عزل وتشخيص فطر *Aspergillus niger* المنتج لأنزيم الاميليز من بعض ترب مدينة الرمادي واستعمال المخلفات النباتية في إنتاجه

فرقد حواس موسى

جامعة الأنبار - كلية التربية للعلوم الصرفة - قسم علوم الحياة

E-mail:al_farkad2012@yahoo.com

الكلمات المفتاحية: الاميليز،مخلفات نباتية، انتاج الفطر، الشنبلان.

تاريخ الاستلام: 21 / 6 / 2011 **تاريخ القبول: 13 / 11 / 2012**

المستخلص:

نفذت هذه الدراسة لإنتاج أنزيم الاميليز بوساطة فطر *Aspergillus niger* المعزول من بعض ترب مدينة الرمادي ومعرفة كفاءته في إنتاج أنزيم الاميليز باستخدام ظروف انتاج مختلفة من الرقم الهيدروجيني pH ، ودرجة الحرارة و المصدر الكربوني و تركيز المصدر الكربوني والمصدر النتروجيني ومدة الحضن . وقد بلغت اعلي قيمة للإنتاج (8.0) سم عند الرقم الهيتـدروجيني 0 .5 ودرجـة الحرارة 30 م^0 وعند استعمال مسحوق الشمبلان كمصدر وحيد للكربون وبتركيز 1.5% واستعمال خلاصة الخميرة مصدر للنتروجين وبمدة حضن 8 أيام .

ISOLATION AND IDENTIFICTION OF THE PRODUCER AMYLASE ENZYME *Aspergillus niger* FROM SOME AL_RAMADI SOILS AND THE USE OF PLANT WASTES TO PRODUCE IT

Farkad Hawas Musa

University of Anbar - College of Education for Secentific

E-mail:al_farkad2012@yahoo.com

Keywords: Amylse ,Plant waste production, Certatophyllum.

Recieved: 21 / 6 / 2011 **Accept: 13 / 11 / 2012**

ABSTRACT:

This research was conducted to study the production of amylase by the fungus *Aspergillus niger* which is isolated from some Ramadi soils :Also to know its adequacy in the enzyme production PH,Temperature ,Carbon source , Carbon concentration ,Nitrogen and incubation period .The highest production value was 8.0 cm at PH 5.0 , 30C° with the use of (*Ceratophyllum demersum*) as the only carbon source at the concentration 1.5% and for the incubation period 8 days.

المقدمة:

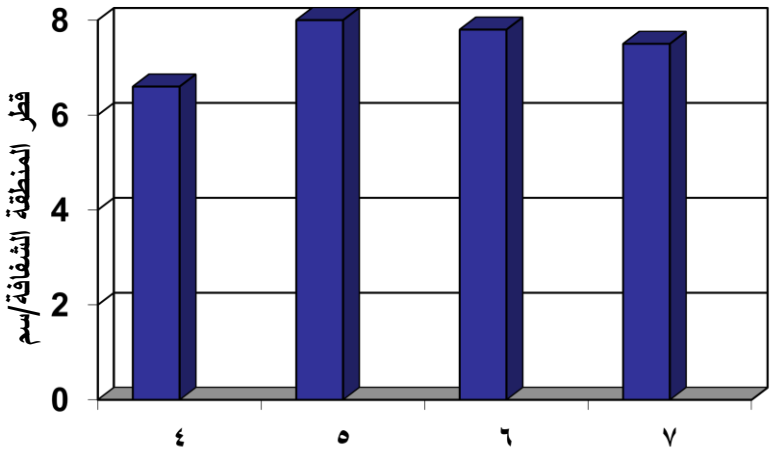
تعمل الإنزيمات عوامل مساعدة بروتينية عادة داخل الأنظمة الحيوية والبعض منها لها القابلية على العمل خارج الأنظمة الحية، تعد الفطريات من المصادر الهامة لإنتاج الإنزيمات ومن أهم الأنواع المدروسة في هذا المجال فطر (Bhargav and *Aspergillus niger*) (Allen,2008) الذي ينمو في مدى واسع من pH ودرجة الحرارة ويستعمل أوساط غذائية مختلفة محتوية على النشا كمصدر وحيد للكاربون (URaoandUma, 2007). تعد عملية إنتاج الانزيم من العمليات المهمة في القضاء على التلوث البيئي وذلك باستخدامها لبعض المخلفات النباتية الملوثة للبيئة وبعض النباتات كمادة أساس في الإنتاج ومن هذه الأنواع التي يمكن استغلالها في هذا المجال مخلفات نبات الشمبلان *Ceratophyllum demersum* ،مخلفات نبات البرسيم *Medicago sativa* ، تبن الحنطة (*Triticum*). تعتبر الانزيمات المحللة للنشا من أوائل الانزيمات التي استخدمت الفطريات في إنتاجها لكونها سريعة النمو ويمكن ان تنمو على أوساط تحوي مصادر رخيصة ومتوفرة في البيئة (Ellaiah وآخرون، 2002) وهي من الإنزيمات التي تفرز خارج الخلية. ان عملية تحلل النشا باستخدام أنزيم الاميليز المنتج بالطرق الحيوية طريقة كفوءه ورخيصة الثمن مقارنة بالطرق الكيمياوية، علما ان نسبة تحلل النشا بوساطة الفطر هي 80% (Francis وآخرون،2003).

