٦٤) و Bulock وآخرون (١٩٧٤) و Vass و Jefferys (١٩٧٩) و Jones و Pharis (١٩٨٧). في حين ان هذه النتائج لم تتفق مع ما ذكره Holme و Zacharias (١٩٦٥) إذ أعطى تركيز ٦٪ أعلى كمية من الحامض خلال (٩) أيام من التحضين وقد استخدم Nava-saucedo وآخرون (١٩٨٩) تركيز ٥٪ من كلوكوز خلال (١٥) يوماً من التحضين. أما فيما يتصل بالسكر المتبقي فقد بلغ ٢.٩٤ غم/لتر عند تركيز ٦٪ وهذا يرجع إلى استهلاك العفن لسكر الكلوكوز في إنتاج

الكتلة الحيوية والحامض. وانخفض الأس الهيدروجيني بعد التخمير كما هو معتاد عن الأس الهيدروجيني الأولي في تراكيز الكلوكوز كافة.

الجدول (٣): تأثير تراكيز مختلفة من الكلوكوز في إنتاج الكتلة الحيوية وحامض الجبرليك بعد (٩) أيام من التحضين.

تركيز الكلوكوز ٪	الكتلة الحيوية غم/لتر	حامض الجبرليك GA_3 ملغم/لتر	السكر المتبقي غم/لتر	الأس الهيدروجيني النهائي
١	١.٩٦ ± ٠.٠٤٢ ج	٥٩.٢٦ ± ١.٣٥٧ د	٠.٠٠ ± ٠ و	٥.١٢ ± ٠.٠٢١ أ
٢	٢.٣٥ ± ٠.٠٤٢ ب	٩١.١٣ ± ٢.٨٠٠ أ	٢.٩٤ ± ٠.٠٤٢ هـ	٤.٧٣ ± ٠.٠٣٥ ج
٣	٢.٥٣ ± ٠.٠٢٨ أ	٨٢.٧٨ ± ١.٧٣٩ ب	٩.٠٤ ± ٠.٠٥٦ د	٤.٣١ ± ٠.٠٢٨ د
٤	٢.٦١ ± ٠.٠٢١ أ	٧٣.٩٠ ± ٢.٤٠٤ ج	١٩.٥٢ ± ٠.٠٤٩ ج	٤.٠٢ ± ٠.٠٢١ هـ
٥	١.٩٣ ± ٠.٠٣٥ ج	٥٨.٥٦ ± ٢.٠٤٣ د	٣٤.٤٨ ± ١.٣٥٧ ب	٤.٨٥ ± ٠.٠٢٨ ب
٦	١.٣٦ ± ٠.٠٥٦ د	٤٣.٠٣ ± ٣.٥٧٠ هـ	٣٩.٥٠ ± ٠.٧١٤ أ	٤.٨٧ ± ٠.٠٢٨ ب

الأرقام تمثل معدل مكررين ± الخطأ القياسي
الأحرف المتشابهة في العمود الواحد لاتختلف معنويا حسب اختبار دنكن متعدد المدى عند مستوى احتمال ٠.٠٥ .

تأثير مصادر نتروجينية مختلفة في إنتاج حامض الجبرليك: يعد النتروجين من العناصر الأساسية لبناء الخ يا ونموها ولايمكن الحصول على كتلة حيوية بدون إضافة مصدر نتروجيني إلى الوسط الغذائي.

في هذه التجربة أضيفت مصادر نتروجينية مختلفة (كبريتات الأمونيوم ونترات الأمونيوم وكلوريد الأمونيوم وفوسفات الأمونيوم ونترات الصوديوم وثايوريا) وبتركيز ٣ غم/لتر ويلاحظ من الجدول رقم (٤) ان أفضل مصدر نتروجيني كان نترات الأمونيوم إذ بلغت به كمية الحامض والكتلة الحيوية ٩٠.٢٦ ملغم/لتر و ٢.٩٥ غم/لتر على التوالي وتليه كبريتات الأمونيوم وفوسفات الأمونيوم في حين أعطت نترات الصوديوم اقل كمية من الحامض والكتلة الحيوية إذ بلغت ٤٨.٥٥ ملغم/لتر و ١.٩٧ غم/لتر على التوالي واتفقت هذه النتائج مع ما ذكره كل من Joshi و Mather (١٩٨٨) و Bruckner و Blechsmidt (١٩٩١a) و Candan وآخرون (١٩٩٢) في حين ذكر Bulock وآخرون (١٩٧٤) ان أفضل مصدر نتروجيين كان الحامض الأميني (الكيسين) الذي أعطى أعلى كمية من الحامض أما معدل استهلاك العفن للسكر فكان عالياً عند استخدام نترات الأمونيوم إذ بلغت كمية السكر المتبقي ٢.٩٢ غم/لتر. وقد حصل انخفاض للأس الهيدروجيني لكافة المصادر النتروجينية المستخدمة في التجربة.

