مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 21 (5) 2016
ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

تاثير اضافة مصادر كاربونية ونيتروجينية مختلفة على انتاج السكر المتعدد البوليولان من الفطر *Aureobasidium pullulans*

محمد بشير اسماعيل ، خالد دحام احمد ، زينة وجيه الجادر
قسم علوم الحياة ، كلية التربية للعلوم الصرفة ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

الملخص

تم عزل عشرة عزلات محلية للفطر *Aureobasidium pullulans* من اوراق نباتات مختلفة واختبرت قابلية هذه العزلات على إنتاج البوليولان باستخدام وسط الانتاج. اعلى انتاجية من الكتلة الحيوية والسكر المتعدد تم الحصول عليها من العزلات (A5، A2) بلغت (11.93، 23.5) غم/لتر على التوالي.

اختبر تاثير ثمانية مصادر كاربونية وثمانية مصادر نيتروجينية عند التركيز النهائي (5%)على انتاجية الكتلة الحيوية والسكر المتعدد من العزلات المحلية. واظهرت النتائج ان الكلوكوز اعطى اعلى انتاجية من السكر المتعدد من العزلة (A7) بلغت (15.5)غم/لتر. بينما اعلى انتاجية من الكتلة الحيوية تم الحصول عليها عند استخدام السكروز بوصفه مصدرا كاربونيا حيث كانت (14.53) غم/لتر من العزلة (A5). فشل اللاكتوز والزايلوز في دعم انتاجية الكتلة الحيوية والسكر المتعدد. كذلك اعطى نترات الامونيوم اعلى انتاجية من السكر المتعدد كانت (22.9) غم/لتر من العزلة (A9).بينما اقل انتاجية من الكتلة الحيوية والسكر المتعدد تم الحصول عليها عند استخدام اليوريا كمصدر نيتروجيني (1.15، 0.28) غم/لتر من العزلات (A6، A9) على التوالي. اما اعلى انتاجية من الكتلة الحيوية تم الحصول عليها عند استخدام كبريتات الامونيوم كمصدر نيتروجيني بلغت (18.97) غم/لتر من العزلة (A9).

المقدمة

عرف الفطر *Aureobasidium pullulans* بالخميرة السوداء والذي يتميز باللون الاسود او الوردي او الابيض ،شبيه بالفطريات الدقيقة التي توجد بشكل واسع في البيئة الاستوائية [1] ، عزل هذا الفطر لاول مرة من قبل الباحث De Bary من السطوح الرطبة المظللة ومن المواد الغذائية [2]. كذلك عزل من البيئة ذات الضغط الازموزي العالي كالمياه عالية الملوحة ومن الصخور[3، 4]. يتميز هذا الفطر بقابليته على انتاج الانزيمات الصناعية مثل انزيمات Amylase ، Xylanase، Pectinase وغيرها بالاضافة الى انتاج بروتين احادي الخلية والقلويدات وكذلك انتاج المواد البلاستيكية الحيوية التي لها القابلية على التحلل احيائياً فضلاً عن انتاج السكريات المتعددة المايكروبية وخصوصاً البوليولان [5].

يتكون السكر المتعدد الخارج خلوي (البوليولان) من وحدات الكلوكوز المرتبطة مع بعضها بالاصرة Glycosidic linkages α-1,4 وكل ثلاث وحدات من الكلوكوز مرتبطة مع بعضها بالاصرة α-1,6 Linkages. كذلك فان هذا الفطر يمتلك فعالية مضادة ضد عدد من الفطريات المرضية ولهذا فانه يستخدم في السيطرة الحيوية Biocontrol ضد بعض الامراض ما قبل الحصاد كما ان بعض السلالات لهذا الفطر لها القابلية على هضم او تكسير مركبات Xenobiotic وله مقاومة للعديد من ايونات المعادن والتي تكون مشتركة مابين التربة والماء[6].

ان للسكر المتعدد البوليولان تطبيقات عديدة تصل الى اكثر من 300 تطبيق في مجال التصنيع الحيوي ،صناعة مستحضرات التجميل، انتاج بعض المركبات الطبية وفي المنتجات الغذائية وفي استخراج النفط والمنتجات النفطية [6 ، 7، 8].

الهدف من الدراسة الحالية هو الحصول على عزلات فطرية محلية من الفطر *A. pullulans* لها القابلية على إنتاج السكر المتعدد بكميات كبيرة وتحديد افضل مصدر كاربوني ونيتروجيني يعطي افضل إنتاجية من السكر المتعدد والكتلة الحيوية .

المواد وطرائق العمل

عزل وتشخيص الفطر:

1- جمع العينات :

جمعت اوراق غير مصابة من اشجار الحمضيات المختلفة (اللالنكي والبرتقال والنارنج والليمون) وفي مناطق مختلفة من مدينة الموصل (حي الجامعة ،حي الفلاح، حي المحاربين ،حي النجار، حي العربي، المهندسين) لشهري تشرين الثاني وكانون الاول 2012.

