مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2007) ــ المجلد (23) ــ العدد 1 ــ الصفحات: 387 -402

تحديد الظروف البيئية المثلى لإنتاج أنزيم الأميلاز من العزلة الفطرية *Aspergillus niger* SS4

عادل عمر[1] سمير سليق[2] محي الدين جمعة[3]

الملخص

عُزل الفطر *Aspergillus niger* SS4 من التربة الخصبة لحديقة كلية الزراعة بجامعة دمشق، وبعد تنقيته على الأوساط Potato Dextrose Agar (PDA) و Malt Extract Agar (MEA) حُدّدت هويته بمتحف التاريخ الطبيعي بباريس فرنسا.

أظهرت العزلة الفطرية قدرة تحليلية عالية على الوسط الصلب (Starch agar) كخطوة أولى لفحص قدرتها على إنتاج أنزيم الأميلاز، وخلال دراسة الظروف البيئية المختلفة وتأثيرها في إنتاج الأنزيم لوحظ أن استخدام درجة حرارة 30°م لوسط الإنتاج أعطى أعلى فعالية نوعية بلغت (353 وحدة/ ملغ من البروتين)، في حين بلغت الفعالية النوعية أقصاها (426 وحدة/ ملغ من البروتين) عند درجة حموضة pH 7 لوسط الإنتاج.

وكانت بقية الظروف البيئية المدروسة لإنتاج أنزيم الأميلاز من العزلة الفطرية قيد الدراسة قد أعطت أعلى فعالية نوعية عند يومين من عمر اللقاح وعند حجم لقاح وصل إلى 3% من حجم وسط الإنتاج وبتركيز بوغي $4x10^5$ بوغ/ مل، وبواقع (446 وحدة/ ملغ من البروتين) و(375 وحدة/ ملغ من البروتين) على التوالي .

كما حققت فترة (48 ساعة) أقصى فعالية نوعية بلغت (343 وحدة/ ملغ من البروتين) من بين فترات التخمير المختلفة التي دُرس تأثيرها في إنتاج أنزيم الأميلاز من العزلة الفطرية قيد الدراسة .

الكلمات المفتاحية: الأنزيمات، أميلاز، ظروف الإنتاج، ***Aspergillus niger*.**

[1] طالب دكتوراه، [2] أستاذ مساعد، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، ص.ب. 30621، جامعة دمشق، سورية.
[3] أستاذ، كلية الصيدلة، جامعة دمشق، سورية.

Environmental Optimization of amylase production from the locally isolated *Aspergillus niger* SS4

Adel Omer[(1)], Samir Seliq[(2)] and Muhidin Jouma[(3)]

ABSTRACT

The fungi *Aspergillus niger* SS4 was isolated from soil collected from the garden of Agriculture Faculty, Damascus University and purified on (PDA) and (MEA) media. The isolate was identified in Museum of Natural History Paris- France. The fungal isolate showed high hydrolytic ability on starch agar medium as a first step to determine their ability for production of amylase.

The results of evaluation of different conditions and their effects on the production of enzyme revealed that the optimum temperature was 30 c with specific activity 353 U/mg protein and the optimum pH was 7 with specific activity 426 U/mg protein. Maximum specific activity was achieved when the medium was inoculated by 2 day old inoculum culture at 3% of medium at concentration of 4×10^5 spore/ml with 446 U/mg protein and 375 U/mg protein respectively. The study of different fermentation periods showed that the maximum specific activity (343 U/mg protein) was obtained when the isolate was grown on medium for 48 hours.

Key words: Enzymes, Amylase-Optimization, *Aspergillus niger*.

[(1)]Ph. D Student, [(2)] Associate Prof., Department of Food Science, Faculty of Agriculture, P.O.Box 30621, Damascus University, Syria.
[(3)]Prof., Faculty of Pharmacy, Damascus University, Syria.

المقدمـــة

تعدُّ أنزيمات الأميلاز باختلاف مصادرها ذات أهمية قصوى بسبب المجالات التطبيقية الواسعة لها كالصناعات الغذائية التي يكثر فيها استخدام هذه الأنزيمات، فعملية تحويل النشاء إلى سكريات بسيطة أو ما يعرف بصناعة النشاء (Starch industry) تعتمد بصورة كلية على استخدام أنزيمات الاميلاز التي تدخل أيضاً في صناعات غذائية أخرى كتحسين المخبوزات وإزالة النشاء في صناعة السكر بالإضافة إلى توفير السكريات البسيطة القابلة للتخمر في الصناعات التخمرية المختلفة، ولا تقتصر التطبيقات الصناعية لهذه الأنزيمات على الصناعات الغذائية، ففي صناعة النسيج (Textile industry) تستخدم أنزيمات الأميلاز لإزالة عجينة النشاء المضافة في مراحل التصنيع الأولى لتقوية خيوط النسيج كما تضاف هذة الأنزيمات في صناعات الورق والمنظفات وتحضير الأعلاف الحيوانية. (السواح، 2002 و2003, Ashie و2004 ,Novo).

ونظراً لما تمتاز به الأحياء المجهرية عن المصادر الأخرى كالمصادر الحيوانية والنباتية لإنتاج الأنزيمات من سرعة للنمو والتكاثر وتوفر المواد الأولية لتنميتها فضلاً عن سهولة تحسين إنتاج هذه الأنزيمات من خلال تحسين الظروف المز رعية فقد استقطبت قدرة بعض هذه الأحياء على إنتاج العديد من المواد البيولوجية ذات الأهمية التطبيقية والاقتصادية اهتمام العديد من الباحثين في اكتشاف سلالات من هذه الأحياء وعزلها ومنها الفطريات لتطوير قدراتها لإنتاج الأنزيمات، إذ درس كل من Corntt *et al*, (2003) و Malvessi and Silveira, (2004) استخدام أنواع مختلفة من الجنس الفطري *Aspergillus* تركزت على الأنواع *A.niger* و*A.oryzae* و*A. Nidulans* لإنتاج أنزيمات الأميلاز المحللة للنشاء، وتؤدي الظروف البيئية المختلفة كتباين درجات الحرارة المناسبة لإنتاج أنزيمات الأميلاز أو اختلاف درجات الـpH دوراً كبيراً في كفاءة الإنتاج والوصول للفعالية القصوى للإنزيم، بالإضافة إلى عوامل بيئية أخرى لاتقل أهمية عنها: كمدة التخمر وكذلك عمر اللقاح المستخدم وحجمه وقد سعى العديد من الباحثين لدراسة تأثير هذه العوامل في إنتاج إنزيمات الأميلاز فقد درس Ramachandran *et al*, (2004) تأثير درجة الحرارة والـpH في إنتاج أنزيم الأميلاز من الفطر *A. oryzae* .