المواد وطرائق العمل:

جمعت 60 عينة تربة من مناطق مختلفة من مدينة الرمادي لغرض إجراء عملية العزل تراوح وزن العينة 0.5-1.0 كغم بعد إزالة 2 سم من سطح التربة من عمق (0–25) سم. ولغرض العزل استعملت طريقة العد بالأطباق Plate count method فقد أجريت سلسلة من التخافيف (110- , 210- ,310- , 410- , 510-) لعينات التربة في الماء المقطر المعقم وزرعت التخافيف (410- , 510-)، اذ نشر 1 مللتر من التخافيف في إطباق بتري المعقمة على وسط dextrose Patato agar (PDA) وبثلاث مكررات لكل تخفيف في 5.0pH ودرجة حرارة 30 م° ولمدة 4 أيام بعدها اختيرت المستعمرات التي تنطبق صفاتها المظهرية مع الصفات المظهرية العامة للفطر ثم أعيدت تنقية العزلات التي حصل عليها بأعادة زراعتها بعدة نقلات على وسط PDA ولغرض التأكد من كون هذه العزلات محللة للنشا فقد أعيد زراعة العزلات المنقاة على وسط اكار النشا الصلب داخل دائرة قطرها 1 سم في مركز الطبق وبعد مدة الحضن كشف عن صفة تحلل النشا بغمر الوسط بمحلول اليود وقياس قطر المنطقة الشفافة حول المستعمرات بعد ازالة اليود من الطبق (Yeohandو1985,Allen) وقد تم الحصول على 45 عزلة فطرية منتجة لانزيم الاميليز. شخصت العزلة المنتخبة A.niger المعزولة من التربة اعتمادا على مفاتيح التصنيف والتشخيص الواردة في المصادر الآتية للتعرف على العزلة على مستوى الجنس والنوع (Barron واخرون، 1983). (Barnate,1960) وتمت الاستعانة بالمختصين في تصنيف الفطريات في كلية الزراعة - جامعة الانبار لتصنيف العزلة وشملت الفحوصات:- الخواص المزرعية Cultural Characteristics اذ فحص نمو العزلة النامية على وسطي جابك–دوكس s- Dox Agar، Czapek ومستخلص الشعير Malt extract وسجل قطر المستعمرة ولونها وطبيعة نموها في 4, 6, و8 ايام. اما فيما يخص الخواص المجهرية Microscopic Characteristics فقد استعمل محلول اللاكتوفينول بتحضير شرائح زجاجية من المستعمرات الفطرية وفحصت الشريحة تحت عدسة المجهر واستعمال الشريحة المايكروميترية وسجلت تشعبات خيوط الفطر وابعاده، اشكال الكونيديا وحواملها ولونها وأبعادها ،أشكال الابواغ وابعادها، Strigmat شكلها – التميز – الأبعاد والحويصلة Vesical شكلها – الأبعاد. اما فيما يتعلق بالاختبارات الكيموحيوية Biochemical Test فقد استخلص الغزل الفطري للعزلة الفطرية بمحلول الكحول البيوتيلي بتركيز 80% او محلول الكلوروفورم بتركيز 100% ثم عرض المستخلص للأشعة فوق البنفسجية ولوحظ وجود انعكاس بلون ازرق غامق او اصفر متألق من المستخلص او عدمه (Kenneth واخرون، 1960).

النتائج والمناقشة:

أظهرت نتائج الصفات الزرعية والمجهرية للعزلة الفطرية المنتخبة باستعمال مجهر التشريح والمجهر الضوئي للشرائح المحضرة منها،تميزت المستعمرات النامية على وسط Czapek، s- Dox Agar على درجة حرارة 30 م0 لمدة 4 ايام بقطر8.0 سم مع وجود اصفر شاحب بني في مركز المستعمرة وتميزت بغزلها الفطري (Mycelium) المقسمة بجدر عرضية بقطر بين 25-30 مايكرون، شفافة مغمور جزء منها في الوسط . وظهر حامل الكونيديا (Conidiphores) ناعم شفاف نصفه العلوي مظلل بسواد بطول يتراوح 2.0-2.5 ملم وقطر18-20 مايكرون يحمل في نهايته تركيب وعائي اسطواني يدعى الحوصلة Vesical بطول 20-60 مايكرون وقطر 8.0 مايكرون بلون اصفر شاحب ،ترتب عليه سلسلتين من تراكيب تدعى Sterigma منها اولية بطول 20-30مايكرون وقطر 5.0 مايكرون كانت بشكل صفائح في مرحلة النضج وذات لون بني مبرقش بسواد. أما الثانوية غير مميزة تتفرع منها سلاسل كونيديا (Conidia) سوداء كربونية بنية في العمق محززة طولياً إلى أقسام متعامدة بطول 600-700 مايكرون وقطر 5-8 مايكرون. اما مستعمراتها النامية على وسط مستخلص الشعير الصلب Malt Extract Agar بدرجة حرارة 30 م ولمدة 4 ايام، فقد تميزت بنمو سريع اذ بلغ معدل قطر المستعمرة 8.0 سم الا ان عزلها الفطري المقسم بحواجز عرضية قطرها تراوح بين 18-20 مايكرون وظهور حامل الكونيديا القصير بطول 1.2-1.4 ملم وقطر 5.0 مايكرون اغلبه مبرقش بسواد ينتهي بتركيب وعائي بلون اصفر كبدي بطول 50-60 مايكرون وقطر 10 مايكرون. ترتب عليه صفان من تراكيب Sterigma الاولية مميزة بطول 18 مايكرون وقطر 5.0 مايكرون بنية مبرقشة تفرع منها رؤوس كثيرة سوداء محززة طولياً بشكل متعامد بطول 500 مايكرون وقطر 5.0 مايكرون. اما مستخلص غزلهما الفطري بمحلول الكحول البيوتيلي ذو تركيز 80% ومحلول الكلوروفورم بتركيز 100 % فقد أظهر انعكاساً متألقاً ازرق غامقاً ومتألقاً اصفر شاحباً عند التعرض للاشعة فوق البنفسجية للمحلولين على التوالي . وقد تبين ان هذه العزلات تنتمي الى صف الفطريات الناقصة Deuteromycetes وانها تعود لجنس Aspergillus sp وعد هذا الجنس من نوع A.niger والذي يعد مهم اقتصادياً اذ يستخدم لانتاج البروتين احادي الخلية بكميات كبيرة فضلاً عن كونه من الفطريات الأساسية في تحليل المخلفات العضوية المختلفة والمنتخب في التجارب المنفذة خلال هذا البحث.تبين النتائج الموضحة في (الشكل-1) وجود فروق معنوية عند استخدام أرقام هيدروجينية مختلفة. وقد تبين ان أفضل رقم هيدروجيني الأنزيم كان pH لإنتاج 5.0 إذ بلغ قطر المنطقة الشفافة 8.0 سم إذ يؤثر الرقم الهيدروجيني في عملية إنتاج الأنزيم من خلال ثاثيره على مكونات الوسط وبالتالي تغير صفاته (Salas واخرون، 2006).

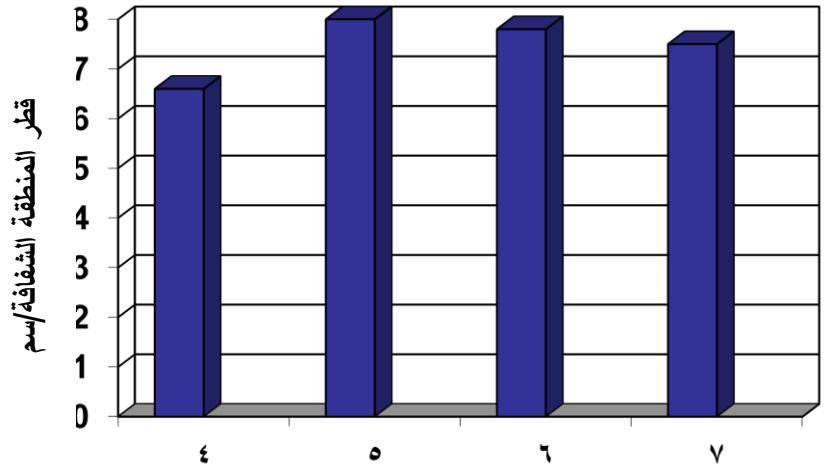


شكل-1: تأثير قيم الرقم الهيدروجيني على إنتاج أنزيم الاميليز باستخدام عزلة *Aspergillus niger*

