

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية
كلية التربية
قسم علوم الحياة

***Aspergillus niger* الخصائص المظهرية والجزيئية للفطر
وتقييم قابليته في إنتاج حامض الستريك تحت ظروف
مختلفة**

أطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية/جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة دكتوراه فلسفة

في

علوم الحياة/أحياء مجهرية

من قبل

علي عبد الهادي ماهد السوداني

بكالوريوس علوم/علوم حياة/جامعة القادسية/2005

ماجستير علوم حياة/فطريات/جامعة القادسية/2009

بإشراف

أ.م.د. ماجد كاظم عبود الشبلي

2015 م

1436 هـ

الخلاصة

نفذت هذه الدراسة لتقييم قابلية فطريات من التربة في إنتاج حامض الستريك باستخدام وسط غذائي صناعي مدعم بمصادر كربونية ونيتروجينية وأملاح وتحديد بعض الظروف المثلى للإنتاج من العزلة الفطرية الأكفأ بعد تنميتها على وسط المولاس المروق ووسط راشح قشور الرز المدعمن ببعض المغذيات، كما تم تحديد النمط الوراثي للعزلة الفطرية الأكفأ في إنتاج الحامض بواسطة تقنية Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length (PCR-RFLP) Polymorphism وتحديد تسلسل قواعد الحامض النووي (DNA) Deoxyribonucleic acid لمنطقة ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2، وشملت الدراسة أيضاً تنقية الحامض بطريقة الترسيب (Precipitation) والكشف عنه باستخدام كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC) High Performance Liquid Chromatography.

أظهرت النتائج وجود ٢١ عزلة فطرية شملت ١٢ عزلة للفطر *Aspergillus niger* بنسبة تردد بلغت ٥٧,١٤ % و ٥ عزلات للفطر *Trichoderma viride* بنسبة تردد بلغت ٢٣,٨ % و ٤ عزلات للفطر *Mucor spp.* بنسبة تردد بلغت ١٩,٠٤ %، وقد استبعدت من الدراسة بعض العزلات الفطرية التي أظهرت قابلية على إنتاج الافلاتوكسينات.

تم غربلة ١٦ عزلة فطرية محلية للفطريات *A. niger* و *T. viride* و *Mucor spp.* واتضح أن العزلة الفطرية *A. niger* 5 هي الأكفأ في إنتاج حامض الستريك، كما بينت النتائج ظهور حزمتين منفردتين للحامض النووي DNA ذواتي حجم جزيئي ٤٨٠ و ٦٦ زوجاً قاعدياً عند استخدام *RsaI* restriction enzyme وأن النمط الوراثي للعزلة الفطرية *A. niger* 5 هو من النوع A.

حددت بعض الظروف المزرعية والبيئية المثلى لإنتاج حامض الستريك من العزلة المنتخبة إذ تم الحصول على أعلى إنتاج من حامض الستريك والذي بلغ 28.947 غم/لتر على وسط المولاس المروق و 30.015 غم/لتر على وسط راشح قشور الرز باستخدام ١٥ % سكريات مختزلة و ٠,٢٥ % كبريتات الأمونيوم و ٠,٢, ٠,١, ٠,٢ % فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و 0.025 % كبريتات المغنسيوم سباعية جزيء الماء وبرقم هيدروجيني ابتدائي ٤,٣,٥ و بلاقح حجمه ٤ % من اللقاح الأولي ذي التركيز ١ x ١٠^٦ بوغ/مل وبظروف حضان مهتزة وبسرعة رج ٢٠٠ دورة/دقيقة ودرجة حرارة ٣٠ مُم لمدة ٨, ٩ لوسط المولاس المروق ووسط راشح قشور الرز على التوالي.

أوضحت نتائج الكشف عن حامض الستريك باستخدام كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة وجود قمتي امتصاص لكل من حامض الستريك القياسي والحامض قيد الدراسة بزمن احتجاز بلغ ١٢,٦٣٧ و ١٢,٦٤١ دقيقة على التوالي.

١- المقدمة Introduction

يعدّ حامض الستريك (Citric acid) والذي يعرف أيضاً بحامض الليمون من أهم الأحماض العضوية (Organic acid) من الناحيتين الغذائية والصناعية وهو حامض ثلاثي الكربوكسيل (2-hydroxy propane 1,2,3- tricarboxylic acid) اشتق اسمه من الكلمة اللاتينية Citrus التي تعني الحمضيات، وقد تم فصل الحامض وبلورته لأول مرة من عصير الليمون عام 1784 م من قبل العالم الكيميائي السويدي Carl Wilhelm Scheele، كما ينتج الحامض بشكل طبيعي بواسطة المسارات الأيضية التي تجري في الخلية الحية عن طريق دورة الأحماض العضوية الثلاثية الكربوكسيل (Tri carboxylic acid cycle) (Swain et al., 2011).

بالرغم من إمكانية إنتاج الأحماض العضوية من المصادر النباتية والحيوانية أو عن طريق التصنيع الكيميائي إلا أن الإنتاج التجاري لها يتم بشكل رئيس عن طريق التخمرات الميكروبية

لما تمتاز به هذه التخمرات من إمكانية زيادة الإنتاج من خلال تحسين الظروف البيئية والسيطرة الوراثية للكائن المجهري (Demain & Dana, 2007).

وصل إنتاج حامض الستريك العالمي عام ١٩٩٣ م إلى ٧٠٠ ألف طن/سنة وعام 2004 م إلى 1.4 مليون طن/سنة (Soccol et al., 2006). بينما وصل الإنتاج العالمي عام ٢٠٠٦ م إلى ١,٧ مليون طن/سنة وبمعدل زيادة يصل إلى ٥ % سنوياً ويتضمن هذا الإنتاج كميات قليلة جداً لا تتجاوز ١ % تعتمد على الإنتاج من عصير الفواكه في المكسيك وبعض دول أمريكا الجنوبية (Kana et al., 2012).

هنالك العديد من الأحياء المجهرية لها القابلية على إنتاج حامض الستريك مثل البكتريا ومنها *Bacillus subtilis* و *B. licheniformis* و *Corynebacterium* spp. (Kapoor et al., 1983). والفطريات ومنها *Aspergillus niger* و *A. wentii* و *A. awamori* و *A. nidulans* و *A. fonsecaeus* و *Mucor piriformis* و *Trichoderma viride* و *Penicillium janthinellum* و *P. restrictum* و *Ustilina vulgaris* والخمائر ومنها *Candida tropicalis* و *C. lipolytica* و *C. intermedia* (Papagianni, 2007).

حظيت عملية تنمية الأحياء المجهرية على مواد أولية رخيصة الثمن في عمليات إنتاج الأحماض العضوية المختلفة بالاهتمام الكبير في الفترة الأخيرة من أجل تحقيق أعلى إنتاج من الحامض العضوي المطلوب وبأقل تكلفة خصوصاً أن عمليات التصنيع الغذائي المختلفة يرافقها طرح العديد من المخلفات والنواتج العرضية التي تكون غالباً غنية بالسكريات بسبب طبيعتها العضوية مما يتيح إمكانية الاستفادة منها في إنتاج الأحماض العضوية (Ali & Zulkali, 2011).

تستخدم المصانع المنتجة لحامض الستريك العديد من السلالات التابعة للفطر *A. niger* لإنتاج الحامض بكميات كبيرة مع إجراء بعض التحسينات على ظروف ومراحل الإنتاج المختلفة بين مدة وأخرى من أجل زيادة الإنتاج ومن أهم مميزات استخدام الفطر *A. niger* في إنتاج حامض الستريك سهولة عزله وامتلاكه لنظام إنزيمي متطور وقابليته على تخمير كمية كبيرة من المواد الخام رخيصة الثمن والحصول على إنتاجية عالية (Munshi et al., 2013)

بسبب ازدياد الاهتمام بالأحياء المجهرية وتطبيقاتها في الغذاء كمدعمات تغذية وفي الصحة كمواد صيدلانية علاجية وفي الصناعة كمواد التجميل والمنظفات وغيرها لذا فقد هدفت هذه الدراسة إلى البحث عن عزلات فطرية من البيئة المحلية لها القابلية العالية على إنتاج حامض الستريك وتنميتها على أوساط محلية ذات جدوى اقتصادية (رخيصة الثمن) من خلال تحقيق المحاور الآتية:

١- عزل وتشخيص فطريات من التربة (*Aspergillus niger* و *Trichoderma viride* و *Mucor spp.*) واستبعاد العزلات التي لها القابلية على إنتاج الافلاتوكسينات.

٢- غرلة العزلات الفطرية حسب النمو الجيد (الكتلة الحيوية الجافة) وإنتاجها لحامض الستريك وتحديد العزلة التي هي أغزر إنتاجاً للحامض بنظام التخمرات المغمورة (Submerged fermentation).

٣- دراسة النمط الوراثي للعزلة الفطرية المنتخبة بتقنية PCR-RFLP.

٤- استخدام بعض المخلفات الزراعية والفضلات الصناعية الغذائية المحلية ذات الكلف الرخيصة كمصادر كربونية بديلة تستخدمها العزلة الفطرية المنتخبة في إنتاج الحامض وتحديد بعض الظروف المثلى التي تزيد من الإنتاج.

٥- استخلاص الحامض والكشف عنه بتقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC.

(٢-١): حامض الستريك Citric acid

تعدّ الأحماض العضوية بالإضافة إلى المضادات الحيوية والحوامض الأمينية من المنتجات التخمرية المهمة وتشتمل الأحماض العضوية بالدرجة الأساس على حامض الستريك (Citric acid) وحامض الكلوكونيك (Gluconic acid) وحامض الكوجيك (Kojic acid) وحامض الايتاكونيك (Itaconic acid) (Brown et al., 1987). ويعدّ حامض الستريك من أهم هذه الأحماض وهو حامض ثلاثي الكربوكسيل ينتج بشكل طبيعي من الفواكه ويطلق عليه حامض الستريك الطبيعي لتمييزه عن الحامض المنتج عن طريق التخمرات الميكروبية، وقد بقي إنتاج حامض الستريك لفترات طويلة معتمداً على الفواكه الحامضية مثل الليمون والبرتقال والأناناس وغيرها لاحتوائها على حامض الستريك بتركيز عالية، كما تم إنتاجه باستخدام بعض مشتقات الأسيتون لكن معظم هذه الطرق بقي استخدامها محدوداً لكونها مكلفة اقتصادياً (Papagianni, 2007).

تمكن العالم الألماني Wehmer عام ١٨٩٣ م من توجيه الأنظار إلى امكانية إنتاج حامض الستريك بطرق التخمر عندما وجد أن للفطر *Penicillium glaucum* قابلية على إنتاج حامض الستريك عند تنميته على وسط يحتوي على السكر وبعض الأملاح غير العضوية لكن إنتاج الحامض بقي على مستوى مختبري ولم يستطع العالم Wehmer من إنتاجه على المستوى التجاري بسبب ما تعرض له من مشاكل تتعلق بالتلوث وطول فترة التخمر في ذلك الوقت، وفي عام ١٩١٧ م وجد العالم الأمريكي Currie أن بعض السلالات التابعة للفطر *A. niger* لها القدرة على إنتاج حامض الستريك عند تنميتها على أوساط غذائية تحتوي على تراكيز عالية من السكر وبعض الأملاح المعدنية عند رقم هيدروجيني ابتدائي يتراوح ما بين ٢,٥-٣,٥ وقد قاد هذا الاكتشاف إلى وضع الحجر الأساس لعملية الإنتاج الصناعي لحامض الستريك بواسطة الفطر *A. niger* (Swain et al., 2011).

بدأت عمليات إنتاج حامض الستريك باستخدام الأحياء المجهرية التي تصدرت طرق الإنتاج الأخرى أول عملية إنتاج للحامض عام ١٩٢٣ م عن طريق الألماني Pfizer وشركته في الولايات المتحدة الأمريكية بالاعتماد على النتائج التي توصل إليها Currie ومنذ ذلك الوقت ازداد إنتاج الحامض وبكميات كبيرة جداً وبشكل يوازي الحاجة المتزايدة واستخداماته الكثيرة (Dhillon et al., 2010).

يتواجد الحامض بهيئتين أما بلورات لامائية (Anhydrous) يمكن الحصول عليها ببلورة المحاليل المائية عند درجات الحرارة الأعلى من 36.5 ْم أو بلورات مائية أحادية (Monohydrate) يمكن الحصول عليه بالبلورة عند درجات الحرارة الأقل من 36.5 ْم (Yokoya, 1992).

يمتلك حامض الستريك الصيغة التركيبية (CH₂COOH.COH.COOH.CH₂COOH) ويتواجد بشكل طبيعي كنواتج وسطي في دورة كربيس عندما تتم أكسدة الكربوهيدرات إلى غاز ثنائي اوكسيد الكربون ويتصف الحامض بأنه بلورات بيضاء اللون، صلب في درجات حرارة الغرفة ويتحلل بدرجات الحرارة العالية، يبلغ وزنه الجزيئي ١٩٢,١٢ غم/مول ونقطة انصهاره ١٥٣ ْم (Rajoka et al., 1998).

حامض الستريك شديد الذوبان في الماء ويذوب بسهولة بالإيثانول لكنه قليل الذوبان بالإيثر وله طعم حامضي مريح ومقبول وهو المسؤول عن الطعم الحامضي لمختلف الفواكه التي تحويه مثل الليمون والبرتقال والتين والأناس وغيرها وهو غير سام ويتأكسد بسهولة في جسم الإنسان (Ul-Haq *et al.*, 2002).

(٢-٣): تطبيقات حامض الستريك Applications of citric acid

هنالك العديد من التطبيقات لحامض الستريك في جوانب الصناعات الغذائية والكيميائية والصيدلانية، إذ يستخدم ٧٠% من حامض الستريك في الصناعات الغذائية المختلفة و ١٢% في الصناعات الكيميائية والصيدلانية والطبية و ١٨% في الصناعات الأخرى (Socol *et al.*, 2003)، فهو مضاف غذائي غير سام متعدد الاستخدام وصف من قبل منظمة الصحة العالمية (World Health Organization (WHO) ومنظمة الأغذية والزراعة Food and Agriculture Organization (FAO) بأنه آمن الاستخدام من الجانب الصحي (GRAS) Generally Recognized As Safe على المستوى العالمي (Papagianni, 2007).

أشارت العديد من الدراسات إلى الاستخدامات المختلفة لحامض الستريك، إذ يستخدم الحامض في حفظ الأغذية ويمنع تلفها مثل السمك المجمد والفواكه والخضروات والمعلبات المختلفة إذ يعمل على خفض الرقم الهيدروجيني ويقلل من احتياجات المعالجات الحرارية ويقلل من نشاط بعض الإنزيمات غير المرغوب فيها مثل الإنزيمات المؤكسدة ويمنع اسمرار الفواكه والخضروات (Buchard & Merrit, 1979)، كما وجد له فعالية مضادة لنمو بعض البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام (محمد، ٢٠٠٦).

يضاف حامض الستريك إلى الحلويات والمرببات والجلي والجلاتين لتعزيز النكهة ولزيادة قابلية الذوبان ويساعد على خفض الرقم الهيدروجيني وبالتالي التشكيل الجيد لها، كما يستخدم كعامل مضاد للأكسدة في صناعة الألبان وكعامل استحلاب في صناعة الجبن والأيس كريم ومنتجات اللحوم، كما يضاف حامض الستريك إلى المشروبات الغازية المختلفة عند صناعتها إذ يضيف لها نكهة مميزة وحموضة مناسبة (Stops *et al.*, 2006).

تستخدم سترات الصوديوم بشكل واسع كمادة مانعة لتخثر الدم وذلك بتكوينها لمعقدات مع الكالسيوم وعلى أساس فعل الحامض الفوار ظهرت له استخدامات أخرى عند خلطه مع الكربونات والبيكاربونات لإنتاج مضادات الحموضة ومركبات الأسبرين (Socol *et al.*, 2006).

لحامض الستريك القابلية على تكوين معقدات مع بعض المعادن مثل النحاس والحديد وهذه الخاصية أدت إلى استخدامه في صناعة الزيوت والدهون في التنقية وإزالة الروائح ومنع الأكسدة، كمادة حافظة، كما يستخدم محل الفوسفات في صناعة المنظفات وذلك لقابليته العالية على التحلل كما يستخدم في الصناعات البلاستيكية (Berovic & Legisa, 2007).

أما في الجانب الزراعي فيضاف حامض الستريك مع بعض الأسمدة لكونه عاملاً مخلبياً (Chelating agents) يساعد في إصلاح التربة التي تفتقد إلى المعادن كالحديد والنحاس والمغنسيوم والخاصين إذ يساعد على إمساك هذه المعادن في التربة ويعمل على دعم الفسفور المتاح للنبات كما يستخدم في إزالة الرصاص من التربة الملوثة (Dilara & Wayne, 2007).

ذكر احمد (٢٠٠٩) أن لحامض الستريك القابلية على إزالة سمية الافلاتوكسينات في الرز المحلي إذ أدى استخدام الحامض مع التسخين بدرجة حرارة ١٠٠ م° والتحرك لمدة ساعة واحدة إلى تحطم الافلاتوكسينات B1

و B2 و G1 و G2 بنسب مئوية بلغت ٩١,٢ و ٥٥,٨ و ١٠٠ و ٥٥,٦ % على التوالي، في حين أدى استخدام الحامض مع التسخين بدرجة حرارة ١٠٠م والحضن لمدة أسبوع واحد عند درجة حرارة ٢٠م إلى تحطم الافلاتوكسينات أعلاه بنسب مئوية بلغت ١٠٠ و ٣٢,٩ و ١٠٠ و ٤٧,٦ % على التوالي.

يدخل حامض الستريك في الوقت الحاضر في صناعة البوليمرات الصديقة للبيئة والتي تستخدم بشكل واسع في صناعة مختلف الأدوية والمستلزمات الطبية (Naeini et al., 2010).

ووجد أيضاً أن لحامض الستريك تأثير تثبيطي على نمو بعض الأعفان والخمائر ومنها *Candida albicans* و *Aspergillus fumigatus* و *Trichophyton mentagrophytes* و *Malassezia furfur* (Shokri, 2011).

كما يستخدم الحامض في إزالة التلكتسات المترسبة على أنابيب أجهزه المبادلات الحرارية والمرجل المستخدمة في مصافي النفط (Raheem & Lazer, 2012).

درس عبد الله (٢٠١٣) تأثير الرش بحامض الستريك في النمو والحاصل الأخضر لنبات الباقلاء ووجد أن الرش بحامض الستريك بتركيز ٢٢٥ ملغم/لتر أدى إلى زيادة معنوية في ارتفاع النبات، عدد الأفرع الجانبية، عدد الأوراق الكلية، المساحة الورقية، عدد القرينات، حاصل القرينات للنبات والإنتاجية الكلية منها.

وجد ديوان وجماعته (2014) أن معاملة ابواغ الفطرين *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* المستخدمين في المكافحة الحيوية لبعض الحشرات ببعض الحوامض مختبرياً ومنها حامض الستريك زاد من حيوية ابواغ الفطرين وبالتالي زيادة كفاءة هذين الفطرين في المكافحة الحيوية.

(٣-٣): مصادر إنتاج حامض الستريك Sources of citric acid production

ينتج حامض الستريك بعمليات التخمر المختلفة من عدد من الأحياء المجهرية تتضمن بعض أنواع الأعفان والخمائر والبكتريا كما موضح في (الجدول ٢-١).

الجدول (٣-١): أهم الأحياء المجهرية المنتجة لحامض الستريك.

المصدر	الكائن المجهري المنتج للحامض
--------	------------------------------

<p>(Hang & woodams, 1998; Pintado <i>et al.</i>, 1998; Vandenberghe <i>et al.</i>, 1999; Watanapokasin <i>et al.</i>, 2007; Kareem <i>et al.</i>, 2010; Pohnerkar & Desai, 2014).</p> <p>(Ul-Haq <i>et al.</i>, 2004).</p> <p>(Anwar <i>et al.</i>, 2009).</p> <p>(Kuforiji <i>et al.</i>, 2010).</p> <p>(Grewal & Kalra, 1995).</p> <p>(Hang & Woodams, 1995; Majolli & Aguirre, 1999).</p> <p>(Tran <i>et al.</i>, 1998).</p> <p>(Tran & Mitchell, 1995).</p> <p>(Anastassiadis <i>et al.</i>, 2008; Minh, 2014).</p> <p>(Harman <i>et al.</i>, 2004; Makut & Ade-Ibijola, 2012).</p>	<p><i>Aspergillus niger</i></p> <p><i>A. niger</i> GCMC7</p> <p><i>A. niger</i> IIB-A6</p> <p><i>A. niger</i> NRRL328</p> <p><i>A. awamori</i></p> <p><i>Penicillium janthinellum</i></p> <p><i>A. wentii</i></p> <p><i>A. foetidus</i></p> <p><i>A. foetidus</i>_ACM 3996</p> <p><i>Mucor piriformis</i></p> <p><i>Trichoderma viride</i></p>	<p>الأعفان</p>
<p>(Kapelli <i>et al.</i>, 1978).</p> <p>(Omar & Rehm, 1980).</p> <p>(Seraphim <i>et al.</i>, 2008; Da Silva <i>et al.</i>, 2012).</p> <p>(Rymowicz <i>et al.</i>, 2010).</p>	<p><i>Candida tropicalis</i></p> <p><i>C. parapsilosis</i></p> <p><i>Yarrowia lipolytica</i></p> <p><i>Y. lipolytica</i> A-101-1.22</p>	<p>الخمائر</p>
<p>(Kapoor <i>et al.</i>, 1983).</p> <p>(Hang & Woodams, 1995).</p>	<p><i>Bacillus subtilis</i></p> <p><i>B. licheniformis</i></p> <p><i>Corynebacterium</i> spp.</p> <p><i>Arthrobacter paraffinens</i></p>	<p>البكتريا</p>

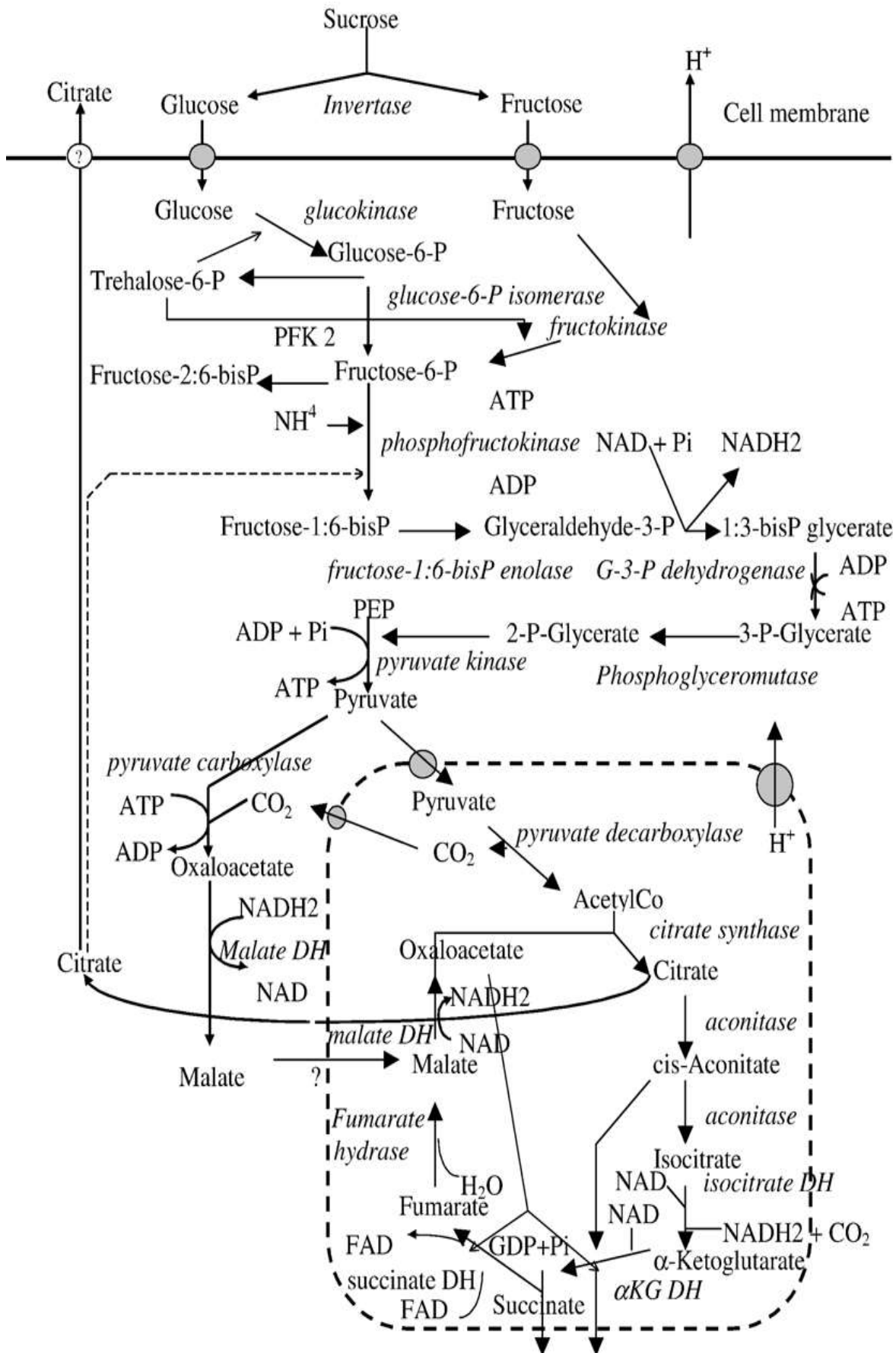
Biosynthesis of citric acid

(٢-٤): التخليق الحيوي لحمض الستريك

هنالك عدة نظريات وضعت لتوضيح عملية تكوين حامض الستريك خصوصاً في الفطر *A. niger* الذي يعرف بقبليته العالية على إنتاج الحامض (Krzystek *et al.*, 1996; Wolschek & Kubicek, 1999).

يمكن تلخيص مسارات التخليق الحيوي لحامض الستريك بثلاث عمليات رئيسة كما أشار لذلك Kubicek & Roehr (1986) وهي عملية التحلل السكري (Glycolysis) للسكريات وتكوين الـ Pyruvate و الـ Acetyl-CoA، وعملية تكوين الـ Oxaloacetate من الـ Pyruvate وعملية تكثيف الـ Acetyl-CoA و الـ Oxaloacetate إلى حامض الستريك.

أوضح (Karaffa & Kubicek (2003) إن جزيئين من الـ Pyruvate تنتجان من عملية التحلل السكري (Glycolysis) للسكريات وهاتان الجزيئتان تخضع إلى نوعين من العمليات المهمة إحداهما تكون في الساييتوبلازم والأخرى تكون داخل الماييتوكونديريا. جزيئة الـ Pyruvate التي تدخل إلى الماييتوكونديريا تتحول إلى Acetyl-CoA بواسطة إنزيم Pyruvate decarboxylase وبعدها يتحول الـ Acetyl-CoA إلى Citrate بواسطة إنزيم Citrate synthase، بينما جزيئة الـ Pyruvate التي تبقى في الساييتوبلازم تتحول إلى Oxaloacetate بواسطة إنزيم Pyruvate carboxylase بعدها يتحول الـ Oxaloacetate المتكون إلى Malate بواسطة إنزيم Malate dehydrogenase، عند تكوين الـ Malate خارج الماييتوكونديريا في الساييتوبلازم تصبح عملية النقل خلال غشاء الماييتوكونديريا متاحة بواسطة دخول الـ Malate إلى الماييتوكونديريا وخروج كميات مساوية لها من Citrate المتكون داخل الماييتوكونديريا إلى الساييتوبلازم بواسطة نظام نقل متخصص يدعى (Tricarboxylate Transporter (TCT) (الشكل ١-٢).



الشكل (1-3): التفاعلات الأيضية المتضمنة إنتاج حامض الستريك في الفطر *A. niger* (Papagianni, 2007).

من الإنزيمات المهمة في عملية تكوين حامض الستريك الإنزيم المنظم Phosphofructokinase الذي يعمل على تنظيم تكوين حامض الستريك في الفطر *A. niger* وقد وجد أن عمل هذا الإنزيم يثبط بواسطة التراكيز العالية من الـ Citrate و ATP وينشط بواسطة ADP و AMP ومركبات الفوسفات اللاعضوية وأيونات الأمونيوم والتي تعمل على تنشيط الإنزيم وتجاوز التثبيط الناتج بواسطة الـ Citrate و الـ ATP أثناء عملية إنتاج الحامض (Habison *et al.*, 1983). كما يؤدي إنزيما Aconitase و Isocitrate dehydrogenase دوراً مهماً في عملية تكوين الحامض إذ تصل فعالية هذين الإنزيمين إلى مستويات متدنية جداً أثناء مراحل تكوين حامض الستريك مما يسبب خللاً بتوازن وتنظيم المسارات الأيضية داخل الخلايا ويتم إعادة التوازن والتنظيم بواسطة زيادة فعالية إنزيم Citrate synthase ومن ثم تكوين كميات كبيرة من حامض الستريك (Kubicek, 1988).

(٢-٥): طرق التخمر Fermentation methods

تعدّ عملية إنتاج حامض الستريك بالاعتماد على الطرق التخمرية باستخدام بعض الأحياء المجهرية من أكثر الطرق المستخدمة في الوقت الحاضر وتصل نسبة الإنتاج العالمي بهذه الطرق إلى ٩٩ % وذلك لكفاءة هذه الطرق في إنتاج كميات كبيرة من الحامض وجودتها الاقتصادية بالمقارنة بالطرق الكيميائية والطرق المعتمدة على الفواكه الحامضية (Kuforiji *et al.*, 2010).

تتضمن عملية الإنتاج بواسطة التخمرات ثلاث مراحل مختلفة هي مرحلة تحضير وسط التخمر أو المواد الخام المستعملة كوسط تخمري وتلقيحها بلقاح الكائن المجهرية تليها مرحلة التخمر ثم مرحلة استخلاص وتنقية المنتج ومن الطرق الرئيسية للإنتاج الحيوي لحامض الستريك بواسطة التخمرات هي التخمرات المغمورة (Submerged fermentation) والتخمرات السطحية (Surface fermentation) وتخمرات الحالة الصلبة (Solid state fermentation)، هنالك العديد من المواد الخام التي يمكن استخدامها لإنتاج حامض الستريك ترتبط كفاءتها وجودتها الاقتصادية بحسب نوع التخمرات المستخدمة (Vandenberghe *et al.*, 2004).

(٢-٥-١): التخمرات المغمورة Submerged fermentation

يستخدم هذا النوع من التخمرات بشكل واسع في إنتاج حامض الستريك لما تمتاز به هذه التخمرات من مميزات كثيرة في الجوانب الهندسية التي تتعلق بنوع المخمر وتصميمه وكذلك عملية السيطرة على التفاعل الذي يتم فيه تحلل الكاربوهيدرات بواسطة الأحياء المجهرية في وسط سائل يحوي على كميات وافية من الماء (Rivas *et al.*, 2008).

يتم في الأونة الأخيرة حوالي ٨٠ % من الإنتاج العالمي لحامض الستريك عن طريق هذا النوع من التخمرات لكفاءتها العالية في الإنتاج وجودتها الاقتصادية ولكونها أقل عرضة لخطر التلوث بالأحياء المجهرية بالمقارنة بالطرق التخمرية الأخرى (Vandenberghe *et al.*, 1999).

التخمرات المغمورة من الممكن أن تتم باستخدام مزرعة الدفعة (Batch culture) التي تستخدم بشكل واسع أو باستخدام المزرعة المستمرة (Continuous culture) وينتج حامض الستريك بشكل طبيعي أثناء عملية التخمر بعد ٥-١٢ يوماً بالاعتماد على ظروف التفاعل المستخدمة (Soccol *et al.*, 2006).

يمكن أن تستخدم مختلف المواد الخام من المخلفات الزراعية والصناعية في تحضير الأوساط التخمرية لإنتاج حامض الستريك بواسطة هذا النوع من التخمرات وذلك عن طريق تنمية الأحياء المجهرية التي لها القابلية على إنتاج الحامض على هذه الأوساط ومن هذه المواد مولايس البنجر ومولايس قصب السكر (Ogawa & Fazeli, 1976; Kundu *et al.*, 1984)، وأشبه السليلوزات في الأخشاب المختلفة (Maddox *et al.*, 1985)، ونشا الذرة والنشا المتحلل (Nguyen *et al.*, 1992; Shah *et al.*, 1993)، وكذلك بعض الزيوت مثل زيت بذور اللفت وزيت فول الصويا (Wojtatowicz *et al.*, 1993).

استخدم (Dhillon *et al.*, 2011) هذا النوع من التخمرات لمعرفة إمكانية استعمال بعض المخلفات الزراعية والصناعية في إنتاج حامض الستريك بواسطة سلالتين مختلفتين من الفطر *A. niger* هما NRRL 567 و NRRL 2001 ووجد أن استخدام المخلفات الناتجة من صناعة عصير التفاح قد أعطت أعلى إنتاج من الحامض للعزلتين بالمقارنة بالمخلفات الزراعية والصناعية الأخرى.

(٣-٥-٢): التخمرات السطحية Surface fermentation

التخمرات السطحية تشير إلى التخمرات التي تتم فيها عملية تنمية الأحياء المجهرية على السطح العلوي للوسط التخمرى المستخدم، لقد استخدمت التخمرات السطحية السائلة في بادئ الأمر في عمليات إنتاج حامض الستريك التي تطورت فيما بعد إلى التخمرات المغمورة (Yokoya, 1992).

هذا النوع من التخمرات يتم باستخدام وعاء تخمري يحوي على عدد من الأوعية الصغيرة المرتبة على شكل رفوف مصنوعة من الألمنيوم عالي النقاوة أو الفولاذ أو البولي اثيلين وتستغرق عملية التخمر ٨-١٢ يوماً تنتج في أثناءها كميات كبيرة من الحرارة لذلك تكون الحاجة إلى تهوية كبيرة للسيطرة على درجات الحرارة وتجهيز الهواء للأحياء المجهرية، يمكن تقسيم المواد الناتجة بعد انتهاء عملية التخمر إلى قسمين هما سائل التخمر الخام والغزل الفطري الذي يغسل بالماء المقطر المعقم عدة مرات لاسترداد ما تبقى به من حامض الستريك (Soccol & Vandenberghe, 2003).

عملية إنتاج حامض الستريك بواسطة التخمرات السطحية ممكن أن تتم باستخدام العديد من المواد الخام وباستخدام عدد من الأحياء المجهرية التي لها القابلية على إنتاج الحامض لكن هذا النوع من التخمرات لا يستخدم بشكل واسع في الوقت الحاضر لعدة أسباب منها ما يتعلق بالحيز الكبير الذي يشغله المخمر أو لكون هذه التخمرات أكثر عرضة للتلوث بالأحياء المجهرية وكذلك المساحة السطحية القليلة المتاحة للأحياء المجهرية فضلاً عن توليد كميات كبيرة من الحرارة والمخلفات السائلة أثناء مراحل الإنتاج والتكلفة المرتفعة (Dhillon *et al.*, 2010).

(٣-٥-٣): تخمرات الحالة الصلبة Solid state fermentation

في السنوات القليلة الماضية أصبح إنتاج حامض الستريك بواسطة هذا النوع من التخمرات محط اهتمام ودراسة الكثير من الباحثين بعد عدة استخدامات لهذا النوع من التخمرات في إنتاج الإنزيمات وبعض المواد الأخرى، يمتاز هذا النوع من التخمرات بمتطلبات طاقة قليلة للإنتاج وإنتاج كميات قليلة جداً من المخلفات السائلة الضارة للبيئة (Shojaosadati & Babaeipour, 2002).

يمكن تعريف هذا النوع من التخمرات وفقاً لما ذكره (Chundakkadu 2005) بأنه عبارة عن عملية تخمر تتم باستخدام الأحياء المجهرية التي تنمو على مواد خام صلبة تحتوي على مواد مغذية لكنها غير حاوية على كميات كبيرة من الماء الحر.

تكون الرطوبة في هذا النوع من التخمرات ضرورية لنجاح عملية نمو الأحياء المجهرية على المواد الخام الصلبة المستخدمة التي هي عبارة عن مواد طبيعية تنتج كمخلفات للعمليات الزراعية والصناعية المختلفة (Pandey, 2003).

