

إنتاج الأنزيمات البكتينية من فطر *Aspergillus* بطريقة تخمير الوسط السائل وتحديد الظروف المثلى للإنتاج

رشا طاووز*⁽¹⁾ وأديب فالح⁽¹⁾ وفاتح خطيب⁽²⁾ ومحمد العظم⁽³⁾

(1). قسم علوم الأغذية ، كلية الزراعة، جامعة حلب، سورية.

(2). قسم وقاية النبات ، كلية الزراعة، جامعة حلب، سورية.

(3). قسم تقانات الهندسة الغذائية، كلية الهندسة التقنية، جامعة حلب، سورية.

(*للمراسلة: الباحثة رشا طاووز. البريد الإلكتروني: rashat.310@gmail.com).

تاريخ القبول: 2020/10/15

تاريخ الاستلام: 2020/8/25

الملخص

اختيرت عشرين عزلة فطرية تتبع جنس *Aspergillus* من أربع وستين عينة من ثمار الفاكهة والخضار، وانتخبت أفضل العزلات من حيث إنتاجها للإنزيمات البكتينية على الوسط الصلب plate assay method حيث تم العمل في مخبر قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة جامعة حلب للعام الدراسي 2018-2019، اختيرت الخمس عزلات الأقوى من بينها لإنتاج الأنزيمات البكتينية باستخدام نظام تخمير الوسط الصلب Solid state fermentation وذلك بهدف معرفة إمكانية العزلات المنتخبة على إنتاج الأنزيمات البكتينية وتحديد العزلة الأكثر إنتاجاً لتلك الأنزيمات، إضافة إلى أمثلة إنتاج الأنزيمات من تلك العزلة من حيث درجة حرارة التحضين، مدة التحضين، درجة pH الوسط الابتدائي، تركيز البكتين في وسط التخمر، تركيز المعلق الفطري من الأبواغ، حجم اللقاح الفطري، وكانت أربع عزلات من نوع *A. niger* وواحدة من نوع *A. fumigatus*. وقد استخدمت قشور البرتقال في عملية التخمر كمصدر للبكتين بعد أن تم حسابه فيها وكان 5%، كما تبين أن فعالية الأنزيمات البكتينية المنتجة من العزلات المأخوذة من ثمار الحمضيات أعلى بالمقارنة مع باقي العزلات وقد وصلت الفعالية إلى 51، 52 U/ml، كما تبين من الدراسة المتبعة لأمثلة إنتاج هذه الأنزيمات أنه يمكن الحصول على أعلى فعالية أنزيمية عند درجة حرارة تحضين 40°C، ومدة تحضين 96 ساعة، ودرجة pH في الوسط الابتدائي 4.5، وعند استخدام 2.5 % من البكتين في الوسط وتركيز المعلق الفطري من الأبواغ 10⁷ بوغة/مل، وحجم لقاح (معلق فطري) 2 مل.

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus*، فعالية أنزيمية، تخمير، الأنزيمات البكتينية، أمثلة الإنتاج، بكتين.

المقدمة:

تشكل الأنزيمات البكتينية والتي تدعى إنزيمات البكتيناز Pectinases 25% تقريباً من إجمالي المستحضرات الأنزيمية المحضرة تجارياً في العالم، وهي الأنزيمات التي تحفز تحطيم البكتين والذي يشكل الجزء الرئيسي من الجدر الخلوية للنبات ويربط الخلايا مع