كما دُرست الظروف ذاتها بالإضافة إلى فترة التخمر وعمر اللقاح وحجمه في دراسات أخرى كدراسة Nadakumar *et al*, (1999) لإنتاج أنزيم الأميلاز من الفطر *Aspergillus niger* CFTRI 1105، وكذلك درست الظروف المثلى لإنتاج أنزيم الأميلاز من قبل Shigechi *et al*, (2004) التي استخدموا فيها الفطر *Rhizopus oryzae* كمصدر لإنتاج الأنزيم.

ونظراً لأهمية أنزيمات الأميلاز في المجالات الصناعية المتعددة وخاصة الصناعات الغذائية منها وللاستغناء عن استيراد هذا المركب الحيوي المهم وإنتاجه محلياً داخل سورية فقد هدفت الدراسة الحالية إلى:

1 ــ عزل وتحديد هوية عزلة فطرية قادرة على إنتاج أنزيم الأميلاز
2 ــ إجراء اختبار أولي لفحص قدرة السلالة الفطرية على إنتاج أنزيم الأميلاز على الوسط الصلب .
3 ــ دراسة العوامل البيئية المثلى (درجة الحرارة والـpH وفترة التخمر وحجم اللقاح وعمره) لإنتاج الأنزيم بهدف الوصول لأعلى كمية من أنزيم الأميلاز المنتج .

مواد البحث وطرائقه

1- مصدر العزلة الفطرية: تربة زراعية خصبة (حديقة كلية الزراعة دمشق).

2- الأوساط الزراعية المستخدمة لعزل الفطر:

أ ــ آجار مستخلص البطاطا Potato Dextrose Agar (PDA) المجهزة من شركة Scharlau - أسبانيا وحضر بحسب تعليمات الشركة بإذابة39 غراماً من الوسط في لتر من الماء المقطر، وبعد ضبط الـ pH على 6,6 وزع الوسط على دوارق مخروطية سعة 250 مل بمعدل 150 مل لكل دورق، ثم عقمت الدوارق في درجة121مْ مدة 15 دقيقة وفي ضغط 15 باوند/أنش^2 وترك الوسط حتى الوصول لدرجة 5 ± 40مْ وصب في أطباق بتري معمقة وترك حتى تصلبه واستخدامه.

ب ــ آجار مستخلص الشعير Malt Extract Agar (MEA) المجهزة من شركة Merck إنكلترا. وحضر بحسب طريقة (Jernejc and Cimerman,2001) بوزن 25غ من مستخلص الشعير و15 غم آجار في لتر من الماء المقطر وضبط الـpH على 7 ثم وزع الوسط على دوارق مخروطية سعة 250 مل بمعدل 150 مل لكل دورق، وعقمت الدوارق في درجة حرارة 121مْ مدة 15 دقيقة وضغط 15 باوند /أنش^2 .

3 ــ عزل هوية العزلة الفطرية وتحديدها:

أجريت عملية تخفيف متسلسل للتربة المأخوذة من حديقة كلية الزراعة في جامعة دمشق بالماء المقطر المعقم ووزعت على البيئات (PDA) و(MEA) والموضوعة في أطباق بتري معقمة باستخدام طريقة التلقيح السطحي، وحُضّنت بحسب طريقة (Omemu,2005 و1992, Beuchat) في درجات حرارية مختلفة راوحت بين 20 و45ْم عدة أيام (5 10 أيام)، بعد ذلك اتبعت طريقة التنقية المتوالية للمستعمرات الفطرية حتى تم الحصول على العزلة الفطرية بصورة نقية، أرسلت بعدها العزلة الفطرية إلى متحف التاريخ الطبيعي بباريس، فرنسا لتحديد هويتها بمركز معتمد لإنجاز بقية مراحل الدراسة.

4 - وسط Starch agar:

لاختبار قدرة العزلة الفطرية قيد الدراسة على إنتاج أنزيم الأميلاز على الوسط الصلب حُضّر وسط آجار النشاء (starch agar) بحسب ما جاء في طريقة Cherry *et al.*,(2004) بإذابة 20 غرام نشاء ذواب soluble starch و15 غرام آجار في لتر من الماء المقطر مع إجراء تحوير على الطريقة بإضافة 1مل من محلول المعادن النزرة (Trace element) والمتكون من:

كبريتات الحديد النشادرية	$FeNH_4(SO_4)_2$	1ملغ/مل
كبريتات الزنك	$ZnSO_4$	1ملغ/مل
كبريتات المنغنيز	$MnSO_4$	1ملغ /مل
كبريتات النحاس	$Cu\ SO_4$	0.5 ملغ/مل
كبريتات الكوبالت	$Co\ SO_4$	0.08 ملغ/مل

ثم تمّ ضبط الـpH على 7 وتعقيم في درجة121مْ مدة 15 دقيقة وفي ضغط 15 باوند/ أنش^2، وبعد التعقيم ترك الوسط للتبريد وصب في أطباق بتري معقمة تمهيداً لتلقيحة بالعزلة الفطرية قيد الدراسة.