الجدول (٤): تأثير مصادر نتروجينية مختلفة في إنتاج الكتلة الحيوية وحامض الجبرليك بعد (٩) أيام من التحضين.

أنواع المصادر النتروجينية	الكتلة الحيوية غم/لتر	حامض الجبرليك GA_3 ملغم/لتر	السكر المتبقي غم/لتر	الأس الهيدروجيني النهائي
كبريتات الأمونيوم	٣.١٣ ± ٠.٠٤٢ أ	٧٨.٥٦ ± ٢.٠٤٣ ب	٣.٢٢ ± ٠.٠٤٢ أ	٤.٩٢ ± ٠.٠٢١ ج
نترات الأمونيوم	٢.٩٥ ± ٠.٠٤٩ ب	٩٠.٢٦ ± ١.٠٧٤ أ	٢.٩٢ ± ٠.٠٤٢ ج	٤.٧٣ ± ٠.٠١٤ هـ
كلوريد الأمونيوم	٢.٦٦ ± ٠.٠٣٥ ج	٦٩.٣٠ ± ١.١٣١ ج	٢.٥٢ ± ٠.٠٤٩ و	٥.١٥ ± ٠.٠٢٨ ب
فوسفات الأمونيوم	٣.١٨ ± ٠.٠٤٢ أ	٧٦.٤٥ ± ١.٦٢٦ ب	٢.٨٥ ± ٠.٠٤٩ ج	٤.٨٤ ± ٠.٠٢١ د

نترات الصوديوم	١.٩٧ ± ٠.٠٤٢ د	٤٨.٥٥ ± ٢.٠٥ د	٢.٩٦ ± ٠.٠٤٩ ب ج	٥.٣٥ ± ٠.٠٢٨ أ
ثايوريا	٢.٠١ ± ٠.٠٤٢ د	٦٥.٤٤ ± ١.٥٦٩ ج	٣.٠٦ ± ٠.٠٦٣ ب	٥.٣١ ± ٠.٠٢١ أ

الأرقام تمثل معدل مكررين ± الخطأ القياسي
الأحرف المتشابهة في العمود الواحد لاتختلف معنويا حسب اختبار دنكن متعدد المدى عند مستوى احتمال ٠.٠٥ .

تأثير تراكيزختلفة من نترات الأمونيو في إنتاج حامض الجبرليك: استخدمت في هذه التجربة تراكيز مختلفة من نترات الأمونيوم (١، ١.٥، ٢، ٢.٥، ٣، ٣.٥ غم/لتر) ويبين الجدول (٥) ان زيادة تركيز الأمونيوم في الوسط الغذائي قد أدى إلى زيادة إنتاج العفن لحامض الجبرليك وبشكل تدريجي وإلى حد معين وتـ زمت هذه الزيادة في كمية الحامض الناتج مع الزيادة التدريجية البطيئة للكتلة الحيوية ومع النقصان في كمية السكر المتبقي في الوسط الغذائي مما يدل على استهـ ك العفن للسكر في بناء الخـ يا وإنتاج الحامض. وقد تم الحصول على أقصى إنتاجية للحامض عند استخدام الوسط الغذائي الحاوي على (٣ غم/لتر) نترات أمونيوم إذ بلغت ٩٤.٥٥ ملغم/لتر في حين كانت اقل كتلة حيوية للعفن وأوطأ إنتاجية للحامض عند تركيز ١ غم/لتر إذ بلغتا ٢.٣٣ غم/لتر و ٧٠.٣٤ ملغم/لتر على التوالي. أما الأس الهيدروجيني النهائي فقد انخفض كالمعتاد عن الأس الهيدروجيني الأولي وجاءت هذه النتائج مطابقة لما وجده Borrow وآخرون (١٩٦١) و Borrow وآخرون (١٩٦٤) في حين كانت غير متفقة مع Bruckner و Blechsmidt (a١٩٩١) اللذان استخدما كبريتات الأمونيوم بوصفها أفضل مصدر نتروجيني لإنتاج أعلى كمية من حامض الجبرليك.