بعضها البعض (Khatiri *et al.*, 2015)، تضم إنزيمات البكتيناز عدة إنزيمات وهي (Pectinmethyle esterase و Pectinesterase و Pectinlyase و Pectate lyase و exo - Polygalacturonase و endo- Polygalacturonase (فالح، 2012، 2014، George)، يلعب كل منها دور معين فعندما تهاجم هذه الأنزيمات جزيء البكتين يتم العمل عليه من عدة جوانب، حيث يعمل إنزيم Polygalacturonase على تحفيز حلمة الرابطة الغليكوزيدية بين وحدتي حمض الغالاكتورونيك، بينما تقوم إنزيمات Pectinlyase بكسر الرابطة الغليكوزيدية ولكن بطريقة النزع (Elimination)، أما إنزيم Pectinesterase فيحفز نزع مجموعة الميثيل من وحدات البكتين (فالح، 2012، Doughari, *et al.* 2019)، كما يعد وجود إنزيم Polygalacturonase هاماً لنضج ثمار بعض أنواع الفاكهة والخضار لأنه يساعد في تطرية الثمار لتصبح صالحة للأكل مثل البندورة (Helga *et al.*, 2014) وتعد عملية إنتاج هذه الفطور للإنزيمات غاية في الأهمية على المستوى الاقتصادي، لأنها تستطيع النمو على أوساط رخيصة الثمن وتحولها إلى مواد ذات قيمة عالية، تدخل إنزيمات البكتين في العديد من التطبيقات الصناعية سواء أكانت غذائية أم غير غذائية إذ تستعمل في إزالة المواد الصمغية من ألياف القشور النباتية قبل استخدامها في صنع الأنسجة من خلال إنزيمات البكتيناز مع إنزيم Xylanase كما في القنب (Kiran, 2007)، كما تضاف لأغذية الماشية والدواجن لتساعد على الهضم وتسمح لها بتناول علف أو أطعمة غير معالجة بشكل كبير وبالتالي تصبح تكلفتها أقل (Thomas *et al.*, 2000)، كذلك تستعمل كمادة مساعدة في استخلاص الزيوت وذلك من خلال تهتك النسيج النباتية لزيادة كفاءة الضغط على الثمار لاستخلاص الزيت (Helga *et al.*, 2014)، كما تم استخدام الأنزيمات البكتينية في صناعة منتجات التخمر كإنتاج البيرة والنبيذ منذ عام 1960، حيث أن دور هذه الأنزيمات في مثل هذه الصناعات يكون مضاعفاً فهي تساعد أولاً على تحطيم الجدر الخلوية أثناء هرس الثمار وبالتالي زيادة الإنتاجية كما تساعد على استخلاص النكهة من المالت أو الهريس، وثانياً تعيد في ترويق هذه المنتجات من العكارة وإزالة اللون القاتم وإعطاء منتج رائق وشفاف (Cao *et al.*, 1992)، ولعل أكبر تطبيق للإنزيمات البكتينية هو استخلاص وترويق عصائر الفاكهة حيث يساهم البكتين في تعزيز وزيادة لزوجة عصائر الفاكهة لذا يتم استخدام الأنزيمات المحللة للبكتين والأميلاز لتصفية ذلك العصير المعكر حيث تقوم هذه الأنزيمات بتحطيم بنية البكتين الأمر الذي يساهم في ترويق عصائر الفاكهة (Cao *et al.*, 1992)، Tankano, 2014)، وتجدر الإشارة إلى أن هناك طرائق حديثة في تصنيع العصائر تعتمد على إضافة الأنزيمات المحللة للبكتين أثناء مرحلة هرس الثمار إذ يزيد ذلك من مردود العصير بنسبة تصل إلى 20% و يحسن الإنتاجية كماً ونوعاً (الوزير، 2008). وعلى الرغم من إمكانية إنتاج هذه الأنزيمات من أنواع عديدة من الكائنات الحية الدقيقة إلا أن الدراسات التي أجريت على إنتاج الأنزيمات البكتينية من الكائنات الحية الدقيقة بأنواعها المختلفة أظهرت أن أفضل مصدراً لإنتاج هذه الأنزيمات هي فطور جنس *Aspergillus* وعلى وجه الخصوص فطر *Aspergillus niger* وذلك بسبب قدرة هذا الفطر على إنتاج كميات كبيرة من الإنزيم من جهة ومن جهة أخرى بسبب إمكانية استخدام المستخلص الأنزيمي الناتج عن هذا الفطر بشكل آمن في الصناعات الغذائية والصناعات الأخرى أيضاً لأن هذا الفطر GRAS (Generally recognized as safe) وهذا يعني أن هذا الفطر ومنتجاته معترف بها من قبل منظمة الدواء والغذاء (FDA) على أنها آمنة الاستخدام في العديد من الصناعات (Patil & Dayanand, 2006، Sarnraj *et al.*, 2012).

وقد أثبت Benoit عام 2012 وزملائه إمكانية استخلاص إنزيمات البكتيناز من *A. niger* و *A. oryzae* بطريقة التخمير الصلب وقد أكدوا على قدرة هذه الأنواع على إنتاج الأنزيمات المحللة للبكتين بكميات كبيرة بفعالية عالية في الوسط الحامضي عند pH 3 (Benoit et al., 2012).

كذلك درس Maldona و Strasser عام 2008 إنتاج إنزيم Pectinesterase و Polygalacturonase من فطور *Aspergillus niger* باستخدام أنظمة التخمير المختلفة وكانت النتائج جيدة مع اختلاف معدل الإنتاج بين أنظمة التخمير المدروسة (Maldona & Strasser, 2008).

وفي دراسة أجراها (Khatri et al., 2015) تبين إمكانية نشاط الأنزيمات البكتينية في الوسط القلوي حيث تم الحصول على أعلى فعالية أنزيمية عند pH 8.2، كما أظهرت هذه الدراسة ثباتية الأنزيمات البكتينية تجاه الحرارة فقد حافظت هذه الأنزيمات على فعاليتها الكاملة حتى درجة حرارة 70°C وقد حافظ على 82% من فعاليته عند حرارة 100°C.

في حين أنتج (Jayani et al., 2005) هذه الأنزيمات من فطر *Rhizopus stolonifer* وفطر *oxysporium Fusarium*، وقد أبدت الأنزيمات المنتجة فعالية مثلى في الوسط الحامضي في مجال pH بين 3 و 6.

بينما درس Marcia وزملائه عام 1999 إنتاج أنزيم Polygalacturonase من جراثيم *Bacillus. sp* باستعمال تقنيات التخمير الصلب والسائل، وبوجود بكتين البريتقال كمصدر وحيد للكربون، وقد أظهرت النتائج قدرة هذه السلالات على إنتاج الأنزيم المدروس وبكمية كبيرة، ولدى دراسة شروط عمله المثلى تبين بأن نشاطه الأعظمي يكون عند درجة حرارة 50°C - 55°C مئوية و pH تتراوح بين 6-7 (Marcia et al., 1999).

نظراً لقدرة أنواع فطر الجنس *Aspergillus* العالية على إفراز إنزيمات البكتيناز ذات الدور الهام في العديد من الصناعات الغذائية، علاوة على إنتاج هذه الأنزيمات من مواد رخيصة الثمن، وبالتالي تحويل المواد ذات القيمة الغذائية المنخفضة إلى مواد حيوية هامة، جاءت أهمية البحث وذلك لتسليط الضوء على إنتاج هذه الأنزيمات من مصدر حيوي وهي فطور جنس *Aspergillus* معزولة من مصادر طبيعية وبتكلفة منخفضة. يهدف البحث إلى:

1- إنتاج الأنزيمات البكتينية بطريقة تخمير الوسط السائل من عزلات فطرية لها القدرة على إنتاج هذه الأنزيمات.