5 - وسط نمو الفطر:

استخدم الوسط المتكون من (غ/ لتر) 2غم مستخلص الخميرة، 2غ كازئين، 5غ مانيتَول، 0.15غ كبريتات الحديديك، 5 غ بيبتون، 2 غرام جلوكوز و2 غ نشأ ذواب مع إضافة 1 مل من محلول المعادن النزرة (Trace element) والمتكون من (ملغ/مل)0.1 $FeNH_4\ (SO_4)_2$ 0.1 $CoSO_4$ 0.8 $CuSO_4$ 0.5 $Mn\ SO_4$ 0.5 $Zn\ SO_4$ بهدف إنتاج اللقاح وتحضيره للعزلة الفطرية *Aspergillus niger* SS4 لإجراء تجارب هذه الدراسة، وقد حُضر الوسط بحسب ما ذكره Whitaker, (1970) و Nguyen *et al*, (2000) حيث وزنت المكونات المذكورة أعلاه وأذيبت في لتر واحد من الماء المقطر وعدُل الـpH إلى 5.7-6.0، ووزعت المكونات في دوارق مخروطية سعة 250 مل وبواقع 75 مل لكل دورق وعقمت الدوارق في درجة حرارة121مْ مدة 15 دقيقة وضغط 15 باوند/ أنش^2، وبعد تبريد الوسط لقح بالعزلة الفطرية قيد الدراسة والمنماة سابقاً على وسط (PDA) وبمقدار 2% من حجم وسط النمو تحت ظروف معقمة، وضعت بعدها الدوارق في الحاضنة الهزازة (Shaking incubator) في درجة حرارة 25مْ مدة 3 أيام.

6- الوسط الغذائي المستخدم لإنتاج الأنزيم:

استخدم الوسط الغذائي الموصوف من قبل Yang and Wang, (1999) والمكون من 10 غرامات من طحين أبيض white flour 20 غ من نشاء ذواب Soluble starch 4 غرام كبريتات الأمونيوم (NH4)SO4، 8 غرامات كربونات الكالسيوم CaCo3

5 غرام كلوريد الكالسيوم Nacl و2 مل زيت فول الصويا Soy bean oil، حيث أذيبت هذه المكونات في لتر من الماء المقطر، وبعد ضبط الـpH على 6.5 – 7 ثم وُزع الوسط في دوارق مخروطية سعة 250 مل وبمعدل 75مل لكل دورق وعقمت الدوارق بما تحويه من وسط في درجة حرارة 121مْ مدة 15 دقيقة وضغط 15 باوند/ أنش^2، وبعد تبريد الدوارق لقحُت ب2 مل من وسط النمو السابق الحاوي على الكتلة الحيوية للفطر *Aspergillus niger* SS4 ووضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة بسرعة بلغت 100 دورة/ دقيقة مدة 48 ساعة.

7 ــ اختبار الظروف المثلى لإنتاج أنزيم الأميلاز:

درست الظروف البيئية المثلى لإنتاج أنزيم الأميلاز من الفطر *Aspergillus niger* SS4 وقد اختُبر الإنتاج في درجات حرارية متباينة (15 20 25 30 35 40 45مْ) وفي درجات pH مختلفة (3 4 5 6 7 8 9) وذلك باستخدام حمض كلور الماء0.5 عياري وماءات الصوديوم0.5 عياري، كذلك اختبر الإنتاج للأنزيم بعمر وحجم لقاح متباينين حيث استخدم اللقاح بعمر (2 3) أيام وحجم (1% 2% 3% 4% 5% 6% 7% 8%) من حجم وسط الإنتاج وبتركيز $4x10^5$ بوغ/ مل، كما استخدمت مدد زمنية مختلفة لمعرفة تأثير فترة التخمير في إنتاج الإنزيم، وكانت المدد المستخدمة كالآتي: (24 48 72 96 120) ساعة.

8 - استخلاص الأنزيم وتقدير فعاليته:

بعد انتهاء فترة التخمير المبينة في (6) من مواد البحث وطرائقه وعقب كل اختبار من اختبارات الدراسة أجريت عملية الطرد المركزي لوسط إنتاج الأنزيم بسرعة 6000 دورة/دقيقة بحسب طريقة Shigechi *et al.*, (2004) للتخلص من الكتلة الحيوية للفطر والحصول على الراشح الحاوي على الأنزيم وقدّرت الفعالية باتباع طريقة Miller, (1959) والمتبعة من قبل Moreira *et al*,(2001) و Omemu *et al* ,(2005) والمعتمدة على استخدام الكاشف dintro salicylic acid (DNS) حيث أضيف 0.1 مل من الرشاحة المحتوية على (المحلول الأنزيمي) إلى 0.9 مل من محلول النشاء الذواب تركيز 1% ثم حضَن المزيج في درجة حرارة 40 م مدة 10 دقائق، بعدها أوقف التفاعل بإضافة 1 مل من الكاشف 3,5 dinitrosalicylic acid ثم وضعت الأنابيب في حمام مائي مغلي مدة 5 دقائق، ثم بردت تحت ماء الحنفية مباشرة وأضيف إليها 10 مل ماءً مقطراً ومزجت جيداً، وتمت قراءة الامتصاص عند الطول الموجي 540 نانومتراً بجهاز مقياس الضوء الطيفي ضد عينة الشاهد المحضرة بالطريقة نفسها عدا إضافة محلول الأنزيم عقب إضافة الكاشف، وتعرف وحدة الفعالية Enzyem activity (وحدة/مل) بأنها كمية الأنزيم التي تحرر1 مايكرو مول

من المالتوز في الدقيقة الواحدة ضمن ظروف القياس والفعالية النوعيـــة Specific activity تعبر عن وحدات الفعالية لكل ملغ بروتين.