2- العزل والتشخيص:

بعد جمع اوراق النباتات، قطعت الاوراق كلاً على حدى الى قطع صغيرة ووضعت في دوارق مخروطية معقمة حاوية على 25 مل من الماء المقطر المعقم وتركت لمدة 3 ايام في الحاضنة تحت درجة 25°م بعدها تم اخذ 0.5 مل من محلول كل نوع من الاوراق المنقوعة الى دوارق معقمة تحتوي على 50 مل من وسط عزل السلالات المحلية (الوسط السائل) المحضر حسب طريقة Pollock [9] ويتضمن ما يأتي: (غم/لتر من الماء المقطر).

10 سكروز، 1 $(NH_4)_2Hpo_4$، 0.5 Nacl ، 0.05 $Mgso_4.7H_2O$، 2 K_2HPO_4، 0.02 لكل من $FeSO_4$، $MnSO_4$، $ZnSO_4$، وتم ضبط الرقم الهيدروجيني عند 6.0 وعقم بجهاز الموصدة عند ضغط 1 جو وبدرجة حرارة 121°م ولمدة 15 دقيقة بعد ان اضيف اليه 10 مايكروغرام /مل مضاد حيوي Chloramphenicol، ثم حضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة

ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

150 دورة/ دقيقة لمدة 3 ايام تحت درجة حرارة 28°م بعدها رفعت الدوارق من الحاضنة وتركت لمدة 10 دقائق لتستقر ثم اخذ مالا يزيد عن 20 مايكروليتر بواسطة Micropipet من الرائق العلوي ونشر في اطباق محتوية على الوسط الصلب (نفس مكونات الوسط السابق مع اضافة 20 غم/لتر من الاكاروز وضبط الرقم الهيدروجيني عند 5.0) والمضاف اليه 10 مايكروغرام /مل من المضاد الحيوي Chloramphenicol قبل صبه في الاطباق ولقحت الاطباق ووضعت في الحاضنة عند درجة حرارة 25 °م الى حين ظهور مستعمرات الفطريات [10]. تم التشخيص بالاعتماد على الشكل الظاهري للفطر *A. pullulans* والفحص المجهري [11].

قابلية الفطر على إنتاج السكر المتعدد البوليولان والكتلة الحيوية:

تم اختبار قابلية العزلات الفطرية المحلية على إنتاج الكتلة الحيوية والسكر المتعدد البوليولان باستخدام وسط الانتاج المتكون من : 50 كلوكوز، 5 K_2HpO_4، 1 NaCl، 0.2 $MgSO_4.7H_2O$، 0.6 $(NH_4)_2SO_4$، 2.5 Yeast extract وضبط الرقم الهيدروجيني عند 6 [12].

الظروف الزرعية لانتاج السكر المتعدد:

وزع وسط الانتاج في دوارق مخروطية سعة 250 مل بمقدار 48 مل لكل دورق وبمعدل مكررين لكل معاملة (للعزلات العشرة) وغلقت الدوارق باحكام بسدادات قطنية وغلفت السدادات برقائق المنيوم (Foil) ثم عقمت بجهاز المعقام عند ضغط 1 جو ودرجة حرارة 121 °م ولمدة 15 دقيقة (ظروف التعقيم هذه كانت هي نفسها لجميع التجارب التي اجريت في هذه الدراسة). بعد التعقيم تركت الدوارق لتبرد ثم لقحت في ظروف معقمة بخلايا الفطر من اللقاح المحضر مسبقاً وبعمر 3 ايام وبحجم 4% (حضر هذا اللقاح بنقل جزء من مستعمرة الفطر المنماة على وسط PDA وبعمر اسبوع تقريباً وبصورة معقمة الى دوارق مخروطية معقمة حجم 250 مل تحتوي على 50 مل من وسط انتاج السكر المتعدد ثم وضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند درجة 28±°م وبمعدل تدوير 180 دورة/دقيقة لمدة 3 ايام). وضعت الدوارق بعد التلقيح في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 28 ±1 °م وبمعدل 150 دورة /دقيقة ولمدة 3 ايام من التحضين [13].

طرائق التحليل:

تقدير الكتلة الحيوية: بعد انتهاء مدة التحضين المعينة سحبت الدوارق من الحاضنة بصورة عشوائية وتم قياس الرقم الهيدروجيني النهائي لكل مزرعة بعدها اجريت عملية النبذ المركزي لمحتوى كل دورق بمعدل 9000 دورة/دقيقة لمدة عشر دقائق. اخذ الرائق وترك جانباً لتقدير السكر المتعدد ثم اضيف 25 مل من الماء المقطر الى الراسب بسبب اللزوجة العالية للسكر المتعدد ولضمان الحصول على الكتلة الحيوية لوحدها واجري النبذ المركزي مرة ثانية بنفس المدة والسرعة وبعدها جمعت خلايا الفطر (الراسب) باطباق معلومة الوزن او زجاج ساعة Watch glass ووضعت في فرن كهربائي عند درجة حرارة 60 °م لمدة 24 ساعة بعدها وزنت الاطباق مع الخلايا بميزان حساس وقيست الكتلة الحيوية بفارق الوزنين [14].