تخمرات الحالة الصلبة تدعى أيضاً بـ Koji process إذ استخدمت وطورت لأول مرة في اليابان باستعمال بعض المواد الخام مثل مخلفات الفواكه والمخلفات الزراعية وهي طريقة بديلة لإنتاج حامض الستريك من هذه المخلفات تحت ظروف حموضة ودرجة حرارة مختلفة بحسب نوع الأحياء المجهرية المستخدمة في عملية التخمر ويستغرق هذا النوع من التخمرات ٩٦ ساعة تقريباً تحت الظروف المثلى للإنتاج (Kubicek & Roehr, 1986).

من أهم الصعوبات التي تعيق استخدام هذا النوع من التخمرات بشكل واسع صعوبة السيطرة على ظروف التنمية المختلفة مثل الرقم الهيدروجيني والحرارة والرطوبة والمغذيات فضلاً عن التكلفة المرتفعة لاستخلاص وتنقية المنتج (Susana & Sanroman, 2006).

(٢-٦): الخصائص التشخيصية والتصنيفية لبعض فطريات التربة

Diagnostic and taxonomic characteristics of some soil fungi

(٢-٦-١): الفطر *Aspergillus niger*

(٢-٦-١-١): التصنيف العلمي Scientific classification

Kingdom: Mycota

Subkingdom: Eumycota

Phylum: Ascomycota

Class: Eurotiomycetes

Order: Eurotiales

Family: Trichocomaceae

Genus: *Aspergillus*

(Binomial name) Species: *A. niger* Van Tieghem 1867

(٢-٦-١-٢): الخصائص Characteristics

ينتمي جنس *Aspergillus* إلى الفطريات الخيطية (Filamentous fungi) ذات الانتشار الواسع في الطبيعة، أغلب الأنواع التابعة لهذا الجنس تكون رمية المعيشة (Saprophytes) والبعض الآخر تكون انتهازية (Opportunistic) ممرضة للإنسان، تختلف أنواع هذا الجنس عن بعضها ببعض الصفات مثل شكل المستعمرة

ولونها ولون ظهر المستعمرة ولون الكونيدات والخيوط الفطرية، بالإضافة إلى الاختلافات في بعض الصفات المجهرية مثل شكل وحجم الحويصلات (Vesicles) والميتيولات (Metulae) والفياليدات (Phialides) والكونيدات (Conidia)، تنتج الكونيدات على شكل سلاسل تنشأ من تركيب مركزي بترتيب شعاعي وتظهر بشكل قالب يشبه مرشة الماء التي تدعى باللاتينية *Aspergillum* ومنها اشتق اسم الجنس *Aspergillus* (1992 Kown-Chung & Bennett).

تصنف الكثير من الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* بأن الطور الجنسي لها غير معروف مثل *A. niger* و *A. flavus* و *A. parasiticus* و *A. oryzae* و *A. fumigatus*، إذ أنها تمتلك تراكيب تكاثرية عقيمة مثل الأجسام الحجرية وخلايا هول (Hull cells)، إلا أن البعض منها تتكاثر جنسياً وتكون ابواغ كيسية منتظمة داخل أكياس (Asci) مطمورة ضمن جسم ثمري كروي الشكل (Cleistothecium) (Webster & Weber, 2007). إن مستعمرات الفطر *A. niger* تظهر على الوسط الغذائي Potato dextrose agar (PDA) بلون أسود غامق أو أسود مائل إلى الجوزي، ذات نسجة مترابطة غير مفككة وطبيعية مخملية (Velvety)، الخيوط الفطرية تكون مقسمة ومتفرعة، الحوامل الكونيدية تنشأ على خلايا قديمة (Foot cells) وتكون مثخنة الجدران ذات لون أحمر إلى جوزي وذات طبيعة ناعمة ويبلغ طول الحامل 800-2200 مايكروميتر وتتسع نهاية كل حامل لتكون حويصلة كروية الشكل أو تشبه القبة، أما فياليدات هذا النوع فتكون ثنائية التفرع الأولية تكون طويلة يبلغ طولها 15-30 مايكروميتر والثانوية تكون قصيرة يبلغ طولها 5-10 مايكروميتر تحمل الكونيدات والتي تكون كروية الشكل يبلغ قطرها 3-5،4 مايكروميتر، خشنة ذات حواجز داخلية ولون جوزي (Moustafa, 1982).

Trichoderma viride الفطر (٢-٦-٢)

Scientific classification التصنيف العلمي (١-٢-٦-٢)

Kingdom: Mycota

Subkingdom: Eumycota

Phylum: Ascomycota

Class: Sordariomycetes

Order: Hypocreales

Family: Hypocreaceae

Genus: *Trichoderma*

(Binomial name) Species: *T. viride* Pers. ex Gray 1821

Characteristics الخصائص (٢-٢-٦-٢)

يضم الجنس *Trichoderma* العديد من الأنواع ذات الانتشار الواسع في التربة، أكتشف العالم Person هذا الجنس لأول مرة عام 1794 م معتمداً على الطور اللاجنسي الذي عزله من التربة والمواد العضوية، مستعمرات الفطر *T. viride* تنمو بشكل سريع على الوسط الغذائي PDA وتكون في البداية ذات مظهر صوفي أبيض اللون

ثم سرعان ما تتحول إلى خضراء ثم تصبح أشد خضرة عند اكتمال النمو إذ تغطي الطبق بالكامل بعد ٤ أيام، الخيوط الفطرية تكون مقسمة ومتفرعة ومفككة ناعمة عديمة اللون، الحوامل الكونيدية تكون قصيرة ومتفرعة إلى أفرع جانبية والتي تظهر بشكل فردي أو بشكل مجاميع ثنائية أو ثلاثية أو رباعية وكل فرع يحمل فياليد صغير كأسى الشكل والذي يحمل بدوره الكونيدة والتي تكون كروية الشكل تنتج بصورة متعاقبة من قمة الفياليدات ويبلغ قطرها ٤,٥-٣,٦ مايكروميتر وتكون خشنة (Moubasher, 1993; Harman *et al.*, 2004).

Mucor sp. الفطر (٣-٦-٢)

Scientific classification التصنيف العلمي (١-٣-٦-٢)

Kingdom: Mycota

Subkingdom: Eumycota

Phylum: Zygomycota

Class: Mucoromycetes

Order: Mucorales

Family: Mucoraceae

Genus: *Mucor* sp. Fresen 1850

Characteristics الخصائص (٢-٣-٦-٢)

يعدّ الجنس *Mucor* من الفطريات الشائعة في التربة وعلى النباتات المختلفة ويضم أنواعاً عديدة منها *M. piriformis* و *M. hiemalis* و *M. racemosus* و *M. spinosus*، مستعمرات هذا الجنس سريعة النمو جداً على الوسط الغذائي PDA وتظهر بشكل مستعمرات قطنية إلى زغبية بيضاء إلى صفراء اللون وتصبح رمادية داكنة مع تكون الحواظ السبورية، الخيوط الفطرية غير مقسمة، الحواظ السبورية تكون كبيرة إذ يبلغ قطرها ٦٠-٣٠٠ مايكروميتر وهي طرفية الموقع كروية الشكل عديدة الابواغ وحاوية على عويمد (*Columella*) كبير ومتطاول، حوامل الحواظ السبورية تكون قائمة، بسيطة أو متفرعة، الابواغ شفافة رمادية إلى بنية اللون ذات شكل كروي تقريباً وجدار أملس وأحياناً ذو نقوش دقيقة، المدادات وأشباه الجذور Rhizoids غير موجودة وهي من الصفات المميزة لأفراد هذا الجنس (Ellis, 1997).

rDNA gene cluster مجموعة جين الدنا الرايبوسومي (٧-٢)

مجموعة جين الدنا الرايبوسومي هي عبارة عن تتابعات الدنا التي تشفر الرنا الرايبوسومي وبصورة عامة تستخدم لدراسة العلاقات التصنيفية والتشخيصية والتغايرات الوراثية في الفطريات (Bruns *et al.*, 1992).

يترتب rDNA النووي في الفطريات بشكل وحدات متكررة كل وحدة تحتوي على ثلاثة جينات rRNA بشكل وحدات ثانوية الصغيرة هي 18S rRNA و 5.8S rRNA والكبيرة هي جين 28S rRNA ويفصل بين الجينات في الوحدة الواحدة منطقتا حيز استنساخي داخلي (ITS) Internal Transcribed Spacer هما (ITS1) و (ITS2) ويفصل بين كل وحدتين من الـ rDNA منطقة تسمى الحيز بين الجيني Intergenic Spacer (IGS)، منطقة الـ ITS بصورة عملية مفيدة لأجل دراسة الصفات الجزيئية في الفطريات لعدة أسباب من أهمها أنها منطقة قصيرة نسبياً حجمها يتراوح ما بين 500-800 زوجاً قاعدياً سهلة التضاعف بواسطة تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام بادئين عامين مفردين يكونان متممين إلى المناطق الثابتة بداخل جينات وحدة الرنا الريبوسومي الثانوية (White et al., 1990).

تكون هذه المناطق الفاصلة (Spacer regions) أكثر تغييراً من تتابعات الوحدات الثانوية وقد استخدمت بصورة واسعة في دراسة العلاقات بين الأنواع بداخل الجنس الواحد أو ضمن أفراد النوع الواحد (Buscot et al., 1996).

إن تطور تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل (PCR) وتصميم البودائ لتضخيم مناطق مختلفة من الـ rDNA كان له الفضل الكبير في الدراسات التصنيفية للفطريات خصوصاً البودائ المصممة بالاعتماد على المنطقة ITS التي بواسطتها تم الكشف عن العديد من تعاقبات مناطق الـ ITS لمختلف الفطريات التي استخدمت لدراسة العلاقات الوراثية بين مختلف الأنواع ضمن الأجناس أو الأشكال الفسيولوجية التابعة للنوع الواحد (Bridge et al., 1998).

تمكن Accensi et al. (1999) من استخدام تقنية الـ PCR لمضاعفة منطقة ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 ووجد تغييراً في تتابع النيوكليوتيدات في هذه المناطق للفطرين *A. niger* و *A. tubingensis*.

في دراسة أخرى استخدمت تقنية الـ PCR لمضاعفة منطقة ITS1 للتمييز بين أنواع الجنس *Trichoderma* spp. المعزول من حقول الرز في الفلبين وقد تم تشخيص نوعين هما *T. viride* و *T. harzianum* (Cumagun et al., 2000).

استطاع Gonzalez-Salgado et al. (2005) التمييز بين بعض الأنواع التابعة للجنس *Aspergillus* spp. وهي *A. niger* و *A. tubingensis* و *A. japonicus* و *A. ellipticus* و *A. carbonarius* و *A. heteromorphus* بواسطة مضاعفة منطقة ITS2 rRNA gene-ITS1 لهذه الأنواع الفطرية والكشف عن التغيرات في تتابع النيوكليوتيدات التابعة لها.

(٣-٨): تأثير بعض الظروف البيئية في إنتاج حامض الستريك

The effect of some environmental conditions in citric acid production

Carbon source المصدر الكربوني (٣-٨-١)

يعتمد إنتاج حامض الستريك بشكل كبير على طبيعة ونوع المصدر الكربوني المستخدم وتعدّ السكريات التي تستهلكها الفطريات بسهولة لنموها مصادر كربونية مفضلة لإنتاج الحامض وبكميات كبيرة (Mattey, 1992). إن أفضل السكريات المستخدمة في إنتاج حامض الستريك هي السكروز والكلوكوز والفركتوز بشكل أساس يليها سكر الكالكتوز بشكل قليل بسبب عدم دعمه لنمو الفطريات بصورة جيدة (Hossain *et al.*, 1984). من المصادر الكربونية الأخرى المستخدمة في إنتاج الحامض هي النشا والسليلوز والمانيتول والإيثانول والسوربيتول وبعض السكريات الخماسية مثل الزايلوز والأرابينوز وبدرجات مختلفة بحسب طبيعة التخمر والكائن المجهرى المستخدم (Yokoya, 1992).

درس Maddox *et al.* (1985) تأثير مصادر كربونية مختلفة وهي الكلوكوز والمالتوز والكالكتوز والزايلوز والأرابينوز في إنتاج حامض الستريك من الفطر *A. niger* والخميرة *Saccharomycopsis lipolytica* ووجد أن أفضل النتائج كان باستخدام الكلوكوز وذلك بإنتاج 0.45 غم حامض/غم كلوكوز من الفطر *A. niger* و 0.41 غم حامض/غم كلوكوز من الخميرة *S. lipolytica*، وفي دراسة أخرى لبيان تأثير نوع وتركيز المصدر الكربوني في إنتاج الحامض باستخدام التخمرات المغمورة (Submerged fermentation) وجد أن أعلى إنتاج للحامض يمكن الحصول عليه باستخدام السكروز والفركتوز والمالتوز والمانوز بتركيز 10% والكلوكوز بتركيز 7,5% وأن إنتاج الحامض توقف تماماً عند استخدام السكريات بتركيز 2.5% (Xu *et al.*, 1989).

أشار Honecker *et al.* (1989) إلى أن الخلايا المقيدة للفطر *A. niger* تحتاج إلى تركيز قليل من المصدر الكربوني بالمقارنة بالخلايا الحرة لذات الفطر وذلك بسبب حاجة الخلايا الحرة لضغط ازموزي عالٍ، كما وجد أن بعض السلالات التابعة للفطر *A. niger* تستطيع أن تحول 90% من الكلوكوز المستخدم كمصدر كربوني في وسط التخمر إلى حامض الستريك (Wasay *et al.*, 1998).

فيما ذكر Papagianni *et al.* (1999) أن الزيادة الحاصلة في تركيز الكلوكوز المستخدم كمصدر كربوني في مزارع الدفعة (Batch culture) تؤدي إلى زيادة كميات حامض الستريك المنتجة من الفطر *A. niger*، وهذا ما أكدته Leangon *et al.* (2000) من أن زيادة تركيز المصدر الكربوني المستخدم هي السبب الرئيس في الزيادة الحاصلة في إنتاج حامض الستريك وأن استخدام تراكيز قليلة من المصدر الكربوني يؤدي إلى إنتاج حامض الأوكزاليك بدلاً عن حامض الستريك.

كما أجرى Yalcin *et al.* (2009) دراسة على سلالتين مختلفتين تابعتين للخميرة *Yarrowia sp.* هما *Y. lipolytica* NBRC-1658 و *Y. lipolytica* 57 لبيان قابليتهما على إنتاج حامض الستريك باستخدام الكلوكوز والفركتوز كمصدر كربوني ووجد أن أفضل إنتاج لحامض الستريك كان عند استخدام تركيز أعلى من 100 غم/لتر للفركتوز عن طريق خميرة *Y. lipolytica* 57.

تستخدم الكثير من المواد الخام في الوقت الحاضر في تحضير أوساط التخمر لإنتاج حامض الستريك مثل المخلفات الزراعية والمخلفات الصناعية إذ استخدمت مخلفات الفواكه المختلفة مثل التفاح والموز والأناناس والعنب وغيرها من المخلفات الزراعية بالإضافة إلى مولايس قصب السكر ومولاس البنجر في تحضير أوساط التخمر لإنتاج حامض الستريك عن طريق الأحياء المجهرية التي لها القابلية على إنتاج الحامض وبطرق تختلف حسب المادة الخام المستخدمة وظروف التخمر مع مراعاة التكلفة الاقتصادية والحاجة إلى المعاملة الأولية للمادة الخام قبل الاستخدام (Ngadi & Correia, 1992; Jianlong, 1998; Gutierrez-Correa *et al.*,

1999)

(٣-٨-٣): المصدر النيتروجيني Nitrogen source

يعدّ النيتروجين مصدراً مهماً لبناء الأحماض الأمينية والقواعد النيتروجينية وبعض الكاربوهيدرات والدهون والمرافقات الإنزيمية وبعض المواد الأخرى وتكون المصادر النيتروجينية على نوعين هما: لا عضوية مثل أملاح الأمونيوم المختلفة أو عضوية مثل البيبتون ومستخلص الخميرة وماء نقيع الذرة (Zhang *et al.*, 2007). يتأثر إنتاج حامض الستريك بشكل مباشر بنوع وتركيز المصدر النيتروجيني المستخدم في عملية التخمير (Chundakkadu, 2005).

إن استخدام أملاح الأمونيوم كمصدر نيتروجيني في عمليات التخمير لإنتاج حامض الستريك له فائدة كبيرة تتمثل بخفض الرقم الهيدروجيني عند استهلاك هذه الأملاح، يعدّ الرقم الهيدروجيني المنخفض من المتطلبات الأساسية لإنتاج الحامض كما أن لأيونات الأمونيوم دوراً كبيراً في إيقاف عملية تثبيط إنتاج حامض الستريك وإعادة تنشيط إنزيم Phosphofructokinase المهم أثناء عملية التحلل السكري (Jernejc & Legisa, 2004).

إن إضافة تراكيز عالية من المصدر النيتروجيني المستخدم أثناء عملية التخمير لإنتاج الحامض تعمل على زيادة النمو الفطري والسكر المستهلك والتقليل من كميات حامض الستريك المنتجة (Vandenberghe *et al.*, 1999).

في دراسة لبيان تأثير المصادر والتراكيز النيتروجينية المختلفة في إنتاج حامض الستريك من الفطر *A. niger* وجد Xu *et al.* (1989) أن استخدام كبريتات الأمونيوم بتركيز ٥ غم/لتر أعطى أفضل إنتاج من الحامض.

كما أشار Choe & Yoo (1991) إلى أن أفضل إنتاج لحامض الستريك كان باستخدام نترات الأمونيوم بتركيز ٣ غم/لتر وعند دراسة العلاقة بين تركيز المصدر النيتروجيني وبين إنتاج الحامض وجد أنه إذا كان تركيز أيونات الأمونيوم داخل الخلايا ما بين ٢-٣ ملي مول/غم خلية فإن سرعة إنتاج الحامض ستكون عالية أما إذا كان تركيز أيونات الأمونيوم داخل الخلايا أقل من ١ ملي مول/غم خلية فإن إنتاج الحامض سيتوقف تماماً.

في حين وجد Yigitoglu *et al.* (1992) عند دراسته تأثير تراكيز مختلفة من كبريتات الأمونيوم تتراوح ما بين 0.5-٤ غم/لتر في إنتاج حامض الستريك أن التركيز ٣ غم/لتر هو التركيز الأمثل لإنتاج الحامض.

في دراسة لمعرفة تأثير مصادر نيتروجينية مختلفة شملت كبريتات الأمونيوم ونترات الأمونيوم ونترات الصوديوم وكاربونات الأمونيوم في إنتاج حامض الستريك من الفطر *A. niger* UV-6 وجد أن نترات الأمونيوم قد أعطت أعلى إنتاج من الحامض بلغ ٣٩,٠١ غم/لتر بالمقارنة بالمصادر النيتروجينية الأخرى وعند دراسة تأثير تراكيز مختلفة منها في إنتاج الحامض وجد أن التركيز 0.2 % هو أفضل تركيز للإنتاج وإن التراكيز الأعلى أو الأقل أعطت إنتاجية منخفضة من الحامض (UI-Haq *et al.*, 2001).

كما وجد Minh (2014) أن استخدام نترات الأمونيوم بتركيز 0.2 % أعطى أعلى إنتاج من الحامض من الفطر *M. piriformis* بالمقارنة بمصادر نيتروجينية وتراكيز أخرى.

(٣-٨-٣): الأملاح وبعض العناصر المعدنية Salts and some mineral elements

تؤثر الأملاح والعناصر المعدنية بشكل عام في عملية نمو الأحياء المجهرية وإنتاج المركبات الأيضية الثانوية المختلفة وتعدّ أملاح الفوسفات من المغذيات المهمة لنمو معظم الفطريات وتوجد بشكل متحد في بعض الجزيئات مثل الأحماض النووية والدهون الفوسفاتية والسكريات الفوسفاتية ومن أهم المصادر الفوسفاتية وأفضلها استخداماً

فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 وفوسفات البوتاسيوم الأحادية K_2HPO_4 (Abou-Zeid & Ashy, 1984).

وجد أن للفوسفات دوراً تنظيمياً لعمليات الأيض المختلفة كما في حالة إنتاج بعض الحوامض العضوية والمضادات الحيوية إذ تؤدي فوسفات البوتاسيوم الموجودة في الوسط الزراعي مهمتين رئيسيتين الأولى المحافظة على الرقم الهيدروجيني للوسط الزراعي بوصفها محلولاً منظماً والثانية كونها مصدراً مغذياً للفطر بتزويده بالفسفور (الخفاجي، ١٩٩٠).

هنالك أهمية كبيرة لتواجد المصدر الفوسفاتي في الوسط التخمرى المعد لإنتاج حامض الستريك إذ أن استخدام تراكيز قليلة يساعد على زيادة إنتاج الحامض وذلك بزيادة فعالية بعض الإنزيمات المهمة في إنتاجه، في حين أن استخدام تراكيز عالية يؤدي إلى تقليل تثبيت غاز ثنائي أكسيد الكربون وزيادة فرص تكوين أحماض سكرية مختلفة مع زيادة في نمو الخلايا (Grewal & Kalra, 1995).

إذ درس (Ul-Haq *et al.* (2001) تأثير مصادر فوسفاتية مختلفة هي فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 وفوسفات البوتاسيوم الأحادية K_2HPO_4 وفوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين NaH_2PO_4 وفوسفات الصوديوم الأحادية Na_2HPO_4 في إنتاج حامض الستريك من الفطر *A. niger* ووجد أن فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين أفضل مصدر للفوسفات إذ أعطت أعلى إنتاج من حامض الستريك بلغ ٣٨,٩ غم/لتر بالمقارنة مع مصادر الفوسفات الأخرى، وعند دراسة تأثير تراكيز مختلفة من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين التي تتراوح ما بين ٠,٠٥-٠,٢٠% في إنتاج الحامض وجد أن أفضل تركيز هو ٠,١% إذ بلغ إنتاج حامض الستريك ٤٢,٠١ غم/لتر وأن الزيادة عن هذا التركيز تؤدي إلى انخفاض ملحوظ في إنتاج الحامض، وهذا ما وجدته أيضاً (Mirminachi *et al.* (2002) والذي ذكر أن إضافة تراكيز قليلة من المصدر الفوسفاتي إلى وسط التخمر تساعد على زيادة إنتاج حامض الستريك وعلى العكس من ذلك فإن إضافة تراكيز عالية تؤدي إلى انخفاض ملحوظ في كمية الحامض المنتجة.

وجد أن لأملاح المغنسيوم تأثير كبير على عملية نمو الكائن المجهرى وإنتاج حامض الستريك بالإضافة إلى دورها الرئيس كمساعد إنزيمي لبعض الإنزيمات فقد أشار (Kapoor *et al.* (1983) إلى أن استخدام كبريتات المغنسيوم بتراكيز تتراوح ما بين ٠,٠٢-٠,٠٢٥% يعطي أفضل إنتاج لحامض الستريك.

للحصول على إنتاج جيد من حامض الستريك من الضروري تحديد تراكيز العناصر المعدنية مثل الخارصين والحديد والمنغنيز والنحاس في الوسط التخمرى ويمكن أن تتم عملية تحديد تراكيز العناصر المعدنية بطريقتين. الأولى تتضمن تنقية الوسط التخمرى لإزالة مختلف العناصر المعدنية ومن ثم إضافة تراكيز وكميات معلومة من العناصر المعدنية الضرورية، أما الثانية فتتضمن إضافة عوامل مخلبية (Chelating agents) للوسط التخمرى للتقليل من تراكيز العناصر المعدنية (Jianlong, 1998)، إذ ذكر (Vandenberghe *et al.* (1999) أن لوجود الخارصين أهمية في إنتاج حامض الستريك إذا تمت إضافته بتراكيز قليلة مع فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وأن وجوده بتراكيز عالية يؤدي إلى تقليل إنتاج حامض الستريك، فيما توصل (Majolli & Aguirre (1999) إلى أن وجود أيونات الحديد بتراكيز عالية يعمل على تحفيز فعالية إنزيم Aconitase الذي يعمل بدوره على تحويل Citrate المتكون إلى Isocitrate ومن ثم انخفاض معدلات إنتاج حامض الستريك.

ذكر (Anastassiadis *et al.* (2008) أن لتحديد تركيز المنغنيز في الوسط التخمرى تأثيراً مهماً في زيادة إنتاج حامض الستريك فعند إضافة المنغنيز بتراكيز تتراوح ما بين 0.002-0.02 ملي مولاري سيتم دعم إنتاج حامض

الستريك دون التأثير على سرعة نمو الكائن المجهرى وكتلته الحيوية، أما عند وجوده بتركيز عالية فإنه سيعمل على تقليل إنتاج الحامض بشكل كبير، وكذلك بالنسبة للنحاس فعند إضافته بتركيز قليلة جداً للوسط التخمرى سيساعد ذلك على زيادة إنتاج الحامض عن طريق تقليل تأثير الحديد المثبط لإنتاج الحامض وتداخله مع المغنيز المضاف للوسط التخمرى وتثبيط عملية استهلاك المغنيز من قبل الخلايا بشكل كبير (Benuzzia & Segovia, 1996).

إن التراكيز المثالية من العناصر المعدنية المختلفة التي يجب أن تتوفر في أوساط التخمر قد تختلف بسبب التأثيرات المتداخلة لهذه المعادن وقد يعتمد التركيز المناسب من معدن واحد على تراكيز بقية المعادن المتواجدة وكذلك تختلف السلالات بشكل واسع فيما بينها من ناحية قدرة تحملها للتراكيز المختلفة من العناصر المعدنية (Soccol *et al.*, 2006).

Temperature درجة الحرارة (٢-٨-٤)

تعدّ درجة حرارة الوسط التخمرى المستخدم لإنتاج حامض الستريك إحدى العوامل المهمة التي تؤثر بشكل مباشر في عملية الإنتاج، فعندما تكون درجة الحرارة منخفضة ستكون الفعالية الإنزيمية منخفضة أيضاً ومن ثم إنتاج كمية قليلة من الحامض وعندما تكون درجة الحرارة أعلى من ٣٠ م° فإن عملية بناء حامض الستريك ستقل أيضاً بسبب تأثيرها على عمل الإنزيم Citrate synthase ويمكن أن تسبب مسخه وتساعد على تكون حامض الأوكزاليك (Panda *et al.*, 1984)، وهذا ما أكده (Hang & Woodams, 1998) الذي أوضح أن درجة الحرارة ٤٠ م° هي الدرجة المثلى لإنتاج حامض الأوكزاليك وعندها يقل إنتاج حامض الستريك بشكل كبير.

فيما درس (Ul-Haq *et al.*, 2002) تأثير درجات الحرارة المختلفة في إنتاج حامض الستريك من الفطر *A. niger* GCMC-7 وهذه الدرجات هي ٢٥ و ٣٠ و ٣٥ و ٤٠ م° ووجد أن أفضل إنتاج من الحامض كان عند درجة حرارة ٣٠ م°.

توصل (Anastassiadis *et al.*, 2008) أن درجات الحرارة التي تتراوح ما بين ٢٨-٣٢ م° هي الفضلى لإنتاج حامض الستريك وأن درجة الحرارة ٣٠ م° هي درجة الحرارة المثلى للإنتاج، كما تم التوصل إلى أن درجة الحرارة ٣٠ م° قد أعطت أفضل إنتاج من الحامض بلغ ٣٤,٥٢ غم/لتر من الفطر *A. niger* على وسط المولاس (El-Hussein *et al.*, 2009). وفي دراسة لبيان تأثير درجات الحرارة المختلفة في إنتاج حامض الستريك باستخدام سلالة أخرى من الفطر *A. niger* على وسط نخالة الشوفان وجد أن درجة الحرارة ٢٥ م° هي المثلى لإنتاج الحامض (Rao & Reddy, 2013).

Growth method طريقة النمو (٣-٨-٥)

تختلف الأحياء المجهرية في قدرتها على إنتاج المركبات الأيضية الثانوية بحسب طريقة نموها، إذ فضل عدد كبير من الباحثين استخدام ظروف التخمر المهتزة على الظروف الساكنة في إنتاج حامض الستريك (Pallares *et al.*, 1996; El-Holi & Al-Delaimy, 2003; Majumder *et al.*, 2010; Sukesht *et al.*, 2013).

إن لعملية التحريك تأثيراً كبيراً في إنتاج حامض الستريك فهي تعمل على المحافظة على تجانس الظروف الكيميائية والفيزيائية من أجل التوزيع المتساوي للمواد الغذائية في الوسط التخمرى، كما أنها تعمل على زيادة نوبان الأوكسجين في الوسط التخمرى وإيصال أكثر كمية منه إلى الخلايا (Shojaosadati & Babaeipour, 2002). إذ استخدم Roukas (1991) سرعة الرج ٣٠٠ دورة/دقيقة في إنتاج حامض الستريك من الفطر *A. niger* ATCC9142 باستعمال مولاى البنجر كوسط لتنمية الفطر وأشار إلى أن الزيادة في سرعة الرج من ٣٠٠ إلى ٦٠٠ دورة/دقيقة أدت إلى نقصان في إنتاج الحامض. استعملت سرعة الرج ١٠٠ دورة/دقيقة في إنتاج حامض الستريك من سلالة تعود للفطر *A. niger* (Demirel et al., 2005)، فيما استعملت سرعة الرج ٢٠٠ دورة/دقيقة في إنتاج الحامض من سلالة أخرى تعود للفطر *A. niger* (AL-Mahin et al., 2012).

(٢-٨-٦): الرقم الهيدروجيني Power of Hydrogen

يعدّ الرقم الهيدروجيني للوسط من العوامل المؤثرة على نمو الأحياء المجهرية بشكل عام وعلى إنتاج عملية التخمر بشكل خاص إذ تحدث تغيرات ملحوظة في الرقم الهيدروجيني أثناء عملية التخمر فعند حدوث عملية الأكسدة التامة لمواد التفاعل أو امتصاص أيونات الأمونيوم سينخفض الرقم الهيدروجيني أما عند حدوث عملية إطلاق الأيونات بواسطة الـ Deamination لليوريا أو الأمينات الأخرى فيؤدى ذلك إلى ارتفاع الرقم الهيدروجيني (Raimbault, 1998).

وجد Srivastava & De (1980) أن الرقم الهيدروجيني ٢,٢ هو الأمثل لنمو الفطريات وإنتاج حامض الستريك، بينما أشار Roukas & Harvey (1988) إلى أن الرقم الهيدروجيني الذي يتراوح ما بين ٤-٥ هو الأمثل لإنتاج حامض الستريك باستخدام المولاى كوسط تخمرى.

إن التغير في الرقم الهيدروجيني للوسط التخمرى من الممكن أن يحدث تبعاً لنوع المصدر النيتروجيني المستخدم لدعم النمو وأن استخدام اليوريا كمصدر نيتروجيني بدلاً عن أملاح الأمونيوم هو أحد الطرق المستخدمة للسيطرة على الرقم الهيدروجيني (Lonsane et al., 1992).

فيما ذكر Karaffa & Kubicek (2003) أن الرقم الهيدروجيني المنخفض للوسط التخمرى يدعم إنتاج حامض الستريك ويقلل من مخاطر التلوث بالأحياء المجهرية ويثبط إنتاج الأحماض العضوية الأخرى مثل حامض الأوكزاليك وحامض الكلوكونيك ومن ثم ستكون عملية استخلاص حامض الستريك من الوسط التخمرى أسهل، إذ وجد أن الفطر *A. niger* ينتج حامض الأوكزاليك عند الرقم الهيدروجيني الأعلى من ٦ أما حامض الكلوكونيك فينتج عند الرقم الهيدروجيني الذي يتراوح ما بين ٤-٦ وأن إنتاج هذين الحامضين يتوقف عند الرقم الهيدروجيني المنخفض المفضل عند إنتاج حامض الستريك.

معظم الفطريات الخيطية تنمو جيداً تحت الظروف الحامضية التي تتراوح قيمها ما بين ٣-٦ أما بعض الفطريات فقد تنمو تحت رقم هيدروجيني بقيمة ٢ ووجد أن الفعالية الأيضية للفطريات حساسة جداً للرقم الهيدروجيني في الوسط ولا يوجد اتفاق كبير في الدراسات السابقة حول الرقم الهيدروجيني الأمثل عند إنتاج حامض الستريك (Anastassiadis et al., 2008).

(٣-٨-٧): حجم اللقاح Inoculum size

يعدّ حجم اللقاح احد العوامل المؤثرة على إنتاج حامض الستريك من الأحياء المجهرية ففي جميع خطوات التخمير ينبغي أن ينمو الكائن الحي المجهرى بسرعة وبأعداد مناسبة لكي تكون مدة الحضانة قصيرة نسبياً إذ إن فعالية العمليات الأيضية تزداد بنسب محددة عند زيادة حجم اللقاح المستخدم وعلى العكس من ذلك فإن استخدام حجم لقاح قليل جداً يؤدي إلى انخفاض هذه الفعالية وزيادة فرصة حدوث التلوث بالأحياء المجهرية الأخرى إذ أن استخدام تراكيز لقاح تتراوح ما بين $10^4 \times 1 - 10^9 \times 1$ بوغ/مل هو الأفضل لإنتاج الحامض من الفطر *A. niger* (Papagianni & Matthey, 2006).

درس (Ali et al., 2002) تأثير حجوم لقاح مختلفة تتراوح ما بين ٠,٥-٣,٥ % في إنتاج حامض الستريك من الفطر *A. niger* GCBT7 وكان تركيز العالق البوغي الأولي المستخدم هو $6,٥ \times 10^6$ بوغ/مل وقد وجد أن حجم اللقاح ١ % هو الأمثل في إنتاج حامض الستريك.

فيما استخدم (Rao & Reddy (2013) تركيز اللقاح $10^7 \times 1$ بوغ/مل لإنتاج الحامض من سلالة أخرى للفطر *A. niger* باستخدام وسط نخالة الشوفان. وفي دراسة أخرى لبيان تأثير حجوم لقاح مختلفة تتراوح ما بين ١-٥ % في إنتاج حامض الستريك من سلالة أخرى تابعة للفطر *A. niger* على وسط لب الفول الأفريقي وجد أن حجم اللقاح ٣ % هو الأفضل في إنتاج الحامض (Auta et al., 2014).

(٣-٨-٨): مدة الحضانة Incubation period

اهتمت دراسات عدة في تحديد مدة الحضانة المثلى لإنتاج حامض الستريك من الفطريات فقد وجد Palo et al. (1984) أن مدة الحضانة البالغة ١٤ يوماً هي الفضلى في إنتاج حامض الستريك باستخدام الفطر *A. niger* B-65 عن طريق التخمرات السطحية، بينما كانت مدة الحضانة البالغة ٨ أيام هي الفضلى لإنتاج حامض الستريك من سلالة أخرى للفطر *A. niger* باستخدام وسط يحتوي على السكرز كمصدر كربوني (Ali et al., 2001)، فيما كانت مدة الحضانة البالغة ١١ يوماً هي المثلى لإنتاج الحامض من العزلة الفطرية *A. niger* IIB-A6 إذ بلغت كمية الحامض المنتجة 23.87 غم/لتر باستخدام وسط نشا البطاطا الحلوة (Anwar et al., 2009).

وجد في دراستين حديثتين أن مدة الحضانة البالغة ٦ و ٥ أيام هي الفضلى في إنتاج حامض الستريك من سلالتين مختلفتين للفطر *A. niger* باستخدام وسط مولاس قصب السكر ووسط لب الفول الأفريقي على التوالي (Farooq et al., 2013; Auta et al., 2014)، فيما توصل (Minh (2014 إلى أن مدة الحضانة البالغة ٧ أيام هي الفضلى لإنتاج الحامض من الفطر *M. piriformis*.

(٣-٩): الكشف عن حامض الستريك Detection of citric acid

تستخدم وسائل متعددة لاستخلاص وتنقية الأحماض العضوية من الأوساط التخمرية التي تحويها مثل الترسيب (Precipitation) والاستخلاص بالمذيبات (Solvent extraction) والإدمصاص على الراتنجيات (Adsorption resins) والبلورة (Crystallization) والديليزة الكهربائية (Electrodialysis) والترشيح

الغشائي (Membrane filtration) فضلاً عن استخدام بعض الطرق الفيزيائية مثل الترشيح (Filtration) والتبخير (Evaporation) (Omar *et al.*, 2009).