2- دراسة الظروف المثلى لإنتاج الأنزيمات البكتينية.

مواد البحث وطرائقه:

1.2. مواد البحث:

- البكتين المخبري.

- عزلات من بعض أنواع فطور *Aspergillus* المعزولة مسبقاً من بعض أنواع الفاكهة (برتقال، ليمون، تفاح، دراق، خوخ).

2.2. طرائق البحث:

بعد ان تم عزل 20 عذلة فطرية من جنس *Aspergillus* أبدت 13 عذلة منها قدرتها على إفراز الأنزيمات البكتينية على الوسط الصلب والذي تكون من وسط Czapek Dox Agar مع إضافة البكتين كمصدر للكربون، ولكن تميزت خمس عزلات منها بقدرتها

العالية على إفراس الأنزيمات البكتينية، وهذا ما تم نشره في بحث سابق، وقد أخذت العزلات الخمس السابقة الذكر وتم تنفيذ هذا البحث عليها كما هو موضح بالمراحل التالية:

1.2.2. تحضير الوسط السائل:

تم تحضير وسط النمو السائل المناسب لتنمية فطور *Aspergillus* ووضعه في دوارق سعة 100 مل ليستعمل في عملية التخمر وإنتاج الأنزيمات البكتينية ويتكون هذا الوسط من: 1% بكتين مخبري، 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ كبريتات الأمونيوم الثنائية، 0.6% K_2HPO_4 فوسفات البوتاسيوم الثنائية، 0.2% KH_2PO_4 فوسفات البوتاسيوم الأحادية، 0.2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ كبريتات المغنيزيوم، ثم ضبطت درجة pH الوسط عند 6.0، وعقم الوسط في الأوتوغلاف عند درجة حرارة 121°C لمدة 20 دقيقة.

2.2.2. تحضير المعلق الفطري: تم تحضير المعلق الفطري من العزلات الفطرية الخمس ذات الإنتاج الأعلى للإنزيمات البكتينية بتركيز $(10^7 \times 1)$ بوغة/مل باستخدام شريحة Hymocetometer، وأضيف لها بضع نقاط من مادة Tween 20، ومن الجدير بالذكر أن هذه العزلات كانت تنتمي إلى نوعي *A. fumigatus*، *A. niger*.

3.2.2. تلقيح الوسط: لقم الوسط السائل المعقم بـ 3 مل من المعلق الفطري السابقة.

4.2.2. تحضين الوسط الملقح: حضنت الدوارق الحاوية على الوسط السائل الملقح عند درجة حرارة 30° لمدة 96 ساعة.

5.2.2. تحضير الإنزيم الخام: بعد انتهاء مدة التخمر (التحضين) تم إضافة 25 مل من الماء المقطر المعقم لكل دورق على حدى، وضعت جميع الدوارق في حاضنة متحركة (هزازة) بسرعة 150 rpm بدرجة حرارة 30° مدة ساعة، رشح الناتج بورق ترشيح (Wattman 1) وذلك لفصل الكتلة الحيوية النامية، بعد ذلك تم الحصول على الإنزيم بتثقيف الرشاحة بسرعة 10000 rpm مدة 10 دقائق عند درجة حرارة 4°C ، وأطلق عليه اسم المستخلص الأنزيمي الخام الذي أجريت عليه الدراسة لاحقاً (Tariq and Latif, 2012).

6.2.2. قياس الفعالية الأنزيمية: اعتمدت طريقة ثنائي نيترو حمض الساليسيليك (DNS) لتقدير فعالية الإنزيم (المستخلص الأنزيمي الخام) من خلال قياس كمية السكر المرجع الناتج عن تفكيك الإنزيم للركيزة، حيث حضر مزيج التفاعل من 0.5 مل ركيزة (بكتين 1%) و 0.5 مل من المستخلص الأنزيمي الخام، وحضن مزيج التفاعل عند درجة حرارة 40°C مدة عشر دقائق، وقيست الامتصاصية عند طول موجة 570 نانومتر الذي يكون عنده امتصاص الضوء أعظمياً من قبل المعقد الناتج عن كل من السكر المرجع ودي نيترو حمض الساليسيليك (DNS)، ويتم الاعتماد على منحني قياسي لحمض الغالاكتورونيك لتقدير كمية حمض الغالاكتورونيك (ميكرومول/مل)، وقد عرفت وحدة الفعالية لإنزيم البكتيناز بقدرة الإنزيم على تحرير 1 ميكرومول من حمض الغالاكتورونيك في الدقيقة في 1 مل ضمن شروط التجربة (Okonji et al., 2019).