9 ــ تقدير تركيز البروتين:

قدَر البروتين باتباع الطريقة المطلقـــة (Absolut method) الموصـــوفة مـــن قبـــل Whitaker and Granum, (1980) والمستخدمة من قبل الراوي وجماعته (2002) حيث تعتمد هذه الطريقة على الامتصاص عند الطول الموجي235 و 280، ويُحـــسب تركيـــز البروتين في المحلول (مغ/مل) وفق المعادلة الآتية:

$$\text{تركيز البروتين (مغ/مل)} = \frac{\text{الامتصاص عند الطول الموجي 235} - \text{الامتصاص عند الطول الموجي 280}}{2.51}$$

أضيف 3 مل من محلول 5% حامض الخل ثلاثي الكلـــور (Trichloroacetic acid) المحضّر بإذابة 5 غرامات من حامض الخل ثلاثي الكلور في 100 مل ماءً مقطراً إلـــى 2 مل من محلول المستخلص الأنزيمي، وتم النبذ المركزي بـــسرعة 3000xg مـــدة 20 دقيقة ثم أهمل الرائق وأذيب الراسب بكمية معلومة 2 مل من محلول 0.05 مولار ماءات الصوديوم، والذي حضَر بإذابة 2 غ ماءات الصوديوم في 100 مل ماءً مقطـــراً، وبعـــد المزج الجيد تمت قراءة الامتصاص عند الطول الموجي 235 و280 ضد عينـــة الـــشاهد محلول ماءات الصوديوم.

النتائـــج والمناقشـــة

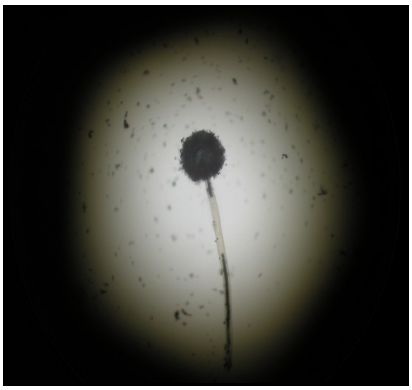
1- تحديد هوية العزلة الفطرية:

يبيّن الشكل (1 - أ، ب) الصفات الشكلية لمستعمرة الفطـــر *Aspergillus niger* SS4 الذي حُددت هويته بمتحف التأريخ الطبيعي بباريس فرنسا وكذا شكل الحامل الكونيدي للفطر تحت المجهر الضوئي، وتتفق الصفات المظهرية والمجهرية للفطر قيد الدراسة مع ما جاء في أطلس تصنيف الفطريات لـــ Watanab,(2002) والمفاتيح التـــصنيفية التـــي ذكرها Samson *et al*.,(1995) ومع المواصفات الشكلية التـــي أوردهـــا Jernejc and Cimerman,(2001) في دراستهما للصفات المورفولوجية للأنواع الفطرية التابعة للجنس *Aspergillus* .

وقد أستخدم العديد من الباحثين النوع الفطري *Aspergillus niger* تحديداً في العديـــد من الدراسات لإنتاج المركبات الحيوية المختلفة كالأنزيمات وغيرها من المركبات، فقـــد اعتمد Ghasemi *et al*.,(2004) هذا النوع من الفطريات في إنتاج أنزيم اليورياز، كمـــا استخدم النوع ذاته وإن اختلفت السلالة من قبل Paclinger *et al*.,(2005) في دراســـتهم لإنتاج أنزيم الغلوكوأميلاز .

وتعدُّ التربة الخصبة أحد أهم المصادر الرئيسية لأنواع الجنس الفطري *Aspergillus* وقد توافق مصدر العزلة الفطرية قيد الدراسة واستخدامها مع العديد من الدراسات ومنها دراسات كل من Oliveira,(2001) و Omemu *et al.*,(2005) الذين استخدموا الفطر *Aspergillus niger* لإنتاج أنزيمي الغلوكوأميلاز والأميلاز على التوالي.

(أ) مستعمرة الفطر النامية على وسط (PDA)



(ب) الحامل الكونيدي للفطر النامي على وسط (MEA) تحت المجهر الضوئي

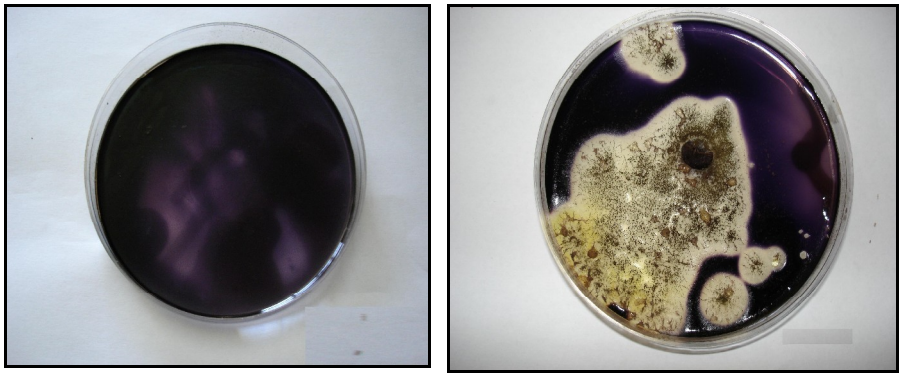
الشكل (1) الصفات المظهرية والمورفولوجية للفطر *Aspergillus niger* SS4

2 - فحص القدرة التحليلية للسلالة الفطرية على الوسط الصلب:

أبدت السلالة الفطرية ***Aspergillus niger*** SS4 قدرة تحليلية عالية للوسط الصلب (Starch agar) كما هو واضح في الشكل (2 - أ، ب) ومن خلال المقارنة بعينة الشاهد الطبق الحاوي على الوسط ذاته والمعامل بظروف التجربة نفسها عدا تلقيحه بالعزلة الفطرية قيد الدراسة، والقدرة التحليلية للفطر على الوسط الصلب تعكس قدرته على إنتاج أنزيم الأميلاز باستخدام طريقة المزارع المغمورة (الغاطسة) Submerged method، وقد اعتمد Cherry *et al.*,(2004) طريقة الفحص الأولي لقدرة الفطر *Aspergillus fumigatus* على تحليل الوسط الصلب قبل استخدامه لإنتاج أنزيم الغلوكواميلاز بواسطة المزارع المغمورة، واستخدم Zuccaro *et al.*, (2004) الأسلوب ذاته لفحص قدرة أنواع عديدة تابعة لبعض الأجناس الفطرية على إنتاج أنزيم الأميلاز إضافة إلى أنزيمات أخرى دُرست بالطريقة ذاتها.