استخدمت طريقة الترسيب بشكل كبير في دراسات عدة لاستخلاص وتنقية حامض الستريك من الأوساط التخمرية التي تحويه وهي من الطرق التقليدية في ذلك وما يزال الكثير من المصانع الكبيرة يستخدم هذه الطريقة في تنقية الحامض (Messing & Schmitz, 1976; Annadurai *et al.*, 1996; Vandenberghe *et al.*, 1999; Farooq *et al.*, 2013; Prabha & Rangaiah, 2014) وتتضمن هذه الطريقة استخدام كاربونات الكالسيوم لترسيب السترات على شكل سترات الكالسيوم ومن ثم تعامل بحامض الكبريتيك لترسيب كبريتات الكالسيوم وتحرير السترات (Pazouki & Panda, 1998).

ينتج من عملية الترسيب وتنقية الحامض نوعان من المخلفات التي يمكن أن تستخدم في مجالات أخرى، النوع الأول من المخلفات يتضمن بقايا الكائن الحي المجهرى المستخدم في عملية التخمر مثل البروتينات والأحماض الأمينية والمواد غير العضوية والسكريات والصبغات وبعض الفيتامينات مثل البيوتين وغيرها من المواد الأخرى التي يمكن أن تستخدم بعد تجفيفها كأعلاف للماشية أو تجهيز معامل تصنيع الأعلاف بها، أما النوع الثاني من المخلفات فيتضمن كبريتات الكالسيوم والتي يمكن أن تستخدم في صناعة الإسمنت بعد تجهيز معامل صناعة الإسمنت بها (Yokoya, 1992).

بشكل عام يعقب عملية التنقية استخدام عمليات فصل وتشخيص الحامض والكشف عنه مثل تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Thin Layer Chromatography (TLC) التي تتميز بسرعتها وكلفتها الواطئة مما يسهل اعتمادها بشكل كبير في الصناعات الدوائية وخاصة في تحديد نقاوة المنتج وكذلك تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC) High Performance Liquid Chromatography التي تعدّ من التقنيات المستخدمة في جميع عمليات الفصل التحليلي لما تتميز به من مميزات مثل حساسيتها وإمكانية استخدامها في التحليلات الكمية بدقة عالية وملاءمتها لفصل المواد غير المتطايرة وغير المتحملة لدرجات الحرارة العالية فضلاً عن استخداماتها الواسعة لفصل المركبات العضوية واللاعضوية المختلفة (Skoog *et al.*, 1997).

استخدمت تقنية HPLC في الكشف عن حامض الستريك في عدد من الدراسات، إذ استخدم Nour *et al.* (2010) هذه التقنية في الكشف عن بعض الحوامض العضوية ومن ضمنها حامض الستريك في عدد من الفواكه الحامضية. كما تم تحديد تركيز حامض الستريك والكشف عنه بعد إنتاجه من ثلاث سلالات مختلفة تعود للفطر *niger* بتقنية الـ (HPLC) أيضاً (Alben & Erkmén, 2004; Lotfy *et al.*, 2007; Farooq *et al.*, 2013). كما استخدم Weikle (2012) التقنية ذاتها في الكشف عن حامض الستريك المتواجد في بعض الفواكه الحامضية المختلفة وتحديد تركيزه. وفي دراسة حديثة كشف Suneetha (2014) عن حامض الستريك المنتج من قبل بعض الفطريات والبكتريا المعزولة من البصل بتقنية HPLC أيضاً.

Materials & Methods

٣- المواد وطرائق العمل

Apparatus & Materials

(٣-١): الأجهزة والمواد

Apparatus (٣-١-١): الأجهزة

المنشأ	النوع	الأجهزة
Germany	Sartorius	Sensitive balance ميزان حساس
Germany	Memmert	Distillator جهاز تقطير
Germany	Mauritius	pH-meter مقياس الأس الهيدروجيني
Germany	Memmert	Autoclave المؤصدة
Germany	Memmert	Static incubator حاضنة ساكنة
Germany	Memmert	Water bath حمام مائي
Germany	Hettich	Centrifuge جهاز نبد مركزي
Germany	Eppendorf	Cooling centrifuge جهاز نبد مركزي مبرد
Germany	Shimadzu	HPLC جهاز
England	Gallankamp	Shaker incubator حاضنة هزازة
England	Gallankamp	Electrical oven فرن كهربائي
England	Gallankamp	Vacuum pump مضخة تفريغ
England	Shandon-Scientific	Gel electrophoresis جهاز الترحيل الكهربائي
Korea	Lab Companion	Laminar flow cabinet حجرة تلقیح
Korea	Bioneer	Exispin vortex centrifuge جهاز

Korea	Labtech	مسخن حراري مع محرك مغناطيسي Hot plate with magnetic stirrer
Korea	Bioneer	جهاز الدوران الحراري PCR Thermocycler
Japan	Hitachi	جهاز UV-Visible spectrophotometer
Japan	Olympus	مجهر ضوئي Light microscope
Japan	Sony	كاميرا رقمية Digital camera
USA	Thermo	جهاز Nanodrop spectrophotometer
USA	San.Gabriel	باعث الأشعة فوق البنفسجية Ultra violet
USA	Applied Biosystems	AB DNA sequencing system
China	Cyan	مازج Vortex
China	LG	جهاز Microwave
Lebanon	Concord	ثلاجة Refrigerator
Switzerland	Buchi	المبخر الدوار Rotary vacuum evaporator

Materials (٣-١-٣): المواد

Chemical materials (٣-١-٣): المواد الكيميائية

المنشأ	الشركة المصنعة	المادة
Germany	Merck	حامض الهيدروكلوريك Hydrochloric acid
Germany	Merck	حامض الكبريتيك Sulfuric acid

England	BDH	Sodium hydroxide هيدروكسيد الصوديوم
England	BDH	Phosphoric acid حامض الفسفوريك
England	BDH	Sucrose سكروز
England	BDH	Ammonium nitrate نترات الأمونيوم
England	Avonchem	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين Potassium dihydrogen phosphate
England	BDH	كبريتات المغنسيوم المائية Magnesium sulphate heptahydrate
England	BDH	Acetic anhydride أنهيدريد الخليك
England	Griffin	Ammonium Solution محلول الأمونيا
England	BDH	Nitric acid حامض النتريك
England	BDH	Ammonium carbonate كاربونات الأمونيوم
England	BDH	Ammonium sulphate كبريتات الأمونيوم
England	BDH	Calcium carbonate كاربونات الكالسيوم
England	BDH	Potassium nitrate نترات البوتاسيوم
India	Himedia	الأكار Agar
India	Loba chemie	Standard citric acid حامض الستريك القياسي
India	Ajanta pharma limited	Chloramphenicol الكلورامفينكول
India	SDFCL	Potassium sodium tartrate تترات الصوديوم البوتاسيوم
India	AFCO	Glucose كلوكوز
USA	Difco	Yeast extract خلاصة الخميرة

USA	SIGMA	٣،٥- ثنائي نيترو حامض الساليسليك 3,5- Di nitro salicylic acid
Canada	Biobasic	Free nuclease water
Canada	Biobasic	Ladder 2000-100 bp
Canada	Biobasic	أكاروز Agarose
Canada	Biobasic	Ethidium bromide بروميد الأثيديوم
Canada	Biobasic	TBE buffer
Canada	Biobasic	Absolute ethanol
Switzerland	Fluka	بيريدين Pyridine

Kits (٣-٢-١-٣): العدد

المنشأ	الشركة المصنعة	المكونات	اسم العدة	ت
Korea	Bioneer	EZ-10 Column	عدة استخلاص الحامض النووي الفطري EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Mini- Preps Kit	١
		2.0 ml Collection Tube		
		Universal Digestion Buffer		
		Universal Buffer PF		
		Universal Buffer BD		
		Universal PW Solution		
		Universal Wash Solution		
		TE Buffer		
		Proteinase K (10mg/ml)		
Korea	Bioneer	Top DNA polymerase	عدة فحص Accupower® PCR PreMix	٢
		dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		

		Tris-HCl (pH 9.0), KCl, MgCl ₂		
		Stabilizer and tracking dye		

Methods طرائق العمل (٣-٣)

Preparation of Culture media تحضير الأوساط الزرعية (٣-٢-١)

Potato Dextrose Agar (PDA) ١- وسط أكار البطاطا ديكستروز

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات شركة Microgen الهندية وذلك بإذابة 39 غراماً منه في كمية من الماء المقطر في دورق زجاجي، ضبط الرقم الهيدروجيني عند 5.6 ثم أكمل الحجم إلى ١ لتر بالماء المقطر بعدها تم تعقيم الوسط بالمؤصدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121 م° وبضغط 15 باوند/انج^٢ لمدة 15 دقيقة، ثم برد الوسط قليلاً وأضيف إليه المضاد الحيوي كلورامفينكول (Chloramphenicol) بمقدار ٢٥٠ ملغم/لتر لتثبيط نمو البكتيريا في العينات المزروعة وقد استعمل هذا الوسط لغرض عزل وتشخيص وحفظ الفطريات من التربة.

Coconut Extract Agar (CEA) ٢- وسط أكار مستخلص جوز الهند

حضر هذا الوسط طبقاً لما ذكره (Saito & Machida 1999) وكما يأتي:
تم اخذ مقدار ١٠٠ غم من جوز الهند المبروش والمتوفر تجارياً في الأسواق وأضيف إليه ٣٠٠ مل من الماء المقطر، سخن المزيج لمدة ٢٠ دقيقة، بعدها رشح المزيج بواسطة قطعة من الشاش ثم أضيف للراشح ١,٥ % أكار وأكمل الحجم إلى ٣٠٠ مل باستخدام الماء المقطر

بعدها تم تعقيم الوسط كما ورد في الفقرة السابقة وقد استعمل هذا الوسط لغرض الكشف عن قابلية الفطريات المعزولة على إنتاج الافلاتوكسينات.

٣- وسط الإنتاج Production medium

استعمل الوسط الموصوف من قبل Ali *et al.* (2001) لغريلة العزلات الفطرية المستعملة في هذه الدراسة لإنتاج حامض الستريك ويتكون هذا الوسط من 15 % سكروز و 0.25 % نترات الأمونيوم NH_4NO_3 و 0.1 % فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 و 0.025 % كبريتات المغنسيوم المائية $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ وبعد إذابة المواد بالماء المقطر ضبط الرقم الهيدروجيني عند 3.5، وزع بعدها الوسط في دوارق زجاجية سعة ٢٥٠ مل لكل دورق 25 مل وعقم بعدها الوسط كما ورد في الفقرة السابقة ثم هيئت الدوارق لعملية التلقيح.

٣-٢-٣: عزل الفطريات من التربة Isolation of fungi from soil

تم عزل الفطريات المستخدمة في هذه الدراسة وذلك بأخذ العينات من تربة زراعية من إحدى حدائق جامعة القادسية في شهر آذار من عام ٢٠١٤ بوزن ١ كغم وضعت داخل أكياس نايلون نظيفة وتم نقلها إلى المختبر لغرض عزل الفطريات إذ تم إتباع طريقة التخفيف (Dilution Method) الواردة في الخليل (2005) لعزل الفطريات من التربة إذ أخذ ٢٥ غم من عينة التربة ووضعتها في دورق زجاجي معقم سعة ٢٥٠ مل ثم أضيف الماء المقطر المعقم إلى الدورق الزجاجي ليصبح حجم المحلول الكلي ٢٥٠ مل بعدها رج المحلول داخل الدورق جيداً ثم أخذ ١٠ مل من المحلول أعلاه بواسطة ماصة معقمة وأضيف إلى أنبوبة اختبار معقمة تحوي على ٩٠ مل من الماء المقطر المعقم للحصول على التخفيف الأول وهو ١٠/١ ثم أخذ ١٠ مل من التخفيف

الأول بواسطة ماصة معقمة وأضيف إلى أنبوية اختبار أخرى معقمة تحوي على ٩٠ مل من الماء المقطر المعقم للحصول على التخفيف الثاني وهو ١٠٠/١ كررت العملية أعلاه للحصول على محاليل مخففة من التربة وصولاً إلى التخفيف الخامس ١/١٠٠٠٠٠٠، بعدها تم أخذ ١ مل من التخفيف الرابع والخامس كلاً على حدة ووضعت في أطباق بتري بلاستيكية لكل تخفيف 15 طبق وأضيف إليها ٢٥ مل من الوسط الغذائي PDA المحضر مسبقاً ثم حركت الأطباق حركة رجوية لضمان انتشار حبيبات التربة المخففة داخل الوسط الغذائي بعدها تركت الأطباق لحين تصلب الوسط الغذائي ثم حضنت بالحاضنة بدرجة حرارة ٢٥ م° لمدة ٥ أيام بعدها جرت عملية تنقية الفطريات المطلوبة على الوسط الغذائي PDA بعد عملية تشخيصها وحساب النسب المئوية لتردها باستخدام المعادلة الآتية:

عدد مستعمرات الجنس أو النوع الفطري

$$\text{النسبة المئوية لتردد الفطر} = \frac{\text{العدد الكلي لمستعمرات الأجناس أو الأنواع الفطرية}}{100} \times$$

حفظت العزلات النقية بزراعتها على الوسط الغذائي PDA بصورة مائلة في أنابيب اختبار وحضنها لمدة أسبوع بدرجة حرارة 25 م° ووضعت في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال.

(٣-٢-٣): تشخيص الفطريات المعزولة Identification of isolated fungi

بعد عملية عزل الفطريات من التربة جرت عملية تشخيصها وذلك اعتماداً على المظهر الخارجي للمستعمرة (Morphological features) مثل الشكل واللون وأيضاً اعتماداً على الصفات المجهرية (Microscopic features) مثل شكل وحجم ولون وتركيب الحوامل والابواغ والتراكيب الأخرى باستخدام المفاتيح التصنيفية الواردة في المصادر التي تناولت تصنيف

ودراسة الفطريات قيد الدراسة الحالية وهي: (Barnett & Hunter, 1972; Domsch *et al.*, 1980; Moustafa, 1982; Moubasher, 1993).

(٣-٢-٤): الكشف عن إنتاج الافلاتوكسينات Detection of aflatoxins production

تم الكشف عن قابلية الفطريات المعزولة على إنتاج الافلاتوكسينات مختبرياً وذلك بحسب طريقة Saito & Machida (1999) باستخدام الوسط الغذائي CEA مع تحويل للطريقة وذلك باستخدام الوسط الخاص بإنتاج حامض الستريك (المحضر في الفقرة ٣-٢-١) مضافاً إليه مادة الأكار بتركيز ٢٠ غم/لتر وضبط الرقم الهيدروجيني عند 3.5، إذ تم تحضير أطباق زجاجية حاوية على الأوساط الغذائية المذكورة أعلاه، ثم لقت الأوساط بعد تصلبها بالمستعمرات الفطرية قيد الدراسة إذ تم نقل قطعة قطرها 7 ملم من المزارع النقية للفطريات باستخدام الثاقب الفليني ووضعت في منتصف الطبق بعد ذلك حضنت الأطباق الملقحة بالحاضنة لمدة ٧ أيام بدرجة حرارة ٢٥ م ثم أخرجت الأطباق من الحاضنة وأضيف في وسط كل غطاء من الأطباق ٠,٢ مل من محلول الأمونيا (٢٥%) ثم حضنت بالحاضنة بصورة مقلوبة لمدة ٢-٧ أيام وبدرجة حرارة ٣٠ م وبمكررين لكل فطر ولكل وسط، وتمت مراقبة الأطباق أثناء هذه المدة لملاحظة تغير لون قواعدها بالمقارنة بمعاملة السيطرة فإذا تغير لون قاعدة المستعمرة إلى اللون الأحمر الوردي أو الأصفر البرتقالي وبدرجات لونية مختلفة فإن ذلك يدل على أن الفطر له القابلية على إنتاج الافلاتوكسينات.

(٣-٢-٥): غربلة العزلات الفطرية Screening of fungal isolates

Inoculation of production medium تلقيح وسط الإنتاج (٣-٢-٥-١)

لغرض اختيار العزلة الفطرية ذات النمو الجيد (الكتلة الحيوية الجافة) والأكفأ في إنتاج حامض الستريك تم نقل قرص واحد بقطر ٧ ملم من 16 عزلة فطرية غير منتجة للفلاتوكسينات نامية على الوسط الغذائي PDA بعمر أسبوع واحد إلى ورق الوسط الإنتاجي المحضر مسبقاً (كلاً على حدة ولكل عزلة ٣ دوارق) بعدها تم حضن الدوارق الزجاجية في الحاضنة الهزازة (Shaker incubator) بسرعة رج ٢٠٠ دورة/دقيقة بدرجة حرارة ٣٠ مُم لمدة ٧ أيام.

Estimation of dry biomass تقدير الكتلة الحيوية الجافة (٣-٢-٥-٢)

تم تقدير الكتلة الحيوية الجافة بعد انتهاء فترة الحضانة المحددة وذلك بترشيح مزارع الفطريات باستخدام ورق ترشيح من نوع Whatman No.1 وترك الراشح جانباً لتقدير كمية حامض الستريك والرقم الهيدروجيني النهائي لاحقاً ثم جففت أوراق الترشيح في الفرن بدرجة حرارة ١١٠ مُم لمدة ٢-٤ ساعة وتم قياس الوزن الجاف باستخدام الميزان الحساس (Ali et al., 2001).

Estimation of amount of citric acid تقدير كمية حامض الستريك (٣-٢-٥-٣)

اتبعت طريقة (Marier & Boulet (1958) في تقدير كمية حامض الستريك أثناء جميع مراحل الدراسة واعتماداً على المنحنى القياسي لحامض الستريك.

إذ تم تحضير محلول حامض الستريك القياسي بتركيز ١٠ ملغم/مل وذلك بإذابة ١ غم من الحامض في كمية من الماء المقطر المعقم ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر المعقم ليكون التركيز النهائي للحامض ١٠ ملغم/مل ثم تم عمل المنحنى القياسي للحامض وكالاتي:

١- أضيفت الأحجام المبينة في الجدول أدناه في أنابيب اختبار بثلاث مكررات لكل حجم للحصول على تراكيز متدرجة من الحامض.

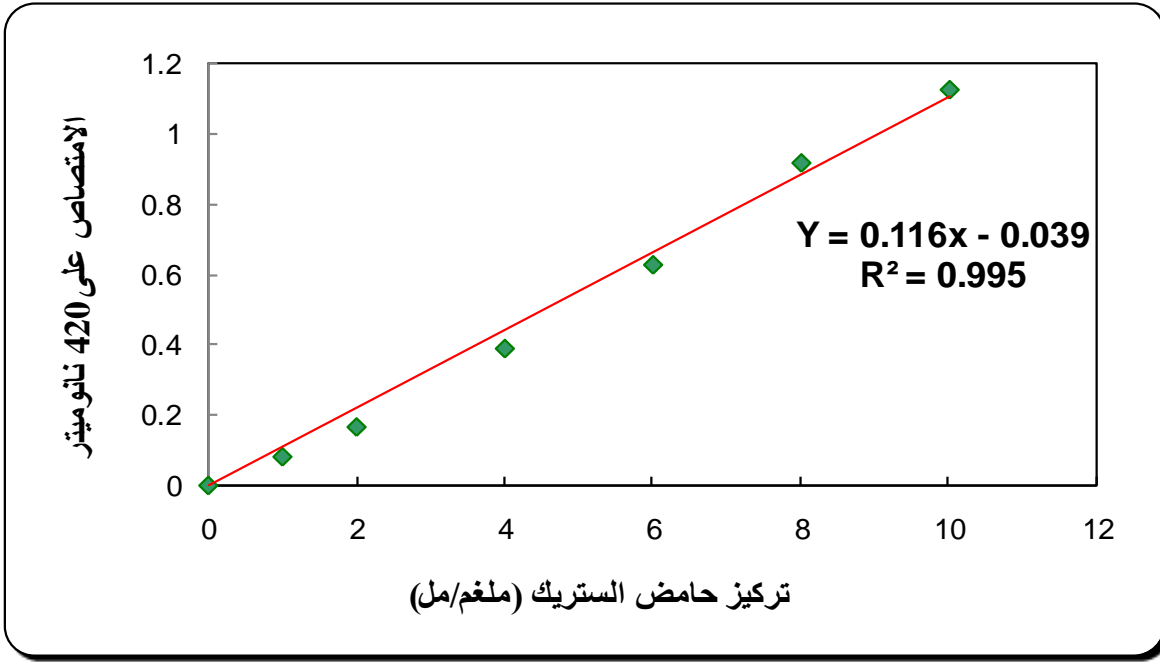
رقم الأنبوبة	حجم حامض الستريك القياسي (مل)	حجم الماء المقطر (مل)	الحجم النهائي (مل)	تركيز حامض الستريك (ملغم/مل)
١	٠	٥	5	0
٢	0.5	٤,٥	5	1
٣	1	4	5	2
٤	2	3	5	4
٥	3	2	5	6
٦	4	1	5	8
٧	5	٠	5	10

٢- أضيف ١,٣ مل من الـ Pyridine إلى ١ مل من كل تركيز من تراكيز الحامض المحضرة في الجدول السابق ورجت الأنابيب جيداً.

٣- أضيف ٥,٧ مل من Acetic anhydride إلى كل أنبوبة ورجت الأنابيب جيداً ثم وضعت بشكل مباشر في حمام مائي بدرجة حرارة ٣٢ مُم لمدة ٣٠ دقيقة.

٤- تم قراءة الامتصاص لكل تركيز عند الطول الموجي ٤٢٠ نانوميتر بواسطة جهاز المطياف بعد تصفير الجهاز بأنبوبة رقم (١) باعتبارها محلولاً صفرياً (Blank).

٥- رسمت العلاقة بين الامتصاص وتركيز حامض الستريك لإستحصال المنحنى القياسي (الشكل ١-٣) وتم حساب تركيز حامض الستريك لوسط الإنتاج بعد حضن العينات بالرجوع إلى المنحنى القياسي.



الشكل (٣-١): المنحنى القياسي لحامض الستريك.

بعدها تم تحديد العزلة الفطرية التي هي أغزر إنتاجاً لحامض الستريك واستخدامها في خطوات

الدراسة اللاحقة.

(٣-٢-٦): دراسة النمط الوراثي للعزلة الفطرية المنتخبة

Study genotype for the selected fungal isolate

تمت عملية دراسة النمط الوراثي للعزلة الفطرية 5 *A. niger* التي هي أغزر إنتاجاً لحامض

الستريك وقد تضمنت العملية عدة خطوات وكما يلي:

(٣-٢-٦-١): استخلاص الحامض النووي DNA DNA extraction

تم إجراء استخلاص الحامض النووي DNA من مستعمرات عزلة الفطر *A. niger* 5 وذلك باستخدام عدة الـ (EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Mini-Preps Kit) المجهزة من شركة Bioneer الكورية الجنوبية، وتم إجراء الاستخلاص حسب تعليمات الشركة المصنعة كالتالي:

- 1- نقل حوالي ٢٠٠ ملغم من مستعمرات النمو الفطري لخمسة مكررات إلى حاوية خزفية معقمة كلاً على حدة ثم تم سحق المستعمرات الفطرية باستخدام النيتروجين السائل ذي درجة حرارة 169-م الذي تم الحصول عليه من مركز التلقيح الاصطناعي البيطري في مدينة الديوانية ثم نقلت المستعمرات إلى أنابيب معقمة سعة 1.5 مل.
- 2- أضيف 180 مايكروليتر من محلول Universal Digestion Buffer و 20 مايكروليتر من إنزيم Proteinase K إلى كل عينة ومن ثم مزجت جيداً بواسطة جهاز المازج وحضنت العينات بدرجة حرارة 56 م في الحمام المائي لمدة ٣٠ دقيقة.
- 3- أضيف 100 مايكروليتر من محلول Universal Buffer PF ومزج بواسطة تقليب الأنابيب وحضنت بدرجة حرارة -20 م في الثلاجة لمدة ٣٠ دقيقة.
- 4- وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة ٥ دقائق ومن ثم نقل السائل الطافي إلى أنبوبة جديدة سعة 1.5 مل.
- 5- أضيف 100 مايكروليتر من محلول Universal Buffer BD ومزج جيداً بواسطة المازج.
- 6- أضيف 100 مايكروليتر من الكحول الأيثيلي المطلق 96 % إلى جميع العينات ومزجت جيداً بواسطة المازج.
- 7- نقل المزيج إلى أنابيب خاصة تحتوي على فلتر لاستخلاص الحامض النووي المجهزة مع العدة EZ-10 column موضوعة داخل أنابيب جامعة (Tube collection) سعة 2 مل ومن ثم وضعت

في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة ومن ثم تم التخلص من الراسب.

٨- أضيف 500 مايكروليتر من محلول Universal PW Solution ومن ثم وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة ومن ثم تم التخلص من الراسب.

٩- أضيف 500 مايكروليتر من محلول Universal Wash Solution ومن ثم وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة ومن ثم تم التخلص من الراسب.

١٠- وضعت الـ EZ-10 column الحاوية على الحامض النووي في أنابيب معقمة سعة 1.5 مل ومن ثم وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتان لتجفيف الـ EZ-10 column membrane من الكحول ومن ثم تم التخلص من الراسب.

١١- أضيف 50 مايكروليتر من محلول الـ TE Buffer لإذابة الحامض النووي داخل الـ EZ-10 filter column ومن ثم حضنت في درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة واحدة وبعدها وضعت جميع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة لجمع الحامض النووي وبعدها نقلت الأنابيب إلى الحفظ بدرجة حرارة -20 م في الثلاجة لحين الاستعمال.

(٣-٢-١-٢): قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي DNA

Purity and concentration measuring of DNA

تم الكشف عن الحامض النووي DNA المستخلص من عزلة الفطر *A. niger* 5 وذلك بواسطة استخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer الخاص بالكشف عن وقياس تركيز الأحماض النووية إذ تم الكشف عن الحامض النووي DNA وتحديد تركيزه بوحدة نانوغرام/مايكروليتر وقياس نقاوته بقراءة الامتصاصية بطول موجي (280/260) نانوميتر وتم استخدام الجهاز على النحو التالي:

- ١- بعد تشغيل جهاز Nanodrop تم اختيار برنامج قياس الحامض النووي نوع DNA.
- ٢- تم تصفير ركيزة المقياس مرتين باستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز وذلك بوضع ١ ميكروليتر من Free nuclease water باستخدام مايكروبايبيت معقمة على سطح ركيزة المقياس وإجراء التصفير وتم تنظيف الركيزة لقياس العينات.
- ٣- تم قياس تركيز الـ DNA وذلك باستخدام ١ ميكروليتر من كل عينة من الـ DNA المستخلص ومن ثم تم تنظيف ركيزة المقياس للجهاز مرة أخرى لقياس العينة الأخرى وهكذا.
- ٤- تم تحديد نقاوة عينات الـ DNA المستخلص بقراءة الامتصاصية باستخدام جهاز Nanodrop Spectrophotometer بطول موجي (280/260) نانوميتر إذ أن الحامض النووي DNA المستخلص يعدّ نقياً عندما تكون نسبة الامتصاصية هي أقل أو تساوي 1.8 حسب المواصفات القياسية للشركة المصنعة.

Primers البادئات: (٣-٢-١-٣)

تم استخدام البادئات الخاصة بمنطقة ITS2 gene-ITS1-5.8S rRNA وهما ITS 5 و ITS 4 في فحص الـ PCR في هذه الدراسة بالاعتماد على ما ورد في White *et al.* (1990) وقد تم تجهيز هذه البادئات من قبل شركة Bioneer الكورية الجنوبية (الجدول ٣-١).

الجدول (٣-١): بادئات منطقة ITS2 gene-ITS1-5.8S rRNA المستخدمة في تقنية الـ PCR

و PCR-RFLP.

اسم المنطقة	نوع البادئ	تسلسل القواعد النيتروجينية (٣' - ٥')	حجم ناتج PCR الـ
ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2	F (ITS5)	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	546 زوج قاعدي
	R (ITS4)	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	

F: Forward البادئ الأمامي. R: Reverse البادئ العكسي.

Preparation of PCR components (٣-١-٤): تحضير مكونات الـ PCR

حضرت مكونات الـ PCR باستخدام عدة الـ PCR PreMix ® Accupower المجهزة من قبل

شركة Bioneer الكورية الجنوبية واتبعت تعليمات الشركة المصنعة (الجدول ٣-٢).

الجدول (٣-٢): مكونات الـ PCR.

الحجم (مايكروليتر)	المكونات
5	DNA template
1.5	Forward primer (10pmole)
1.5	Reverse primer (10pmole)
12	Free nuclease water
20	الحجم النهائي

بعد ذلك وضعت مكونات مزيج تفاعل الـ PCR التي ذكرت في الجدول أعلاه في أنابيب حجم 0.2 مل خاصة بعدة فحص الـ PCR (PCR PreMix) PCR (Accupower®) والحاوية على بقية مكونات تفاعل الـ PCR ونقلت جميع الأنابيب إلى جهاز الطرد المركزي المازج (Exispin) Vortex centrifuge بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة ثلاث دقائق ومن ثم نقلت الأنابيب إلى جهاز الدوران الحراري (PCR Thermocycler) لإجراء عملية التضخيم (Amplification).

(٣-٢-٦-٥): ظروف الدورات الحرارية للـ PCR PCR thermocycler conditions

تم تضخيم الحامض النووي DNA المستخلص من المكررات الخمسة للعزلة الفطرية *A. niger* 5 باستخدام جهاز الدوران الحراري (PCR Thermocycler) وحسب طريقة Spadaro et al. (2012) (الجدول ٣-٣).

الجدول (3-3): ظروف التضخيم الحراري للحامض النووي DNA المستخلص من عينات الفطر *A. niger*

خطوات الـ PCR	درجة الحرارة	الوقت	التكرار (دورة)
المسخ الأولي Initial denaturation	95°م	5 دقائق	1 دورة
المسخ Denaturation	95°م	1 دقيقة	35 دورة
التصالب Annealing	52°م	1 دقيقة	
الاستطالة Extension	72°م	دقيقتان	
الإستطالة النهائية Final extension	72°م	10 دقائق	1 دورة
وقف التفاعل Hold	4°م	Forever	-

(٣-٢-٦-٦): الترحيل الكهربائي لنواتج الـ PCR

Electrophoresis for PCR

products

تم إجراء الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز 1 % كما يأتي:

١- أذيب ١ غم من هلام الاكاروز (Agarose gel) في ١٠٠ مل من محلول الـ TBE buffer

الداري بتركيز 1X وسخن باستخدام جهاز Microwave لمدة ٥ دقائق.

٢- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة ٥٠ °م وبعدها تم إضافة ٣ مايكروليتر من Ethidium bromide

ومزج جيداً مع الهلام.

٣- صب هلام الاكاروز في قالب الترحيل (Tray) الحاوي على المشط (Comb) لتحديد أماكن

العينات, وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة ١٥ دقيقة ومن ثم أزيل المشط من

الهلام بعناية.

- ٤- حملت عينات ناتج الـ PCR (٥ مكررات) ووضع في كل حفرة من الهلام ١٠ مايكروليتر.
- ٥- استخدم السلم القياسي (Marker ladder) ذي الحجم الجزيئي (100-2000) زوجاً قاعدياً لقياس ناتج الـ PCR ووضع ٥ مايكروليتر منه في الحفرة الأولى.
- ٦- بعد اكتمال عملية التحميل تم غمر هلام الاكاروز باستخدام محلول TBE Buffer الدارئ بتركيز 1X وأغلق غطاء الترحيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل باستخدام التيار الكهربائي بـ ١٠٠ فولت و ٨٠ أمبير لمدة ساعة واحدة.
- ٧- بعد انتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام الحاوي على ناتج الـ PCR باستخدام مصدر الأشعة فوق البنفسجية (U.V light source) لتحديد الناتج مع سلم القياس وصور الهلام باستخدام كاميرا رقمية.

٣-٦-٧): فحص الـ PCR-RFLP PCR-RFLP test

تم إجراء فحص PCR-RFLP للمكررات الخمسة للعزلة الفطرية 5 *A. niger* بحسب طريقة Spadaro *et al.* (2012) وقد تضمن الفحص تحضير مزيج PCR-RFLP باستخدام إنزيم القطع (*RsaI* restriction enzyme) المجهز من قبل شركة Biolab البريطانية (الجدول ٣-٤).

الجدول (٣-٤): مكونات الـ PCR-RFLP.

الحجم (مايكروليتر)	المكونات
5 مايكروليتر	PCR product
2 مايكروليتر	1XCutSmart™ Buffer
0.5 مايكروليتر	<i>RsaI</i> Restriction enzyme (10 unit)

12.5 مايكروليتر	Free nuclease water
20 مايكروليتر	الحجم النهائي

وضعت بعد ذلك مكونات مزيج تفاعل PCR-RFLP التي ذكرت في الجدول السابق في جهاز الطرد المركزي المازج (Vortex centrifuge (Exispin) بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة ثلاث دقائق ثم وضعت في جهاز الدوران الحراري (PCR Thermocycler) لكي تحضن بدرجة حرارة ٣٧ م لمدة ساعتين, بعد ذلك تم ترحيل الناتج على هلام الاكاروز بتركيز ٢ % كما ورد في طريقة الترحيل الكهربائي لنواتج الـ PCR وفحص الهلام الحاوي على ناتج PCR-RFLP باستخدام مصدر الأشعة فوق البنفسجية (U.V light source) وصور الهلام باستخدام كاميرا رقمية.

(٣-٢-٦-٨): طريقة تسلسل الحامض النووي DNA DNA sequencer method

تم الحصول على تسلسل الحامض النووي DNA لمنطقة ITS2 gene-ITS1-5.8S rRNA للعزلة الفطرية *A. niger* 5 وذلك بإرسال ناتج تفاعل الـ PCR إلى شركة Macrogen في كوريا الجنوبية وذلك لإجراء تسلسل الحامض النووي DNA باستخدام جهاز AB DNA sequencing system وبعد الحصول على نتائج التسلسل للحامض النووي DNA تم استخراج مناطق التغيرات الوراثية والمسافات الجينية وإجراء تحليل الشجرة الوراثية (Phylogenetic tree analysis) باستخدام برنامج MEGA 6 وذلك بمقارنة تسلسل الحامض النووي DNA لعزلة الفطر *A. niger* المحلية مع تسلسل الحامض النووي DNA لبعض عزلات الفطر *A. niger* العالمية المعزولة من التربة والمسجلة في قاعدة بيانات المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحيوية (NCBI)

.National Center for Biotechnology Information

(٣-٢-٧): تحديد بعض الظروف المثلى لإنتاج حامض الستريك

Determine some optimal conditions of citric acid production

تم دراسة تأثير بعض العوامل في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger* 5 وقد اشتملت هذه العوامل على نوع المصدر الكربوني وتركيزه ونوع المصدر النيتروجيني وتركيزه والأملاح وتركيزها ودرجة حرارة الحضان وطريقة النمو والرقم الهيدروجيني الابتدائي وحجم اللقاح ومدة الحضان.

(٣-٢-٧-١): تأثير المصدر الكربوني Effect of carbon source

استخدم مولاس قصب السكر وقشور الرز كمصدر كربوني لإنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية المنتخبة وقد تضمنت العملية عدة خطوات وكما يلي:

(٣-٢-٧-١-١): تحضير المنحنى القياسي للكلوكوز

Preparation of standard curve for

glucose

حضر المنحنى القياسي للكلوكوز بوصفه سكرًا مختزلًا لتقدير السكريات المختزلة في وسطي مولاس قصب السكر وقشور الرز لاحقاً عند تحضيرهما وكذلك تقدير السكريات المختزلة المتبقية في وسطي الإنتاج بعد انتهاء عملية التخمر وقد اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Miller (1959) في تقدير السكريات المختزلة وكما يلي:

١- محلول الكلوكوز القياسي بتركيز ١٠ ملغم/مل:

حضر بإذابة ١ غم من الكلوكوز في كمية من الماء المقطر المعقم ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠

مل بالماء المقطر المعقم ليكون التركيز النهائي للكلوكوز ١٠ ملغم/مل.