عزل وتقدير السكر المتعدد

اخذ 10 مل من رائق المزرعة الخالي من خلايا الفطر واضيف اليه حجمان اي 20 مل من الاسيتون وحرك المزيج بقوة لغرض ترسيب السكر المتعدد ثم اجريت عملية النبذ المركزي بمعدل 9000 دورة لكل دقيقة لمدة عشر دقائق. فصل الرائق جانباً وجمع السكر المتعدد في اطباق زجاجية او زجاج الساعة معلومة الوزن وجففت في فرن كهربائي عند درجة حرارة 60 °م لمدة 24 ساعة ثم حسب وزن السكر المتعدد بفارق الوزنين [14].

تاثير اضافة مصادر كاربونية مختلفة على النمو الخلوي وانتاج السكر المتعدد:

تم دراسة تاثير مصادر كاربونية مختلفة على انتاج السكر المتعدد والكتلة الحيوية لجميع العزلات وكانت المصادر الكاربونية كما يأتي: كلوكوز، سكروز، مانوز، مالتوز، لاكتوز، كالكتوز، ارابينوز، زايلوز واستخدمت هذه السكريات اعلاه بتركيز 5% وزن/ حجم اذ حضر وسط الانتاج بمكوناته كافة اضافة إلى السكريات المذكورة سابقاً كلاً على حدى وضبط الرقم الهيدروجيني عند 6.0 وتم توزيع الوسط لكل نوع من انواع المصدر الكاربوني على دورقين بحجم 250 مل وبواقع 48 مل لكل دورق (اي مكررين لكل معاملة) ثم التعقيم والتلقيح باللقاح الفطري وبواقع 2 مل لكل دورق ثم التحضين في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 28 ± 2°م وعند معدل رج 150 دورة لكل دقيقة وبعد 72 ساعة من التحضين سحبت الدوارق واخذ الرقم الهيدروجيني النهائي وتم اجراء عملية النبذ المركزي لفصل الخلايا لغرض تقدير الكتلة الحيوية والسكر المتعدد لراشح المزرعة (11).

تأثير اضافة مصادر نايتروجينية مختلفة على النمو الخلوي وانتاج السكر المتعدد: استخدمت مصادر نايتروجينية مختلفة لغرض تحديد افضل مصدر نايتروجيني يحفز اقصى انتاجية من السكر المتعدد البوليولان لجميع العزلات واضيف الى الوسط الانتاجي بتركيز 0.013 نتروجين (وزن/حجم) والمصادر النتروجينية التي استخدمت في هذه الدراسة وبنفس التركيز النتروجيني هي(وزن/حجم) كبريتات الامونيوم 0.06% ونترات الصوديوم 0.08% ونترات الامونيوم 0.036% ويوريا 0.027% ونترات البوتاسيوم 0.086% واسباراجين 0.059% وكلايسين 0.064% وكلوريد الامونيوم 0.05% وتم متابعة التجربة كما في التجارب السابقة (11).

النتائج والمناقشة

1-تشخيص عزلات الفطر *A. pullulan*: شخصت العزلات المحلية بالاعتماد على الشكل الخارجي Morphology للمستعمرات، فقد كانت المستعمرات ذات الوان متباينة مابين (الاسود والوردي والكريمي)، وتميزت بكون سطوحها مرتفعة ذات حافات ملساء مخاطية القوام عالية اللزوجة كمافحصت عينات الفطر تحت المجهر ولوحظ فيها تعددية الاطوار اذ ظهر فيها الطور الخميري وحيد الخلية والطور

الخيطي متعدد الخلايا وطور الكلاميدوسبور (السبورات الكلاميدية). وهذه النتيجة كانت مطابقة لنتائج الدباغ (11) ومطابقة لما وصفه (8) من حيث الشكل الخارجي المورفولوجي للمستعمرات وتعددية الاشكال.