7.2.2. تحديد الظروف المثلى لإنتاج الأنزيمات البكتينية:

1. تحديد درجة الحرارة المثلى: حضرت سبع عينات ذات تركيب متجانس يحوي على الأوساط الزرع المعقمة والملقحة عند درجات حرارة مختلفة $(25^\circ, 30^\circ, 40^\circ, 45^\circ, 50^\circ, 55^\circ, 60^\circ)\text{C}$ وقيست الفعالية الأنزيمية للمستخلص الأنزيمي الناتج كما هو موضح في الفقرة

6.2.4

2. تحديد مدة التحضين (التخمير) المثلى: حضرت خمس عينات ذات تركيب متجانس يحوي على الأوساط الزرعية المعقمة والملقحة عند درجة الحرارة المثلى المستخلصة من التجربة السابقة ولفترات زمنية مختلفة (144,120,96,72,48) ساعة وقيست الفعالية الأنزيمية للمستخلص الأنزيمي الخام الناتج كما هو موضح في الفقرة 6.2.4.
 3. تحديد حجم اللقاح (المعلق الفطري) الأمثل: حضرت ست عينات ذات تركيب متجانس يحوي على الأوساط الزرعية المعقمة ولكن بأحجام مختلفة من المعلق الفطري (5,4,3,2,1.5,1,0.5) مل وتحضينها عند درجة الحرارة المثلى ولمدة الزمنية المثلى وقيست الفعالية الأنزيمية للمستخلص الأنزيمي الناتج كما هو موضح في الفقرة 6.2.4.
 4. تحديد تركيز البكتين المثالي: حضرت ثمان عينات من أوساط زرعية ذات محتوى مختلف من البكتين (4,3.5,3,2.5,2,1.5,1,0.5) % ولقحت بحجم اللقاح الأمثل وحضنت عند درجة الحرارة المثلى 40°C ولمدة الزمنية المثلى 96 ساعة، وقيست الفعالية الأنزيمية للمستخلص الأنزيمي الناتج كما هو موضح في الفقرة 6.2.4.
 5. تحديد التركيز الأمثل من الأبواغ في المعلق الفطري: حضرت ست عينات من الأوساط الزرعية ولقحت بالمعلق الفطري ذو التراكيز المختلفة من الأبواغ ($10^9, 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4$) بوغة/مل حضنت عند درجة الحرارة المثلى والمدة الزمنية المثلى، وقيست الفعالية الأنزيمية للمستخلص الأنزيمي الناتج كما هو موضح في الفقرة 6.2.4.
 6. تحديد pH الوسط الابتدائي: حضرت ست عينات من الأوساط الزرعية ذات درجات pH مختلفة (3.5,4.5,5.5,6.5,7.5) ولقحت بتركيز اللقاح المثالي وحضنت درجة الحرارة المثلى والمدة المثلى، وحضنت الفعالية الأنزيمية للمستخلص الأنزيمي الناتج.
- 8.2.4 التحليل الإحصائي:** اعتمد في تجربة البحث تصميم القطاعات العشوائية الكاملة وتم العمل بثلاث مكررات، كما تم التحليل الإحصائي بواسطة برنامج Genstat 12 عند مستوى معنوية 0.01%.

النتائج والمناقشة:

الفعالية الأنزيمية للمستخلصات الأنزيمية الخام:

يبين الجدول رقم (1) الفعالية الأنزيمية للمستخلصات الأنزيمية الخام التي تم الحصول عليها من العزلات الفطرية الخمس المستخدمة في البحث ذات الإنتاج الأعلى من الأنزيمات البكتينية، ويلاحظ من النتائج المدونة في الجدول وبعد التحليل الإحصائي أن المستخلص الأنزيمي المنتج من العزلة A1 قد تفوق معنوياً على المستخلصات الأخرى المنتجة من باقي العزلات في فعاليته أنزيمية والتي وصلت إلى 51.5 U/ml ، يليه المستخلص الأنزيمي المنتج من العزلة A5 بفعالية أنزيمية قدرها 50.1 U/ml ويعزى ذلك إلى أن هاتين العزلتين مصدرهما قشور الحمضيات ذات المحتوى الغني من البكتين الأمر الذي يحفز إنتاج الأنزيمات البكتينية.

جدول رقم (1) الفعالية الأنزيمية للمستخلصات الأنزيمية الخام من العزلات الفطرية الخمس.

العزلة	المصدر	الفعالية الأنزيمية U/ml
A1	قشور البرتقال	51.5 ^a
A2	التفاح	48 ^c
A3	الدراق	4 ^e

5 ^d	الخوخ	A4
50.1 ^b	قشور الليمون	A5

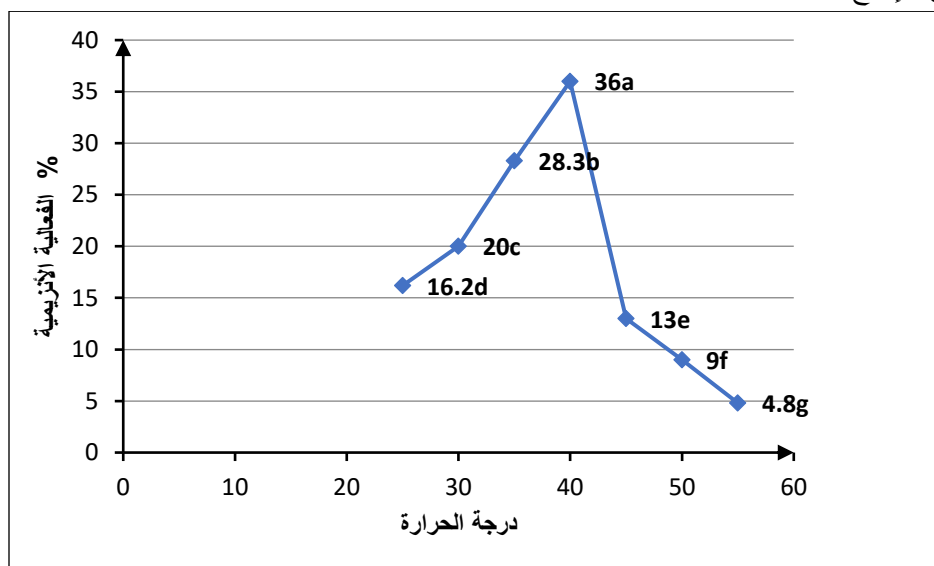
تشير الأحرف المتشابهة ضمن العمود إلى عدم وجود فروق معنوية عند مستوى معنوية 0.01 %

2.3. تحديد الظروف المثلى للإنتاج: تم أخذ العزلة A1 ذات الفعالية الأعلى للإنزيم مقارنة بالإنزيمات المنتجة من العزلات الأخرى، وذلك من أجل تحديد الشروط المثلى لإنتاج الأنزيمات البكتينية.