٢- محلول هيدروكسيد الصوديوم:

حضر هذا المحلول بإذابة ٨ غم من هيدروكسيد الصوديوم في كمية معينة من الماء المقطر

المعقم ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر المعقم.

٣- محلول 5,3 ثنائي نيترو حامض الساليسيليك (3,5-Di nitro salicylic acid):

حضر هذا المحلول بإذابة ١ غم من المادة (3,5-DNSA) في ٥٠ مل من الماء المقطر المعقم.

بعدها أضيف إلى محلول 5,3 ثنائي نيترو حامض الساليسيليك ٢٠ مل من محلول هيدروكسيد

الصوديوم و ٣٠ غم من تترترات الصوديوم البوتاسيوم وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مل بالماء المقطر

المعقم، بعدها تم إتباع الخطوات التالية في عملية تحضير المنحنى القياسي للكلوكوز:

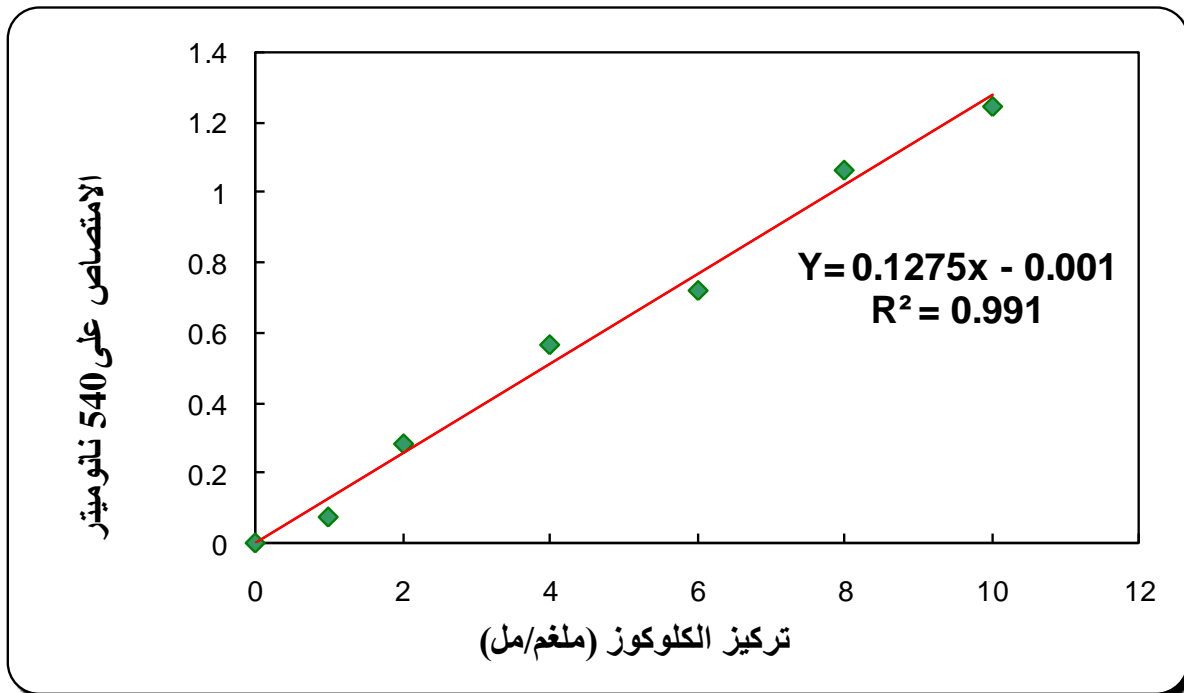
١- أضيفت الأحجام المبينة في الجدول أدناه في أنابيب اختبار بثلاث مكررات لكل حجم

للحصول على تراكيز متدرجة من الكلوكوز.

رقم الأنبوبة	حجم الكلوكوز القياسي (مل)	حجم الماء المقطر (مل)	الحجم النهائي (مل)	تركيز الكلوكوز (ملغم/مل)
١	٠	٥	5	0
٢	0.5	٤,٥	5	1
٣	1	4	5	2
٤	2	3	5	4

6	5	2	3	5
8	5	1	4	6
10	5	0	5	7

- ٢- أضيف ١ مل من الخليط المحضر أعلاه إلى ١ مل من كل تركيز من تراكيز محلول الكلوكوز المحضرة في الجدول أعلاه ووضعت في حمام مائي مغلي لمدة ٥ دقائق.
- ٣- بردت الأنابيب في حمام مائي ثلجي بعد انتهاء مدة الغليان بشكل مباشر.
- ٤- أضيف ٥ مل من الماء المقطر المعقم لكل أنبوبة اختبار وتم رجها جيداً.
- ٥- تم قراءة الامتصاص لكل تركيز عند الطول الموجي 540 نانومتر بواسطة جهاز المطياف بعد تصفير الجهاز بأنبوبة رقم (١) باعتبارها محلولاً صفرياً (Blank).
- ٦- رسمت العلاقة بين الامتصاص وتركيز الكلوكوز لإستحصال المنحنى القياسي (الشكل ٣-٢).



الشكل (٣-٢): المنحنى القياسي للكلوكوز.

Preparation of molasses medium تحضير وسط المولاس (٣-١-٧-٢-٣)

جلبت كميات من المولاس من معمل قصب السكر في محافظة ميسان وقد تم ترويق المولاس بحسب طريقة Panda *et al.* (1984) وذلك بأخذ ٢٥ مل من المولاس في دورق زجاجي سعة ٢٥٠ مل وأضيف إليه ٧٥ مل من الماء المقطر ليكون الحجم النهائي ١٠٠ مل ثم أضيف إليه 3.5 مل من حامض الكبريتيك وتم غلي الخليط لمدة نصف ساعة ثم ترك لليوم التالي بعدها وضع في جهاز الطرد المركزي بسرعة ٥٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة دقيقتين وأهمل الراسب وأخذ الرائق. تم تقدير محتوى الرائق من السكريات المختزلة بالرجوع إلى المنحنى القياسي للكلوكوز بعدها حضرت تراكيز مختلفة من المولاس المروق وذلك بالتخفيف بالماء المقطر وهذه التراكيز هي ١١ و ١٣ و ١٥ و ١٧ و ١٩ % سكريات مختزلة.

استخدم المولاس بعد تروييقه كوسط لإذابة مكونات وسط إنتاج حامض الستريك (المحضر في الفقرة ٣-٢-١) فيما عدا السكروز وتم ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط عند 3.5، وزع بعدها الوسط في دوارق زجاجية سعة ٢٥٠ مل لكل دورق 25 مل وعقم بجهاز المؤسدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121 م° وبضغط 15 باوند/انج^٢ لمدة 15 دقيقة ثم برد الوسط ولقح بعدها بقرص من المزرعة الفطرية النامية للعزلة المنتخبة بقطر ٧ ملم وبتلات مكررات بعدها تم

حضن الدوارق الزجاجية في الحاضنة الهزازة (Shaker incubator) بسرعة رج ٢٠٠ دورة/دقيقة بدرجة حرارة ٣٠ مُم لمدة ٧ أيام.

بعد انتهاء فترة الحضانة المحددة تم ترشيح مزارع الفطريات باستخدام ورق ترشيح من نوع Whatman No.1 وترك الراشح جانباً لتقدير كمية حامض الستريك والسكر المتبقي فيما جففت أوراق الترشيح في الفرن وتم تحديد الكتلة الحيوية كما ورد في الفقرة (2-5-2-3).

(٣-٢-٧-١-٣): تحضير وسط راشم قشور الرز

Preparation of rice husk filtrate medium

تم جلب كميات من قشور الرز من إحدى المزارش في مدينة الديوانية واتبعت طريقة (Ang et al. (2009) في تحضير وسط قشور الرز إذ تم غسل القشور جيداً بالماء العادي ثم بالماء المقطر لإزالة الشوائب والأتربة العالقة بها ثم جففت قليلاً باستخدام الفرن الكهربائي بدرجة حرارة ٥٥ مُم لمدة ٢٤ ساعة بعدها تم أخذ ١٠٠ غم من قشور الرز ووضعت في دورق زجاجي سعة ٥٠٠ مل وأضيفت إليها كمية من الماء المقطر ومن ثم أضيف إليها ١٠ مل من حامض النتريك وأكمل الحجم بالماء المقطر إلى ٥٠٠ مل ثم تم غلي الخليط بدرجة حرارة ١٠٠ مُم لمدة ٨ ساعات بعدها ترك ليبرد ثم رشح باستخدام أوراق ترشيح من نوع Whatman No.1 وأهمل الراسب وأخذ الراشح.

تم تقدير محتوى الراشح من السكريات المختزلة بالرجوع إلى المنحنى القياسي للكلوكوز بعدها حضرت تراكيز مختلفة من الراشح وذلك بالتخفيف بالماء المقطر وهذه التراكيز هي ١١ و ١٣ و ١٥ و ١٧ و ١٩ % سكريات مختزلة.

استخدم الراشح كوسط لإذابة مكونات وسط إنتاج حامض الستريك (المحضر في الفقرة ٣-٢-١) فيما عدا السكروز وتم ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط عند 3.5، وزع بعدها الوسط في دوارق زجاجية سعة ٢٥٠ مل لكل دورق ٢٥ مل وعقم بجهاز المؤصدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121 م° وبضغط 15 باوند/انج^٢ لمدة 15 دقيقة ثم برد الوسط ولقح بعدها بقرص من المزرعة الفطرية النامية للعزلة المنتخبة بقطر ٧ ملم بثلاث مكررات بعدها تم حضن الدوارق الزجاجية في الحاضنة الهزازة (Shaker incubator) بسرعة رج ٢٠٠ دورة/دقيقة بدرجة حرارة ٣٠ م° لمدة ٧ أيام.

بعد انتهاء فترة الحضن المحددة تم ترشيح مزارع الفطريات باستخدام ورق ترشيح من نوع Whatman No.1 وترك الراشح جانباً لتقدير كمية حامض الستريك والسكر المتبقي فيما جففت أوراق الترشيح في الفرن وتم تحديد الكتلة الحيوية وكما ورد في الفقرة (3-2-5-2).

Effect of nitrogen source تأثير المصدر النيتروجيني (٣-٧-٢)

تم اختيار التركيز ١٥ % بالنسبة للمولاس وراشح قشور الرز كمصدر كربوني في الخطوات اللاحقة جميعاً، إذ حضرت التراكيز أعلاه كلاً على حدة وأضيفت إليها مكونات وسط الإنتاج وبالتراكيز ذاتها عدا المصدر النيتروجيني إذ تم اختبار خمسة مصادر نيتروجينية لتحديد المصدر الأفضل منها في إنتاج حامض الستريك من العزلة المنتخبة وهذه المصادر هي (نترات الأمونيوم ومستخلص الخميرة وكاربونات الأمونيوم وكبريتات الأمونيوم ونترات البوتاسيوم) وقد استخدمت هذه المصادر جميعاً بتركيز ٠,٢٥ % مع معاملة المقارنة التي تتضمن عدم إضافة أي مصدر نيتروجيني.

بعدها تم تحديد تركيز المصدر النيتروجيني الأمثل لإنتاج الحامض إذ أضيفت تراكيز متدرجة من المصدر النيتروجيني الأفضل إلى وسط المولاس ووسط راشح قشور الرز كلاً على حدة وهذه التراكيز هي ٠,١ و ٠,٢٥ و ٠,٥ و ٠,٧٥ و ١,٠ % وحدد التركيز الأمثل من المصدر النيتروجيني الأفضل لإنتاج الحامض.

Effect of salts : تأثير الأملاح (٣-٧-٢-٣)

استخدمت فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وكبريتات المغنسيوم المائية بتوليفات مختلفة

ليبين تأثيرهما في إنتاج حامض الستريك وكما مبين في أدناه:

رقم المعاملة	تركيز KH_2PO_4 (%)	تركيز $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (%)
١	٠	٠
٢	٠,٠٥	0.025
٣	٠,٠٥	٠,٠٥
٤	0.05	0.1
٥	0.1	٠,٠٢٥
٦	٠,١	٠,٠٥
٧	٠,١	0.1
٨	0.2	٠,٠٢٥
٩	٠,٢	٠,٠٥

٠,١	0.2	١٠
-----	-----	----

Effect of incubation temperature تأثير درجة حرارة الحضانة (٣-٢-٧-٤):

حضر وسطا المولاس وراشح قشور الرز كلاً على حدة وأضيف إليهما كاربونات الأمونيوم والأملاح بالتركيز الأمثل الذي تم التوصل إليه سابقاً، وزعت الأوساط في دوارق زجاجية سعة ٢٥٠ مل لكل دورق ٢٥ مل ثم لقت بلقاح العزلة المنتخبة وتم دراسة تأثير درجة حرارة الحضانة في إنتاج حامض الستريك لاختيار درجة الحرارة المثلى لإنتاج الحامض وهذه الدرجات هي ٢٠ و ٢٥ و ٣٠ و ٣٥ و ٤٠ م.

Effect of growth method تأثير طريقة النمو (٣-٢-٧-٥):

تم تنمية العزلة المنتخبة بطريقتين مختلفتين هما الحضانة بالحاضنة الساكنة (Static incubator) والحضانة بالهزارة (Shaker incubator) بسرعات مختلفة هي ١٠٠ و ٢٠٠ و ٣٠٠ و ٤٠٠ دورة/دقيقة لبيان تأثير طريقة النمو في إنتاج حامض الستريك واختيار الطريقة المثلى.

Effect of primary pH تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي (٣-٢-٧-٦):

تم دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج حامض الستريك من العزلة المنتخبة إذ وزعت الأوساط في دوارق زجاجية سعة ٢٥٠ مل لكل دورق ٢٥ مل وعدل الرقم الهيدروجيني في هذه الدوارق إلى ٢,٥ و ٣ و ٣,٥ و ٤ و ٤,٥ و ٥ باستخدام كل من هيدروكسيد الصوديوم وحامض الهيدروكلوريك ثم حضنت الدوارق بظروف الإنتاج المثلى التي تم التوصل إليها سابقاً.

Effect of inoculum size تأثير حجم اللقاح (٣-٧-٧):

تم تحضير عالق ابواغ العزلة المنتخبة وذلك من مزارع نقية عمرها أسبوع واحد على الوسط الغذائي PDA وذلك بإضافة ٢٠ مل الماء المقطر المعقم للطبق، بعدها فصلت الابواغ باستخدام قضيب زجاجي على شكل حرف (L) معقم وتم تحريكه على سطح المزرعة بجميع الاتجاهات لغرض حصاد اكبر كمية من كتلة الابواغ للفطر ثم نقل العالق إلى بيكر زجاجي سعة ١٠٠ ووضع على جهاز المزج ذي الصفيحة الساخنة (Hotplate magnetic stirrer) لتكسير السلاسل الكونيدية، بعدها رشح العالق باستخدام القطن المعقم لغرض التخلص من الخيوط الفطرية وبقايا الوسط الغذائي (الجريايوي والمعموري، ٢٠١٥)، إن الراشح الناتج يمثل العالق البوغي غير المخفف أو ما يمثل التركيز 1×10^6 بوغ/مل بعد حسابه في شريحة عد كريات الدم الحمراء (Haemocytometer) وذلك بأخذ ١٠٠ مايكروليتر من العالق البوغي وأضيف إلى ٣٠٠ مايكروليتر من الماء المقطر المعقم في أنبوبة زجاجية معقمة ثم وضع غطاء الشريحة بشكل محكم على شريحة العد بعدها وضعت قطرة من العالق البوغي المخفف على الشريحة وتم حساب عدد الابواغ في خمسة مربعات باستخدام المجهر ثم أخذ المعدل لكل قراءة وبتلاثة مكررات وتم حساب معدل عدد الابواغ في ١ مل بالاعتماد على معادلة (Lacey 1997) وكما يلي:

$$\text{معدل عدد الابواغ (x)} = \text{معدل عدد الابواغ في ٥ مربعات} \times \text{معامل التخفيف المستخدم} \times 10^4$$

بعدها لقيح وسطا الإنتاج (المولاس وقشور الرز) كلاً على حدة بحجوم لقيح مقدارها 1 و 2 و 3 و 4 و 5 % من حجم الوسط وحضنت الأوساط بظروف الإنتاج المثلى التي تم التوصل إليها سابقاً لبيان تأثير حجم اللقاح في إنتاج الحامض من العزلة المنتخبة.

Effect of incubation period تأثير مدة الحضانة (٣-٧-٨):

لمعرفة مدة الحضانة المثلى للإنتاج لقيحت الأوساط بلقاح العزلة المنتخبة وحضنت الأوساط بطروف الإنتاج المثلى التي تم التوصل إليها سابقاً بمدد حضانة مختلفة تراوحت ما بين 1-10 أيام وتم متابعة إنتاج حامض الستريك وتقدير الكتلة الحيوية للفطر يومياً.

Purification of citric acid تنقية حامض الستريك (٣-٢-٨):

اتبعت طريقة الترسيب الموصوفة من قبل Annadurai *et al.* (1996) في استخلاص وتنقية حامض الستريك من وسط التخمر وكما يلي:

١- تم إنتاج كمية من حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger* 5 وتحت الظروف المثلى للإنتاج التي تم التوصل إليها سابقاً.

٢- رشح وسط التخمر الحاوي على حامض الستريك باستخدام ورق ترشيح من نوع No.1 Whatman لفصل نواتج التخمر عن الخيوط الفطرية وبقايا الوسط ثم وضع الراشح في جهاز الطرد المركزي وطرده مركزياً بسرعة ٥٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق وأخذ الرائق وكررت العملية للحصول على الكميات المطلوبة.

٣- أخذ ١٠٠ مل من الراشح الرائق ووضع في بيكر زجاجي سعة ٢٥٠ مل وأضيف إليه ٧,٥ غم من كربونات الكالسيوم ومزج جيداً باستخدام جهاز المزج ذي الصفيحة الساخنة (Hotplate magnetic stirrer) وضبط الرقم الهيدروجيني عند ٨ ثم سخن المزيج بدرجة حرارة ١٠٠ م لمدة ٤٥ دقيقة.

٤- رشح المزيج باستخدام ورق ترشيح من نوع Whatman No.1 لفصل سترات الكالسيوم المتكونة بشكل راسب ومن ثم غسل الراسب بماء ساخن عدة مرات وجففت أوراق الترشيح الحاوية على الراسب بالفرن الكهربائي بدرجة حرارة ٨٠ مُم لمدة ٤٨ ساعة وتم وزن الراسب.

٥- أضيف حامض الكبريتيك إلى الراسب الموضوع في بيكر زجاجي آخر سعة ٢٥٠ مل بمقدار (٣ مل/غم راسب) ومزج جيداً باستخدام جهاز المزج ذي الصفيحة الساخنة وضبط الرقم الهيدروجيني عند 1.3 وسخن المزيج بدرجة حرارة ٨٠ مُم لمدة ٣٠ دقيقة.

٦- رشح المزيج باستخدام ورق ترشيح من نوع Whatman No.1 للتخلص من كبريتات الكالسيوم المتكونة بشكل راسب وأهمل الراسب وأخذ الراشح الحاوي على حامض الستريك.

٧- كررت عملية الترشيح باستخدام مرشحات دقيقة (Millipore filters 0.22 µm) باستعمال قمع بخنر موصل بواسطة جهاز التفريغ الهوائي وأحتفظ بالراشح الحاوي على الحامض.

٨- تم تركيز الحامض بتجفيف الراشح باستعمال جهاز المبخن الدور (Rotary vacuum evaporator) بدرجة حرارة 40 مُم لحين الحصول على سائل كثيف.

(٣-٢-٩): الكشف عن حامض الستريك باستخدام كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة

Detection of citric acid using HPLC

استخدمت تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة للكشف عن حامض الستريك المنتج إذ تم حقن ٥ مايكروليتر من الراشح المنقى وحامض الستريك القياسي المحضر بتركيز ١ غم/لتر كلاً على حدة باستخدام الحاقن في العمود الخاص بالجهاز وهو من نوع C18 ذي الأبعاد 250 x 4 ملم وقد استعمل الطور المتحرك (50 mM Phosphate solution) والمحضر بإذابة ٦,٨ غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في ٩٠٠ مل ماء مقطر عند رقم هيدروجيني 2.8 الذي تم

ضبطه باستخدام حامض الفسفوريك ومن ثم أكمل الحجم إلى ١ لتر بالماء المقطر بعدها رشح باستخدام (Polyamide membrane 0.2 µm) بواسطة جهاز التفريغ الهوائي وقد تم استخدام معدل جريان 0.7 مل/دقيقة فيما كانت درجة حرارة العمود ٣٥ م°م وتم قياس الامتصاص بطول موجي ٢١٤ نانوميتر بعدها رسمت العلاقة بين الامتصاص وزمن الاحتجاز (Nour et al., 2010).

Statistical analysis التحليل الإحصائي (٣-٢-١٠):

حددت الفروق المعنوية عند مستوى احتمال 5 %، إذ شمل التحليل الإحصائي تحليل التباين الأحادي (ANOVA) One Way Analysis of Variance باستخدام برنامج (SPSS) Statistical Package for the Social Sciences، وتم اختبار الفروق المعنوية بين المتوسطات بواسطة اختبار دنكن متعدد الحدود (الراوي وخلف الله، ٢٠٠٠).

Results & Discussion النتائج والمناقشة ٤-١-٤

(٤-١): عزل وتشخيص الفطريات من التربة

تم تشخيص 21 عزلة فطرية توزعت بين ١٢ عزلة تعود للفطر *Aspergillus niger* بنسبة تردد بلغت ٥٧,١٤ % و ٥ عزلات تعود للفطر *Trichoderma viride* بنسبة تردد بلغت ٢٣,٨ % و ٤ عزلات تعود للفطر *Mucor spp.* بنسبة تردد بلغت ١٩,٠٤ % (الجدول ٤-١).

إذ ظهرت مستعمرات الفطر *A. niger* على الوسط الغذائي PDA بلون أسود غامق، سريعة النمو، ذات نسجة مترابطة غير مفككة وطبيعة مخملية (Velvety)، الخيوط الفطرية كانت مقسمة ومتفرعة، الحوامل الكونيدية نشأت على خلايا قديمة (Foot cells) وهذه الحوامل مثخنة الجدران واتسعت نهاية كل حامل وكونت حويصلة كروية الشكل، أما الفياليات فكانت ثنائية التفرع (Biseriate) الأولية تكون طويلة والثانوية تكون قصيرة تحمل كونيدات كروية الشكل، أما

مستعمرات الفطر *T. viride* فكانت على الوسط الغذائي PDA ذات مظهر صوفي أبيض اللون ثم سرعان ما تحولت إلى خضراء اللون عند اكتمال النمو، الخيوط الفطرية كانت مقسمة ومتفرعة ومفككة ناعمة عديمة اللون، الحوامل الكونيدية كانت قصيرة ومتفرعة إلى أفرع جانبية بشكل مجاميع ثنائية وثلاثية ورباعية وكل فرع يحمل فياليد صغير كأسى الشكل والذي يحمل بدوره كونيدة كروية الشكل، أما بالنسبة لمستعمرات الفطر *Mucor spp.* فكانت سريعة النمو جداً على الوسط الغذائي PDA وظهرت بشكل مستعمرات قطنية إلى زغبية بيضاء اللون وأصبحت رمادية داكنة عند اكتمال النمو، الخيوط الفطرية كانت غير مقسمة، الحوافز السبورية كانت كبيرة الحجم وكروية الشكل عديدة الابواغ وحاوية على عويمد (Columella) كبير ومتطاوّل، حوامل الحوافز السبورية ظهرت بشكل قائم، متفرعة، الابواغ ذات شكل كروي تقريباً، تم اختيار هذه العزلات الفطرية تبعاً للمعلومات الأولية التي تم الحصول عليها من عدد من الدراسات السابقة التي أشارت إلى إمكانية استخدامها في إنتاج حامض الستريك وتفضيلها على الفطريات الأخرى (Vandenberghé *et al.*, 1999; Harman *et al.*, 2004; Papagianni, 2007; Anastassiadis *et al.*, 2008; Makut & Ade-Ibijola, 2012;; Minh, 2014)

الجدول (1-4): الفطريات المعزولة من التربة والمستعملة في الدراسة الحالية.

رقم العزلة	الفطر	رقم العزلة	الفطر
١	<i>Aspergillus niger</i>	١٢	<i>A. niger</i>
٢	<i>A. niger</i>	١٣	<i>Trichoderma viride</i>
٣	<i>A. niger</i>	١٤	<i>T. viride</i>
٤	<i>A. niger</i>	١٥	<i>T. viride</i>
٥	<i>A. niger</i>	١٦	<i>T. viride</i>

<i>T. viride</i>	١٧	<i>A. niger</i>	٦
<i>Mucor sp.</i>	١٨	<i>A. niger</i>	٧
<i>Mucor sp.</i>	١٩	<i>A. niger</i>	٨
<i>Mucor sp.</i>	٢٠	<i>A. niger</i>	٩
<i>Mucor sp.</i>	٢١	<i>A. niger</i>	١٠
		<i>A. niger</i>	11

نسبة تردد الفطر *A. niger* ١٤,٥٧٪، نسبة تردد الفطر *Trichoderma viride* ٨,٢٣٪، نسبة تردد الفطر *Mucor sp.* ١٩,٠٤٪.

(٤-٣): الكشف عن قابلية العزلات الفطرية المدروسة على إنتاج الافلاتوكسينات

جرت عملية غربلة للعزلات الفطرية قيد الدراسة وذلك بالكشف عن قابليتها على إنتاج الافلاتوكسينات مختبرياً واستبعاد العزلات التي لها هذه القابلية وذلك باستخدام محلول الأمونيا ٢٥ % باعتباره محلولاً كاشفاً إذ بمجرد ملامسة سطح المستعمرة الفطرية بخار الأمونيا فإن تغير لون قاعدتها إلى اللون الأحمر الوردي أو الأصفر البرتقالي وبدرجات شدة متباينة اعتماداً على كمية الافلاتوكسين المنتج دليل على قابلية الفطر على إنتاج مثل هذه السموم (Saito & Machida, 1999).

يتبين من النتائج الموضحة في الجدول (٤-٢) قابلية بعض العزلات التي تعود للفطر *A. niger* على إنتاج الافلاتوكسينات على وسط CEA ووسط الإنتاج المضاف إليه مادة الأكار إذ أظهرت العزلة الفطرية *A. niger* 4 قابلية عالية على إنتاج الافلاتوكسينات بينما كانت للعزلتين *A. niger* 6

و *A. niger* 12 قابلية معتدلة على إنتاج الافلاتوكسينات على وسط CEA وقابلية قليلة على وسط الإنتاج المضاف إليه مادة الأكار، بينما وجد للعزلتين *A. niger* 1 و *A. niger* 10 قابلية قليلة على إنتاج الافلاتوكسينات وعلى كلا الوسطين المستخدمين، فيما لم تظهر بقية العزلات قيد الدراسة قابلية على إنتاج الافلاتوكسينات (الشكل ٤-١).

جاءت هذه النتائج متوافقة مع عدد من الدراسات التي أشارت إلى قابلية بعض العزلات التي تعود للفطر *A. niger* على إنتاج الافلاتوكسينات إذ أشار (Amadi & Adeniyi 2009) إلى قابلية عزلات الفطر *A. niger* المعزولة من بعض البذور المخزونة على إنتاج الافلاتوكسينات، فيما ذكر سرحان وأبو طبيخ (2010) أن بعض عزلات الفطر *A. niger* المعزولة من بذور الذرة الصفراء لها القدرة على إنتاج نوعين من سموم الافلاتوكسينات هما B1 و B2.

الجدول (٤-٣) قابلية العزلات الفطرية المدروسة على إنتاج الافلاتوكسينات.

وسط الإنتاج+الأكار	CEA	نوع الوسط العزلات الفطرية	وسط الإنتاج+الأكار	CEA	نوع الوسط العزلات الفطرية
*	++	<i>A. niger</i> 12	*	*	<i>A. niger</i> 1
-	-	<i>T. viride</i> 13	-	-	<i>A. niger</i> 2
-	-	<i>T. viride</i> 14	-	-	<i>A. niger</i> 3
-	-	<i>T. viride</i> 15	***	+++	<i>A. niger</i> 4
-	-	<i>T. viride</i> 16	-	-	<i>A. niger</i> 5

-	-	<i>T. viride</i> 17	+	**	<i>A. niger</i> 6
-	-	<i>Mucor</i> sp.18	-	-	<i>A. niger</i> 7
-	-	<i>Mucor</i> sp.19	-	-	<i>A. niger</i> 8
-	-	<i>Mucor</i> sp.20	-	-	<i>A. niger</i> 9
-	-	<i>Mucor</i> sp.21	*	+	<i>A. niger</i> 10
			-	-	<i>A. niger</i> 11

+ احمر وردى فاتح (قابلية الفطر على إنتاج الافلاتوكسين قليلة).
* اصفر برتقالي فاتح

++ احمر وردى معتدل (قابلية الفطر على إنتاج الافلاتوكسين معتدلة).
** اصفر برتقالي معتدل

+++ احمر وردى غامق (قابلية الفطر على إنتاج الافلاتوكسين عالية).
*** اصفر برتقالي غامق
- عدم قابلية الفطر على إنتاج الافلاتوكسين.





الشكل (٤-١): اختبار قابلية العزلات الفطرية على إنتاج الافلاتوكسينات باستخدام بخار الأمونيا.
 A: عزلة الفطر *A. niger* غير المنتجة للافلاتوكسين على الوسط CEA.
 B: عزلة الفطر *A. niger* ذات الإنتاجية العالية للافلاتوكسين على الوسط CEA.
 C: عزلة الفطر *A. niger* غير المنتجة للافلاتوكسين على وسط الإنتاج المضاف إليه مادة الأكار.
 D: عزلة الفطر *A. niger* ذات الإنتاجية القليلة للافلاتوكسين على وسط الإنتاج المضاف إليه مادة الأكار.

(٤-٣): غربلة العزلات الفطرية المدروسة حسب إنتاج حامض الستريك والكتلة الحيوية

تم اختبار قابلية ١٦ عزلة فطرية محلية عائدة للفطريات *A. niger* و *T. viride* و *Mucor spp.* على إنتاج حامض الستريك باستخدام الوسط الصناعي للإنتاج، وقد أظهرت النتائج المبينة في الجدول (3-4) أن لجميع العزلات الفطرية المدروسة القابلية على إنتاج الحامض ولكن بدرجات متباينة، إذ يلاحظ من الشكل (2-4) أن ١٨,٧٥ % من العزلات الفطرية أظهرت قابلية منخفضة على إنتاج حامض الستريك (دون ١ غم/لتر) شملت هذه العزلات (15) *T. viride* و *Mucor sp.* (18, 21)، بينما أظهرت ٥٠,٠٠ % من العزلات قابلية متوسطة على إنتاج حامض الستريك شملت هذه العزلات (2, 3, 8, 11) *A. niger* و (14, 16, 17) *T. viride* و (20) *Mucor sp.*، بينما أظهرت ٣١,٢٥ % من العزلات قابلية مرتفعة على إنتاج حامض الستريك شملت هذه العزلات A. (5, 7, 9) *niger* و (13) *T. viride* و (19) *Mucor sp.* تراوحت قيم الكتلة الحيوية الجافة للعزلات الفطرية المدروسة ما بين ١٢,٦٤-١٩,٧٣ غم/لتر لعزلات الفطر *A. niger* و ما بين

١٥,٨٣-١٢,٦٧ غم/لتر لعزلات الفطر *T. viride* و ما بين ١٦,٦٥-١٩,٨٥ غم/لتر لعزلات الفطر
Mucor spp.

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى احتمال ٥ % بين تركيز حامض الستريك المنتج من العزلة الفطرية *A. niger* 5 البالغ 14.683 غم/لتر وبقية العزلات الأخرى وعدم وجود فروق معنوية بين قيمة الكتلة الحيوية الجافة لهذه العزلة التي بلغت 18.96 غم/لتر وقيم العزلات الأخرى التي أعطت أعلى كتلة حيوية لذا فقد وقع الاختيار على العزلة الفطرية *A. niger* 5 لاستخدامها في دراسات الإنتاج اللاحقة جميعاً.

تمت غربلة العزلات الفطرية واختيار العزلات الأكفأ في إنتاج حامض الستريك في عدد من الدراسات السابقة فقد قام Makut & Ade-Ibijola (2012) بغربلة فطريات من التربة ولاحظ تفوق العزلات التابعة للفطرين *A. niger* و *T. viride* على بقية العزلات في إنتاج الحامض، كما عمل Dashen et al. (2013) على غربلة ١٤ عزلة فطرية تعود للفطر *A. niger* والمعزولة من مصادر مختلفة ووجد أن للعزلة *A. niger* CP3 قابلية عالية على إنتاج الحامض إذ بلغت 12.81 غم/لتر، كما استطاع Patil & Patil (2014) عزل عدة فطريات من التربة ووجد أن عزلات الفطر *A. niger* تفوقت على بقية العزلات في إنتاج الحامض، وفي دراسة أخرى تم غربلة عدة فطريات من التربة والتي تعود للفطرين *A. niger* و *A. fumigatus* وأظهرت النتائج أن للعزلة الفطرية *A. niger* S-6 قابلية عالية على إنتاج الحامض إذ بلغت ٣٩ غم/لتر (Bhattacharjee & Baruah, 2015).

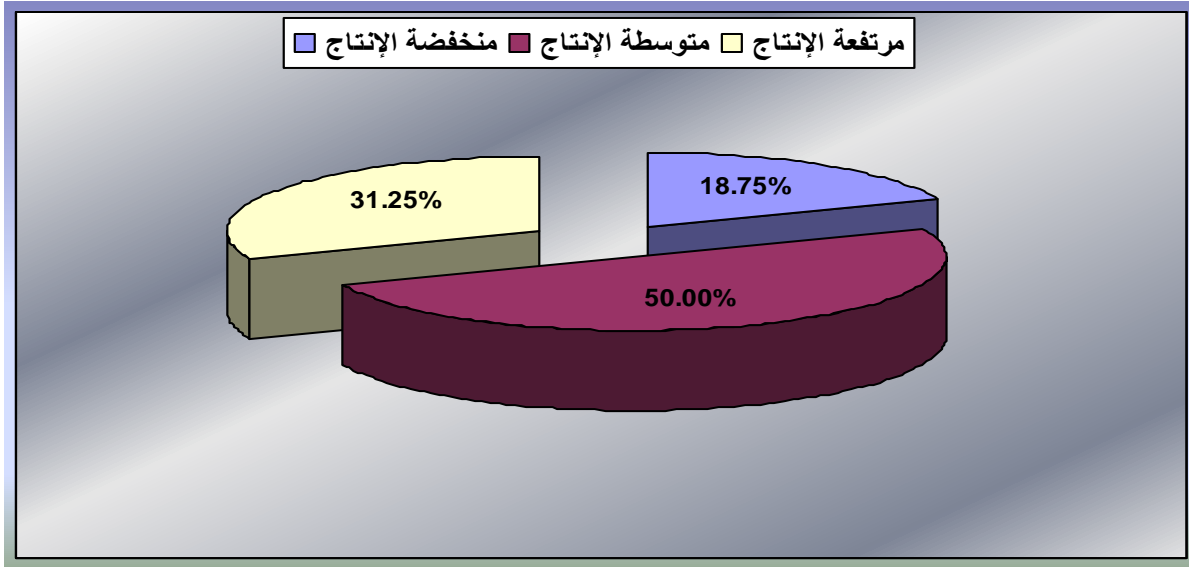
الجدول (3-4): إنتاج حامض الستريك والكتلة الحيوية الجافة للعزلات الفطرية المدروسة.