2- قابلية العزلات الفطرية المحلية على النمو الخلوي وانتاج السكر المتعدد: بعد الحصول على العزلات الفطرية المحلية وتشخيصها من حيث الفحص المجهري والشكل الخارجي Morphology للمستعمرات تم اختبار وتحديد انتاجيتها من السكر المتعدد الخارجي وتبين ان جميع العزلات تباينت في انتاجيتها من السكر المتعدد حيث بلغت الانتاجية (22.40 ، 23.50 ، 17.55 ، 15.80، 10.80 ، 13.75 ، 18.80 ، 19.30 ، 13.55 ، 10.55)غم/لتر للعزلات (A1، A2، A3، A4، A5، A6، A7، A8، A9، A10) على التوالي (جدول1). اذ اعطت العزلة (A2) انتاجية عالية من السكر المتعدد بلغت (23.50) غم/لتر واقل انتاجية كانت (10.55)غم/لتر للعزلة (A10) . فيما يتعلق بالكتلة الحيوية فقد كان انتاجها متفاوتا بين العزلات حيث بلغت (10.75، 10.59، 10.27، 7.72، 11.93، 11.04، 10.19، 8.31، 9.88، 9.45) غم/لتر للعزلات (A1، A2، A3، A4، A5، A6، A7، A8، A9، A10) اذ اعطت العزلة (A6) اعلى انتاجية من الكتلة الحيوية بلغت (11.93) غم/لتر بينما اقل انتاجية كانت (7.72) غم/لتر للعزلة (A5). يتضح من النتائج ان انتاجية جيدة من السكر المتعدد اعطتها العزلات (A4، A8 ، A9، A10) على حساب نمو الفطر ويعود الاختلاف في انتاجية السكر المتعدد والنمو الفطري للعزلات جميعها الى اختلاف السلالات وطبيعة العزلات ومصادر عزلها [15]. اما الرقم الهيدروجيني النهائي فقد انخفض بشكل واضح عن الرقم الهيدروجيني الاولي (6.0) خلال مدة التخمر ويعزى هذا الانخفاض الى تراكم العديد من الحوامض العضوية نتيجة للعمليات الايضية المختلفة التي تحدث في خلايا الفطر[10]. هذه النتيجة تتفق مع ماتوصل اليه الدباغ [11] من حيث الاختلاف في قابلية العزلات المحلية على انتاج السكر المتعدد الخارجي. ومقاربة لما ذكره Moubasher واخرون [16] حول وجود تغاير في انتاجية السكر المتعدد البوليولان من العزلات المحلية.

جدول (1) قابلية العزلات الفطرية المحلية على النمو الخلوي وإنتاج السكر المتعدد

العينة	الكتلةالحيوية (غم/لتر)	السكر المتعدد (غم/لتر)	الـpH النهائي
A1	(0.01)10.75	(0.04) 22.40	5.35
A2	(0.02)10.59	(0.01)23.50	5.67
A3	(0.03)10.27	(0.10)17.55	5.23
A4	(0.02)7.72	(0.00)15.80	4.98
A5	(0.01)11.93	(0.02)10.80	5.52
A6	(0.11)11.04	(0.12)13.75	4.84
A7	(0.04)10.19	(0.03)18.80	5.65
A8	(0.02)8.31	(0.01)19.30	5.42
A9	(0.01)9.88	(0.05)13.55	5.55
A10	(0.03)9.45	(0.04)10.55	4.95

كل قيمة هي معدل لمكررين/ القيم بين الاقواس تمثل الانحراف المعياري/ A10-A1 تمثل العزلات قيد الدراسة

3- تاثير اضافة مصادر كاربونية مختلفة على النمو الخلوي وانتاج السكر المتعدد:

في هذه التجربة تم تنمية 10 عزلات محلية من الفطر *A. pullulan* في وسط الانتاج باستخدام مصادر كاربونية مختلفة بتركيز 5% وبينت النتائج ان اقصى انتاجية من السكر المتعدد تم الحصول عليها عند استخدام الكلوكوز كمصدر كاربوني وللعزلات كافة كالاتي: (12.9، 11.35، 15.35، 14.45، 11.5، 12.05، 15.5، 12.25 ، 14.30، 13.00) غم/لتر للعزلات (A1، A2، A3، A4، A5، A6، A7، A8، A9، A10) على التوالي خلال 3 ايام من التحضين. تتطابق هذه النتائج مع عدد من الدراسات التي اشارت الى قدرة الكلوكوز على دعم انتاج السكر المتعدد للفطر *A. pullulan* [17، 18، 19]، وانه يعزز انتاجاً عالياً من السكر المتعدد المنتج من قبل البكتريا والفطريات وذلك لسهولة تمثيل الاحياء الدقيقة له. بينما اعلى انتاجية من الكتلة الحيوية كانت عند استخدام السكروز حيث بلغت (14.58 غم/لتر) للعزلة A5 في حين فشل سكر اللاكتوز والزايلوز في انتاج كل من السكر المتعدد والنمو الخلوي وهذا يتفق مع ماتوصل اليه Cheng واخرون [20] وربما يعود السبب في ذلك الى عدم قدرة الفطر على افراز انزيم β-Galactosidase الذي يقوم بتكسير اللاكتوز الى وحداته الكلوكوز والكالكتوز. وبالرغم من ذلك فقد تمكن Le Duy واخرون [21] من استخدام اللاكتوز كمصدر كاربوني لانتاج البوليولان من قبل الفطر *A. pullulan* عند استخدام المزارع المختلطة للفطر *A.pullulan* والفطر *Ceratocystis* sp. الذي يقوم بتكسير اللاكتوز الى وحداته الكلوكوز والكالكتوز. ومن الجدول (2) يبدو ان بقية السكريات المستخدمة بوصفها مصادر كاربونية قد دعمت انتاجية السكر المتعدد والنمو الخلوي الى حد معين وبنسب متفاوتة.