وقد توافقت نتيجة هذا الاختبار مع ما توصل إليه Alves *et al.*, (2002) في دراستهم لقدرة بعض أنواع الجنس الفطري *Mucor* على إنتاج أنزيمات الأميلاز بالإضافة إلى أنزيمات الليباز والبروتياز على الأوساط الصلبة، وتوافقت النتيجة كذلك مع ما خلص إليه Topal *et al.*, (2000) من قدرة بعض العزلات الفطرية على إنتاج بعض الأنزيمات

الصناعية المهمة المتضمنة لأنزيمات الأميلاز على الأوساط الصلبة، وإن كان البـــاحثون في الدراستين السابقتين قد اعتمدوا قياس مساحة الهالات الشفافة كانعكاس لقدرة الفطـــور التحليلية لغرض المقارنة بين أنزيم وآخر، أو لمفاضلة القدرة التحليلية والإنتاج الأنزيمـــي بين فطر وآخر.



(أ) الهالة الشفافة المحيطة بنمو الفطر (ب) طبق الشاهد غير الملقح بالفـــــطر

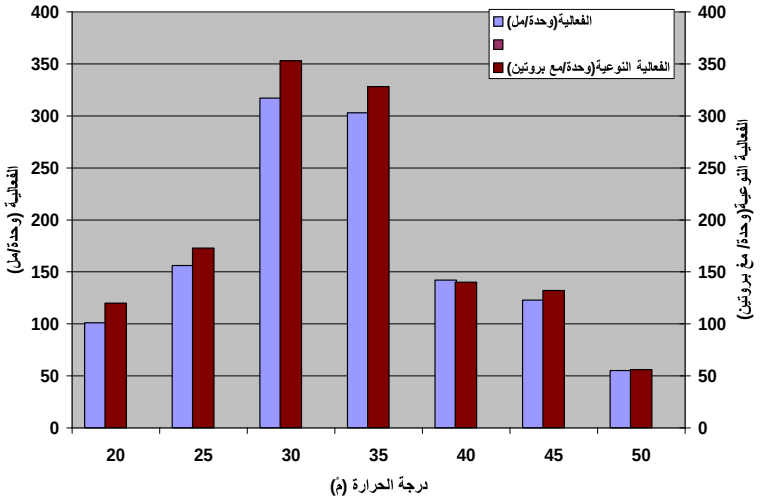
الشكل (2) القدرة التحليلية للفطر *A.niger* SS4 على الوسط الصلب (Starch agar)

3- تأثير درجة الحرارة في إنتاج أنزيم الأميلاز:

تشير النتائج المبينة في الشكل (3) إلى ازدياد الفعالية النوعية لأنزيم الأمـــيلاز فـــي وسط الإنتاج مقابل زيادة درجة الحرارة حتى الدرجة 30°م وهي الدرجة الحرارية المثلى للإنتاج على اعتبار أن ارتفاع درجة حرارة الحضانة لإنتاج الأنزيم عن 30°م قد رافقهـــا انخفاض تدريجي في الفعالية النوعية للأنزيم، وهذا يعكس ما ذكره السواح (2002) بـــأن درجة الحرارة تؤثر بشكل مباشر في معدلات كـــل مـــن النمـــو الميكروبـــي والتخليـــق الأنزيمي، وإن ارتفاع درجة الحرارة عن حدها الأمثل لتخليق الأنزيم قد يؤثر ســـلباً فـــي الإنتاج ومن ثم في الفعالية المطلوبة للأنزيم المنتج.

وتتوافق درجة الحرارة المثلى لإنتاج أنزيم الأميلاز من الفطر *Aspergillus niger* SS4 في هذه الدراسة مع ما جاء في دراسة Moreira *et al.*,(1999) من انخفاض فـــي الفعاليـــة الأنزيمية لأنزيمي الغلوكو أميلا والألفا أميلاز بعـــد درجـــة حـــرارة 30°م. التـــي رافـــق استخدامها ضمن درجات حرارية أخرى ودراسة تأثيرها في إنتاج الأنزيمين المذكورين من الفطر *Aspergillus niger*. والدرجة ذاتها كانت أفضل الـــدرجات الحراريـــة المدروســـة لإنتاج أنزيم الغلوكواميلاز مـــن الفطـــر *Aspergillus niger* فـــي دراســـة Cornett *et al.*,(2003)، كما توافقت درجة الحرارة المثلى لإنتاج أنزيم الأميلاز في هذه الدراســـة مـــع

الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج أنزيم الأميلاز المنتج من خميرة *Shwanniomyces occidentalis* في دراسة Fossi *et al.*, (2005) الذين اختبروا درجات حرارية تراوحت بين 20 60ْم وكانت درجة 30 ْم أفضلها تأثيراً في إنتاج أنزيم الأميلاز.



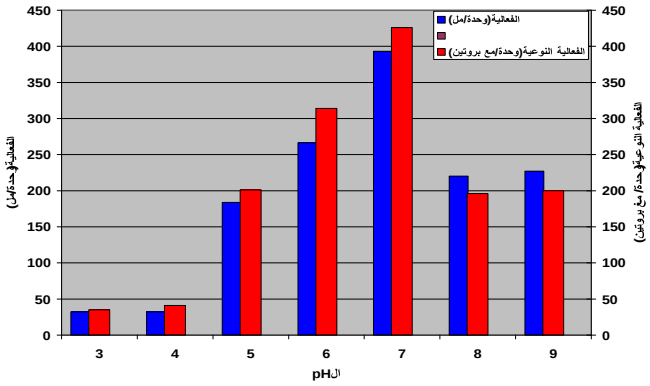
الشكل(3) تأثير درجات الحرارة المختلفة في إنتاج أنزيم الأميلاز من الفطر *Aspergillus niger* SS4

4 ــ تأثير الـــPh في إنتاج أنزيم الأميلاز:

تعدُّ الأنزيمات ذات حساسية عالية للتغير في قيم الـــpH، إضافة إلى أن تعيين الـــpH الأمثـــل لإنتـــاج أنزيمـــات الأمـــيلاز خطـــوة مهمـــة فـــي عمليـــة الإنتـــاج (McMahon *et al.*,1999). وفي الدراسة الحالية تحققت أعلى فعالية نوعية لأنزيم الأميلاز عند pH 7 فيما انخفضت الفعالية وكما مبيّن في الشكل (4) عند استخدام قيم أعلى للـــpH التي درس تأثيرها في إنتاجيـــة أنزيم الأميـــلاز من الفطر قيد الدراســـة وقد توافقت هـــذه النتيجة مع ما حصل عليه Heui *et al.*, (1987) من فعالية أنزيميـــة قـــصوى مـــع pH 7 مقارنة مع القيم الأخرى المستخدمة في دراستهم لإنتاج أنزيم ألفا أمـــيلاز مـــن خميـــرة *Streptomyces* sp. HA-40 .