العزلات	تركيز حامض الستريك (غم/لتر)	الكتلة الحيوية الجافة (غم/لتر)	الرقم الهيدروجيني النهائي
<i>A. niger</i> 2	٠,٣٢١±1.824 hi	٠,٥٦١±17.17 b	2.60

2.41	٠,٣٢±12.64 g	٠,٤١±5.174 de	<i>A. niger</i> 3
1.85	٠,٤٤٣±18.96 a	٠,٥٢٦±14.683 a	<i>A. niger</i> 5
1.73	٠,٢١٨±17.26 b	٠,٤٢٣±10.135 bc	<i>A. niger</i> 7
2.30	٠,٣٧٧±19.73 a	٠,٣٢٦±2.513 h	<i>A. niger</i> 8
1.67	٠,٥١±14.62 ef	٠,٥٥٢±10.973 b	<i>A. niger</i> 9
2.14	٠,٦٢٣±16.86 bc	٠,٥٧١±3.796 fg	<i>A. niger</i> 11
2.88	٠,٣١٤±١٣,٤٧ fg	٠,٣٦٥±9.375 bc	<i>T. viride</i> 13
3.16	٠,٤٥١±15.83 cd	٠,٦٧٢±6.337 d	<i>T. viride</i> 14
4.62	٠,٥٢٥±12.91 g	٠,٥٢±0.618 j	<i>T. viride</i> 15
3.21	٠,٤٩٩±15.47 de	٠,٣١٩±2.220 h	<i>T. viride</i> 16
2.53	٠,٣٣٢±12.67 g	٠,٢٢±4.735 ef	<i>T. viride</i> 17
3.66	٠,٣٧٦±19.85 a	٠,٥٥٢±0.971 ij	<i>Mucor</i> sp.18
2.25	٠,٣٤±17.21 b	٠,٤١٦±8.637 c	<i>Mucor</i> sp.19
3.78	٠,٤٨٣±17.53 b	٠,٣٧٢±2.768 gh	<i>Mucor</i> sp.20
4.93	٠,٣٧٨±16.65 bc	٠,٥٢٧±0.497 j	<i>Mucor</i> sp.21

❖ تمثل النتائج الموضحة في الجدول معدل ثلاث مكررات ± الخطأ القياسي.

❖ المعدلات التي تحمل نفس الأحرف لا تختلف معنوياً فيما بينها للمقارنات العمودية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال ٥٪.



الشكل (2-4): النسب المئوية للعزلات الفطرية المدروسة موزعة بحسب قابليتها على إنتاج حامض الستريك.

(2-4): دراسة النمط الوراثي للعزلة الفطرية *A. niger 5*

(1-2-4): استخلاص الحامض النووي DNA من العزلة الفطرية *A. niger 5*

أظهرت نتائج استخلاص الحامض النووي DNA من العزلة الفطرية *A. niger 5* أن تراكيز الـ DNA للمكررات الخمسة قد تراوحت ما بين 12,6-10,0 نانوغرام/مايكروليتر ودرجة نقاوة تراوحت ما بين 1,44-1,79 (الجدول 4-4).

إن هذه القيم تعدّ كافية لإجراء عملية التضخيم (Amplification) إذ إن القيمة القياسية لتركيز الحامض النووي DNA تتراوح ما بين 5-10 نانوغرام/مايكروليتر وللنقاوة أقل أو تساوي 1.8 حسب المواصفات القياسية للشركة المصنعة.

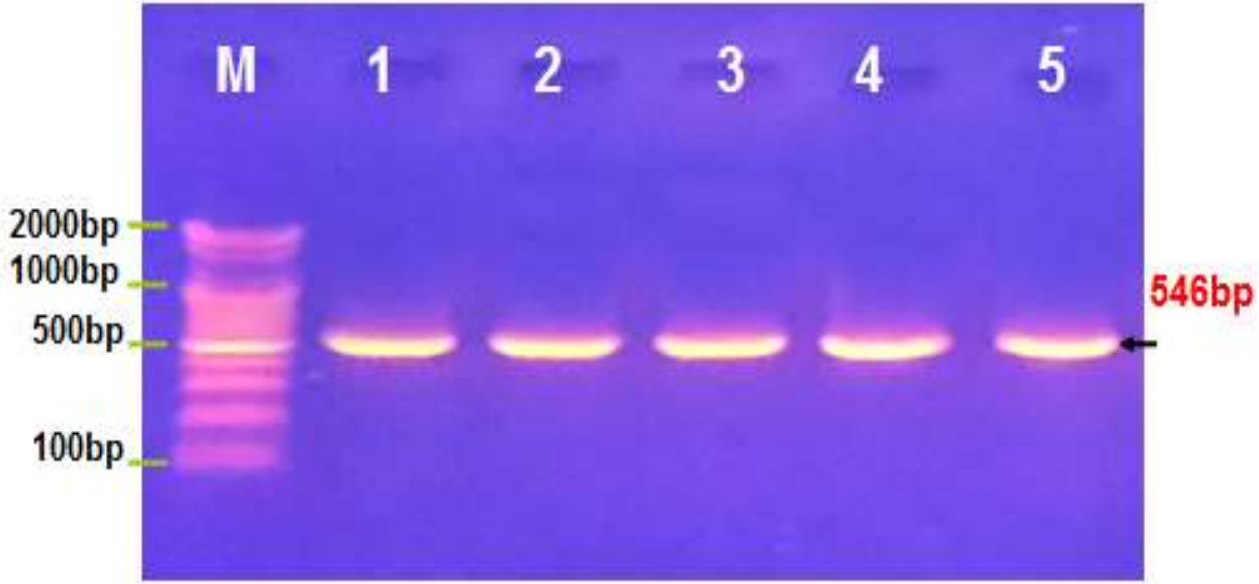
الجدول (2-4): تركيز الحامض النووي DNA ونقاوته للعزلة الفطرية *A. niger 5*.

المكررات	التركيز (نانوغرام/مايكروليتر)	النقاوة
1	١٤,١	١,٦٩
٢	١٣,٤	١,٥٤
٣	١٥,٠	1.51
٤	١٢,٦	١,٤٩
٥	١٣,٨	١,٤٤

(٣-٤-٤): تفاعل إنزيم البلمرة التسلسلي (PCR)

أجريت التفاعلات التضاعفية لسلسلة الـ DNA المستخلص من العزلة 5 *A. niger* مع البادئات النوعية (Specific Primers) لمنطقة ITS2-gene ITS1-5.8S rRNA باستخدام تقنية الـ PCR إذ لوحظ بعد الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز ١ % والفحص تحت الأشعة فوق البنفسجية عن وجود حزمة مفردة للـ DNA ناتجة عن عملية التضخيم للمكررات الخمسة للعزلة الفطرية المدروسة، وهذا يدل على كفاءة طريقة الاستخلاص المستخدمة وعدم حدوث أي تلوث أثناء هذه العملية وارتباط البادئات النوعية مع التسلسل المكمل له في قالب الـ DNA (DNA Template).

تم تقدير الأحجام الجزيئية للحزمة المتضاعفة وذلك بعد الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز ١ % ومقارنتها مع السلم القياسي (Marker ladder) ذي الحجم الجزيئي 100-2000 زوجاً قاعدياً إذ تبين أن الحزمة المتضاعفة ذات حجم جزيئي 546 زوجاً قاعدياً (الشكل ٤-3).



الشكل (٤-٣): نواتج تضخيم منطقة ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 للعزلة الفطرية *A. niger 5* المعزولة من التربة والمرحلة كهربائياً على هلام الاكاروز ١٪ باستخدام تيار كهربائي بـ ١٠٠ فولت و ٨٠ أمبير لمدة ساعة واحدة، إذ يمثل العمود الأول M السلم القياسي (Marker ladder) ذي الحجم الجزيئي 100-2000 زوجاً قاعدياً والأعمدة من ١-٥ تمثل المكررات للعزلة الفطرية *A. niger 5* الموجبة للفحص بناتج طوله 546 زوج قاعدي ولم تظهر نتائج سالبة (عدم ظهور حزمة).

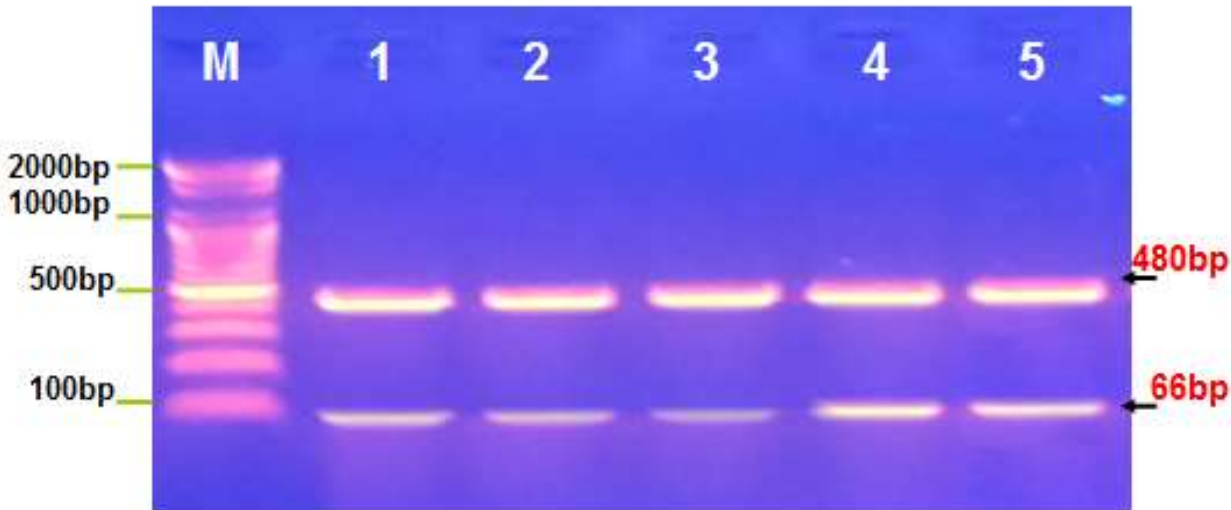
(٤-٤-٣): تفاعل إنزيم البلمرة التسلسلي نوع تقييد طول الجزء المتعدد الأشكال (PCR-RFLP)

أظهرت نتائج القطع الإنزيمي لنواتج تضخيم الـ PCR لمنطقة ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 للعزلة الفطرية *A. niger 5* باستخدام *RsaI* restriction enzyme ظهور حزمتين منفردتين ذاتي حجم جزيئي ٤٨٠ و ٦٦ زوجاً قاعدياً (الشكل ٤-٤).

تم تقدير الأحجام الجزيئية للحزمة المتضاعفة المقطوعة وذلك بعد الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز ٢ ٪ ومقارنتها مع السلم القياسي (Marker ladder) ذي الحجم الجزيئي 100-2000 زوجاً قاعدياً إذ تمثل الحزمتان ذواتا الحجم الجزيئي ٤٨٠ و ٦٦ زوجاً قاعدياً النمط الوراثي من نوع A (Genotype A) للفطر *A. niger 5* بحسب Spadaro et al. (2012) الذي أستطاع تحديد

نمطين وراثيين هما A و B للفطر *A. niger* عند استخدام *RsaI* restriction enzyme إذ أن تحليل خارطة القطع الإنزيمي للمواقع متعددة الأشكال لمنطقة ITS2 gene-ITS1-5.8S rRNA للفطر *Aspergillus spp.* يمكن أن يميز بين الأنواع والسلالات.

استخدمت تقنية PCR-RFLP في عدد من الدراسات لتحديد الأنماط الوراثية والتمييز بين مختلف أنواع الفطريات، إذ تمكن Accensi *et al.* (1999) من التمييز بين الفطرين *A. niger* و *A. tubingensis* باستخدام *RsaI* restriction enzyme وظهرت حزمتين للفطر *A. niger* ذاتي حجم جزيئي 519 و ٧٦ زوجاً قاعدياً فيما ظهرت حزمة واحدة للفطر *A. tubingensis* ذات حجم جزيئي ٥٩٥ زوجاً قاعدياً عند إجراء الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز ٢%. كذلك استطاع Kizis *et al.* (2014) التمييز بين بعض الأنواع التابعة للفطر *Aspergillus spp.* باستخدام تقنية PCR-RFLP بواسطة ثلاثة إنزيمات قطع وهي *RsaI* و *HinfI* و *HhaI*.



الشكل (٤-٤): نواتج القطع الإنزيمي لنواتج ال PCR لمنطقة ITS2 gene-ITS1-5.8S rRNA للعزلة الفطرية 5 *A. niger* المعزولة من التربة والمرحلة كهربائياً على هلام الاكاروز ٢%. باستخدام تيار كهربائي بـ ١٠٠ فولت و ٨٠ أمبير لمدة ساعة

واحدة، وذلك باستخدام *RsaI* restriction enzyme، إذ يمثل العمود الأول M السلم القياسي (Marker ladder) ذي الحجم الجزيئي 100-2000 زوجاً قاعدياً و الأعمدة من 1-5 تمثل المكررات للعزلة الفطرية *A. niger* 5 الموجبة للفحص والتي تشير إلى النمط الوراثي من نوع A (Genotype A) بناتج قطع طوله 480 و 66 زوجاً قاعدياً.

(٤-٤-٢): تسلسل الحامض النووي DNA

تم الحصول على تسلسل قواعد الحامض النووي DNA لمنطقة ITS2-ITS1-5.8S rRNA gene للعزلة الفطرية *A. niger* 5 بعد إرسال ناتج تفاعل الـ PCR إلى شركة MacroGen في كوريا الجنوبية لإجراء تسلسل الحامض النووي DNA باستخدام جهاز AB DNA sequencing system بعدها تم استخراج مناطق التباين (Variation areas) إذ أوضحت نتائج اصطاف تسلسلات النيوكليوتيدات (Nucleotide sequence alignment) لمنطقة ITS2-ITS1-5.8S rRNA gene للعزلة الفطرية *A. niger* 5 المحلية مع بعض عزلات الفطر *A. niger* العالمية المعزولة من التربة المسجلة في قاعدة بيانات المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحيوية (NCBI) National Center for Biotechnology Information باستخدام برنامج MEGA 6 وجود 10 مناطق تباين للعزلات التي تم عمل اصطاف لتسلسلاتها، كذلك بينت النتائج وجود تطابق بنسبة 100% في تعاقب تسلسلات النيوكليوتيدات لمنطقة ITS2-ITS1-5.8S rRNA gene لعزلة الفطر *A. niger* 5 المحلية مع بعض عزلات الفطر *A. niger* العالمية المسجلة في قاعدة بيانات المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحيوية (NCBI) وهي (JX501376.1 Malaysia, KJ881376.1 India, HQ392475.1 Malaysia, JX036483.1 China, HQ392477.1 Malaysia, JX291197.1 Malaysia) بينما ظهرت بعض الاختلافات في تعاقب تسلسلات النيوكليوتيدات لمنطقة ITS2-ITS1-5.8S rRNA gene لعزلة الفطر *A. niger* 5 المحلية مع عزلات الفطر *A. niger* العالمية الأخرى (الجدول ٤-٥).

الجدول (٤-٥): مناطق التباير بين عزلات الفطر *A. niger* المحلية والعالمية لتسلسلات منطقة ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2.

مواقع مناطق التباير										العزلات
5	4	4	1	1						
2	0	0	6	1	6	6	6	2	2	
3	4	3	0	6	5	3	0	5	3	
C	T	C	T	C	A	G	A	C	T	<i>Aspergillus niger</i> 5 soil isolate Iraq
.	C	T	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate KC602371.1 Canada
.	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate JX501376.1 Malaysia
.	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate KJ881376.1 India
T	.	.	.	T	.	A	.	.	.	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate KM103363.1 Nepal
.	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate HQ392475.1 Malaysia
.	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate JX036483.1 China
.	G	G	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate JX501365.1 Malaysia
.	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate HQ392477.1 Malaysia
.	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate JX291197.1 Malaysia
T	.	.	.	T	.	A	.	.	.	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate JQ660373.1 India
.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate JN246057.1 Australia
.	T	.	T	.	.	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate JX291201.1 Malaysia
.	.	.	G	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate HQ710538.1 India

كذلك تم مقارنة المسافات الجينية (Genetic distance) لمنطقة ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2

لعزلة الفطر *A. niger* 5 المحلية مع بعض عزلات الفطر *A. niger* العالمية المسجلة في قاعدة

بيانات المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحيوية (NCBI) باستخدام برنامج MEGA 6 وقد

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (٤-٦) تطابق المسافات الجينية لعزلة الفطر *A. niger* 5

المحلية مع بعض عزلات الفطر *A. niger* العالمية وهي (JX501376.1 Malaysia, KJ881376.1

India, HQ392475.1 Malaysia, JX036483.1 China, HQ392477.1 Malaysia, JX291197.1

Malaysia) بينما ظهرت بعض الاختلافات في المسافات الجينية لعزلة الفطر *A. niger* 5 المحلية

مع عزلات الفطر *A. niger* العالمية الأخرى تراوحت ما بين (٠,٦-٠,٢) %.

الجدول (٤-٦): المسافات الجينية بين عزلات الفطر *A. niger* المحلية والعالمية لتسلسلات

منطقة ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2.

													<i>Aspergillus niger</i> 5 soil isolate Iraq
												0.004	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate KC602371.1 Canada
											0.004	0.000	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate JX501376.1 Malaysia
									0.000	0.004	0.000	0.000	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate KJ881376.1 India
								0.006	0.006	0.009	0.006	0.006	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate KM103363.1 Nepal
								0.006	0.000	0.000	0.004	0.000	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate HQ392475.1 Malaysia
							0.000	0.006	0.000	0.000	0.004	0.000	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate JX036483.1 China
						0.004	0.004	0.009	0.004	0.004	0.007	0.004	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate JX501365.1 Malaysia
					0.004	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.004	0.000	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate HQ392477.1 Malaysia
				0.000	0.004	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.004	0.000	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate JX291197.1 Malaysia
			0.006	0.006	0.009	0.006	0.006	0.000	0.006	0.006	0.009	0.006	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate JQ660373.1 India
		0.002	0.004	0.004	0.007	0.004	0.004	0.002	0.004	0.004	0.007	0.004	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate

													JN246057.1 Australia
	0.007	0.009	0.004	0.004	0.007	0.004	0.004	0.009	0.004	0.004	0.007	0.004	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate JX291201.1 Malaysia
0.006	0.006	0.007	0.002	0.002	0.006	0.002	0.002	0.007	0.002	0.002	0.006	0.002	<i>Aspergillus niger</i> soil isolate HQ710538.1 India

كما تم إجراء تحليل الشجرة الوراثية (Phylogenetic tree analysis) من نوع

(Test UPGMA tree) بالاعتماد على تسلسلات منطقة ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 لعزلة

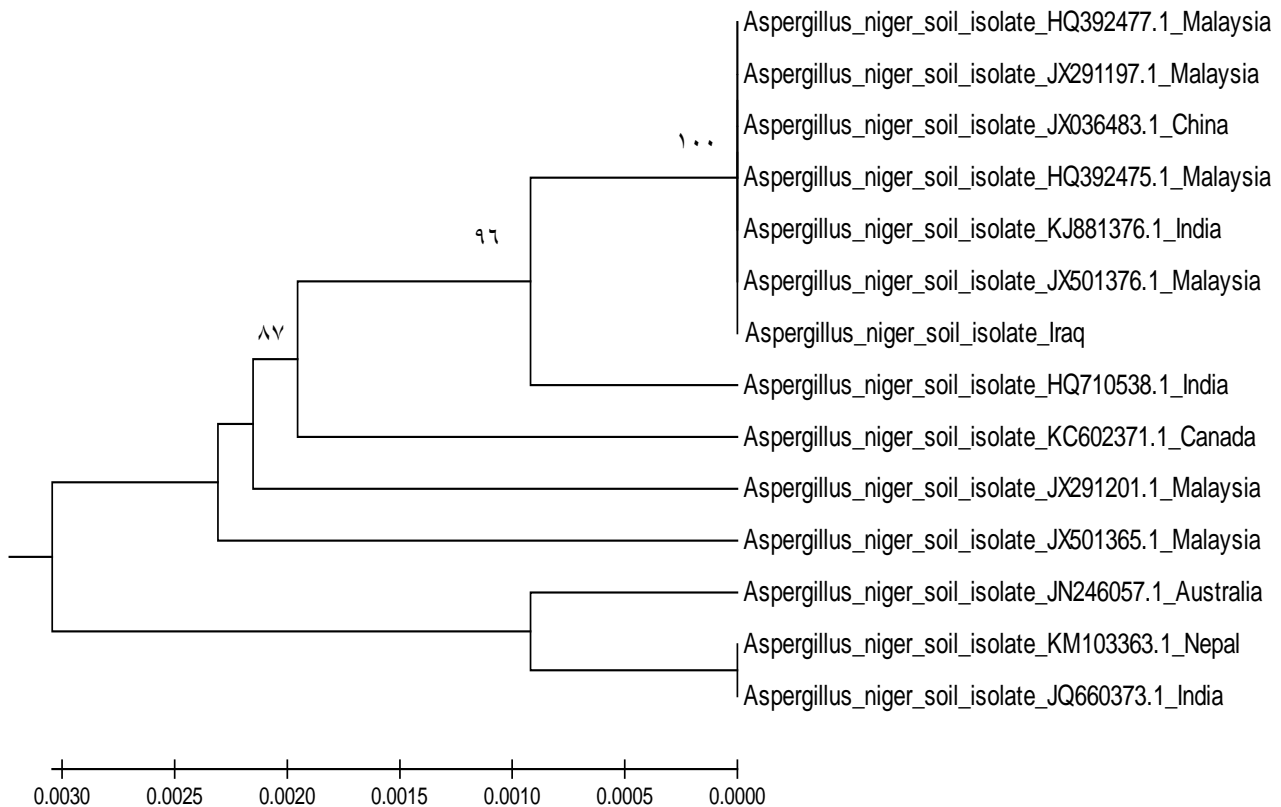
الفطر *A. niger* 5 المحلية ومقارنتها مع تسلسلات المنطقة ذاتها لبعض عزلات الفطر *A. niger*

العالمية المسجلة في قاعدة بيانات المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحيوية (NCBI) باستخدام

برنامج MEGA 6، وقد أظهر التحليل وجود مجموعتين رئيسيتين الأولى تقسم إلى خمس مجاميع

ثانوية إحدى هذه المجاميع الثانوية تضم عزلة الفطر *A. niger* 5 المحلية مع ست عزلات عالمية

تتطابق معها بنسبة ١٠٠% والثانية تقسم إلى مجموعتين ثانويتين تضم ثلاث عزلات عالمية



(الشكل ٥-٤).

الشكل (5-4): تحليل الشجرة الوراثية (Phylogenetic tree analysis) من نوع (Test UPGMA tree) باستخدام برنامج MEGA 6 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

إن تصميم البودائ لتضخيم مناطق مختلفة من الـ rDNA كان لها الفضل الكبير في الدراسات التصنيفية للفطريات خصوصاً البودائ المصممة بالاعتماد على منطقة ITS والتي بواسطتها تم الكشف عن العديد من تعاقبات مناطق الـ ITS لمختلف الفطريات التي استخدمت

٧٥

٨٩

بشكل أساس لدراسة العلاقات الوراثية بين مختلف الأنواع ضمن الأجناس أو الأشكال الفسيولوجية التابعة للنوع الواحد (Mitchell et al., 1995).

٨٦

١٠٠

إذ ميز (1999) Accensi et al. بين الفطرين *A. niger* و *A. tubingensis* وذلك بتحديد مناطق التباير في تسلسلات الحامض النووي DNA لمنطقة ITS2-rRNA gene-ITS1-5.8S و كان الحجم الجزيئي للـ DNA الذي تم مضاعفته 595 زوجاً قاعدياً، كذلك تمكن (2005) Gonzalez-Salgado et al. من التمييز بين بعض الأنواع التابعة للجنس *Aspergillus* spp. وهذه الأنواع هي *A. niger* و *A. tubingensis* و *A. japonicus* و *A. ellipticus* و *A. heteromorphus* و *A. carbonarius* بواسطة مضاعفة منطقة ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 لهذه الأنواع الفطرية والكشف عن مناطق التباير في تتابعاتها، فيما درس Ferracin et al. (2009) العلاقات الوراثية بين ٥١ عزلة فطرية تعود للفطر *A. niger* و ٧ عزلات تعود للفطر *A. tubingensis* وتمكن من إجراء تحليل الشجرة الوراثية لبعض هذه العزلات وتحديد المجاميع الرئيسة والثانوية التي تعتمد على مدى التقارب الوراثي، كما تم إجراء تحليل الشجرة الوراثية لعدد

من العزلات التابعة للفطر *Aspergillus spp.* المعزولة من بعض الفواكه وتحديد مدى التقارب الوراثي سواء بين الأنواع المختلفة أو العزلات التي تعود للنوع الواحد (Somma et al., 2012).

(٤-٥): تحديد بعض الظروف المثلى لإنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية 5 *A. niger*

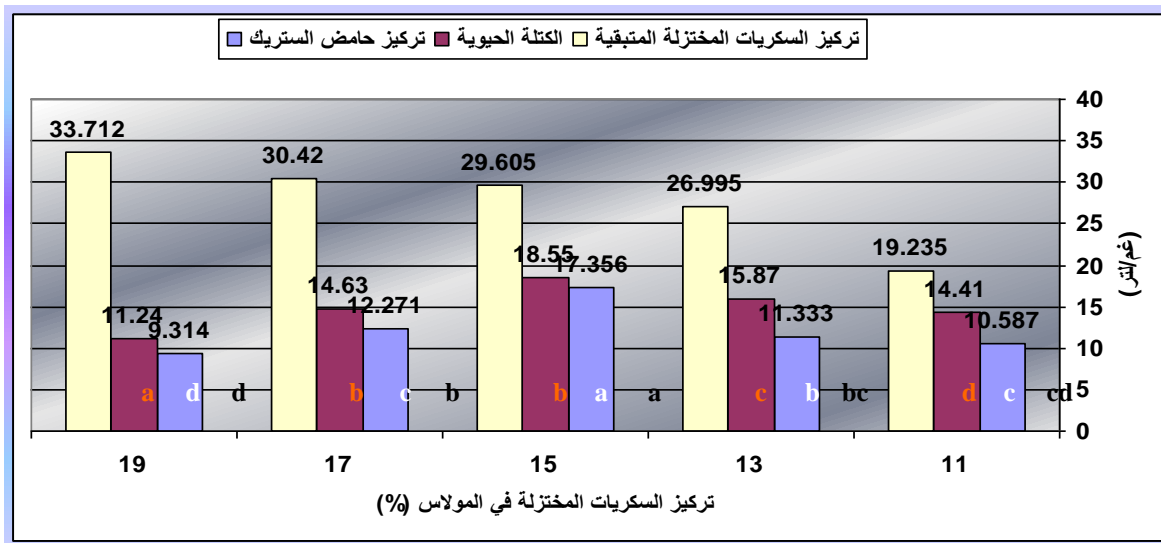
(٤-٥-١): تأثير المصدر الكربوني

أظهرت النتائج المبينة في الشكلين (٤-٦) و (٤-٧) أن أعلى قيم إنتاج لحامض الستريك كانت باستخدام التركيز ١٥% سكريات مختزلة إذ بلغ تركيز الحامض المنتج ١٧,٣٥٦ و ١٤,٧٠٩ غم/لتر لوسطي المولاس المروق وراشح قشور الرز على التوالي وبفروق معنوية عن بقية التراكيز المستخدمة عند مستوى احتمال ٥%، كما أعطى التركيز ذاته أعلى كتلة حيوية للفطر إذ بلغت ١٨,٥٥ و ١٧,٩٧ غم/لتر لوسطي المولاس المروق وراشح قشور الرز على التوالي وبفروق معنوية أيضاً عن بقية التراكيز المستخدمة عند مستوى احتمال ٥%، واعتماداً على هذه النتائج تم اختيار التركيز ١٥% سكريات مختزلة لوسطي المولاس المروق وراشح قشور الرز بوصفه أفضل تركيز للمصدر الكربوني وتم استخدامه في مراحل الدراسة اللاحقة جميعاً.

يمكن أن يعزى سبب ملائمة وسطى المولاس المروق وراشح قشور الرز لإنتاج حامض الستريك بوصفهما مصدراً كربونياً إلى احتوائهما على بعض المكونات التي تدعم نمو الفطريات وإنتاج الحامض، إذ يحتوي المولاس على ٢٠% ماء و ٨% محتويات غير عضوية وأملاح و ١٠% مكونات غير سكرية ومواد نيتروجينية وأحماض مرتبطة وحررة ومواد صمغية ذائبة وما يقارب ٦٢% سكريات أهمها الكلوكوز والفركتوز والسكروز (Kapoor et al., 1983).

أما قشور الرز فتحتوي على ٤٠-٥٠% سليولوز و ٢٥-٣٠% لجنين و ١٥-٢٠% مواد غير عضوية وأملاح و ٨-١٥% ماء (Giddel & Jivan, 2007)، وعند معاملتها بشكل أولي كيميائياً باستخدام أحد الحوامض مثل حامض النتريك والفسفوريك والكبريتيك أو القواعد مثل هيدروكسيد الصوديوم وهيدروكسيد الكالسيوم قبل استخدامها في تحضير الأوساط الغذائية الفطرية فإن هذه المواد المعقدة ستتحلل إلى مواد أبسط يتمكن الفطر من استغلالها في نموه والقيام بفعالياته الأيضية المختلفة (Ang et al., 2009). كذلك تشير بعض الدراسات إلى قابلية بعض الفطريات وخصوصاً العزلات الفطرية التابعة للفطر *A. niger* على إنتاج إنزيمات خارج خلوية (Extracellular enzyme) تحلل المواد السليولوزية المعقدة وتحولها إلى سكريات بسيطة يتمكن الفطر من استغلالها والقيام بفعالياته الأيضية (Reddy & Pushpa, 2012; Jantasila et al., 2012).

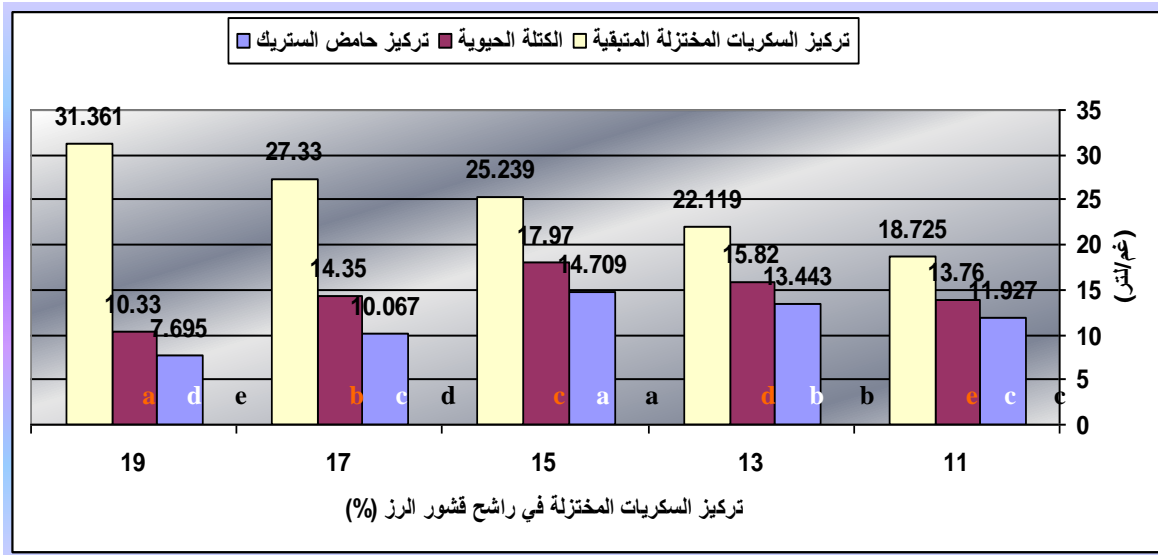
2012)



الشكل (٤-6): تأثير تركيز السكربات المختزلة في المولاس المرووق في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger*

5

❖ المعدلات التي تحمل نفس الأحرف لا تختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05.



الشكل (4-7): تأثير تركيز السكريات المختزلة في راسح قشور الرز في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية A. niger 5

❖ المعدلات التي تحمل نفس الأحرف لا تختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05.

يلاحظ من النتائج انخفاض تركيز حامض الستريك المنتج والكتلة الحيوية للفطر عند استخدام التراكيز الأعلى من 10% وقد يعود السبب في ذلك إلى التأثير الأزموزي (Osmosis effect) الذي تحدثه التراكيز العالية من السكريات لخلايا الفطريات (Peksel & Kubicek, 2003)، كما يلاحظ أيضاً أن زيادة تركيز السكريات المختزلة ينجم عنه زيادة واضحة في تركيز السكريات المتبقية مما يجعل العملية غير اقتصادية و يمكن أن يعزى ذلك إلى عدم قابلية الأحياء المجهرية لتمثيل المستويات العالية من السكريات (Pazouki et al., 2000).

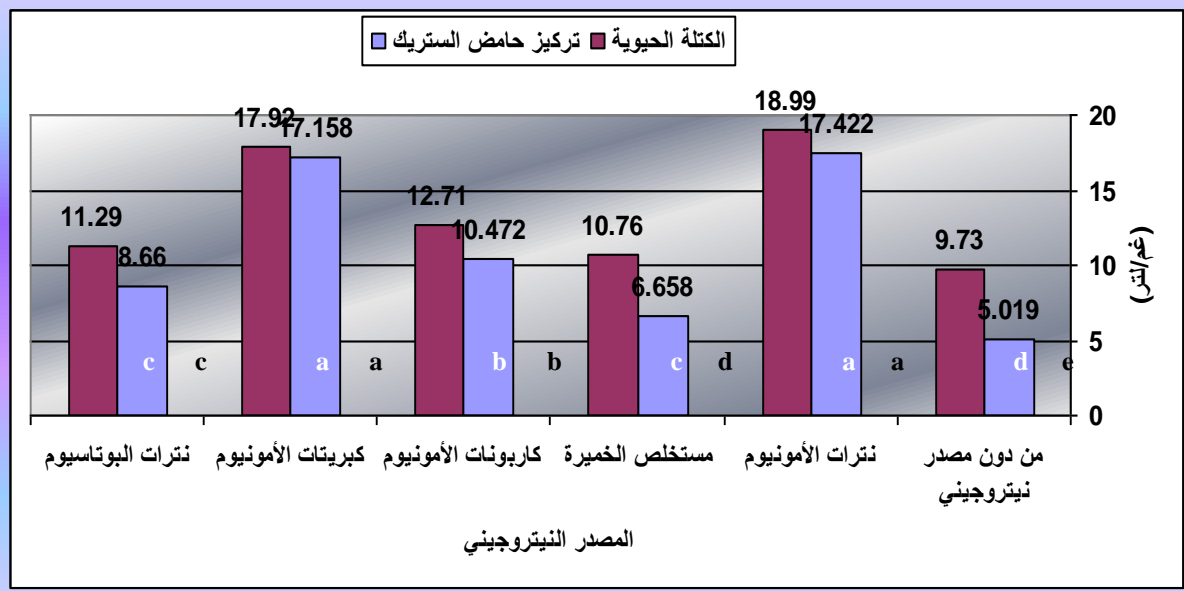
تتفق نتائج الدراسة الحالية تقريباً مع ما وجدته Hossain et al. (1984) من أن أفضل إنتاج لحامض الستريك يمكن الحصول عليه باستخدام تراكيز سكريات تتراوح ما بين 14-22% وأن هذه التراكيز من السكريات تعمل على زيادة فعالية عملية التحلل السكري فضلاً عن كبح عمل الإنزيم α -Ketoglutarate dehydrogenase ومن ثم زيادة إنتاج حامض الستريك، من جانب آخر فإن استخدام تراكيز سكريات منخفضة سيؤدي إلى حدوث تأثيرات سلبية على نمو وشكل وحجم الغزل الفطري والتأثير على إنتاج الحامض (Papagianni et al., 1999). كما تتفق هذه النتائج مع ما

وجده Ali et al. (2001) من أن التركيز ١٥ % من السكروز المستخدم كمصدر كربوني كان التركيز الأمثل في إنتاج حامض الستريك من عزلة تعود للفطر *A. niger* إذ بلغت كمية الحامض المنتجة ٤٩,٩٥ غم/لتر، ومع ما توصل إليه Ul-Haq et al. (2002) الذي درس تأثير تراكيز مختلفة من السكريات المختزلة في المولاس على إنتاج حامض الستريك من الفطر *A. niger* GCMC-7 ووجد أن التركيز ١٥ % هو الأفضل لإنتاج حامض الستريك والكتلة الحيوية للفطر.