1.2.3. درجة الحرارة المثلى:

يبين الشكل رقم (1) الفعالية الأنزيمية للإنزيمات البكتينية المنتجة من العزلة A1 ضمن درجات حرارة مختلفة المتبعة بالبحث

لتحديد درجة الحرارة المثلى للإنتاج.



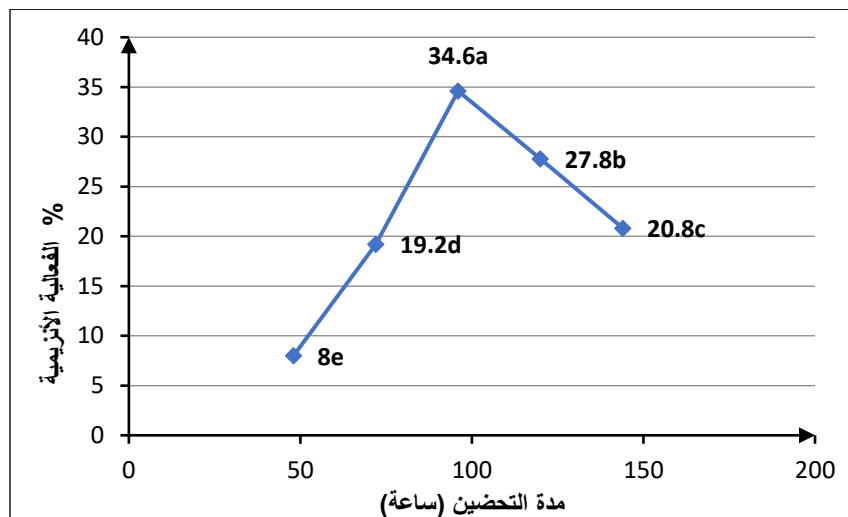
الشكل رقم (1) الفعالية الأنزيمية عند إنتاج الأنزيمات البكتينية في درجات حرارة مختلفة (أي معاملتين تشتركان بحرف واحد لا يوجد فرق معنوي بينهما عند مستوى معنوية 0.01 %).

يلاحظ من الشكل السابق وبعد التحليل الإحصائي ازدياد الفعالية الأنزيمية مع زيادة درجة حرارة التحضين حيث وصلت لأعلى مستوياتها عند درجة الحرارة 40°C وبفروق معنوية واضحة مقارنة بباقي المعاملات ثم بدأت بالانخفاض إلى أدنى مستوياتها عند درجة الحرارة 60°C وهذا يتوافق مع نتائج البحث الذي أجراه (Deshmukh *et al.*, 2012) الذين أكدوا أن درجة الحرارة 40°C هي الدرجة المثلى لإنتاج الأنزيمات البكتينية وأن إنتاج تلك الأنزيمات عند درجات الحرارة الأعلى من ذلك يؤدي إلى انخفاض فعالية الأنزيمات المنتجة.

2.2.5. مدة التحضين (التخمير) المثلى:

يوضح الشكل رقم (2) نتائج قياس الفعالية الأنزيمية للإنزيمات البكتينية المنتجة من العزلة A1 عند تحضينها لفترات زمنية

مختلفة عند درجة الحرارة 40°C بغية تحديد فترة التحضين (التخمير) المثلى لإنتاج هذه الأنزيمات.

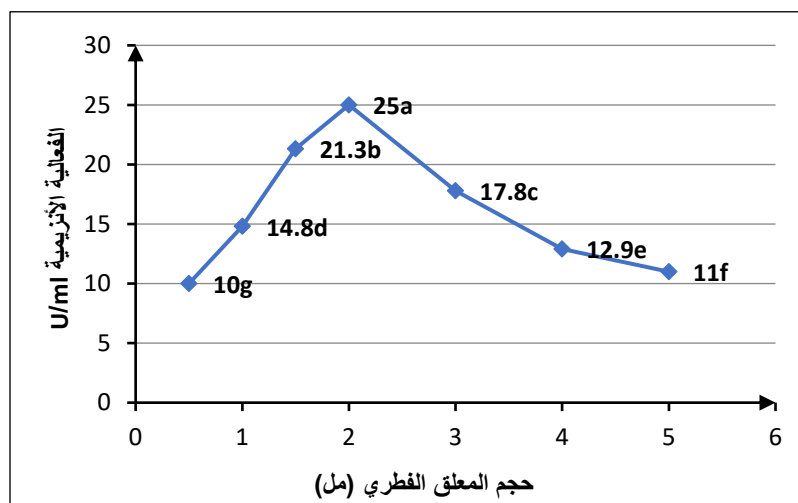


الشكل رقم (2) الفعالية الأنزيمية عند إنتاج الأنزيمات البكتينية في فترات زمنية مختلفة. (أي معاملتين تشتركان بحرف واحد لا يوجد فرق معنوي بينهما عند مستوى معنوية 0.01%).