4- تاثير اضافة مصادر نيتروجينية مختلفة على النمو الخلوي وانتاج السكر المتعدد.

في هذه التجربة تم تنمية 10 عزلات محلية من الفطر *A .pullulan* في وسط الانتاج باستخدام مصادر نايتروجينية مختلفة (حيث استخدمت المصادر النيتروجينية المختلفة بالاعتماد على المحتوى النايتروجيني المساوي لما يحتويه المصدر النايتروجيني الاولي في وسط الانتاج. وأظهرت النتائج (الجدول 3) ان المصدر النايتروجيني نترات الامونيوم قد اعطت اعلى انتاجية من السكر المتعدد ولجميع العزلات مقارنة بالمصادر النيتروجينية الاخرى حيث بلغت (15.2,15.8 ,15.4 ,14.35 ,17.65 ,11.9 ,14.35 ,21.3 ,22.9 , 11.9) غم/لتر للعزلات (A1، A2، A3، A4، A5، A6، A7، A8، A9، A10) على التوالي ، وكانت النتيجة مقاربة في حالة المصدر النايتروجيني نترات البوتاسيوم وهذه النتيجة تتفق مع ماتوصل اليه الدباغ [11] من ان نترات البوتاسيوم اعطت انتاجية عالية من السكر المتعدد بوصفها مصدرا نايتروجينياً . في حين اقل انتاجية من السكر المتعدد تم الحصول عليها عند استخدام اليوريا بوصفها مصدر نايتروجيني اذ بلغت (3.4, 2.95, 2.4, 3.8, 3.35, 1.15, 3.8,

3.35, 1.75, 1.25) غم /لتر للعزلات (A1، A2، A3، A4، A5، A6، A7، A8، A9، A10) على التوالي . اما النمو الخلوي فان اعلى انتاج من الكتلة الحيوية كانت عند استخدام كبريتات الامونيوم وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل اليه كل من العبيدي وعلاوي[10،22] من ان كبريتات الامونيوم تدعم انتاج النمو الخلوي كما ان اقل انتاج من الكتلة الحيوية كان عند استخدام اليوريا وهذا يدل على ان اليوريا لم تدعم كل من النمو الخلوي وانتاج السكر المتعدد.

جدول (2) تاثير المصادر الكاربونية على انتاج السكر المتعدد البوليولان والكتلة الحيوية لعزلات محلية للفطر *A.pullulans*