الجدول (٥): تأثير تراكيز مختلفة من نترات الأمونيوم في إنتاج الكتلة الحيوية وحامض الجبرليك بعد (٩) أيام من التحضين.

تركيز نترات الأمونيوم غم/لتر	الكتلة الحيوية غم/لتر	حامض الجبرليك GA_3 ملغم/لتر	السكر المتبقي غم/لتر	الأس الهيدروجيني النهائي
١.٠	٢.٣٣ ± ٠.٠٤٩ د	٧٠.٣٤ ± ٢.٥٢٤ د	٣.٠٣ ± ٠.٠٣٥ أ	٥.١٦ ± ٠.٠٢١ أ
١.٥	٢.٣٩ ± ٠.٠٢٨ د	٧٢.٠٨ ± ٢.٨٧٠ د	٢.٧٦ ± ٠.٠٤٢ ب	٥.٠٧ ± ٠.٠٢٨ ب
٢.٠	٢.٤٦ ± ٠.٠٥٦ ج د	٧٩.٨٣ ± ١.٦٦١ ج	٢.٣١ ± ٠.٠٣٥ ج	٤.٩٦ ± ٠.٠٢١ ج
٢.٥	٢.٥٧ ± ٠.٠٤٢ ب ج	٨٢.٩٥ ± ٤.٠٣٧ ب ج	٢.١٥ ± ٠.٠٤٩ د	٤.٧٢ ± ٠.٠٢٨ و
٣.٠	٢.٦٨ ± ٠.١٠٦ ب	٩٤.٥٥ ± ٢.١٩٢ أ	١.٩٥ ± ٠.٠٤٩ هـ	٤.٨٧ ± ٠.٠٢٨ د
٣.٥	٢.٩٢ ± ٠.٠٤٩ أ	٨٨.٨٤ ± ١.٨٠٣ أ ب	١.٨٢ ± ٠.٠٣٥ و	٤.٨١ ± ٠.٠١٤ هـ

الأرقام تمثل معدل مكررين ± الخطأ القياسي
الأحرف المتشابهة في العمود الواحد لاتختلف معنويا حسب اختبار دنكن متعدد المدى عند مستوى احتمال ٠.٠٥ .

STUDY THE EFFECT OF CARBON AND NITROGEN SOURCES ON GIBBERELLIC ACID PRODUCTION BY LOCAL STRAINS OF *FUSARUIM MONILIFORME*

Younis A. Y. Al–Mashhadany Nehan B. J. Al–Bayati
Food Sci. and Biotech. Dept. / College of Agric. & Forestry / Mosul Univ. / Iraq

ABSTRACT

Two local strains of *Fusarium moniliforme*, were isolated from leaves and roots of maize plant. The two strains were compared for gibberellic acid

production. The production of gibberellic acid by the local strain (1) was higher than strain (2). The strain (1) of *F. moniliforme* was chosen for the later experiments. The effects of culture components and conditions were studied at aiming to improve gibberellic acid production by the local strain (1). The optimum incubation period for the highest production of gibberellic acid was 9 days. The glucose, as a carbon source, gave the highest production of gibberellic acid reached 91.13 mg/liter especially at the concentration 2%. Ammonium nitrate, as a nitrogen source, gave the higher production of gibberellic acid reached 94.55 mg/liter and at the concentration 3 gm/liter. The technology of the spectrophotometer was used for the quantitative evaluation for gibberellic acid in the samples and at the wase longitude of 254 nanometer.

المصادر

Arteca, R.N. (1995) Plant growth substance, principles and application. Chapman and Hall, NewYork.

AOAC (Association of Official Analytical Chemist) (1980) Official Methods of Analysis 12th ed-Washington, DC., U.S.A.

Avinash, C. S.; A. Shahid; D. K. Agarwal and K. Ashok (2003) Screening of potential gibberellin producing Fusarium strains for the hybrid rice production. Food, Agriculture and Environmental. 1 (2): 250-253.

Barnett, H. L. and B. B. Hunter (1972) Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company.