أظهر التحليل الإحصائي أن المدة المثلى لإنتاج الأنزيمات البكتينية هي 96 ساعة حيث أبدت تلك الأنزيمات الفعالية الأنزيمية العظمى عند إنتاجها خلال الفترة الزمنية السابقة وبفروق معنوية واضحة مقارنة بباقي الفترات الزمنية وهذا ما أشار إليه Doughari و Onyebarchi فقد أكدوا أن المدة المثلى لإنتاج الأنزيمات البكتينية بأعلى فعالية أنزيمية هي 96 ساعة، كما تتوافق هذه النتيجة مع ما ذكره (Banakar & Thippesway, 2012) من أن المدة الزمنية اللازمة لإنتاج إنزيمات بكتينية ذات نشاط أعظمى هي 96 ساعة.

3.2.3. حجم اللقاح (المعلق الفطري) الأمثل:

يوضح الشكل (3) الفعالية الأنزيمية عند إضافة المعلق الفطري بحجوم مختلفة.



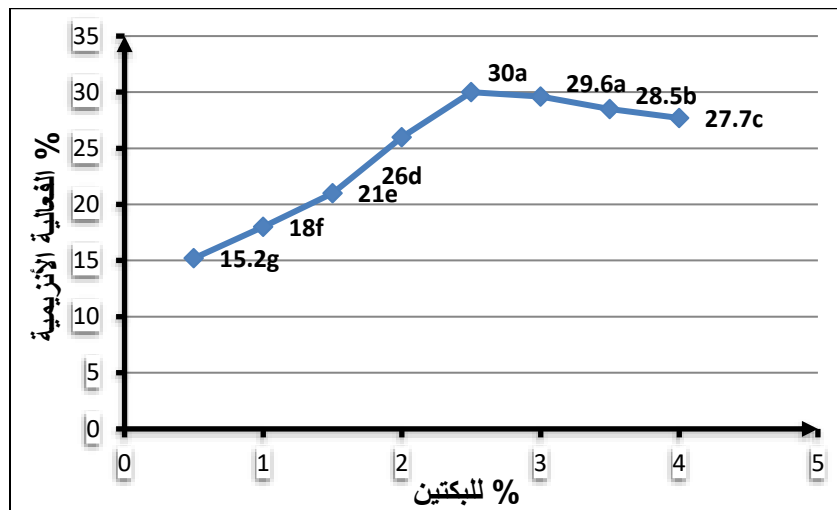
الشكل رقم (3) الفعالية الأنزيمية عند إنتاج الأنزيمات البكتينية بإضافة أحجام من اللقاح الفطري مختلفة (أي معاملتين تشتركان بحرف واحد لا يوجد فرق معنوي بينهما عند مستوى معنوية 0.01%).

وقد بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية في الفعالية الأنزيمية للإنزيمات البكتينية المنتجة عند إضافة المعلق الفطري بحجوم مختلفة، فعند إضافة المعلق الفطري بحجم 2 مل كانت الفعالية الأنزيمية أعلى ما يمكن، بينما كانت الفعالية الأنزيمية أدنى ما يمكن عند إضافة المعلق الفطري بحجم 0.5 مل. وتتوافق هذه النتيجة مع ما ذكره

(Ookonji *et al.*, 2019) الذين درسوا في بحثهم حجم اللقاح الفطري المستخدم لإنتاج الأنزيمات البكتينية وأكدوا أن حجم اللقاح 2 مل هو أفضل حجم لإنتاج تلك الأنزيمات بفعالية عظمى.

4.2.3. تركيز البكتين الأمثل:

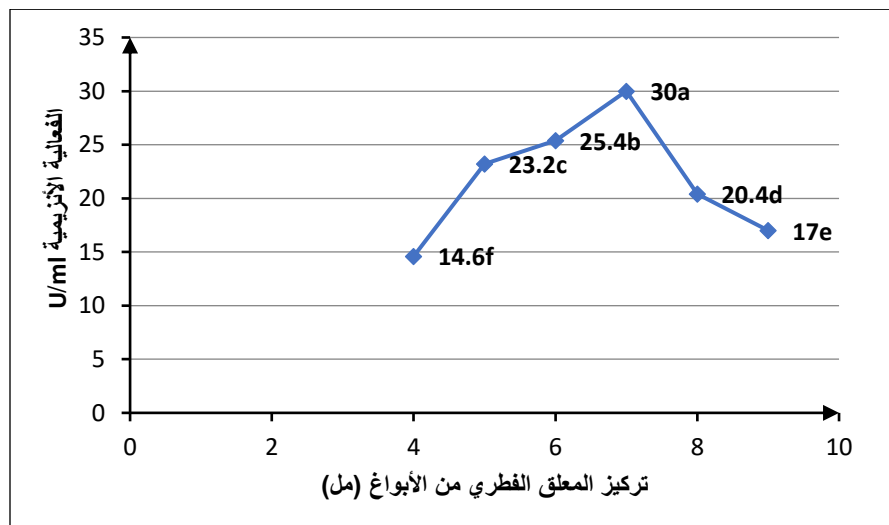
أظهر التحليل الإحصائي تغيرات معنوية ملحوظة في الفعالية الأنزيمية للإنزيمات البكتينية المنتجة من العزلة A1 تبعاً لنسبة البكتين المستخدمة، ووجد أن استخدام 2.5% من البكتين أعطى أعلى فعالية أنزيمية وبفروق معنوية واضحة بالمقارنة مع المعاملات التي استخدم فيها نسب أقل من البكتين ولكن لم يلاحظ أي فروق معنوية في فعالية الأنزيمات المنتجة عند زيادة نسبة البكتين إلى 3 % ثم أخذت الفعالية الأنزيمية تدريجياً بالانخفاض المعنوي عند زيادة نسبة البكتين عن 3 % وهذا ما يوضحه الشكل رقم (4).