وتحصل Gigras *et al.*,(2002) على أقصى فعالية باستخدام pH 7.5 لوســـط إنتـــاج أنزيم الأميلاز من الفطر *Aspergillus oryzae*، وهذا يقارب النتيجة التي توصلنا لها في هذه الدراسة والتي وافقت رقم الـــpH الابتدائي لوسط إنتاج أنزيم الغلوكوأميلاز من الفطر *Aspergillus fumigatus* في دراسة Cherry *et al.*,(2004) الذين استخدموا مدى للـــpH تراوح بين 5 إلى 8 لدراسة تأثيرها في إنتاج الأنزيم.

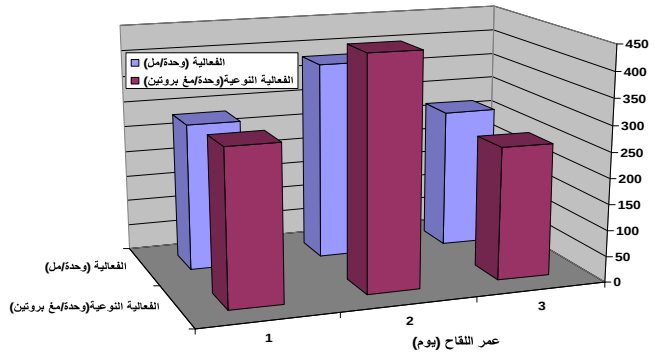
كما وافقت نتيجة هذه الدراسة ما تحصل عليه Tsao *et al.*,(2004) من أفضلية لفعالية أنزيم الأميلاز المنتج من الفطر *Meretrix lusoria* عند pH 7 بالمقارنة مع القيم الأخرى المستخدمة في دراستهم.



الشكل (4) تأثير درجات الـــpH المختلفة في إنتاج الأميلاز من الفطر *Aspergillus niger* SS4.

5 - تأثير عمر اللقاح وحجمه في إنتاج أنزيم الأميلاز

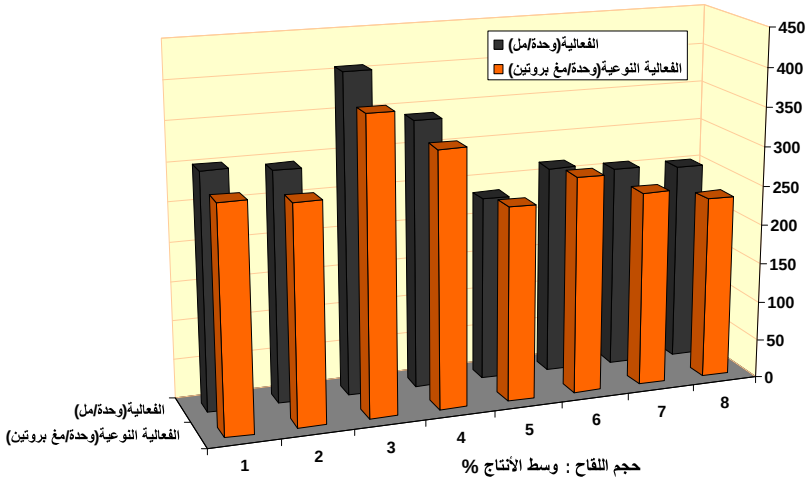
سجلت الدراسة الحالية أعلى فعالية نوعية أنزيمية مرافقة لإنتاج أنزيم الأميلاز باستخدام فطر *Aspergillus niger* SS4 المنمى على وسط النمو الموضح في (4) من مواد البحث وطرائقه بعمر يومين كما هو مبين في الشكل (5) مقارنة مع المدد الزمنية الأخرى المستخدمة لتنمية اللقاح وتحضيره، إضافة إلى أن الفعالية النوعية وكما مبين في الشكل (6) بلغت أقصاها باستخدام حجم من اللقاح ذاته وصلت إلى 3% من حجم وسط الإنتاج (حجم: حجم) وبتركيز 4×10^5 بوغ/ مل، والنتائج المتحصل عليها للعاملين (عمر اللقاح وحجمه) وتأثيرهما في إنتاج الأنزيم في هذه الدراسة تتوافق إلى حد كبير مع العديد من الدراسات السابقة، فقد تحصل Nguyen *et al.*,(2000) على أعلى فعالية لأنزيمي الألفا أميلاز والغلوكوأميلاز باستخدام لقاح من الفطر *Thermomyces lanuginosus* ATCC – 34626 بعمر 48 ساعة (يومان) وبحجم 5% من حجم وسط الإنتاج.



الشكل (5) تأثير عمر اللقاح في إنتاج أنزيم الأميلاز من الفطر *A. niger* SS4

كما توصّل Ang *et al.*,(2002) إلى الفعالية القصوى لأنزيمي الألفا أميلاز والغلوكواميلاز باستخدام 2% من لقاح خميرتي *Saccharomyces cerevisia* YKU 131 و *S. cerevisia* YKU 107 لإنتاج الأنزيمين المذكورين على التوالي.

وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما وصل إليه Haq *et al.*, (2002) من نتيجة للفعالية القصوى المرافقة لاستخدام لقاح من الفطر *Aspergillus niger* وبحجم 2.5% من حجم وسط إنتاج أنزيم الألفا أميلاز وبتركيز وصل إلى 2.6×10^6 بوغ/مل، كما كانت أفضل فعالية أنزيمية لأنزيم الغلوكوأميلاز عند استخدام لقاح من الفطر *Thermomucor Indicae – seudaticae* بتركيز 5×10^6 وبعمر 3 أيام في الدراسة التي قام بها Kaur and Satyanarayana,(2004)، والتباين الطفيف بين نتائج الدراسات السابقة والدراسة الحالية عن تأثير عمر اللقاح وحجمه المستخدمين في إنتاج أنزيمات الأميلاز المختلفة قد يعود إلى اختلاف الأنواع الفطرية ومصادرها وظروف نموها في كل دراسة من الدراسات.

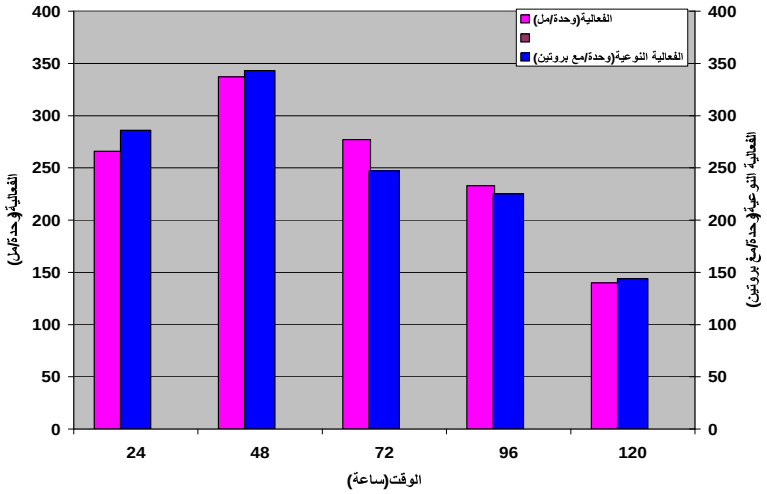


الشكل (6) تأثير حجم اللقاح في إنتاج أنزيم الأميلاز من الفطر *A. niger* SS4

6- تأثير فترة الحضانة في إنتاج أنزيم الأميلاز

رافق استخدام فترة حضانة (تخمّر) 48 ساعة لإنتاج أنزيم الأميلاز في هذه الدراسة الحصول على أقصى فعالية نوعية للأنزيم المنتج من العزلة قيد الدراسة كما مبيّن في الشكل (7)، وتتفق فترة الحضانة المثلى في دراستنا مع ما توصل إليه Moreira *et al.*, (2001) من فعالية أنزيمية قصوى رافقت فترة 48 ساعة من التخمير لوسط إنتاج أنزيم الأميلاز من الفطر *Aspergillus tamarii*، كما أعطت فترة يومين (48 ساعة) أفضل فعالية أنزيمية من بين فترات الحضانة المدروسة الأخرى والتي وصلت إلى 6 أيام في دراسة Nahas and Waldemarin, (2002) عن التحكم في إنتاج أنزيم الأميلاز من الفطر *Aspergillus ochraceus*.

حصل Nandakumar *et al.*,(1999) على أقصى فعالية أنزيمية لأنزيم الألفا أميلاز المنتج من الفطر *Trichoderma harizianum* تحصل De Marco *et al.*, (2003) على أقصى فعالية أنزيمية للأنزيم المنتج، وهذا يعكس تقارب نتائج الباحثين في الدراسات المذكورة مع ما خلصت إليه نتائج هذه الدراسة.



الشكل (7) تأثير فترة الحضانة (التخمّر) في إنتاج أنزيم الأميلاز من الفطر *Aspergillus niger* SS4

REFERENCES المراجـــع

الراوي، أكرم ثابت؛ الباقر، علاء يحيى؛ يحيى، عبد الغني إبـــراهيم. (2002). إنتـــاج الأميليـــزات مـــن الفطر Aspergillus ornatus Group المتحملة لدرجات الحرارة العالية بواســـطة تخمـــرات الحالـــة الصلبة . 1- عزل الفطر المنتج لأنزيم الأميلاز وتعيين الظروف المثلـــى للإنتـــاج. مجلـــة الزراعـــة العراقية. مجلد 7 عدد(7) : 186 195 .

السواح، محمود محمد عوض الله. (2002). الأنزيمات الميكروبية دار النيل للطباعة الطبعة الأولى.

Alves, M., Takaki, G., Porto, A., Milanz, A. (2002). Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. Braz. J. Microbiology. 33(4): 81 – 86.

Ang, D., Abd –Aziz, S., Yosof, H., Karim, M., Arif, A., Uchiyama, K., Shioya, S. (2001). Partial purification and characterization of Amylolytic enzymes obtained from direct fermentation of sago starch to ethanol by recombinant yeast. Pakistan Journal of Biological Sciences 4(3): 266 – 270.

Ashie, I. N. (2003). Bioprocess Engineering of Enzymes. Food Technolo. Feature. 57 (1) : 44 – 51.

Beuchat, L. R. (1992). Enumeration of fungi in grain flours and meals as influenced by setting in diluent and by the recovery medium J. Food Protc. (55): 99-901.

Cherry, H., M. D. Towhid, H., Anwar, M. (2004). Extracellular glucoamylase from the isolate *Aspergillus fumigatus*. Pakistan Journal of Biological Scinces. 7(11) : 1988 – 1992.

Cornett, C., Fang, T., Reilly, P., Ford, C. (2003). Starch–binding domain shuffling In *Aspergillus niger* glucoamylase. Protein Engineering 16 (7)521-529.

De Marco, J., Lnglis, M., Felix, C. (2003). Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderm* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis perniciosa*, the causal agent of withes broom of cocoa. Brazililan Journal of Microbiolog (34): 33 -38.

De Souza, D., and Peralta, R. (2001). Production of amylases by *Asprgillus tamari* in solid state fermentation at high initial glucose concentration. Marina. 23 (2): 599 – 602.

Fossi, B., Tavea, F., Ndjouenkeu, R. (2005). Production and partial characterization of a thermostable amylase from ascomycetes yeast strain isolated from starchy soils. African Journal of Biotechnology 4 (1): 14 – 18.