العزلة	سكروز غم/لتر		كلوكوز غم/لتر		مالتوز غم/لتر		مانتوز غم/لتر		لاكتوز غم/لتر		كالاكتوز غم/لتر		ارابينوز غم/لتر		زايلوز غم/لتر	
	الكتلة الحيوية	السكر المتعدد	الكتلة الحيوية	السكر المتعدد	الكتلة الحيوية	السكر المتعدد	الكتلة الحيوية	السكر المتعدد	الكتلة الحيوية	السكر المتعدد	الكتلة الحيوية	السكر المتعدد	الكتلة الحيوية	السكر المتعدد	الكتلة الحيوية	السكر المتعدد
A1	11.79 (0.04)	12.9 (0.07)	11.79 (0.00)	12.9 (0.01)	13.57 (0.02)	7.45 (0.04)	12.34 (0.01)	11.1 (0.07)	3.95 (0.00)	4.75 (0.01)	10.24 (0.04)	6.75 (0.01)	1.44 (0.06)	5.50 (0.00)	13.28 (0.01)	6.6 (0.01)
A2	13.97 (0.02)	8.9 (0.08)	11.84 (0.07)	11.35 (0.08)	12.53 (0.00)	6.15 (0.04)	13.48 (0.02)	6.05 (0.01)	3.64 (0.02)	2.00 (0.01)	10.9 (0.07)	8.55 (0.04)	11.3 (0.01)	7.2 (0.04)	13.45 (0.02)	6.7 (0.01)
A3	5.7 (0.08)	14.6 (0.07)	7.97 (0.01)	15.35 (0.00)	12.66 (0.01)	9.35 (0.04)	12.62 (0.01)	14.35 (0.02)	1.57 (0.03)	3.01 (0.05)	8.73 (0.02)	2.7 (0.03)	9.4 (0.04)	3.25 (0.02)	9.59 (0.01)	8.8 (0.06)
A4	3.89 (0.01)	13.6 (0.02)	3.52 (0.00)	14.45 (0.00)	2.45 (0.04)	8.9 (0.01)	4.68 (0.02)	12.9 (0.03)	1.43 (0.01)	1.7 (0.04)	7.30 (0.03)	2.8 (0.06)	8.937 (0.01)	4.45 (0.02)	5.38 (0.00)	9.85 (0.00)
A5	14.58 (0.02)	7.55 (0.06)	12.57 (0.00)	11.5 (0.01)	13.58 (0.02)	11.00 (0.04)	14.5 (0.06)	0.65 (0.07)	3.00 (0.07)	1.15 (0.05)	14.57 (0.03)	0.5 (0.02)	12.05 (0.04)	0.55 (0.02)	0.01)	8.1 (0.01)
A6	5.69 (0.07)	11.25 (0.08)	5.68 (0.00)	12.05 (0.01)	8.82 (0.03)	1.45 (0.04)	5.47 (0.01)	0.65 (0.02)	1.11 (0.01)	2.25 (0.02)	6.88 (0.03)	2.8 (0.04)	2.63 (0.00)	4.95 (0.01)	2.61 (0.00)	2.15 (0.04)
A7	6.65 (0.01)	12.25 (0.00)	7.48 (0.00)	15.5 (0.02)	8.17 (0.04)	12.15 (0.00)	8.83 (0.01)	11.65 (0.06)	7.6 (0.00)	12.30 (0.02)	9.91 (0.00)	11.6 (0.01)	7.83 (0.04)	14.2 (0.03)	8.24 (0.01)	10.85 (0.03)
A8	6.82 (0.02)	10.8 (0.01)	5.84 (0.00)	12.25 (0.00)	12.77 (0.01)	8.25 (0.04)	7.26 (0.07)	0.5 (0.06)	1.78 (0.04)	11.4 (0.07)	9.85 (0.01)	11.15 (0.06)	10.11 (0.01)	12.2 (0.07)	9.05 (0.02)	0.9 (0.02)
A9	8.57 (0.03)	11.75 (0.02	8.57 (0.00)	14.30 (0.00)	4.15 (0.01)	12.1 (0.06)	4.31 (0.07)	12.64 (0.03)	2.22 (0.04)	14.15 (0.04)	2.26 (0.02)	12.05 (0.04)	8.24 (0.02)	14.6 (0.01)	7.28 (0.07)	10.0 (0.01)
A10	4.33 (0.06)	9.00 (0.07)	6.08 (0.04)	13.00 (0.02)	11.7 (0.00)	8.97 (0.00)	7.02 (0.01)	6.32 (0.04)	1.5 (0.02)	4.9 (0.00)	14.1 (0.06)	11.10 (0.02)	9.54 (0.01)	0.2 (0.01)	6.93 (0.04)	0.5 (0.02)

القيمة مابين الاقواس تمثل قيم الانحراف المعياري / A1–A10 تمثل رقم العزلة قيد الدراسة

جدول (3) تاثير المصادر النيتروجينية المختلفة على انتاج السكر المتعدد البوليولان والكتلة الحيوية لعزلات محلية من الفطر *A.pullulans*