الشكل رقم (4) الفعالية الأنزيمية عند إنتاج الأنزيمات البكتينية باستخدام تراكيز مختلفة من البكتين (أي معاملتين تشتركان بحرف واحد لا يوجد فرق معنوي بينهما عند مستوى معنوية 0.01%).

5.2.3. تركيز المعلق الفطري من الأبواغ:

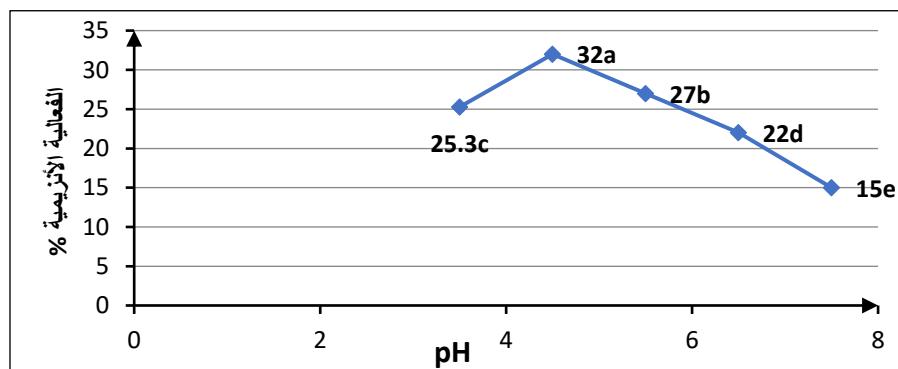
يلاحظ من الشكل رقم (5) تدرج الفعالية الأنزيمية بالزيادة المعنوية مع زيادة تركيز الأبواغ في المعلق الفطري بدءاً من 10^4 حتى 10^7 بوغة/مل نحو الأعلى ثم بدأت بالانخفاض لتبلغ أقل قيمة عندما أصبح تركيز الأبواغ في المعلق الفطري 10^9 بوغة/مل ويعود ذلك إلى زيادة تركيز الأبواغ في وحدة الحجم وبالتالي زيادة عملية التنافس للحصول على الغذاء الأمر الذي يؤدي إلى تراجع في عمليات إنتاج الإنزيم. ومن الجدير بالذكر أن هذه النتيجة تتوافق مع ما ذكره (Sandri & Silveira, 2018) حيث قاموا بإنتاج الأنزيمات البكتينية باستخدام معلق فطري ذو تركيز 10^7 بوغة/مل



الشكل رقم (5) الفعالية الأنزيمية عند إنتاج الأنزيمات البكتينية باستخدام تراكيز مختلفة من الأبواغ في المعلق الفطري. (أي معاملتين تشتركان بحرف واحد لا يوجد فرق معنوي بينهما عند مستوى معنوية 0.01%).

6.2.3. درجة pH الوسط الابتدائي المثلى:

يلاحظ من الشكل رقم (6) تدرج الفعالية الأنزيمية مع زيادة درجة حموضة pH الوسط الابتدائي بدءاً من 3.5 حتى 4.5 نحو الأعلى بدأت بالانخفاض لتبلغ أقل قيمة عند pH 7.5، وما أكده الباحثان Onyebarechi & Doughari عام 2019 بعد أن نفذوا بحثاً يتضمن إنتاج البكتيناز عند درجات pH مختلفة وكان النشاط الأنزيمي أكبر ما يكون عند درجة pH = 4.5.



الشكل رقم (6) الفعالية الأنزيمية عند إنتاج البكتينية عند درجات pH مختلفة. (أي معاملتين تشتركان بحرف واحد لا يوجد فرق معنوي بينهما عند مستوى معنوية 0.01%).

4. الاستنتاجات:

- 1- إمكانية الحصول على الأنزيمات البكتينية من بعض أنواع فطور *Aspergillus* باستخدام نظام تخمير الوسط السائل.
- 2- قدرة فطر *A. niger* على إنتاج الأنزيمات البكتينية بفعالية أكبر من مثيلاتها المنتجة من فطر *A. fumigatus*.
- 3- تتميز الأنزيمات البكتينية المنتجة من فطور معزولة من مصادر غنية بالبكتين (كالحمضيات) بفعالية أعلى من تلك المعزولة من مصادر ذات محتوى بكتيني أقل.
- 4- يمكن الحصول على أعلى فعالية للإنزيمات البكتينية المتحصل عليها من فطر *A. niger* عند إنتاجها عند درجة حرارة 40°C، ودرجة pH للوسط الابتدائي 4.5، ولمدة 96 ساعة، بحيث يكون تركيز الأبواغ في المعلق الفطري 10⁷ بوغة/مل، وتركيز البكتين في وسط التخمير 2.5%، وعند تلقيح الوسط بلقاح فطري حجمه 2 مل.