(٤-٥-٣): تأثير المصدر النيتروجيني

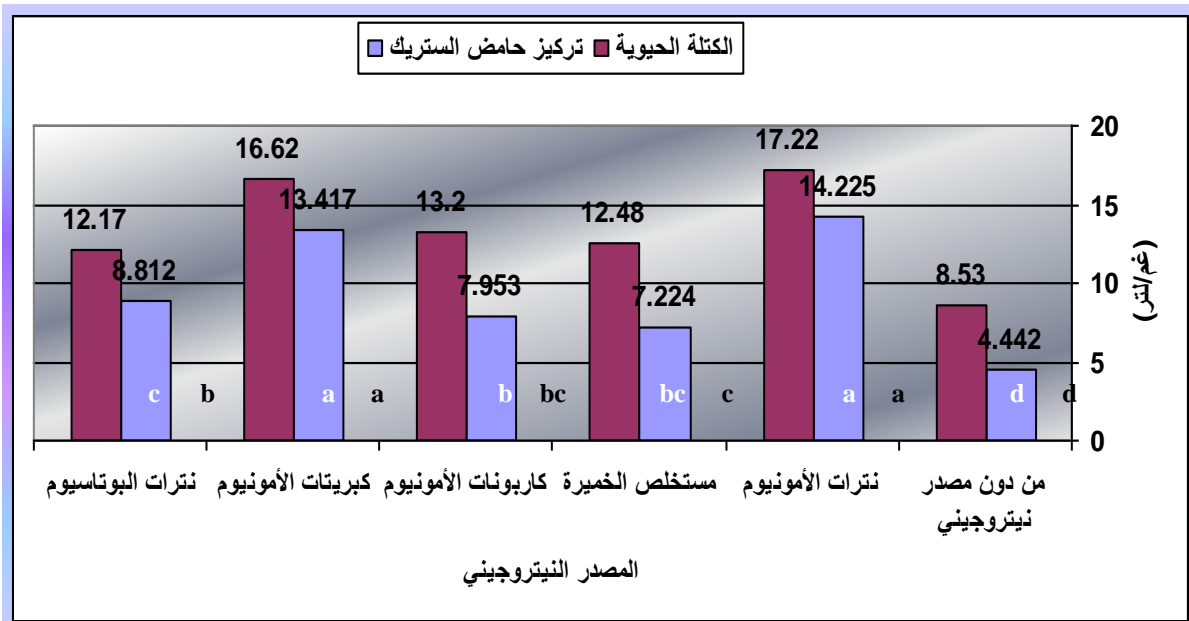
أوضحت النتائج المبينة في الشكلين (٤-٨) و (٤-٩) أن أفضل مصدر نيتروجيني لإنتاج الحامض والكتلة الحيوية للفطر *A. niger* 5 هو نترات الأمونيوم إذ بلغ إنتاج الحامض ١٧,٤٢٢ و ١٤,٢٢٥ غم/لتر والكتلة الحيوية للفطر ١٨,٩٩ و ١٧,٢٢ غم/لتر لوسطي المولاس المروق وراشح قشور الرز على التوالي، كما أظهرت النتائج أن استخدام كبريتات الأمونيوم كمصدر نيتروجيني لإنتاج الحامض أدى إلى إنتاج كمية حامض وكتلة حيوية عالية للفطر *A. niger* 5 إذ بلغت كمية الحامض المنتجة ١٧,١٥٨ و ١٣,٤١٧ غم/لتر والكتلة الحيوية للفطر ١٧,٩٢ و ١٦,٦٢ غم/لتر لوسطي المولاس المروق وراشح قشور الرز على التوالي وهي قيم مقاربة جداً لما تم الحصول عليه عند استعمال نترات الأمونيوم إذ بينت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروق معنوية في كمية الحامض المنتجة من قبل الفطر *A. niger* 5 عند استخدام نترات الأمونيوم وكبريتات الأمونيوم كمصدر نيتروجيني لوسطي المولاس المروق وراشح قشور الرز بالمقارنة بالمصادر النيتروجينية الأخرى المستخدمة عند مستوى احتمال ٥ %.

نظراً لكون نترات الأمونيوم مادة محدودة الاستخدام محلياً في الوقت الحاضر ولا يمكن الحصول عليها بسهولة وتوفرها بكميات كبيرة فقد وقع الاختيار على كبريتات الأمونيوم بوصفها أفضل مصدر نيتروجيني وتم استخدامها في مراحل الدراسة اللاحقة جميعاً.



الشكل (2-8): تأثير نوع المصدر النيتروجيني في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger* 5 في وسط المولاس المروق.

❖ المعدلات التي تحمل نفس الأحرف لا تختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05.



الشكل (٤-٩): تأثير نوع المصدر النيتروجيني في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger* 5 في وسط راشم قشور الرز.

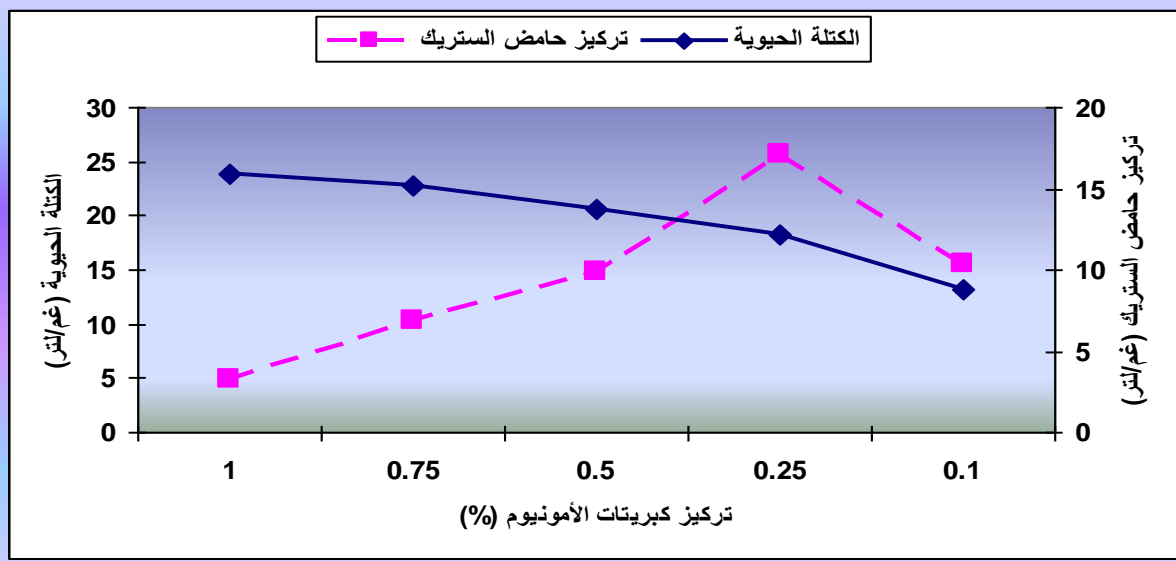
❖ المعدلات التي تحمل نفس الأحرف لا تختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05.

إن النتيجة التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة تشير إلى تفوق المصدر النيتروجيني غير العضوي (كبريتات الأمونيوم) على المصدر العضوي المستخدم (خلاصة الخميرة)، وتتفق هذه النتيجة مع ما تم الحصول عليه في بعض الدراسات السابقة إذ أكد *Boominathan et al.* (2012) تفوق المصدر غير العضوي (كبريتات الأمونيوم) على المصدر العضوي (خلاصة الخميرة) في زيادة إنتاج حامض الستريك من عزلة تعود للفطر *A. niger*، كما توصل *Patil &* (2014) إلى النتيجة ذاتها إذ تفوقت كبريتات الأمونيوم على خلاصة الخميرة في زيادة إنتاج الحامض من عزلة أخرى تعود للفطر *A. niger* على ثلاثة أوساط مختلفة هي نشا الذرة ومسحوق الدخن ومسحوق الحنطة، كما درس *Bhattacharjee & Baruah* (2015) تأثير مصادر نيتروجينية مختلفة في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger* S-6 ووجد أن كبريتات الأمونيوم قد أعطت أعلى كمية منتجة من الحامض بلغت 38 غم/لتر بالمقارنة مع بقية المصادر الأخرى.

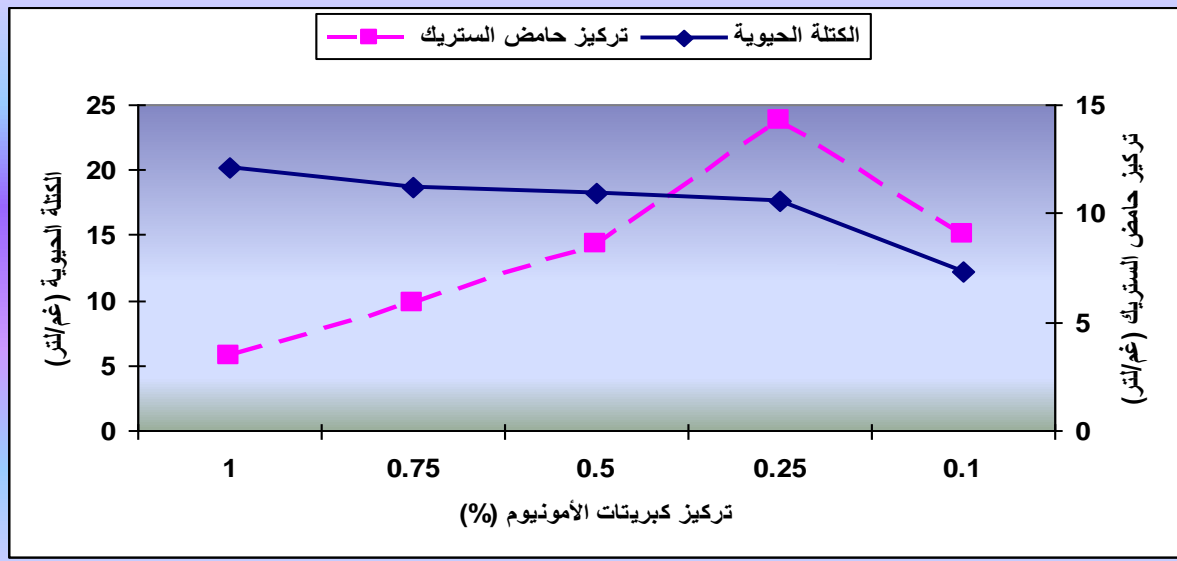
بعد أن تم تحديد كبريتات الأمونيوم كأفضل مصدر نيتروجيني لإنتاج الحامض تم تحديد التركيز الأمثل للمصدر النيتروجيني لإنتاجه، وتشير النتائج الموضحة في الشكلين (٤-١٠) و (٤-١١) إلى أن أعلى إنتاج للحامض كان باستخدام التركيز 0.25% من كبريتات الأمونيوم إذ بلغ تركيز الحامض المنتج 17,109 و 14,275 غم/لتر لوسطي المولاس المروق وراشح قشور الرز على التوالي، كما يلاحظ أنه بزيادة تركيز كبريتات الأمونيوم عن 0.25% تزداد الكتلة الحيوية للفطر مع نقصان واضح في كمية حامض الستريك المنتجة وقد يعود سبب ذلك إلى استغلال

الفطر للمصدر النيتروجيني في نموه وبناء البروتينات على حساب إنتاج الحامض (Kareem *et al.*, 2010).

إن التركيز الأمثل من كبريتات الأمونيوم المتحصل عليه في هذه الدراسة وبوجود التركيز الأمثل من المصدر الكربوني (المولاس المروق وراشح قشور الرز) المتحصل عليه في هذه الدراسة أيضاً ربما يساعد في إعداد وسط متوازن من حيث النسبة بين الكربون والنيتروجين (C/N Ratio) مما يحقق زيادة في إنتاج حامض الستريك، فقد وجد (Pandey 2003) أن إنتاج حامض الستريك ينخفض كثيراً عندما تكون نسبة الكربون إلى النيتروجين أقل من 100 وأن كمية النيتروجين الضرورية لإنتاج الحامض يجب أن تكون محدودة مع توافر كميات كبيرة من المصدر الكربوني أثناء طور الإنتاج لتحويلها إلى الحامض بواسطة الإنزيمات المسؤولة عن ذلك.



الشكل (4-10): تأثير تركيز كبريتات الأمونيوم في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية 5 *A. niger* في وسط المولاس المروق.



الشكل (4-11): تأثير تركيز كبريتات الأمونيوم في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger 5* في وسط راشم قشور الرز.

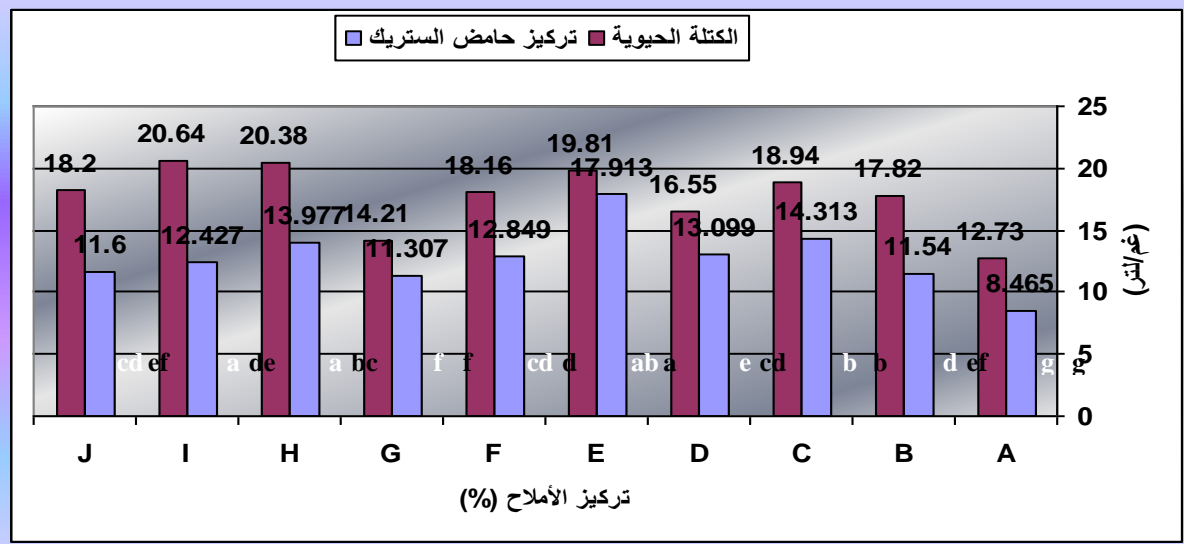
(4-5-3): تأثير الأملاح

درس تأثير الأملاح في إنتاج حامض الستريك وقد تبين من النتائج الموضحة في الشكلين (4-12) و (4-13) أن أقصى إنتاج للحامض والذي بلغ 17,913 و 10,338 غم/لتر من العزلة الفطرية *A. niger 5* لوسطي المولاس المروق وراشح قشور الرز على التوالي كان باستخدام التراكيز 0.1% KH_2PO_4 و 0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ لوسط المولاس المروق و 0.2% KH_2PO_4 و 0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ لوسط راشح قشور الرز وبفروق معنوية عن بقية التراكيز المستخدمة عند مستوى احتمال 5%، كما بينت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروق معنوية في قيم الكتلة الحيوية للفطر عند هذه التراكيز إذ بلغت الكتلة الحيوية للفطر 19,78 و 19,81 غم/لتر لوسطي المولاس المروق وراشح قشور الرز على التوالي بالمقارنة بالتراكيز الأخرى التي أعطت أعلى قيم للكتلة الحيوية ومن ثم تم تثبيت هذين التركيزين من الأملاح لاستعمالهما في التجارب اللاحقة جميعاً.

اتفقت نتائج هذه الدراسة مع Kapoor et al. (1983) الذي ذكر أن استخدام KH_2PO_4 بتراكيز تتراوح ما بين 0.1-0.2% و $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ بتراكيز تتراوح ما بين 0.02-0.025% يعطي أفضل

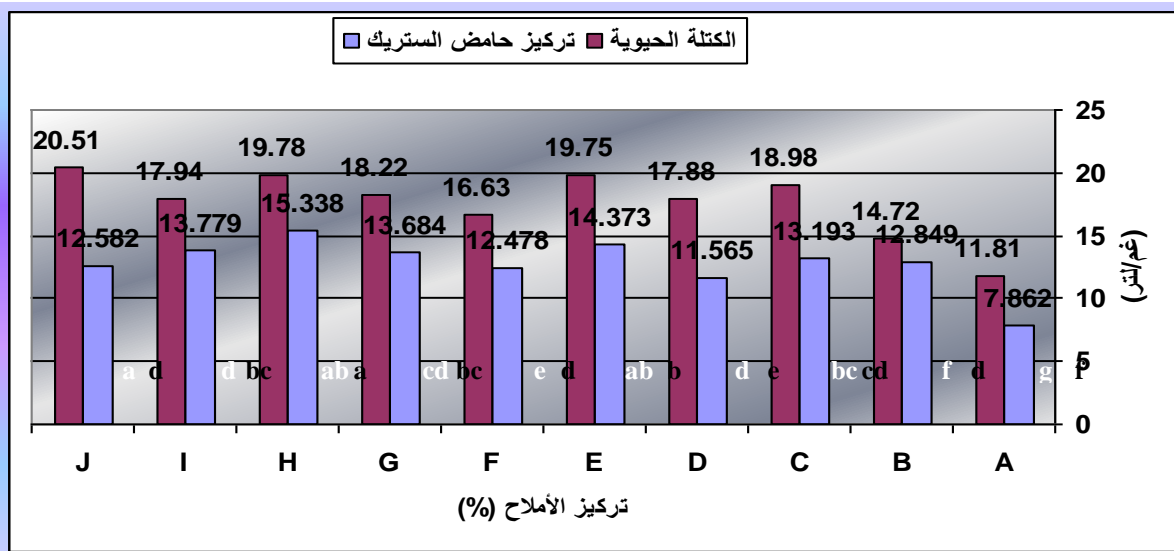
إنتاج لحمض الستريك، كما اتفقت مع (2001) *UI-Haq et al.* الذي استخدم KH_2PO_4 بتركيز 0.1 % و $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ بتركيز 0.025 % لإنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية -*A. niger* UV-6، وكذلك مع (2013) *Farooq et al.* الذي استخدم التراكيز ذاتها لإنتاج الحامض باستخدام وسط مولاس قصب السكر.

على الرغم من تباين الأحياء المجهرية في احتياجاتها الغذائية إلا أن هنالك متطلبات عامة أساسية للنمو وتكوين الناتج وتعدّ الأملاح المعدنية إحدى هذه المغذيات الأساسية التي يجب إضافتها بمقادير ضئيلة لتدعيم النمو وتكوين الناتج (Stanbury & Whitaker, 1984).



الشكل (4-13): تأثير تركيز الأملاح في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger* 5 في وسط المولاس المروج. ❖ المحدلات التي تحمل نفس الأحرف لا تختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05.

MgSO ₄ ·7H ₂ O(%) 0.05 + KH ₂ PO ₄ (%) 0.1 :F	MgSO ₄ ·7H ₂ O (%) 0 + KH ₂ PO ₄ (%) 0 :A
MgSO ₄ ·7H ₂ O(%) 0.1 + KH ₂ PO ₄ (%) 0.1 :G	MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.025(%) + KH ₂ PO ₄ (%) 0.05 :B
MgSO ₄ ·7H ₂ O(%) 0.025 + KH ₂ PO ₄ (%) 0.2 :H	MgSO ₄ ·7H ₂ O(%) 0.05 + KH ₂ PO ₄ (%) 0.05 :C
MgSO ₄ ·7H ₂ O(%) 0.05 + KH ₂ PO ₄ (%) 0.2 :I	MgSO ₄ ·7H ₂ O(%) 0.1 + KH ₂ PO ₄ (%) 0.05 :D
MgSO ₄ ·7H ₂ O(%) 0.1 + KH ₂ PO ₄ (%) 0.2 :J	MgSO ₄ ·7H ₂ O(%) 0.025 + KH ₂ PO ₄ (%) 0.1 :E



الشكل (٤-١٣): تأثير تركيز الأملاح في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger* 5 في وسط راشح قشور الرز.
 ❖ المعدلات التي تحمل نفس الأحرف لا تختلف معنوياً فيما بينها حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05.

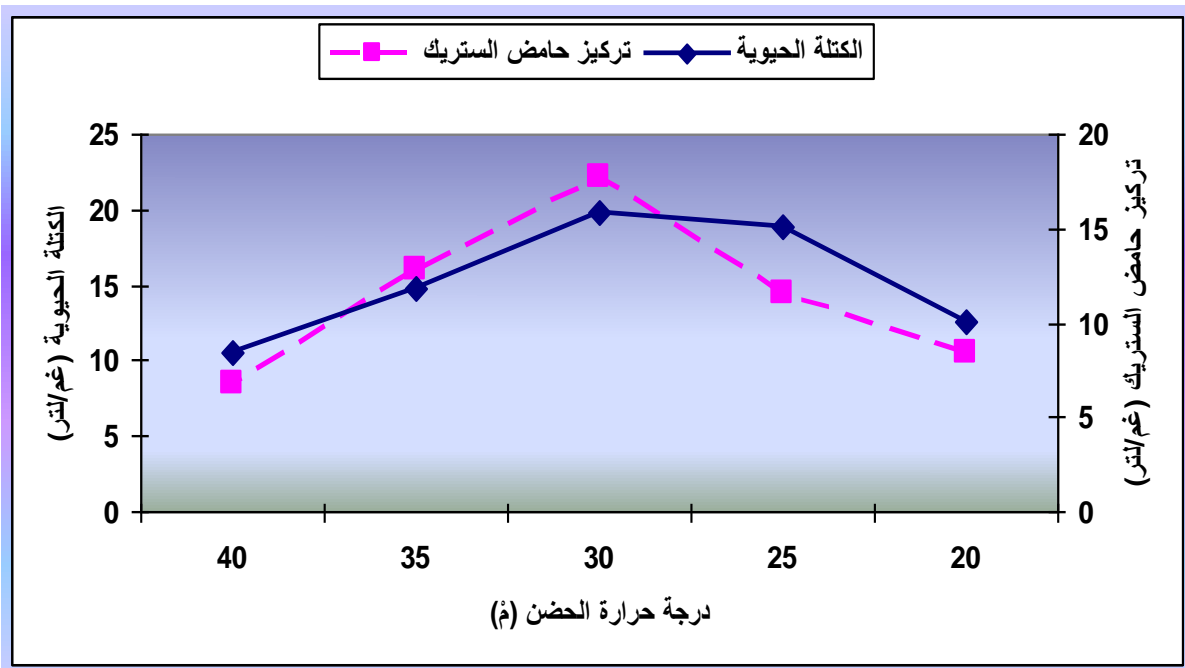
MgSO ₄ .7H ₂ O(%) 0.05+ KH ₂ PO ₄ (%)0.1 :F	MgSO ₄ .7H ₂ O (%)0 + KH ₂ PO ₄ (%)0 :A
MgSO ₄ .7H ₂ O(%)0.1 + KH ₂ PO ₄ (%)0.1 :G	MgSO ₄ .7H ₂ O 0.025(%) + KH ₂ PO ₄ (%)0.05 :B
MgSO ₄ .7H ₂ O(%)0.025 + KH ₂ PO ₄ (%)0.2 :H	MgSO ₄ .7H ₂ O(%)0.05+ KH ₂ PO ₄ (%)0.05 :C
MgSO ₄ .7H ₂ O(%)0.05+ KH ₂ PO ₄ (%)0.2 :I	MgSO ₄ .7H ₂ O(%)0.1+ KH ₂ PO ₄ (%)0.05 :D
MgSO ₄ .7H ₂ O(%)0.1+ KH ₂ PO ₄ (%)0.2 :J	MgSO ₄ .7H ₂ O(%)0.025+ KH ₂ PO ₄ (%)0.1 :E

(٤-٥-٢): تأثير درجة حرارة الحضانة

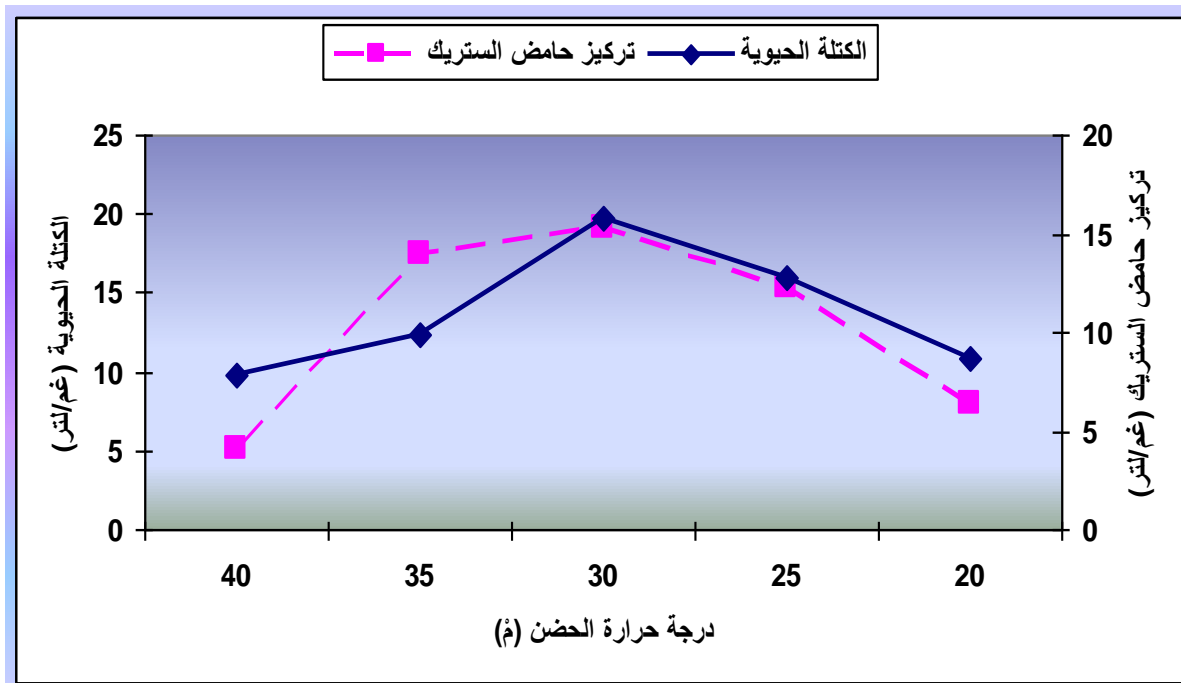
لغرض معرفة تأثير درجات حرارة الحضانة المختلفة في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية المحلية *A. niger* 5 تم حضانة وسطي الإنتاج باستعمال خمس درجات حرارية مختلفة، وتشير النتائج الموضحة في الشكلين (٤-١٤) و (٤-١٥) إلى أن أعلى إنتاج من الحامض والكتلة الحيوية للفطر تحقق باستعمال درجة الحرارة ٣٠ م° إذ بلغت كمية الحامض المنتجة ١٧,٦٨١ و ١٥,٣٢١ غم/لتر فيما بلغت الكتلة الحيوية للفطر ١٩,٧٧ و ١٩,٧٣ غم/لتر لوسطي المولاس المرووق وراشح قشور الرز على التوالي، لذا تم استعمال درجة حرارة الحضانة ٣٠ م° في مراحل الدراسة اللاحقة جميعاً.

كما لوحظ أيضاً من النتائج انخفاض كمية حامض الستريك المنتجة عند ارتفاع درجة حرارة الحضان عن ٣٠ م° وقد يكون السبب في ذلك تكون حوامض أخرى بدلاً من حامض الستريك مثل حامض الأوكزاليك وانخفاض فعالية الإنزيم Citrate synthase (Vergano et al., 1996).

جاءت درجة حرارة الحضان المثلى التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة مماثلة لما ورد في دراسات كثيرة، إذ أشار Anastassiadis et al. (2008) إلى أن درجات الحرارة التي تتراوح ما بين ٢٨-٣٢ م° هي الفضلى لإنتاج حامض الستريك وأن درجة الحرارة ٣٠ م° هي درجة الحرارة المثلى للإنتاج، كما تم التوصل إلى أن درجة الحرارة ٣٠ م° هي أفضل درجة حرارة لإنتاج الحامض الذي بلغ ٣٤,٥٢ غم/لتر من الفطر *A. niger* على وسط المولاس (El-Hussein et al., 2009)، كذلك درس (Vasanthabharathi et al. (2013 تأثير درجات حرارة مختلفة في إنتاج الحامض من عزلة مطفرة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية تعود للفطر *A. niger* ووجد أن درجة الحرارة ٣٠ م° قد أعطت أعلى إنتاج من الحامض، فيما لم تتفق النتائج الحالية مع ما توصل إليه (Auta et al. (2014 الذي وجد أن درجة الحرارة ٥٥ م° هي درجة الحرارة المثلى لإنتاج حامض الستريك.



الشكل (٤-١٤): تأثير درجة حرارة الحضانة في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger* 5 في وسط المولاس المرووق.



الشكل (٤-١٥): تأثير درجة حرارة الحضانة في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger* 5 في وسط راشم قشور الرز.

(٤-٥-٥): تأثير طريقة النمو

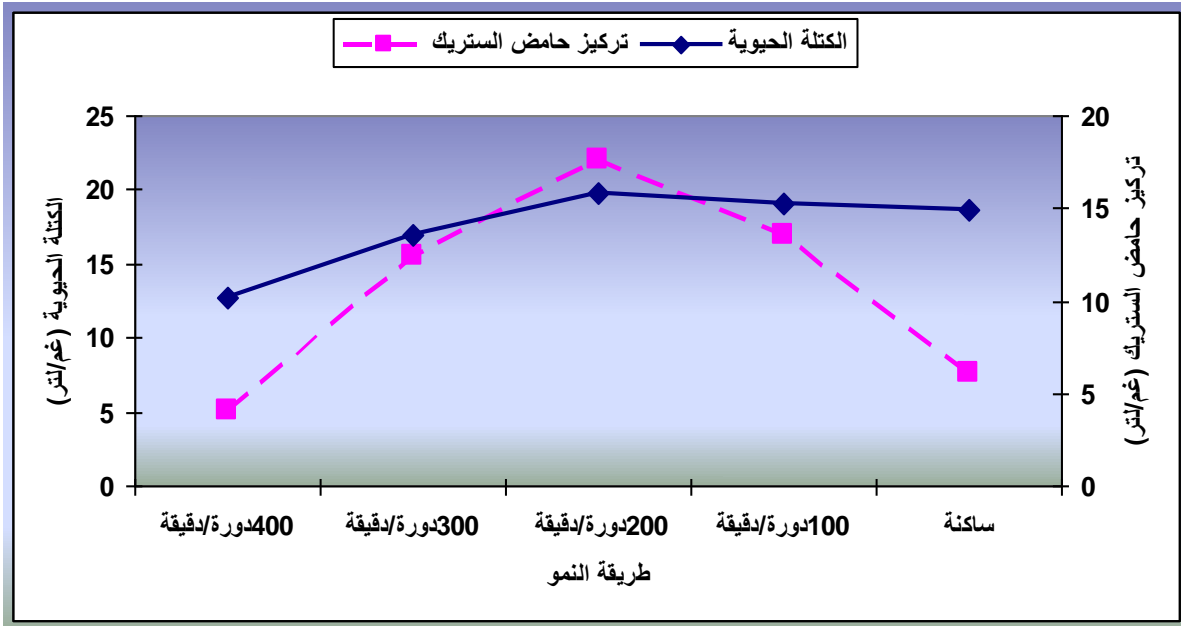
بينت النتائج الموضحة في الشكلين (٤-١٦) و (٤-١٧) أن أقصى إنتاج للحامض وأعلى كتلة حيوية للفطر كانت عند استخدام ظروف الحضانة المهتزة بسرعة ٢٠٠ دورة/دقيقة إذ بلغت كمية الحامض المنتجة ١٧,٦٦٤ و ١٥,٢٧٨ غم/لتر والكتلة الحيوية للفطر ١٩,٧٨ و ١٩,٨٢ غم/لتر لوسطي المولاس المرووق وراشح قشور الرز على التوالي بالمقارنة بكمية الحامض المنتجة والكتلة الحيوية للفطر تحت ظروف الحضانة الساكنة وظروف الحضانة المهتزة بسرعات الرج الأخرى، كما يلاحظ أن بزيادة سرعة الرج تقل كمية حامض الستريك المنتجة وقد يعود سبب ذلك إلى

انخفاض فعالية الإنزيم Citrate synthase وزيادة فعالية الإنزيمين Aconitase و Isocitrate dehydrogenase (Yigitoglu, 1992).

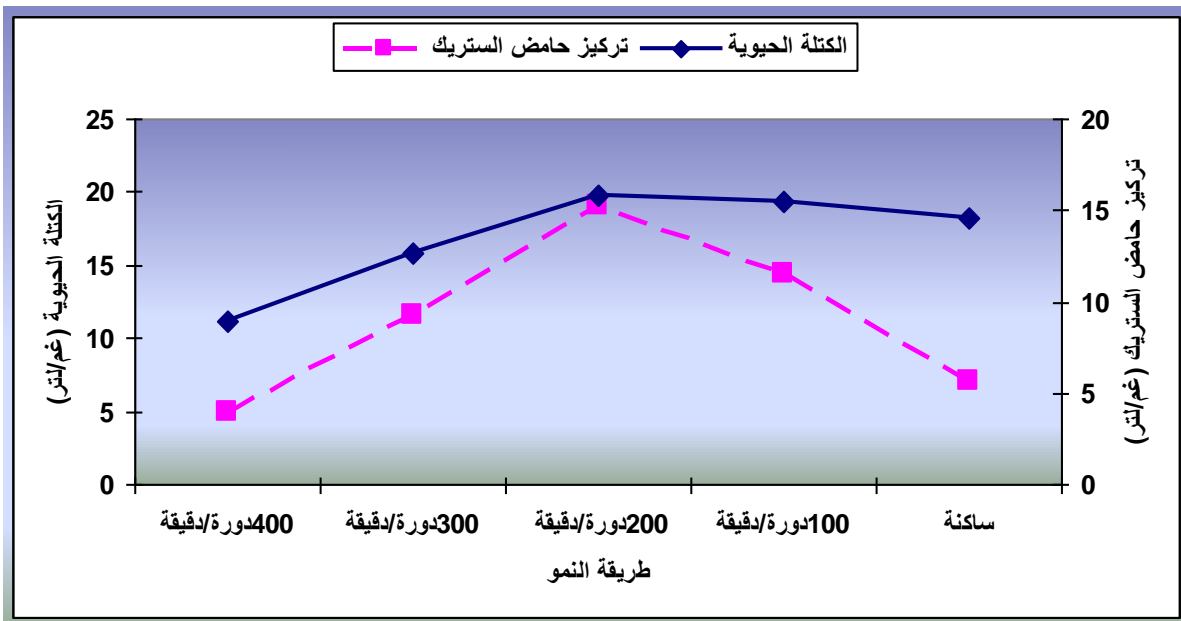
اعتماداً على هذه النتائج فقد تم إنتاج الحامض من العزلة الفطرية قيد الدراسة تحت الظروف المهتزة بسرعة رج ٢٠٠ دورة/دقيقة في مراحل الدراسة اللاحقة جميعاً.

جاءت هذه النتائج مقارنة لما توصل إليه Roukas (1991) الذي وجد أن سرعة الرج ٣٠٠ دورة/دقيقة هي الفضلى لإنتاج حامض الستريك من الفطر *A. niger* ATCC9142 باستعمال مولاس البنجر، فيما اتفقت مع ما وجدته Ul-Haq *et al.* (2002) الذي درس تأثير سرعة الرج المختلفة في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger* GCMC7 ووجد أن الحضان تحت الظروف المهتزة بسرعة رج ٢٠٠ دورة/دقيقة أعطى أعلى إنتاج من حامض الستريك، وكذلك مع El-Hussein *et al.* (2009) الذي استخدم سرعة الرج ٢٠٠ دورة/دقيقة في إنتاج حامض الستريك من عزلة تعود للفطر *A. niger*.