العزلة	كبريتات الامونيوم غم/لتر		نترات الصوديوم غم/لتر		نترات الامونيوم غم/لتر		يوريا غم/لتر		كلايسين غم/لتر		اسبارجين غم/لتر		كلوريد الامونيوم غم/لتر		نترات البوتاسيوم غم/لتر	
	الكتلة الحيوية	السكر المتعدد	الكتلة الحيوية	السكر المتعدد	الكتلة الحيوية	السكر المتعدد	الكتلة الحيوية	السكر المتعدد	الكتلة الحيوية	السكر المتعدد	الكتلة الحيوية	السكر المتعدد	الكتلة الحيوية	السكر المتعدد	الكتلة الحيوية	السكر المتعدد
A1	7.73 (0.01)	14.35 (0.00)	7.09 (0.01)	14.15 (0.01)	8.68 (0.02)	15.8 (0.07)	1.46 (0.04)	3.4 (0.01)	10.93 (0.02)	13.15 (0.01)	13.25 (0.01)	12.00 (0.02)	12.07 (0.04)	12.30 (0.04)	9.44 (0.06)	12.5 (0.07)
A2	9.71 (0.04)	10.7 (0.02)	11.52 (0.01)	14.15 (0.00)	11.12 (0.004)	15.2 (0.05)	0.3 (0.06)	2.95 (0.01)	11.62 (0.04)	13.7 (0.06)	14.84 (0.07)	12.7 (0.04)	11.64 (0.04)	14.65 (0.00)	12.52 (0.07)	12.8 (0.02)
A3	12.87 (0.01)	14.7 (0.02)	8.89 (0.04)	9.2 (0.02)	12.04 (0.01)	15.4 (0.04)	0.67 (0.03)	2.4 (0.01)	10.29 (0.06)	14.05 (0.06)	10.94 (0.02)	12.3 (0.01)	0.61 (0.02)	3.65 (0.01)	12.10 (0.00)	14.6 (0.04)
A4	3.74 (0.04)	13.4 (0.06)	1.4 (0.00)	13.25 (0.00)	4.36 (0.01)	14.35 (0.06)	3.54 (0.07)	3.8 (0.04)	4.19 (0.02)	12.00 (0.01)	3.88 (0.01)	11.25 (0.04)	4.31 (0.07)	10.85 (0.00)	3.4 (0.02)	12.55 (0.04)
A5	9.52 (0.07)	13.9 (0.06)	9.00 (0.09)	11.55 (0.07)	10.3 (0.04)	17.65 (0.03)	0.72 (0.04)	3.35 (0.04)	11.09 (0.02)	11.1 (0.01)	11.77 (0.02)	12.00 (0.00)	11.22 (0.01)	14.75 (0.02)	5.33 (0.04)	10.65 (0.01)
A6	9.22 (0.02)	10.95 (0.01)	6.58 (0.01)	11.5 (0.02)	7.34 (0.04)	11.9 (0.04)	11.08 (0.02)	1.15 (0.00)	6.7 (0.06)	11.25 (0.06)	7.52 (0.01)	11.45 (0.04)	13.43 (0.04)	11.5 (0.01)	5.32 (0.03)	10.30 (0.03)
A7	3.74 (0.04)	13.4 (0.02)	1.4 (0.01)	13.25 (0.04)	4.36 (0.04)	14.35 (0.06)	3.54 (0.00)	3.8 (0.03)	4.19 (0.02)	12.00 (0.06)	3.88 (0.01)	11.25 (0.04)	4.31 (0.06)	10.85 (0.04)	3.4 (0.02)	12.55 (0.05)
A8	8.23 (0.06)	18.35 (0.04)	11.53 (0.07)	13.8 (0.06)	14.41 (0.00)	21.3 (0.01)	0.72 (0.01)	3.35 (0.02)	11.6 (0.04)	18.05 (0.04)	11.55 (0.01)	10.75 (0.02)	12.73 (0.06)	17.4 (0.01)	11.31 (0.00)	20.4 (0.04)
A9	18.97 (0.02)	19.4 (0.04)	11.9 (0.02)	22.0 (0.01)	6.3 (0.04)	22.9 (0.06)	0.28 (0.07)	1.75 (0.04)	9.19 (0.03)	17.15 (0.04)	10.09 (0.06)	11.85 (0.01)	13.13 (0.02)	14.1 (0.03)	9.64 (0.02)	20.55 (0.01)
A10	9.9 (0.06)	11.5 (0.06)	11.01 (0.02)	10.85 (0.04)	10.31 (0.09)	11.9 (0.08)	6.44 (0.00)	1.25 (0.00)	11.76 (0.01)	11.2 (0.02)	11.71 (0.02)	10.75 (0.05)	11.04 (0.06)	10.9 (0.02	11.88 (0.03)	11.4 (0.04)

القيم بين الاقواس تمثل قيم الانحراف المعياري / A1–A10 تمثل رقم العزلة قيد الدراسة

المصادر

1- Oguzham, P. and Yangilar, F., Pullulan: production and usage in-food industrial .Afric. J. food Sci. Technol, 4(3): 57-63.(2013).

2- Samson, R. A.; Hoekstra, E. S. and Frisvad, J. C.,"Introduction to food and air borne fungi" 7th ed. Centraalbureau voor Schimmel cultures, ultrecht, 150-177.(2004).

3- Urzi, C.; De Leo, F.; Lopasso, C. and Criseo, G., Intra-specific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains isolated from rocks and other habitats assessed by physiological methods and by random amplified polymorphic DNA (RAPD). J. Microbiol. Methods,36:95-105 .(1999)

4- Gunde-Cimerman, N.; Zalar, P.; DeHoog, G. S. and Plemenitas, A., Hypersaline water in salterns - natural ecological niches for halophilic black yeasts. FEMS Microbiology. Ecol. 32:235-240.(2000).