Borrow, A.; E. Jefferys; R. H. Kessel; E. C. Lloyd; P.B. Lloyd and I. Nixon (1961) Can. J. Microbiol. 7: 227.

Borrow, A.; S. Brown; E. Jefferys; R. H. Kessel; E. C. Lloyd; P. B. Lloyd; A. Rothwell; B. Rothwell and J. C. Swait (1964) The Kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. Can. J. Microbiol. 10: 407-444.

Bruckner, B.; D. Blechsmidt (1991) The gebberellin fermentation. Critical Review in Biotechnology. 11: 163-192.

Bulock, J. D.; R. W. Detroy; Z. Hostalek and A. Al-Shakarchi (1974) Regulation of secondary biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. Trans. Br. Mycol. Soc. 2: 373-389.

Candan, R.; J. Avalos and E. cerda-olmedo (1992) Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. Plant physiology. 100:1184-1188.

Darken, M.; A. L. Jensen and P. Shu (1959) Production of Gibberellic acid fermentation. Appl. Microbiol. 7:301-303.

Deconejos, R. F. and G. G. Decampo (1975) Productionde Gibberelinas por fermertacion de un medio conteniendo melaza de cana de azucar como fuente de carbono. Ach. Bioquim-Quim. Farm. 20: 39-46.

Dubios, M.; K. A. Gilles; J. K. Hamitton; P. A. Robers and F. Smith (1956) Colorimetric method for determination of sugars. Ana. Chem. 28: 350-356.

Fuska, J.; I. Khur; M. Podojil and V. Sevcik (1961) The influence of the nitrogen source of the production of the Gibberellic acid in submerse cultivation of *Gibberella fujikuroi*. Folia Microbial. 6: 18-21.

Harrigan, W. F and M.E. McCance (1976) Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press London-NewYork. San Francisco.

Holme, T. and B. Zacharias (1965) Gibberellic acid fermentation in continous culture. Biotechnol. Bioeng. 7: 405-415.

Jeffery, S. (1970) The Gibberellin fermentation. Adv. Appl. Microbiol. 13: 283-323.

Jones, A. and R. P. Pharis (1987). Production of gibberellins and bikaverin by cells of *Gibberella fujikuroi* immobilized in carragenaan. J. Ferment. Technol. 65 (6): 717-722.

Joshi, S. and J. M. Mather (1988) The influence of various carbon and nitrogen sources on oil production by *Fusarium oxysporum.* J. Folia Microbiol. 32: 124-129.

Kahlon, S. and S. Malhorta (1986) Production of GA_3 by fungal mycelium immobilized in sodium alginate enzyme. Microbiol. Technol. 8: 613-616.

Machado, C. M.; C. R. soccol; B. H. deoliveria and A. Pandey (2002) Gibberellic acid production by solid fermentation in coffee Husk. Appl. Biochem. Biotechnol. 102: 179-192.

MacMillan, M. (1997) Biosynthesis of the gibberellins plant hormones. Nat. prod. Rep. 14: 221-243.

Nava-Saucedo, J.; J. N. Barbotin and D. Thomas (1989) Contenous production of gibberellic acid in a fixed-bed reactor by immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi* in calcium alignate beads. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30: 226-233.

Qian, X. M. J. C. Duperez and S. G. Killain (1994) Factors affecting gibberellic acid production by *Fusarium moniliforme* in solid-state cultivation on starch. World J. Microbiol biotechnol. 10: 59-62.

Rachev, R. Ch.; R. Pavlova-Rouseva; S. V. Bojkova and V. K. Gancheva (1993) Isolation of gibberellic acid produced by *Fusarium moniliforme*. J. Nat. prod. 56: 1168-1170.

Sanchez-Marroquin (1963) Microbiological production of gibberellic acid in glucose media. Appl. Microbial. 11:523-526.

SAS (2001) SAS Users-Guide. SAS Institute Inc. Cary NC. USA.

Unyayar, S.; F. Topcuglu and A. Unyayar (1996) A modified method for extraction and identification of indol-3- acetic acid (IAA), gibberellic acid (GA3), abscisic acid (ABA) and zetain production by *phanerochaete chrysosporium* ME 446. Bulg. J. plant. Physiol. 22: 105-110.

Vass, R. C. and E. G. Jefferys (1979) Gibberellic acid in economic microbiology. Secondary products of metabolism. A. Rose Academic press, London. 3: 421-434.