المراجع:

- . تقانة الخضار والفواكه (القسم النظري). مطبعة جامعة البعث، 397 صفحة (2008). الوزير، دريد.
- فالح، أديب (2012). تقانات التقطير والتخمير. منشورات جامعة حلب، 644 صفحة.
- Banakar, SP.; and B. Thippesway (2012). Isolation, production and partial purification of fungal extracellular pectinolytic enzymes from the forest soils of Bhadra Wildlife Sanctuary, Western Ghats of Southern India. *Biochem Tech.* 3(5): 138-143.
- Benoit, I.; P. Coutinho; A. Schols; J. Gerlach; B. Henrissat; and R. Devries (2012). Degradation of different pectins by fungi. *BMC Genomics.* 13: 321-471.
- Cao, J.; L. Zheng; and S. Chen (1992). Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of ramie. *Enzyme and Microbial Technoogy.* 14(12): 1013-1016.
- Doughari, JH.; and G.C. Onyebarechi (2019). Production, purification and characterization of polygalacturonase from *Aspergillus flavus* grown on orange peel. *Appli Microbiol.* 4(3).
- Deshmukh, N.; R. Talkal; K. Jha , PG. Sinh; and DC. Prajapati (2012). Production, purification, characterization and comparison of polygalacturonase from various strains of *Aspergillus*. *International Journal of Scientific & Technology Research.* 1(9): 85-91.
- George, M (2014). Pectinase. *Food Processing.* 2(9): 567-589.
- Helga, G.; and A. Michelle (2014). Pectinase. *J Wise geek.* 12(5): 234-267.
- Jayani, R.; S. Saxena; and R. Gupta (2005). Microbial pectinolytic enzymes. *Processing. Biochemistry.* 40(9): 2931-2944.
- Khatri, B.; T. Bhattarai; S. Shrestha; and J. Maharjan (2015). Alkaline thermostable pectinase enzyme from *Aspergillus niger* strain MCAS2 isolated from Manaslu Conservation Area, Gorkha, Nepal. *Springerplus.* 4: 488.
- Kiran, S (2007). Applications of pectinases. *J Pectinase Database.* 30(3): 1060 – 1080.
- M, Maldona.; and S. Strasser (2008). Production of pectinase and polygalacturonase by *Aspergillus niger*. *Microbiol Biotechnology.* 20(1): 8-34.
- M, Marcia.; R. Silva; and E. Gomes (1999). Screening of bacterial strain for pectinolytic activity characterization of the Polygalacturonase produced from *Bacillus.sp.* *Review. Microbiol.* 13(4).
- Okongi, R.; B. Itokorod; J. Ovumedia; and O. Adedeji (2019). Purification and biochemical characterization of pectinase produced by *Aspergillus fumigatus* isolated from soil of decomposing plant materials. *Applied Biology & Biotechnology.* 7(03):1-8.
- Patil, S.; and A. Dayanand (2006). Exploration of regional agrowastes for the production of Pectinase by *Aspergillus niger*. *Food Technology Biotechnology.* 44 (2): 289–292.
- Sandri, G.N.; & M.M. Silveira (2018). Production and Application of Pectinases from *Aspergillus niger* obtained in solid state cultivation. *Beverages.* 11(6): 4-48.
- Saranraj, P.; M. Geetha; S. Mahalakshmi; and D. Eetha (2012). Screening of Pectinase Producing Bacteria And Fungi For ITS Pectinolytic Activity Using Fruit Wastes. *Biochemistry & Biotech Science.* 1: 30-42.
- Tariq, A.; and Z. Latif (2012). Isolation and biochemical characterization of bacterial isolates producing different levels of polygalacturonases from various sources. *Microbiology Research.* 6(45): 7259-7264.

Tankano, J (2014). Importance of enzymes. Free Health.5:108-113.

Thomas, J.; J. Michael; and M. Rose (2000). Pectinases. Agricultural and Food Chemistry.44(10): 2977-2981.

Production Pectinases from *Aspergillus* by Liquid state fermentation and determination of Optimum Parameters for production

Rasha Taowz * ⁽¹⁾, Adib Faleh⁽¹⁾, Fateh Kateeb⁽²⁾ and Muhammad Alazm⁽³⁾

(1). Dept. of Food Science, Faculty of Agriculture, Aleppo University, Syria.

(2).Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Aleppo University, Syria.

(3).Dept. of Food Engineering Techniques, Faculty of Technical Engineering, Aleppo, Syria.

(*Corresponding author: Rasha Taowz. E-Mail: rashat.310@gmail.com).

Received: 25/8/2020

Accepted: 15/10/2020

Abstract

After twenty Fungal isolates belong to *Aspergillus* Genus were obtained from sixty four samples from Fruits and Vegetables, the action was processed in food science laboratories of Agriculture faculty in Aleppo university (2018-2019), and election the best according to its production Pectinases on solid medium. The strongest five isolates were chosen to produce Pectinases by using solid state fermentation to know the ability of the elected isolates to produce pectinases, and determinate the highest enzyme production isolate, in addition to optimize the enzyme production for that isolate (incubation temperature, incubation period, pectin concentration, inoculum volume, Suspension concentrations of spores, pH of initial medium). Four of these isolates were belong to *A. niger* and one were belong to *A. fumigatus*. Citrus peels were used in the fermentation system as pectin resource. The pectin percentage in peels were calculated and it was 5%. The results showed that the activity of pectinases which was produced by isolates from citrus fruits is higher than the other isolates, and it was 51,52 U/ml. When the optimum parameters of production Pectinases were studied, the results showed that the highest activity of pectinases was obtained at 40° of incubation temperature, 96 hours of incubation period, 2.5% of pectin concentration in medium, 10⁷ spore/ml of spore concentration in fungal suspension, 2 ml of indeed suspension volume.

Keywords: *Aspergillus*, Enzym activity, Fermentation, Pectinases, Optimization, Pectin.