إن الاختلاف في سرعة الرج والتهوية اللازمة لإنجاح عملية التخمير تعتمد على نوع الكائن المجهرى المستخدم وعلى مكونات الوسط الغذائي وعلى حجم المخمر، وبشكل عام تكون كمية الأوكسجين المذاب Dissolved Oxygen (DO) التي يجب توفرها في الوسط التخمرى لإنجاح عملية التخمير مرتفعة والتي لا توفرها ظروف الحضان الساكنة (Sanjay & Sharma, 1994).



الشكل (٤-١٦): تأثير طريقة النمو في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger 5* في وسط المولاس المروق.



الشكل (٤-١٧): تأثير طريقة النمو في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger 5* في وسط راشم قشور الرز.

(٤-٥-٦): تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي

درس تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية قيد الدراسة، ومثلما يلاحظ من الشكل (١٨-٤) أن أفضل رقم هيدروجيني ابتدائي لإنتاج الحامض باستخدام وسط المولاس المروق كان ٣,٥ إذ كانت كمية الحامض المنتجة 18.508 غم/لتر، أما في الشكل (١٩-٤) فيلاحظ أن الرقم الهيدروجيني ٤ هو الأمثل لإنتاج الحامض باستخدام وسط راشح قشور الرز إذ بلغت كمية الحامض المنتجة 19.447 غم/لتر.

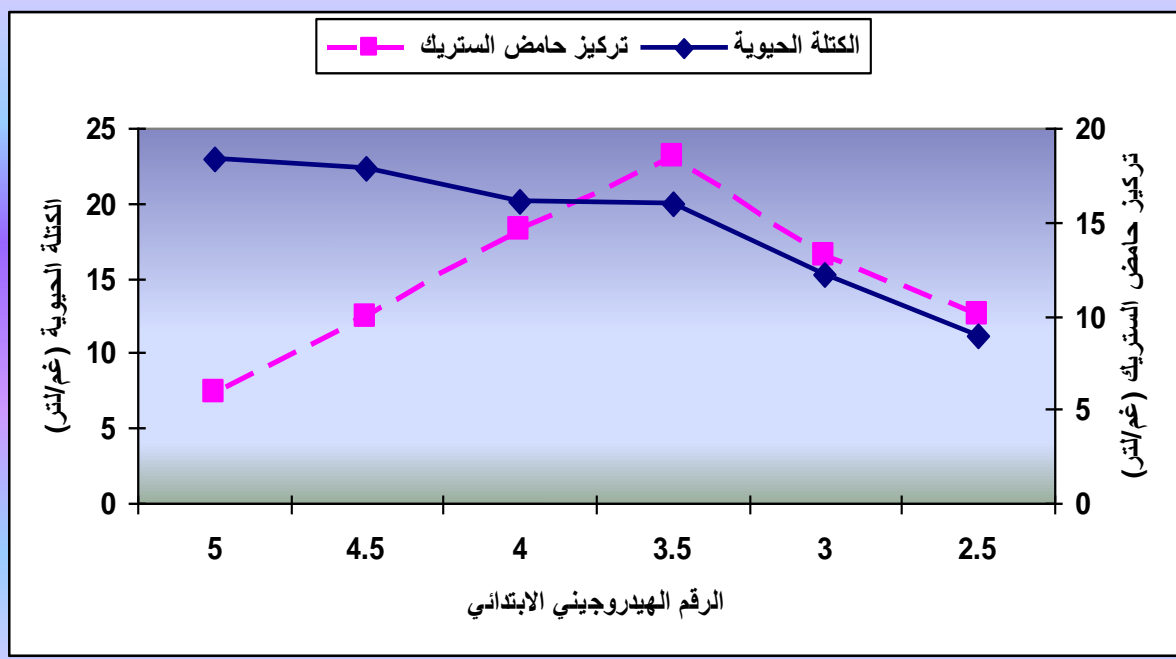
يتضح من الشكلين (١٨-٤) و (١٩-٤) أيضاً أن بزيادة الرقم الهيدروجيني عن ٣,٥ في وسط المولاس المروق و عن ٤ في وسط راشح قشور الرز تزداد الكتلة الحيوية للفطر *A. niger* 5 وتخفض كمية حامض الستريك المنتجة ويمكن تفسير زيادة الكتلة الحيوية للفطر بكون الفطر قيد الدراسة من الفطريات الخيطية التي تنمو بشكل جيد تحت الظروف الحامضية التي تتراوح قيمها ما بين ٣-٦ (Fawole & Odunfa, 2003)، أما فيما يخص انخفاض كمية حامض الستريك المنتجة فيمكن أن يعزى سبب ذلك إلى انخفاض فعالية الإنزيم Citrate synthase المسؤول عن إنتاج حامض الستريك وزيادة فعالية الإنزيمات المسؤولة عن تكوين حامض الأوكزاليك وحامض الكلوكونيك (Paul et al., 1999)، إذ إن الإنزيمات عبارة عن بروتينات حاوية على مجاميع متأينة يتأثر تركيبها وفعاليتها بالرقم الهيدروجيني للوسط الزراعي (Lekha & Lonsane, 1997).

إن النتيجة المستحصلة من الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج حامض الستريك باستخدام وسطي المولاس المروق وراشح قشور الرز من العزلة الفطرية المحلية *A. niger* 5 تتفق مع (El-Hussein et al. (2009) الذي أشار إلى أن الرقم الهيدروجيني ٣,٥ هو الأمثل لإنتاج الحامض من الفطر *A. niger* على وسط المولاس إذ بلغت كمية الحامض المنتجة ٤٨,٩٣ غم/لتر، وتتفق أيضاً مع (Rao & Reddy (2013) الذي وجد أن الرقم الهيدروجيني ٤ هو الأمثل لإنتاج حامض

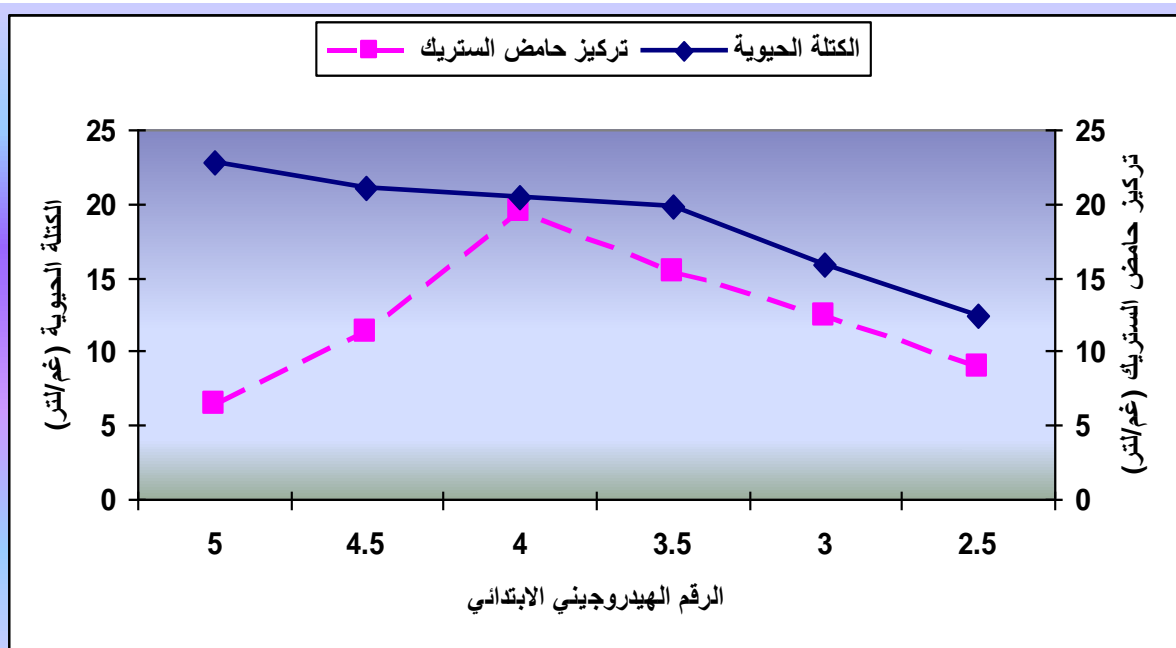
الستريك من عزلة أخرى تعود للفطر *A. niger* على وسط نخالة الشوفان، بينما لا تتفق النتائج مع ما ورد في بعض الدراسات الأخرى التي توصلت إلى أن أقصى إنتاج لحمض الستريك يكون عند قيم pH تتراوح ما بين ٦-٦,٥ وهذا ما أشار إليه *Ali et al. (2002)* و *Ul-Haq et al. (2002)* و *Boominathan et al. (2012)* إذ كان الرقم الهيدروجيني ٦ هو الأمثل لإنتاج الحامض، كما وجد *Bhattacharjee & Baruah (2015)* أن الرقم الهيدروجيني ٦,٥ هو الأمثل لإنتاج الحامض من العزلة الفطرية *A. niger S-6* باستخدام وسط صناعي يحتوي على النشا كمصدر كربوني.

يمكن تفسير اختلاف نتائج دراستنا الحالية مع بعض نتائج الدراسات السابقة إلى الاختلاف في نوع المصدر الكربوني والمصدر النيتروجيني المستخدمين وتقنية الإنتاج إذ أوضح *Yokoya (1992)* أن الـ pH الأمثل لإنتاج حامض الستريك يعتمد على طبيعة ونوع المصدر الكربوني والنيتروجيني المستخدمين بالإضافة إلى تقنية الإنتاج المستخدمة.

على وفق النتائج المستحصل عليها من هذه الدراسة فقد تم تثبيت قيمتي الرقم الهيدروجيني ٣,٥ و ٤ لإنتاج الحامض باستخدام وسطي المولاس المروق وراشح قشور الرز على التوالي وتم استخدامهما في التجارب اللاحقة كافة.



الشكل (٤-١٨): تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger 5* في وسط المولاس المروق.



الشكل (٤-١٩): تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger 5* في وسط راشم قشور الرز.

(٤-٥-٧): تأثير حجم اللقاح

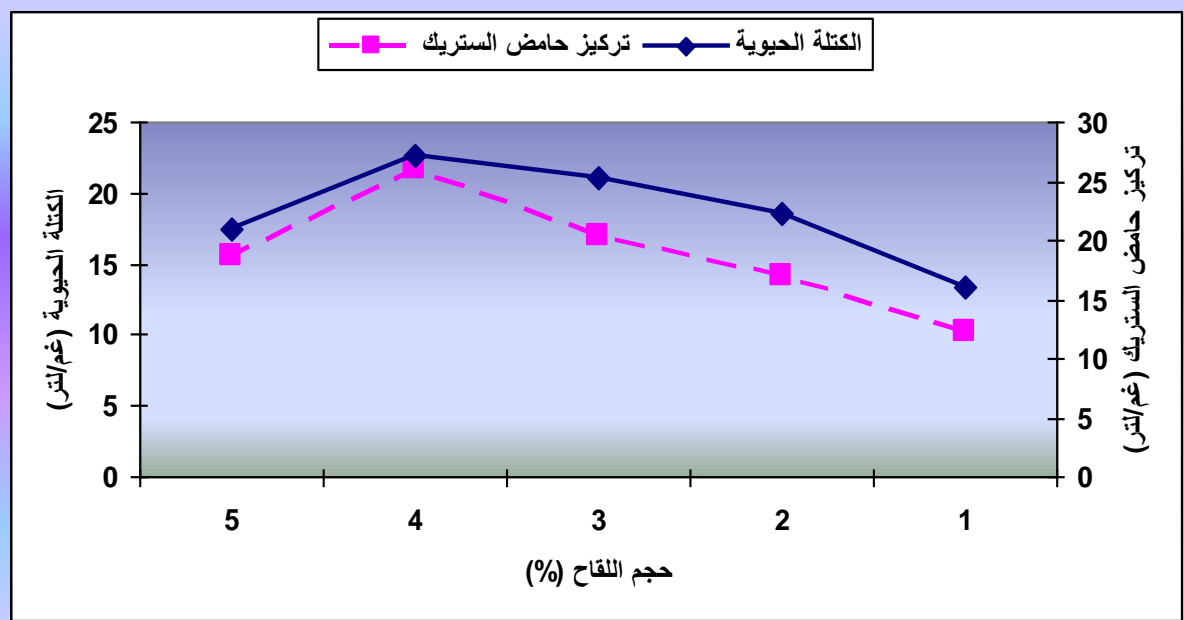
لغرض معرفة تأثير حجم اللقاح الأمثل في إنتاج حامض الستريك تم تلقيح وسطي المولاس المروق وراشح قشور الرز بحجوم لقاح متدرجة من اللقاح الأولي غير المخفف ذي التركيز 1×10^6 بوغ/مل، وتشير النتائج الموضحة في الشكلين (٤-٢٠) و (٤-٢١) إلى أن أقصى إنتاج من الحامض وأفضل كتلة حيوية للفطر كان باستخدام حجم اللقاح ٤ % إذ بلغ إنتاج الحامض ٢٥,٩٨٤ و 27.155 غم/لتر والكتلة الحيوية ٢٢,٥٧ و ٢٢,٨٦ غم/لتر لوسطي المولاس المروق وراشح قشور الرز على التوالي لذا تم اعتماد هذه النتيجة وتم استعمال حجم اللقاح المذكور في جميع مراحل الدراسة اللاحقة.

إن استخدام تراكيز لقاح تتراوح ما بين 1×10^4 - 1×10^6 بوغ/مل هي الأفضل لإنتاج حامض الستريك من الفطر *A. niger* إذ أن فعالية العمليات الأيضية تزداد بنسب محددة عند زيادة حجم اللقاح المستخدم وعلى العكس من ذلك فإن استخدام حجم لقاح قليل جداً يؤدي إلى انخفاض هذه الفعالية وزيادة فرصة حدوث التلوث بالأحياء المجهرية الأخرى (Papagianni & Matthey, 2006).

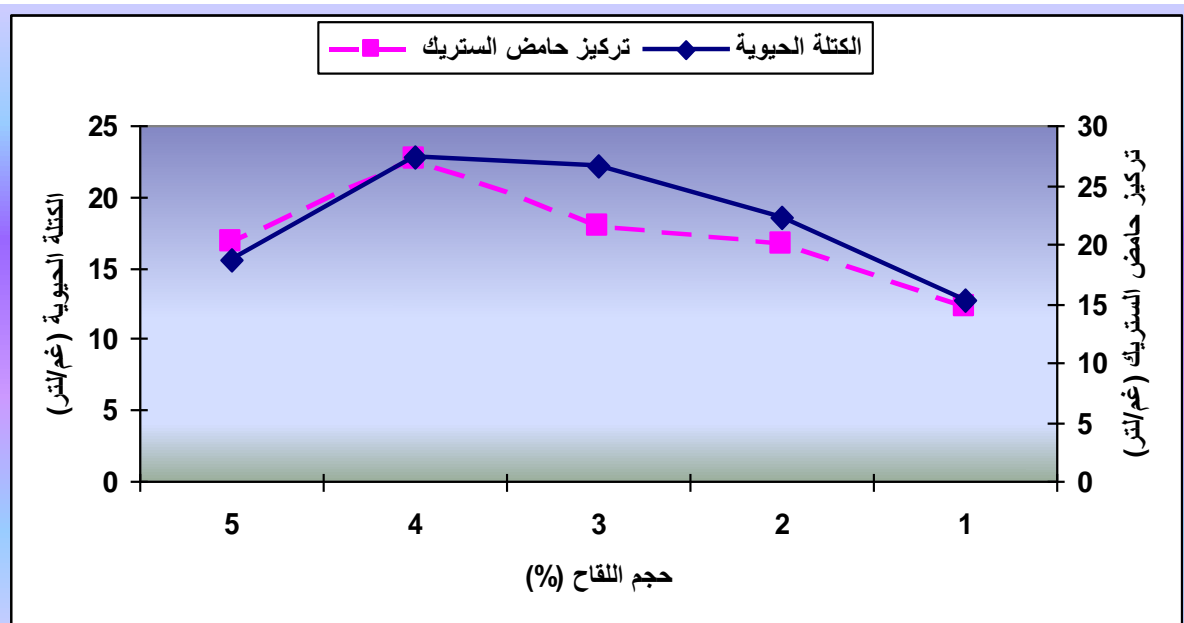
استعملت حجوم وتراكيز لقاح مختلفة في دراسات عدة، فقد درس (Ali et al., 2002) تأثير حجوم لقاح مختلفة في إنتاج حامض الستريك من الفطر *A. niger* GCBT7 وكان تركيز العالق البوغوي الأولي المستخدم هو $6,5 \times 10^6$ بوغ/مل وقد وجد أن حجم اللقاح ١ % هو الأمثل في إنتاج الحامض، فيما تم استخدام تركيز اللقاح $1,35 \times 10^6$ بوغ/مل لإنتاج الحامض من العزلة الفطرية *A. niger* IIB-A6 (Anwar et al., 2009)، كما استخدم (Rao & Reddy, 2013) تركيز اللقاح 1×10^7 بوغ/مل لإنتاج الحامض من سلالة أخرى للفطر *A. niger* باستخدام وسط نخالة الشوفان، وفي دراسة أخرى لبيان تأثير حجوم لقاح مختلفة في إنتاج حامض الستريك من سلالة أخرى تابعة للفطر *A. niger* على وسط لب الفول الأفريقي وجد أن حجم اللقاح ٣ % هو الأفضل في

إنتاج الحامض (Auta et al., 2014)، كما استخدم Prabha & Rangaiah (2014) حجم اللقاح ٤ %

من اللقاح الأولي ذي التركيز 1.2×10^6 بوغ/مل لإنتاج الحامض من العزلة الفطرية *A. niger*.



الشكل (٤-٣٠): تأثير حجم اللقاح في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية 5 *A. niger* في وسط المولاس المروق.



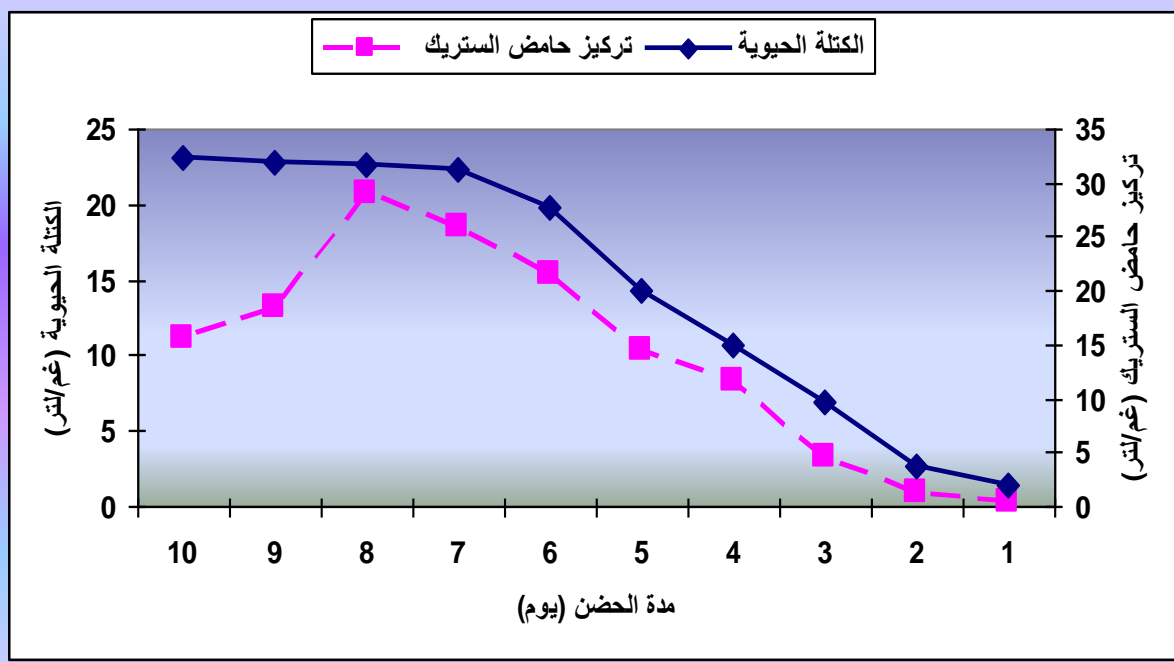
الشكل (٤-٣١): تأثير حجم اللقاح في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية 5 *A. niger* في وسط راشم قشور الرز.

(٤-٥-٨): تأثير مدة الحضانة

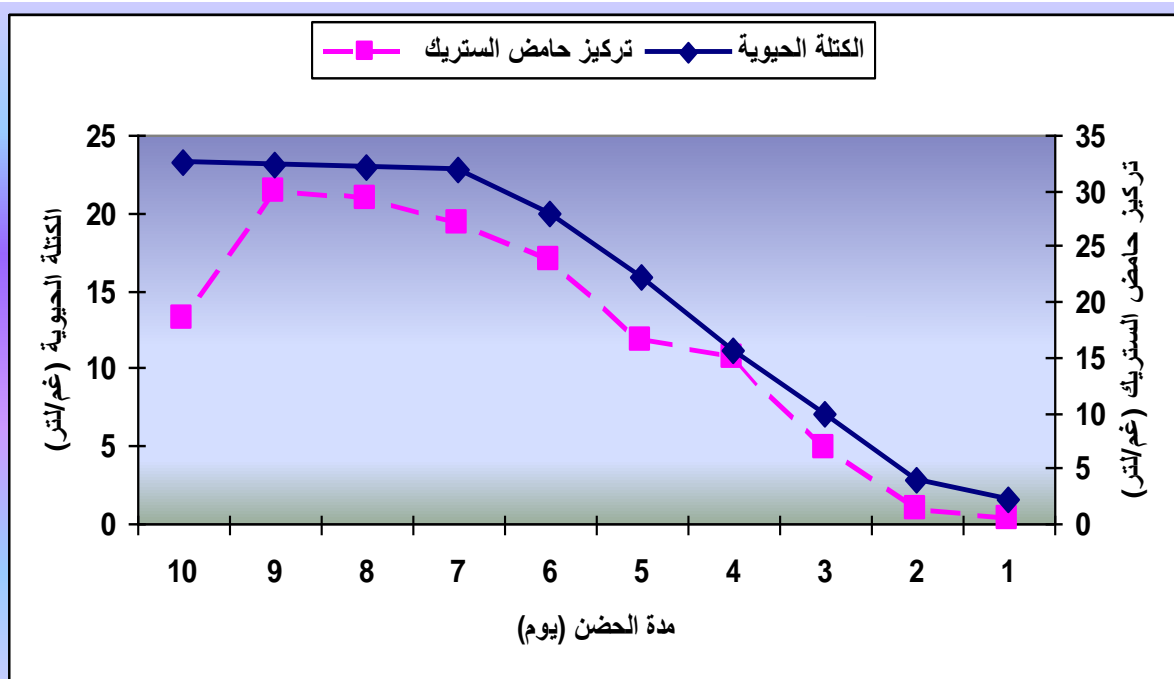
تمت متابعة إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية قيد الدراسة يومياً ولمدة ١٠ أيام متتالية، وقد بينت النتائج الموضحة في الشكل (٤-٢٢) أن أقصى إنتاج للحامض قد تحقق عند ٨ أيام من الحضان باستخدام وسط المولاس المروق إذ بلغت كمية الحامض المنتجة 28.947 غم/لتر، فيما كانت مدة الحضان ٩ أيام هي المثلى لإنتاج الحامض باستخدام وسط راشح قشور الرز إذ بلغت كمية الحامض المنتجة 30.015 غم/لتر (الشكل ٤-٢٣).

يلاحظ من الشكلين (٤-٢١) و (٤-٢٢) أيضاً أنه بزيادة مدة الحضان تزداد الكتلة الحيوية للفطر يرافقها انخفاض في كمية حامض الستريك المنتجة عند زيادة مدة الحضان إلى ٩ و ١٠ أيام لوسط المولاس المروق و ١٠ أيام لوسط راشح قشور الرز، يمكن أن يعزى سبب انخفاض كمية الحامض المنتجة بزيادة مدة الحضان إلى انخفاض كمية النيتروجين المتاحة واستنزاف السكريات في الوسط التخميري وعمر الفطر والمثبطات التي من الممكن أن تفرز من قبل الفطر نفسه (Anwar et al., 2009).

تتفق هذه النتائج مع ما أشار إليه (Kamal & Gupta (1982) الذي ذكر أن مدة الحضان التي تتراوح ما بين ٦-٩ أيام هي الفضلى لإنتاج الحامض من الفطر *A. niger*، كما تتفق مع (Betiku et al. (2010) من أن مدة الحضان البالغة ٨ أيام هي المدة المثلى في إنتاج الحامض وأن الزيادة في مدة الحضان لا تسبب زيادة في كمية الحامض المنتجة. بينما لا تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه (Pawar & Pawar (2014) الذي وجد أن مدة الحضان البالغة 15 يوم هي المثلى لإنتاج حامض الستريك من الفطر *A. niger* باستخدام مواد خام مختلفة.



الشكل (٤-٣٣): تأثير مدة الحضانة في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger* 5 في وسط المولاس المروق.



الشكل (٤-٣٣): تأثير مدة الحضانة في إنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية *A. niger* 5 في وسط راشم قشور الرز.

خلاصة لما سبق فإن الظروف المثلى لإنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية المحلية *A. niger* 5 باستخدام وسط المولاس المروق تمثلت باستعمال وسط المولاس المروق الحاوي على ١٥ % سكريات مختزلة، المدعم بكبريتات الأمونيوم بوصفها مصدراً نيتروجينياً وبتركيز 0.25 % وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين بتركيز 0.1 % وكبريتات المغنسيوم سباعية جزيء الماء بتركيز 0.025 % برقم هيدروجيني ابتدائي ٣.٥، وتلقيح الوسط بلقاح حجمه ٤ % من اللقاح الأولي ذي التركيز ١ x ١٠^٦ بوغ/مل والحضن في الحاضنة تحت الظروف المهتزة وبسرعة رج ٢٠٠ دورة/دقيقة بدرجة حرارة ٣٠ مُم لمدة ٨ أيام.

أما الظروف المثلى لإنتاج حامض الستريك من العزلة الفطرية المحلية *A. niger* 5 باستخدام وسط راشح قشور الرز فقد تمثلت باستعمال وسط راشح قشور الرز الحاوي على ١٥ % سكريات مختزلة، المدعم بكبريتات الأمونيوم مصدراً للنيتروجين وبتركيز 0.25 % وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين بتركيز 0.2 % وكبريتات المغنسيوم سباعية جزيء الماء بتركيز 0.025 % برقم هيدروجيني ابتدائي ٤، وتلقيح الوسط بلقاح حجمه ٤ % من اللقاح الأولي ذي التركيز ١ x ١٠^٦ بوغ/مل والحضن في الحاضنة تحت الظروف المهتزة وبسرعة رج ٢٠٠ دورة/دقيقة بدرجة حرارة ٣٠ مُم لمدة ٩ أيام.

نظراً لكون استخدام وسط راشح قشور الرز قد أعطى كفاءة أعلى من وسط المولاس المروق من حيث كمية الحامض المنتجة فضلاً عن عدم توفر دراسات سابقة عن إنتاج حامض الستريك باستخدام وسط محضر من قشور الرز لذا فقد اختير هذا الوسط لاستكمال دراسة تنقية الحامض والكشف عنه.

(٤-٦): تنقية حامض الستريك والكشف عنه

تم استخدام طريقة الترسيب (Precipitation) لاستخلاص وتنقية حامض الستريك المنتج من العزلة الفطرية المحلية 5 *A. niger* باستخدام كاربونات الكالسيوم لترسيب السترات على شكل سترات الكالسيوم التي تعامل فيما بعد بحامض الكبريتيك لترسيب كبريتات الكالسيوم وتحرير السترات وهي من الطرق التقليدية المستخدمة بكثرة في مصانع إنتاج الحامض (Pazouki & Panda, 1998).

جرى بعد ذلك الكشف عن حامض الستريك المنتج ومعرفة نقاوته فضلاً عن حساب زمن الاحتجاز (Retention time) بتقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC، إذ يتضح من الشكلين (٤-٢٤) و (٤-٢٥) ظهور قمتي امتصاص لكل من حامض الستريك القياسي والحامض قيد الدراسة بزمن احتجاز مقداره ١٢,٦٣٧ و ١٢,٦٤١ دقيقة على التوالي، وبذلك تكون هذه النتيجة دليلاً على أن الحامض المنتج هو حامض الستريك وبدرجة نقاوة عالية.

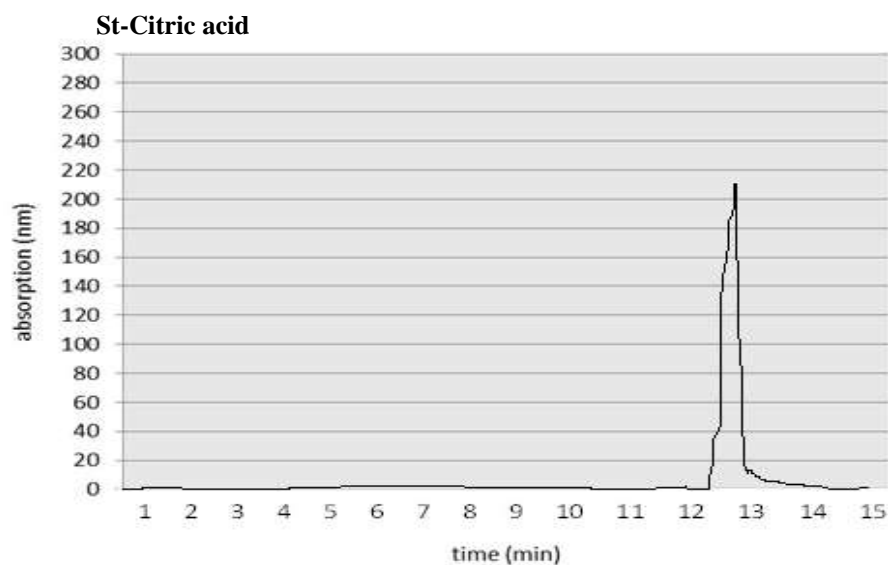
استعملت كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC في الكشف عن حامض الستريك المنتج وتحديد تركيزه من ثلاث عزلات مختلفة تعود للفطر *A. niger* (Alben & Erkmen, 2004; Lotfy *et al.*, 2007; Farooq *et al.*, 2013).

أشارت بعض الدراسات إلى دور تقنية HPLC في فصل حامض الستريك والكشف عنه من بعض الفواكه الحامضية التي تحويه، فقد تمكن (Nour *et al.*, 2010) من فصل بعض الحوامض العضوية والكشف عن تواجدها في بعض الفواكه الحامضية وكان من ضمنها حامض الستريك إذ وجد أن زمن احتجاز حامض الستريك قد بلغ ١٢,٥٣٨ دقيقة وهو مقارب لزمن الاحتجاز الذي تم التوصل إليه في الدراسة الحالية. بينما وجد (Weikle, 2012) أن زمن احتجاز حامض الستريك القياسي وحامض الستريك المستخلص من بعض الفواكه الحامضية قد بلغ ٢,١٦ دقيقة باستخدام

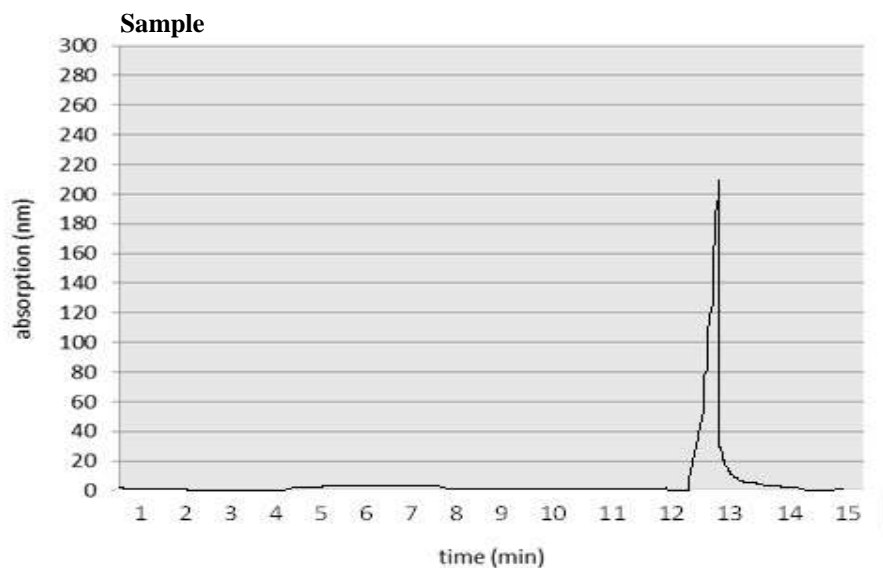
طور متحرك متكون من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين مذابة في ماء خالٍ من الأيونات وهو يعدّ أقلّ بكثير مما تمّ التوصل إليه في الدراسة الحالية، وفي دراسة حديثة استطاع (2014) Suneetha من الكشف عن حامض الستريك المنتج من قبل بعض الفطريات والبكتريا المعزولة من البصل بتقنية HPLC وقد وجدت بعض الفروق في قيم زمن الاحتجاز بين كل من حامض الستريك القياسي وحامض الستريك المنتج من الفطريات وحامض الستريك المنتج من البكتريا وقد ظهرت عدة قمم امتصاص للحامض قيد الدراسة مما يشير إلى أن نقاوة الحامض محدودة.

يتأثر زمن الاحتجاز بعاملين مهمين الأول هو المسافة التي يقطعها الأنموذج خلال مادة العمود والثاني هو السرعة التي يتمكن بها الأنموذج من قطع المسافة (Kupiec, 2004).

تكاد تكون تقنية HPLC ملائمة لفصل معظم أنواع المركبات وذلك لتعدد أنواع الأعمدة المتوفرة والمستخدمه ولما لها من مميزات مثل حساسيتها وملاءمتها لفصل المواد غير المتطايرة وغير المتحملة لدرجات الحرارة العالية إذ تم استخدامها في مجالات متعددة منها المجالات الصيدلانية والغذائية والزراعية فضلاً عن استخدامها في المجالات البيئية (Bucholz *et al.*, 2000; Hao *et al.*, 2007; Stanciu *et al.*, 2008).



الشكل (٤-٣٤): فصل حامض الستريك القياسي باستخدام كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة.



الشكل (٤-٣٥): فصل حامض الستريك المنتج من العزلة الفطرية *A. niger* 5 باستخدام كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة.

الاستنتاجات

- ١- إمكانية الحصول على عزلة محلية من الفطر *Aspergillus niger* كفاءة في إنتاج حامض الستريك وهي العزلة الفطرية 5 *A. niger*.
- ٢- تحديد النمط الوراثي للعزلة الفطرية 5 *A. niger* بالاعتماد على منطقة ITS1-5.8S rRNA gene-ITS2 باستخدام تقنية PCR-RFLP والذي ظهر من النوع A.
- ٣- ظهور العزلة الفطرية المحلية 5 *A. niger* بمجموعة ثانوية واحدة مع بعض العزلات الفطرية العالمية التابعة للفطر *A. niger* المسجلة في قاعدة بيانات المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحيوية (NCBI) عند إجراء تحليل الشجرة الوراثية (Phylogenetic tree analysis).
- ٤- تم إعداد وسطين إنتاجيين من البيئة المحلية رخيصي الثمن ومناسبين لإنتاج حامض الستريك بكميات عالية من العزلة الفطرية 5 *A. niger* يتمثلان بالمولاس المروق وراشح قشور الرز والمدعمين بكبريتات الأمونيوم وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وكبريتات المغنسيوم سباعية جزيء الماء تحت ظروف درجة حرارة حضن وطريقة نمو ورقم هيدروجيني ابتدائي وحجم لقاح ومدة حضن محددة.
- ٥- إمكانية استخدام طريقة الترسيب (Precipitation) في استخلاص وتنقية حامض الستريك من الأوساط التخمرية.