5- Tsuji, K.; Toyota, N. and Fujita, F., Molded pullulans type resins coated with thermosetting films. Us patent 3:993-840.(1976).
6- Gaur, R.; Singh, R.; Gupta, M. and Gaur, M., *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulans. African J. of Biotechnol. 9(47)., 7989-7997.(2010).
7- Leathers, T. D., biotechnological production and applications of pullulan. Appl. Microbial. and Biotechnol. 62:468-473.(2003).
8- Prasongsuk, S.; Sullivan, R. F.;Kuhirun, M.; Eveleigh, D. E. and Punnapayk, H., W., Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in thailand. J. of Microbiol. and Biotechnol., 21: 393-398.(2005).
9- Pollock, T. J. ; Thorn, L. and Armentrout, R.W., Isolation of new *Aureobasidium* strains that produce high-molecular- weight pullulans with reduced pigmentation. Appl. Enviro. Microbiol., 58:877(1992).
10- العبيدي، صفاء اسماعيل رشيد ، ظروف إنتاج وطبيعة السكر المتعدد " البوليولان" المنتج بوساطة احدى العزلات المحلية للفطر *Aureobasidium pullulans* رسالة ماجستير/كلية التربية/ جامعة الموصل/ العراق (1998).
11- الدباغ، زهراء ابراهيم محمد، إنتاج السكر المتعدد (بيتا – كلوكان) بوساطة العزلة المحلية من الفطر *Aureobasidium pullulans* رسالة ماجستير/كلية التربية/ جامعة الموصل/العراق (2012)
12-Ono, K.; Yasuha, N. and Veda, S. I., Effect of pH on pullulan elaboration by *Aureobasidium pullulans* . Agric. Biol. Chem., 41:2113(1977).
13-Breierova, E.; Gregor, T.; Jursikova, P.; Stratilova, E. and Fisera, M., The role of pullulan and pectin in the uptake of Cd^{+2} and Ni^{+2} ions by *Aureobasidium pullulans*. Annals of Microbiol., 54(3), 247-255 (2004).
14-Lacroix, C. ; LeDuy, A.; Noel, G. and Choplin, L., Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium. Biotechnol., Bioeng., 207:202(1985).
15-Wu, S.; Chen, J. and Pan, S., Optimization of fermentation conditions for the production of pullulan by a new strain of *Aureobasidiumpullulans* isolated from sea mud and its characterization. Carbohydr.Polymer. 87:1696-1700. (2012).
16-Moubasher, H.; Wahsh, S. S.; Abo El-kassem, N., Isolation of *Aureobasidium pullulans* and the effect of different conditions for pullulanase and pullulans production.Microbiol.Vol.82, No.2, PP.155-161.(2013).
17-Shin, L.; Kim, Y. H.; Lee, K. S.; Kim, Y. N. and Byun, S. M., Production of pullulan by a fed- batch fermentation. Biotechnol. Letts. 9:621-624.(1987).
18-Souw , P. and Deimain A. L., Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Appl. Environ. Microbiol. 37: 1186-1192.(1979).
19-West T. P.; Reed-Hamer, B., Ability of *Aureobasidium pullulans* to synthesis pullulan upon selected sources of carbon and nitrogen. Microbios. 67: 117-124.(1991).
20-Cheng, K; Demirci, A. and Catchmark, J. M., Pullulan: Biosynthesis, Production and Applications. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 92: 29-44. (2011).
21-LeDuy, A.; Boa, J. M., Enhanced production of pullulans from lactose by adaption and by mixed culture techniques. Can. J. Microbiol. 29: 143-146.(1983).
22- علاوي، رعد حساني سلطان، دراسة إنتاج السكر المتعدد " البوليولان" من مولاس البنجر بوساطة الفطر *Aureobasidium pullulans* مع تشخيص جزئي للمنتوج ،رسالة ماجستير/كلية التربية/جامعة الموصل/العراق.(1996).

Effect of add different carbon and nitrogen source on the pullulan polysaccharide production from fungus *Aureobasidium pullulans*

Mouhammed Basheer Ismaeel , Khalid Dham Ahmed , Zena Wajeeh Al.gader
Department of Biology , College of Education to Pure Science , University of Mosul , Mosul , Iraq

Abstract
Ten local isolates of *Aureobasidium pullulans* were isolated from different plant leaves. The ability of these isolates for pullulans production using production medium was investigated. The highest production of biomass and pullulans were achieved from isolates (A5, A2)with (11.93, 23.5)g/l respactivily.
The effect of eight carbon and eight nitrogen sources at final concentration (5%) on biomass and pullulan production from local isolates were tested. The results showed that glucose gave maximum production of polysaccharide from isolate (A7) with (15.5g/l).While the highest production of biomass were obtained when sucrose were used as a carbon source with (14.53)g/l from isolate (A5). Lactose and xylose failed to support polysaccharide and biomass production. Also Ammonium nitrate gave highest production of polysaccharide for all isolates tested were (22.9 g/l) from (A9). While the lowest production of polysaccharide and biomass were obtained when urea was used as a nitrogen source(1.15 ,0.28 g/l)from isolates (A6, A9) respectively .The highest production of biomass was obtained in case of using ammonium sulphat as a nitrogen source with (18.97 g/l) from isolate (A9).