Ghasemi, M., Bakhtiari, M., Fallahpour, M., Noohi, A., Moazami, N., Amidi, Z. (2004). Screening of Urease Production by *Aspergillus niger* Strains. Iranian Biomedical Journal 8(1) : 47 – 50.

Gigras, P., Sahai, V., Gupta, R. (2002). Statical Media Optimization and Production of α– Amylase from *Aspergillus oryzae* in a Bioreactor. Current Microbiology. 45(3): 203 – 208.

Haq, I., Abdullah,R., Ashraf, H., Shah, A.(2002). Isolation and Screening Scientific Information. BiotechnologyVol. 1 Number (2 -4): 61 – 66.

Heui, Y., Kwon, T., Chung, H. (1987). Production and partial purification of thermostable α– amylase from *Streptomyces* sp.HA-40 Kor. Jou. Appl. Microbiol. Bioen. 15(3) : 190 – 195.

Jernejc, K. and Cimerman, A. (2001). Morpholgical characteristics, extracellular and intracellular protein and enzyme patterns of five *Aspergillus* sp. Food Technol. Biotechnol.39(4):333-340.

Kaur, P., and Satyanarayana, T. (2004). Production and starch Saccharification by a Thermostable and Neutral Glucoamylase of a Thermophilic Mould *Thermomucor indicae–seudaticae*. World J. of Microb. and Biotech. 20 (4): 419 – 425.

Malvessi, E. and Silveira, M. (2004). Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. Brazilian Archives of Biology and Technology 47(5): 693 – 702.

Mc Mahon, E., Kelly, C., Fogarty, W. (1999). High maltose producing amylolytic system of *Sreptomyces* spp. Biotechnology Letters, (21): 23–26.

Miller, G. L. (1959). Use of di nitro salicylic acid resgent for determintation of reducing sugars Analytical. Biochem. (72): 348 – 254.

Moreira, F., Veridiana, L., Cristina,G., Edivan,P., Rosana,M. (2001).The use of α–Methy-l-D-glucoside, a synthetic analogue of maltos as inducer of amylase by *Aspergillus* spp. In solid–state and submerged fermentations. Brazilian Journal of Microbiology (32): 15 – 19.

Moreira, F., Lima, F, Pedrinho, S., Lenartovicz,V., Souza, C., Peralta, M. (1999). Production of amylases by *Aspergillus tamari*. Revista Microbiolgia Print ISSN 0001 –(3714) : 1-9.

Nahas; E., and Waldemarin, M. (2002). Control of amylase production and growth characteristics of *Aspergillns ochraceus*.Rev. Microbiologia. Vol.44(1):5-10.

Nandakumar, M., Thakur, M., Raghavarago, K., Ghilyal, N. (1999). Studies on catabolite repession in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases. Letters in Applied Microbiology. (29): 380 -384.

Nguyen, Q., Szabo, J., Hoscke, A. (2000). Optimisation of composition of media for the production of amylolitic enzymes by *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626. Food Technol. Biotecnol. 38 (3): 229 – 234.

Novo Nordisk, A/S. (2004). Enzymes at work . Bagsvaerd, Denmark.

Oliveira; M. (2001). Production of fungal protein by solid substrate fermentation of cactus *Cereus peruvianus* and ficus indica.Quim Nova. 24(3)307- 310.

Omemu, A., Akpan, I., Bankole, M., Teniola,O. (2005). Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of *Aspergillus niger* AM 07 isolated from the soil. frican Journal of Biotechnology 4(1) :19 – 25 .

Pachlinger, R., Mitterbauer, R., Adam, G., Strauss, J. (2005). Metabolically independent and accurately adjustable *Aspergillus* sp. expression system. Applied and Environmental Microbiology 71(2): 672 – 678.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C., Singh, D., mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. Biotechnol.Appl. Biochem. (31):135-152.

Ramachandran, S., Patel, A., Nampoothiri, K., Chandran, S., Szakacs, G., Soccol, C., Pandey, A. (2004). Alpha amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its properties. Brazilian Archives of Biology and Tecnology 47(2): 1-9.

Samson, R., Hoekstra, E., Frisvad, J. and Filten borg, O. eds. (1995) Introduction to food born fungi 4th ed. Bearn Netherlands :Centraabreau Voor Schimmelcultures.

Santamaria; R., Rio, G., Rodriguez, S. , Soberion, X., Munguia, A.(1999). Alcoholysis reactions from starch with alpha – amylases. FEBS Letters (452) 346 - 350.

Shigechi, H., Koh, J., Fujita, Y., Matsumoto, T., Bito, Y., Ueda, M., Satoh E., Fukuda, H., Kondo,A. (2004). Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation of a novel surface engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and – amylase Amercan Socity for Microbiology Appl. Enviro. Microbiol. 70(8): 5037 – 5040.

Topal, S., Pembecl, C., Borcakli, M. (2000). Investigation of Selected Industrially Important Enzymes Activities of Turkish Agricultural Mycoflora: Amylase, Lipase, Protease. Turk. J. Biol. (24): 79 – 93 .

Tsao, C., Hsu, Y., Chao, L., Jiang, S. (2004). Purification and characterization of three amylases from viscera of hard clam *Meretrix lusoria* . Fisheries Science. 70 (1): 174 – 182.

Watanab, T. (2002). Pictorial Atlas of soil and feed fungi, morphology of cultured fungi and key to species. Second Edition CRC Press. London.

Whitaker, J. (1970). Protease of endothia parasitica. In: Pertman, G and L. (Eds). Method in Enzymology. Academic Press. New York. P 437.

Whitaker, J. and Granum, P. (1980). An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. Anal. Biochm. (109): 156 – 159.

Yang, S., and Wang, J. (1999). Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid state cultivation. Bot. Bull. Acad. Sin (40): 259 – 265.

Zuccaro, A., Summerbell, C., Gams, W., Schroers, H., Mitchell, J. (2004). A new acremoonium species associated with *Fucus* spp., and its affinity with a phylogenetically distinct marine *Emericellopsis* calade. Studies in Mycology (50): 283 – 297.

Received	2005/08/02	إيداع البحث
Accepted for Publ.	2005/12/21	قبول البحث للنشر