التوصيات

- ١- البحث عن عزلات فطرية أخرى وعزلها من مصادر مختلفة مع توسيع لحجم العينات وتحديد قابلية هذه العزلات على إنتاج حامض الستريك ومقارنتها بكميات الحامض المنتجة من العزلات الفطرية المحلية.
- ٢- استعمال نواتج عرضية أخرى من العمليات الصناعية والزراعية بوصفها أوساطاً طبيعية اقتصادية لإنتاج حامض الستريك من الأحياء المجهرية والإفادة منها بشكل أكبر.
- ٣- الكشف عن قابلية العزلات الفطرية التابعة للفطر *A. niger* على إنتاج الإنزيمات التي تحلل المواد المعقدة مثل السليلوز واللجنين وغيرها إلى مواد أبسط وإمكانية استخدام هذه العزلات في المعاملات الأولية للنواتج العرضية المختلفة عند تحضير الأوساط التخمرية بدلاً من المعاملات الكيميائية و الفيزيائية.
- ٤- إجراء بعض الدراسات التطبيقية لحامض الستريك المنقى مثل حفظ المواد الغذائية وفعاليتة كمضاد لنمو بعض الأحياء المجهرية وكمضاد لعملية الأكسدة وعملية تخثر الدم.
- ٥- تحديد الجين المسؤول عن إنتاج حامض الستريك في العزلات الفطرية المنتجة للحامض بهدف زيادة كمية الإنتاج.

المصادر باللغة العربية

احمد, إسماعيل احمد, (2009). تأثير حامض الستريك وهيدروكسيد الأمونيوم على إزالة سمية الافلاتوكسينات في الرز المحلي. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية، المجلد ٩، العدد ١: ٢٠-١٥.

الجريايوي، هدى عباس محمد مخيف والمعموري، زيدان خليف عمران.(٢٠١٥). تأثير الأشعة فوق البنفسجية في حيوية ابواغ الفطر *Aspergillus niger* Van Tieghem. مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية، المجلد ٢٣، العدد ١: ١٥٤-١٦١.

الخفاجي، زهرة محمود.(١٩٩٠). التقنية الحيوية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي/جامعة بغداد. مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر.

الخليل، عبد الله بن صالح بن حسن.(٢٠٠٥). الأساس العملي للفطريات. جامعة الملك سعود. الطبعة الثانية. الرياض.

الراوي، خاشع محمود وخلف الله، عبد العزيز محمد.(2000). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. الطبعة الثانية. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل.

ديوان، حسين مكطوف؛ عبدالله، ماجد ابراهيم؛ عباس، بلاسم احمد وكشمر، حسين نعيمة.(2014). تأثير بعض الاحماض في حيوية الفطرين *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* وقابليتهما في النمو على وسط الكايتين. مجلة مركز بحوث التقنيات الاحيائية، المجلد 8، العدد 1: 37-42.

سرحان، عبد الرضا طه وأبو طبيخ، سامي موسى.(٢٠١٠). عزل الفطريات المرافقة لحاصل الذرة الصفراء والتحرري عن سموم الافلاتوكسين التي تنتجها. مجلة كلية مدينة العلم الجامعة، المجلد ٢، العدد ١: ١-٨.

عبد الله، عبد العزيز عبد الله.(٢٠١٣). تأثير الرش بحامض الستريك في النمو والحاصل الأخضر لنباتات الباقلاء *Vicia faba* L. المزروعة جنوبي العراق. مجلة أبحاث البصرة (العلميات) العدد ٣٩: ١-١٢.

محمد، مثنى جاسم.(٢٠٠٦). دراسة التأثير البيولوجي للمستخلصات والحوامض الكاربوكسيلية المفصولة من ثمار نبات البنزهير *Citrus aurantifolia* في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام. مجلة تكريت للعلوم الصرفة، المجلد ١١، العدد ١: ٤-١.

المصادر باللغة الأجنبية

Abou-Zeid, A.A. & Ashy, M.A.(1984). Production of citric acid: a review. Agriculture wastes, 9: 51-76.

Accensi, F.; Cano, J.; Figuera, L.; Abarca, M.L. & Cabanes, F.J.(1999). New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. FEMS. Microbiol. Lett, 180: 191-196.

- Alben, E. & Erkmen, O.**(2004). Production of citric acid from a new substrate undersized semolina by *Aspergillus niger*. Food. Technol. Biotechnol, 42 (1): 19-22.
- Ali, H.K. & Zulkali, M.M.**(2011). Utilization of Agro-Residual Ligno-Cellulosic substances by using solid state fermentation: A Review. Cro. J. Food. Technol. Biotechnol. Nutri, 6 (2): 5-12.
- Ali, S.; Ul-Haq, I.; Qadeer, M.A. & Iqbal, J.**(2001). Biosynthesis of citric acid by locally isolated *Aspergillus niger* using sucrose salt media. Onl. J. Biol. Sci, 1 (4): 178-181.
- Ali, S.; Ul-Haq, I.; Qadeer, M.A. & Iqbal, J.**(2002). Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor. Elec. J. Biotechnol, 5 (3): 258-271.
- Al-Mahin, A.; Sharifuzzaman, A.B.M.; Faruk, M.O.; Kader, M.A.; Alam, J.; Begum, R. & Or-Rashid, H.**(2012). Improved citric acid production by radiation mutant *Aspergillus niger* using sugarcane bagasse extract. J. Biotechnol, 11 (1): 44-49.
- Amadi, J.E. & Adeniyi, D.O.**(2009). Mycotoxin production by fungi isolated from stored grains. Afr. J. Biotechnol, 8 (7): 1219-1221.
- Anastassiadis, S.; Morgunov, I.G.; Kamzolova, S.V. & Finogenova, T.V.**(2008). Citric acid production patent review. Recent. pat. Biotechnol, 2 (2): 107-123.
- Ang, T.N.; Ngoh, G.C. & Chua, A.S.M.**(2009). Pretreatment of rice husks for fungal fermentation, Int. J. Chem. Eng, 2: 197-202.
- Annadurai, G.; Raju, V.; Chellapandian, M. & Krishnan, M.R.V.** (1996). Citric acid production, part 2: Recovery. J. Bioproc. Eng, 16: 13-15.
- Anwar, S.; Ali, S. & Sardar, A.A.**(2009). Citric acid fermentation of hydrolysed raw starch by *Aspergillus niger* IIB-A6 in stationary culture. Sindh. Univer. Res. J. (Science Series), 4 (1): 1-8.
- Auta, H.S.; Abidoeye, K.T.; Tahir, H.; Ibrahim, A.D. & Aransiola, S.A.**(2014). Citric acid production by *Aspergillus niger* cultivated on *Parkia biglobosa* fruit pulp. Int. Scho. Re. Not, 1: 1-8.

- Barnett, H.L. & Hunter, B.B.**(1972). Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishers Company, Minnesota, 3rd ed.
- Benuzzia, D.A. & Segovia, R.F.**(1996). Effect of copper concentration on citric acid productivity by an *Aspergillus niger* strain. Appl. Biochem. Biotechnol, 61: 393-397.
- Berovic, M. & Legisa, M.**(2007). Citric acid production. Biotechnol. Ann. Rev, 13: 303-343.
- Betiku, E.; Alao, M.M. & Solomon, B.O.**(2010). Production of citric acid using an indigenous *Aspergillus niger* grown on Cassava starch hydrolysates. J. Nig. Soci. Chem. Eng, 25: 131-140.
- Bhattacharjee, I. & Baruah, P.K.**(2015). Isolation and screening of citric acid producing *Aspergillus* spp and optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* S-6. J. Environ. Sci. Toxi. Food. Technol, 9 (3): 19-23.
- Boominathan, S.; Dhanaraj, T.S. & Murugaiah, K.**(2012). Production and optimization of citric acid by *Aspergillus niger* using Pineapple and Tapioca waste.. Herb. Technol. Ind. J, 9 (5): 8-11.
- Bridge, P.; Arora, D.; Reddy, C. & Elander, R.**(1998). Applications of PCR in Mycology. Cambridge University Press, UK, P: 373.
- Brown, C.M.; Campbell, I. & Priest, F.G.**(1987). Introduction to Biotechnology. Blackwell Scientific Publications. Oxford, England, 1st ed.
- Bruns, T.D.; Vilgalys, R.; Brans, S.M. & Sogin, M.L.**(1992). Evolutionary relationships within fungi: analysis of nuclear small subunit rRNA sequences. Molec. Phylo. Evolut, 1: 231-241.
- Buchard, E.F. & Merrit, E.G.**(1979). Citric acid. In: Kirk-Othmers Encyclopedia of Chem. Technol, 3rd ed, Vol 6, Wiley, New York, PP: 150-151.
- Bucholz, B.A.; Dueker, S.R.; Lin, Y.; Clifford, A.J. & Vogel, J.S.**(2000). Methods and applications of HPLC-AMS. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B, 172: 910-914.

- Buscot, F.; Wipf, D.; Di Battista, C.; Munch, J.C.; Botton, B. & Martin, F.**(1996). DNA polymorphism in morels: PCR-RFLP analysis of the ribosomal DNA spacer and microstellite-primed PCR. *Mycol. Res*, 100: 63-71.
- Choe, J. & Yoo, Y.J.**(1991). Effect of ammonium ion concentration and application to fed-batch culture for over-production of citric acid. *J. Ferm. Bioeng*, 72: 106-109.
- Chundakkadu, K.**(2005). Solid-state fermentation systems-An overview. *Critical. Rev. Biotechnol*, 25: 1-30.
- Cumagun, C.J.R.; Hockenhull, J. & Lubeck, M.**(2000). Characterization of *Trichoderma* isolates from Philippine rice fields by UP-PCR and rDNA-ITS1 analysis: Identification of UP-PCR markers. *J. Phytopath*, 148: 109-115.
- Da Silva, L.; Bastos, T.C.; Amaral, P. & Zarur, M.A.**(2012). Production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* in different crude glycerol concentrations and different nitrogen sources. *Chem. Eng. Trans*, 27: 199-204.
- Dashen, M.M.; Ado, S.A.; Ameh, J.; Amapu, T. & Zakari, H.**(2013). Screening and improvement of local isolate of *Aspergillus niger* for citric acid production. *Bay. J. Pure. Appl. Sci*, 6 (1): 105-111.
- Demain, A. & Dana, C.A.**(2007). The business of Biotechnology. *Ind. Biotechnol. J*, 3 (3): 269-283.
- Demirel, G.; Yaykash, K.O. & Yasar, A.**(2005). The production of citric acid by using immobilized *Aspergillus niger* A-9 and investigation of its various effects. *J. Food. Chem*, 89: 393-396.
- Dhillon, G.S.; Brar, S.K.; Verma, M. & Tyagi, R.D.**(2010). Recent advances in citric acid bio-production and recovery. *Food. Bioproc. Technol*, 4 (4): 505-529.
- Dhillon, G.S.; Brar, S.K.; Verma, M. & Tyagi, R.D.**(2011). Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bio-production of citric acid by *Aspergillus niger*. *J. Chem. Eng*, 54: 83-92.
- Dilara, O. & Wayne, P.**(2007). Fungal generation of organic acids for removal of lead from contaminated soil. *Water, Air and Soil Pollution*, 179: 365-380.

- Domsch, K.H.; Gams, W. & Anderson, T.H.**(1980). Compendium of soil fungi. Academic prees, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, Vol 1.
- El-Holi, M.A. & Al-Delaimy, K.S.**(2003). Citric acid production from whey with sugars and additives by *Aspergillus niger*. Afr. J. Biotechnol, 2 (10): 356-359.
- El-Hussein, A.A.; Tawfig, S.A.M.; Mohammed, S.G.; El Siddig, M.A. & Siddig, M.A.M.**(2009). Citric Acid Production from Kenana Cane Molasses by *Aspergillus niger* in Submerged Fermentation. J. Gen. Eng. Biotechnol, 7 (2): 51-57.
- Ellis, D.H.**(1997). Zygomycetes. Chapter 16 In Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th ed, Edward Arnold, London, PP: 247-277.
- Farooq, U.; Anjum, F.M.; Zahoor, T.; Ur-Rahman, S.; Hayat, Z.; Akram, K. & Ashraf, E.**(2013). Citric acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* under different fermentation conditions and substrate levels. Int. J. Agric. Appl. Sci, 5 (1): 8-16.
- Fawole, O.B. & Odunfa, S.A.**(2003). Some factors affecting production of pectin enzymes by *Aspergillus niger*. Int. Biodet. Biodegr. J, 51: 223-227.
- Ferracin, L.M.; Frisvad, J.C.; Taniwaki, M.H.; Iamanaka, B.T.; Sartori, D.; Schapovaloff, M.E. & Fungaro, M.H.**(2009). Genetic Relationships among Strains of the *Aspergillus niger* Aggregate. Brazilian Arch. Biol. Technol. J, 52 (Special Number): 241-248.
- Giddel, M.R. & Jivan, A.P.**(2007). Waste to Wealth- Potential of Rice Husk in India a Literature Review. Int. Con. Cle. Technol. Environ. Man, 4 (6): 586-590.
- Gonzalez-Salgado, A.; Patino, B.; Vazquez, C. & Gonzalez-Jaen, M.T.** (2005). Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section Nigri by PCR assays. FEMS. Microbiol. Lett, 245: 353-361.
- Grewal, H.S. & Kalra, K.L.**(1995). Fungal production of citric acid. Biotechnol. Adv, 13: 209-234.

- Gutierrez-Correa, M.; Portal, L.; Moreno, P. & Tengerdy, R.P.**(1999). Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresour. Technol*, 68: 173-178.
- Habison, A.; Kubicek, C.P. & Roehr, M.**(1983). Partial purification and regulatory properties of phosphofructokinase from *Aspergillus niger*. *J. Biochem*, 209: 669-676.
- Hang, Y.D. & Woodams, E.E.**(1995). Grape pomace: A novel substrate for microbial production of citric acid. *Biotechnol. Lett*, 7: 253-254.
- Hang, Y.D. & Woodams, E.E.**(1998). Production of citric acid from corncobs by *Aspergillus niger*. *Bioresour. Technol*, 65 (3): 251-253.
- Hao, C.; Zhao, X. & Yang, P.**(2007). GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. *Trends. Ana. Chem*, 26 (6): 569-580.
- Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I. & Lorito, M.**(2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol*, 2 (1): 43-56.
- Honecker, S.; Bisping, B.; Yang, Z. & Rehm, H.J.**(1989). Influence of sucrose concentration and phosphate limitation on citric acid production by immobilized cells of *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 31: 17-24.
- Hossain, M.; Brooks, J.D. & Moddax, I.S.**(1984). The effect of the sugar source on citric acid production by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 19: 393-397.
- Jantasila, N.; Kaewsompong, S.; Filer, K. & Nithisinprasert, S.**(2012). Pretreatment of Agricultural Wastes for the Production of Cellulolytic Enzymes from *Aspergillus niger* 386017M1 by Solid State Fermentation. *Kaset. J. Nat. Sci*, 46: 783-794.
- Jernejc, K. & Legisa, M.**(2004). The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation, *Pro. Biochem*, 39: 2261-2265.

- Jianlong, W.** (1998). Improvement of citric acid production by *Aspergillus niger* with addition of phytate to beet molasses. *Bioresour. Technol*, 65 (3): 243-245.
- Kamal, K.S.S. & Gupta, B.K.**(1982). Some cultural conditions (hydrogen ion concentration, incubation period and temperature) affecting citric acid production by *Aspergillus niger* strain. *Life. Sci. Adv*, 1: 89-93.
- Kana, E.B.G.; Oloke, J.K.; Lateef, A. & Oyebanji, A.**(2012). Comparative evaluation of artificial neural network coupled genetic algorithm and response surface methodology for modeling and optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* MCBN297. *J. Chem. Eng*, 27: 397-402.
- Kapelli, O.; Muller, M. & Fiechter, A.**(1978). Chemical and structural alterations at cell surface of *Candida tropicalis*, induced by hydrocarbon substrate. *J. Bacterio*, 133: 952-958.
- Kapoor, K.K.; Chaudhary, K. & Tauro, P.**(1983). Citric acid. In: Prescott and Dunn's Industrial Microbiology, UK: MacMillan Publishers Ltd, PP: 709-747.
- Karaffa, L. & Kubicek, C.P.**(2003). *Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box?. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 61: 189-196.
- Kareem, S.O.; Akpan, I. & Alebiowu, O.O.**(2010). Production of citric acid by *Aspergillus niger* using pineapple waste. *Malay. J. Microbiol*, 6 (2):161-165.
- Kizis, D.; Natskoulis, P.; Nychas, G.E. & Panagou, E.Z.**(2014). Biodiversity and ITS-RFLP Characterisation of *Aspergillus* Section *Nigri* Isolates in Grapes from Four Traditional Grape-Producing Areas in Greece. *Plos One*, 9 (4): 1-15.
- Kown-Chung, K.J. & Bennett, J.E.**(1992). *Medical Mycology*. Philadelphia, Lea and Febiqer. P: 866.
- Krzystek, L.; Gluszcz, P. & Ledakowicz, S.**(1996). Determination of yield and maintenance coefficients in citric acid production by *Aspergillus niger*. *J. Chem. Eng*, 62: 215-222.

- Kubicek, C.P.**(1988). The role of the citric acid cycle in fungal organic acid fermentations. *J. Biochem. Soci. Sym*, 54: 113-126.
- Kubicek, C.P. & Roehr, M.**(1986). Citric acid fermentation. *Critical Rev. Biotechnol*, 3: 331-373.
- Kuforiji, O.O.; Kuboye, A.O. & Odunfa, S.A.**(2010). Orange and pineapple wastes as potential substrates for citric acid production. *Int. J. Plant. Biol*, 1: 19-21.
- Kundu, P.; Panda, T.; Majumdar, S.K.; Guha, G. & Bandyopadhyay, K.K.**(1984). Pretreatment of Indian cane molasses for increased production of citric acid. *J. Biotechnol. Bioeng*, 26 (9): 1114-1121.
- Kupiec, T.**(2004). Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography. *Int. J. Pharm. Comp*, 8 (3): 223-227.
- Lacey, A.L.**(1997). Manual of techniques insect pathology. Academic Press, New York, PP: 410-411.
- Leangon, S.; Maddox, I.S. & Brooks, J.D.**(2000). A proposed biochemical mechanism for citric acid accumulation by *Aspergillus niger* Yang No.2 growing in solid state fermentation. *W. J. Microbiol. Biotechnol*, 16: 271-275.
- Lekha, P.K. & Lonsane, B.K.**(1997). Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv. Appl. Microbiol*, 44: 215-260.
- Lonsane, B.K.; Saucedo-Castaneda, S.; Rimbault, M.; Roussos, S.; Viniegra-Gonzalez, G. & Ghildyal, N.P.**(1992). Scale-up strategies for solid state fermentation systems. *Process. Biochem*, 27: 259-273.
- Lotfy, W.A; Ghanem, K.M. & El-Helow, E.R.**(2007). Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: Mutagenesis and cost reduction studies. *Bioresour. Technol*, 98: 3464-3469.
- Maddox, I.S.; Spencer, K.; Greenwood, J.M.; Dawson, M.W. & Brooks, J.D.**(1985). Production of citric acid from sugars present in wood hemicellulose using *Aspergillus niger* and *Saccharomycopsis lipolytica*. *Biotechnol. Lett*, 7: 815-818.

- Majolli, M.V.I. & Aguirre, S.N.**(1999). Effect of trace metals on the cell morphology, enzymic activity and citric acid production in a strain of *Aspergillus wentii*. Rev. Arg. Microbiol, 31: 65-71.
- Majumder, L.; Khalil, I. & Munshi, M.K.**(2010). Citric acid production by *Aspergillus niger* using molasses and pumpkin as substrates. Euro. J. Biol. Sci, 2 (1): 1-8.
- Makut, M.D. & Ade-Ibijola, O.B.**(2012). Citric acid producing fungi found in the soil environment of Keffi metropolis, Nasarawa state, Nig. Int. Res. J. Microbiol, 3 (7): 240-245.
- Marier, J.R. & Boulet.M.**(1958). Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine acetic anhydride method. J. Dai. Sci, 41 :1683-1692.
- Mattey, M.**(1992). The production of organic acids. Critical Rev. Biotechnol, 12: 87-112.
- Messing, W. & Schmitz, R.**(1976). The technical production of citric acid on the basis of molasses. Chem. Exp, 2 (9): 309-316.
- Miller, G.L.**(1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. J. Ana. Chem, 31 (3): 426-429.
- Minh, N.P.**(2014). Semi-solid state fermentation of citric acid by *Mucor piriformis* on malt waste. Int. J. Multi. Res. Dev, 1 (6): 148-152.
- Mirminachi, F.; Zhang, A. & Roehr, M.**(2002). Citric acid fermentation and heavy metal ions: Effect of iron, manganese and copper. Acta. Biotechnol, 22: 363-373.
- Mitchell, J.I.; Roberts, P.J. & Moss, S.T.**(1995). Sequence or structure? A short review on the application of nucleic acid sequence information to fungal taxonomy. Mycologist, 9 (2): 67-75.
- Moubasher, A.H.**(1993). Soil fungi in Qatar and other Arab countries. published by the centre for sci. Appl. Res. univer. Qatar.
- Moustafa, A.F.**(1982). Taxonomic studies on the fungi of Kuwait. Aspergilli. Kuw. J. Sci, 9: 245-260.

- Munshi, M.K.; Huque, R.; Khatun, A.; Islam, M.; Hossain, M.F.; Rahman, M.M. & Khalil, M.I.**(2013). Effect of biomass and sugar in citric acid production by *Aspergillus niger* using molasses and jackfruit as substrates. Am. J. Food. Nutri, 1: 1-6.
- Naeni, A.T.; Adeli, M. & Vossoughi, M.**(2010). Poly (citric acid)-block-poly (ethylene glycol) copolymers-new biocompatible hybrid materials for nanomedicine. Nanomed, Nanotechnol, Biol. Med, 6: 556-562.
- Ngadi, M.O. & Correia, L.R.**(1992). Kinetic of solid-state fermentation from apple pomace. J. Food. Eng, 17: 97-116.
- Nguyen, T.K.; Martinkova, L.; Seichert, L. & Machek, F.**(1992). Citric acid production by *Aspergillus niger* using media containing low concentrations of glucose or corn starch. Folia. Microbiol, 37: 433-444.
- Nour, V.; Trandafir, I. & Ionica, M.E.**(2010). HPLC Organic Acid Analysis in Different Citrus Juices under Reversed Phase Conditions. Not. Bot. Hort. Agro. Cluj-Napoca. J, 38 (1): 44-48.
- Ogawa, T. & Fazeli, A.**(1976). Additive effect of ferrocyanide treatment and step change of pH on citric acid production from Iranian beet molasses with *Aspergillus niger*. J. Fer. Technol, 54: 63-66.
- Omar, F.N; Rahman, N.A.A.; Hafid, H.S.; Yee, P.L. & Hassan, M.A.** (2009). Separation and Recovery of Organic Acids from Fermented Kitchen Waste by an Integrated Process. Afr. J. Biotechnol, 8 (21): 5807-5813.
- Omar, S.H. & Rehm, H.J.**(1980). Physiology and metabolism of two alkane oxidizing and citric acid producing strains of *Candida parapsilosis*. Euro. Appl. Microbiol. Biotechnol, 11: 42-49.
- Pallares, J.; Rodriguez, S. & Sanroman, A.**(1996). Citric acid production in submerged and solid state culture of *Aspergillus niger*. J. Bioproc. Eng, 15 (1): 31-33.
- Palo, N.D.; Cunanan, L.F. & Danguilan, M.L.**(1984). A study of some factors affecting surface culture production of citric acid from cane sugar by A Philippine strain of *Aspergillus niger* B-65. The Philip. J. Sci, 113: 11-27.

- Panda, T.; Kundu, S. & Majumdar, S.K.**(1984). Studies on citric acid production by *Aspergillus niger* using treated Indian cane- molasses. J. Microbiol, 5: 61-66.
- Pandey, A.**(2003). Solid-state fermentation. J. Biochem. Eng, 13: 81-84.
- Papagianni, M.**(2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger* Biochemical aspects, membrane transport and modeling. Biotechnol. Adv, 25: 244-263.
- Papagianni, M. & Matthey, M.**(2006). Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level, Application of neural network and cluster analysis for characterization of fungal morphology. Microbiol. Cell. Fact, 5 (3): 1-12.
- Papagianni, M.; Matthey, M.; Berovic, M. & Kristiansen, B.**(1999). *Aspergillus niger* morphology and citric acid production in submerged batch fermentation: effects of culture pH, phosphate and manganese levels. Food. Technol. Biotechnol, 37: 165-171.
- Patil, N.G. & Patil, V.R.**(2014). Production and partial characterization of citric acid by local isolate of *Aspergillus niger* using sorghum. Int. Res. J. Pharm, 5 (3): 229-231.
- Paul, G.C.; Priede, M.A. & Thomas, C.R.**(1999). Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations. Biochem. Eng. J, 3 (2): 121-129.
- Pawar, V.A. & Pawar, P.R.**(2014). Effect of various parameters on citric acid production using different substrates. Ind. J. Res, 3(7): 13-15.
- Pazouki, M. & Panda, T.**(1998). Recovery of citric acid- a review. J. Bioproc. Eng, 19: 435-439.
- Pazouki, M.; Felse, P.A.; Sinha, J. & Panda, T.**(2000). Comparative studies on citric acid production by *Aspergillus niger* and *candida lipolytica* using molasses and glucose. J. Bioproc. Eng, 22 (4): 353-361.
- Peksel, A. & Kubicek, C.**(2003). Effects of sucrose concentration during citric acid accumulation by *A. niger*. Turk. J. Chem, 27: 581-590.

- Pintado, J.; Torrado, A.; Gonzalez, M.P. & Murado, M.A.**(1998). Optimization of nutrient concentration for citric acid production by solid-state culture of *Aspergillus niger* on polyurethane foams. J. Enz. Microbiol. Technol, 23: 149-156.
- Pohnerkar, J.K. & Desai, S.A.**(2014). Selective synthesis of citric acid from molasses using *Aspergillus niger*. Int. J. Eng. Trends. Technol, 9 (1): 7-9.
- Prabha, M.S. & Rangaiah, G.S.**(2014). Citric acid production using *Ananas comosus* and its waste with the effect of alcohols. Int. J. Current Microbiol. Appl. Sci, 3 (5):747-754.
- Raheem, D. & Lazer, J.**(2012). Experimental study on boiler scales cleaning using hydrochloric and citric acids. J. Eng. Technol, 30 (3): 489-499.
- Raimbault, M.** (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. Elec. J. Biotechnol, 1: 1-27.
- Rajoka, M.I.; Ahmed, M.N.; Shahid, R.; Latif, F. & Parvez, S.**(1998). Citric acid production from sugar-cane molasses by cultures of *Aspergillus niger*. Biologia, 44 (1): 241-253
- Rao, P.R. & Reddy, M.K.**(2013). Production of citric acid by *Aspergillus niger* using Oat Bran as substrate. Int. J. Chem. Eng, 3 (3): 181-190.
- Reddy, T.K.S. & Pushpa, A.**(2012). Studies on characterizations of agriculture waste (rice husk) for the production of ethanol. J. Environ. Res. Dev, 7 (2A): 1076-1084.
- Rivas, B.; Torrado, A.; Torre, P.; Converti, A. & Dominguez, J.M.** (2008). Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. J. Agric. Food. Chem, 56: 2380-2387.
- Roukas, T.**(1991). Production of citric acid from beet molasses by immobilized cells of *Aspergillus niger*. J. Food. Sci, 56: 878-880.
- Roukas, T. & Harvey, L.**(1988). The effect of pH on the production of citric acid and gluconic acid from beet and cane molasses using continuous culture. Biotechnol. Lett, 10: 289-294.

- Rymowicz, W.; Fatykhova, A.R.; Kamzolova, S.V.; Rywinska, A. & Morgunov, I.G.**(2010). Citric acid production from glycerol containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 87: 971-979.
- Saito, M. & Machida, S.**(1999). A rapid Identification method for aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by Ammonia Vapor. *Mycosci*, 40: 205-208.
- Sanjay, K. & Sharma, P.**(1994). A highly performance fermentation process for production of citric acid from sugarcane molasses. *J. Microbiol*, 23: 211-217.
- Seraphim, P.; Maria, G.P.; Stylianos, F.; Michael, K. & George, A.** (2008). Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill waste water-based media. *Bioresour. Technol*, 99: 2419-2428.
- Shah, N.D.; Chattoo, B.B.; Kothari, R.M. & Hegde, V.M.**(1993). Starch hydrolysate, an optimal and economical source of carbon for the secretion of citric acid by *Yarrowia lipolytica*. *Starch. J*, 45: 104-109.
- Shojaosadati, S.A. & Babaeipour, V.**(2002). Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor. *Process. Biochem*, 37: 909-914.
- Shokri, H.**(2011). Evaluation of Inhibitory Effects of Citric and Tartaric Acids and Their Combination on the Growth of *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* and *Malassezia furfur*. *World. J. Zool*, 6 (1): 12-15.
- Skoog, D.A.; Holler, F.J. & Nieman, T.A.**(1997). Principles of instrumental analysis. 5th ed, Brooks/Cole Thomson Learning.
- Soccol, C.R. & Vandenberghe, L.P.S.**(2003). Overview of applied solid- state fermentation in Brazil. *J. Biochem. Eng*, 13: 205-218.
- Soccol, C.R.; Prado, F.C.; Vandenberghe, L.P.S. & Pandey, A.**(2003). General aspects in citric acid production by submerged and solid-state fermentation. In: *Concise Encyclopedia of Bioresour. Technol*, New York, The Haworth Press, PP: 652-664.

- Socol, C.R.; Vandenberghe, L.P.S.; Rodrigues, C. & Pandey, A.**(2006). New perspectives for citric acid production and application. Food. Technol. Biotechnol, 44 (2): 141-149.
- Somma, S.; Perrone, G. & Logrieco, A.F.**(2012). Diversity of black Aspergilli and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. Phytopath. Med. J, 51 (1): 131-147.
- Spadaro, D.; Patharajan, S.; Lore, A.; Garibaldi, A. & Gullino, M.**(2012). Ochratoxigenic Black Species of Aspergilli in Grape Fruits of Northern Italy Identified by an Improved PCR-RFLP Procedure. J. Toxins, 4: 42-54.
- Srivastava, A.S. & De, S. K.**(1980). Effect of some cultural conditions on microbial citric acid formation. Indian J. Agric. Chem, 13: 39-44.
- Stanbury, P.F. & Whitaker, A.**(1984). Microbial growth kinetics. In: Principles of fermentation technology. 1st ed. Pergamon Press, New York, Oxford, PP: 11-24.
- Stanciu, G.; Dobrinas, S.; Birghila, S. & Popescu, M.**(2008) Determination of organic compounds from different types of coffee by HPLC and GC-ECD analysis. Environ. Eng. Man. J, 7 (6): 661-666.
- Stops, F.; Fell, J.T.; Collett, J.H.; Martini, L.G.; Sharma, H.L. & Smith, A.M.**(2006). Citric acid prolongs the gastro-retention of a floating dosage form and increases bioavailability of riboflavin in the fasted state. Int. J. Pharm, 308 (1-2): 14-24.
- Sukesh, K.; Jayasuni, J.S.; Gokul, C.N. & Anu, V.**(2013). Citric acid production from agronomic waste using *Aspergillus niger* isolated from decayed fruit. J. Chem. Biol. Phys. Sci, 3 (2): 1572-1576.
- Suneetha, V.**(2014). High performance liquid chromatography analysis, production and brief comparative study of citric acid producing microorganisms from spoiled onions in and around Vellore district. Iran. J. Sci. Technol, 38 (A2): 193-197.
- Susana, R.C. & Sanroman, M.A.**(2006). Application of solid-state fermentation to food industry-A review. J. Food. Eng, 76: 291-302.

- Swain, M.R.; Ray, R.C. & Patra, J.K.**(2011). Citric acid: Microbial production and applications in food and pharmaceutical industries. Nova Science Publishers, Inc, New York, PP: 97-118.
- Tran, C.T. & Mitchell, D.A.**(1995). Pineapple waste-A novel substrate for citric acid production by solid-state fermentation. *Biotechnol. Lett*, 17 (10): 1107-1110.
- Tran, C.T.; Sly, L.I. & Mitchell, D.A.**(1998). Selection of a strain of *Aspergillus* for the production of citric acid from pineapple waste in solid-state fermentation. *World. J. Microbiol. Biotechnol*, 14: 399-404.
- Ul-Haq, I.; Ali, S.; Ashraf, H.; Butt, W.A.; Qadeer, M.A.; Shafiq, K. & Iqbal, J.**(2001). Effect of mineral nutrients on the biosynthesis of citric acid by *Aspergillus niger* UV-6 using sucrose salt media. *Pak. J. Bot*, 33: 535-540.
- Ul-Haq, I.; Ali, S.; Qadeer, M.A. & Iqbal, J.**(2002). Citric acid fermentation by mutant strain of *Aspergillus niger* GCMC-7 using molasses based medium. *J. Biotechnol*, 5 (2): 125-132.
- Ul-Haq, I.; Ali, S.; Qadeer, M.A. & Iqbal, J.**(2004). Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. *Bioresour. Technol*, 93: 125-130.
- Vandenberghe, L.P.S.; Socol, C.R.; Pandey, A. & Lebeault, J.M.**(1999). Review: Microbial production of citric acid. *Bra. Arch. Biol. Technol*, 42: 263-276.
- Vandenberghe, L.P.S.; Socol, C.R.; Prado, F.C. & Pandey, A.**(2004). Comparison of citric acid production by solid-state fermentation in flask, column, tray and drum bioreactor. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 118: 1-10.
- Vasanthabharathi, V.; Sajitha, N. & Jayalakshmi, S.**(2013). Citric acid production from U-V mutated estuarine *Aspergillus niger*. *Adv. Biol. Res*, 7 (3): 89-94.
- Vergano, M.G.; Fernandez, N.; Soria, M.A. & Kerber, M.S.**(1996). Influence of inoculums preparation on citric acid production by *Aspergillus niger*. *J. Biotechnol*, 12: 655-656.
- Wasay, S.A.; Barrington, S.F. & Tokunaga, S.**(1998). Using *Aspergillus niger* to bioremediate soils contaminated by heavy metals. *Biorem. J*, 2 (3-4):184-190.

- Watanapokasin, R.; Sawasjirakij, N.; Usami, S. & Kirimura, K.**(2007). Polyploid formation between *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* for enhanced citric acid production from cellulose. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 143 (2): 176-186.
- Webster, J. & Weber, R.W.S.**(2007). Introduction to fungi. 3rd ed, Cambridge. PP: 875.
- Weikle, k.**(2012). Determination of citric acid in fruit juices using HPLC. *J. Ana. Chem*, 3: 57-62.
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S. & Taylor, J.W.**(1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Guide to Methods and Applications, Academic Press, USA, PP: 315-322.
- Wojtatowicz, M.; Marchin, G.L. & Erickson, L.E.**(1993). Attempts to improve strain A-10 of *Yarrowia lipolytica* for citric acid production from n-paraffins. *Process. Biochem. J*, 28: 453-460.
- Wolschek, M.F & Kubicek, C.P.**(1999). Biochemistry of citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. In: Kristiansen B, Matthey M, Linden J, ed. Citric acid biotechnology. London, Taylor and Francis, PP: 11-33.
- Xu, D.B.; Madrid, C.P.; Roehr, M. & Kubicek, C.P.**(1989). The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 30: 553-558.
- Yalcin, S.K.; Bozdemir, M.T & Ozbas, Z.Y.**(2009). A comparative study on citric acid production kinetics of two *Yarrowia lipolytica* strains in two different media. *Ind. J. Biotechnol*, 8: 408-417.
- Yigitoglu, M.**(1992). Production of citric acid by fungi. *J. Islamic. Acad. Sci*, 5 (2): 100-106.
- Yigitoglu, M.; McNeil, B. & Kristiansen, B.**(1992). Effect of initial ammonium concentration on citric acid production in a stirred tank reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 4: 297-305.
- Yokoya, F.**(1992). Citric acid production. Industrial Fermentation Series, Campinas, SP, Brazil, PP: 1-82.

Zhang, Z.Y.; Jin, B. & Kelly, J.M.(2007). Production of lactic acid from renewable material by *Rhizopus* fungi. J. Biochem. Eng, 35: 251-263.