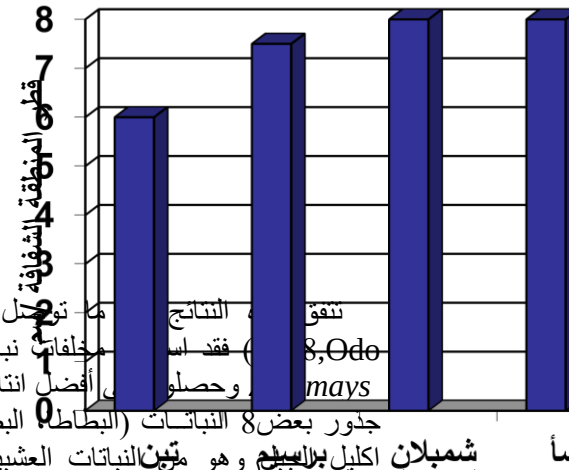
تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه (Salasواخرون، 2006) فقد أكد أن أفضل إنتاج للإنزيم كان عند 5.0pH وكذلك (Oshomaوآخرون 2010) فقد حصل على أفضل إنتاج عند 5.0pH. أما (Bhargav وآخرون، 2008) , فقد حصلا على افضل انتاج عند 6.0 pH باستخدام فطر *A. oryza*. وقد اشار (Bhargav واخرون، 2008) الى ان الاختلاف في الرقم الهيدروجيني يؤثر سلبا وايجابا في عملية الإنتاج . أظهرت النتائج الموضحة في الشكل،2 وجود فروق معنوية في الكميات المنتجة من الأنزيم باستخدام درجات تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه (Salas وآخرون 2006) فقد حصلوا على أفضل إنتاج باستخدام درجة حرارة 30 م°، بينما حصل (Oshomaوآخرون 2010) على أفضل إنتاج عند درجة حرارة 40 م° باستعمال فطر *A. niger* . وقد اشار (Ugwa وOdo وآخرون 2008) ان أفضل درجة حرارة لإنتاج الأنزيم 35م° وبزيادة درجة الحرارة أعلى من ذلك يؤدي إلى نقص الإنتاج .

حرارة مختلفة فقد كانت أفضل درجة حرارة لأفضل إنتاج هي 30م° فقد بلغ قطر المنطقة الشفافة 8.0 سم وقد يعزى سبب زيادة الإنتاج بزيادة درجة الحرارة الى حد معين من خلال تأثيرها في زيادة سرعة التفاعلات داخل الخلية، أما زيادة درجة الحرارة الى أكثر من ذلك فقد يؤدي الى فقد الانزيم لفعاليتة نتيجة لتحلل مكوناته (الأحماض الامينية) الى الوحدات الثانوية وبالتالي فقدان الفعالية الأنزيمية إليه (Salas وآخرون، 2006 ,).

كما أظهرت الشكل 3 نتائج الدراسة وجود فروق معنوية باستخدام أنواع مختلفة من مصادر الكربون فقد تم اختبار كفاءة الفطر على الإنتاج باستخدام أربعة مصادر كربونية (النشا، مخلفات الشمبلان، مخلفات البرسيم، تبن الحنطة) وقد تبين ان أفضل مصدر كربوني استخدم في الدراسة هو الشمبلان فقد أعطى أفضل إنتاج اذ بلغ قطر المنطقة الشفافة 8.0 سم عند 5.0 pH ودرجة حرارة 30 م°.



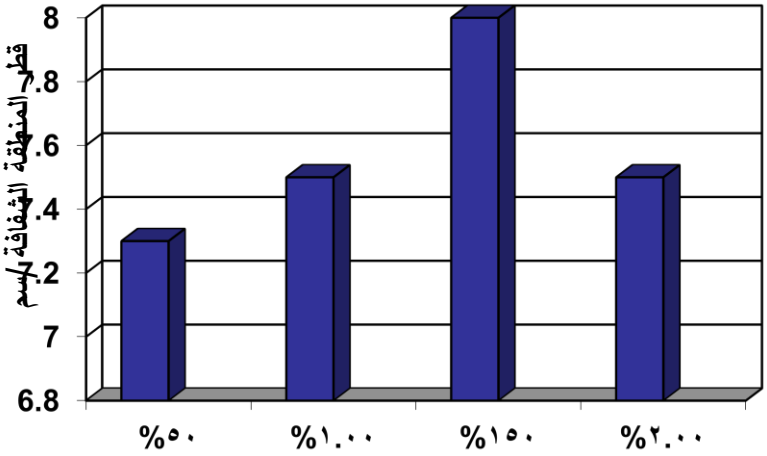
شكل-2: تأثير درجة الحرارة على إنتاج أنزيم الاميليز الانزيم باستخدام عزلة *Aspergillus niger*



ج انزيم الاميليز باستخدام عزلة *Aspergillus niger* LSD Carbon = 0.3695

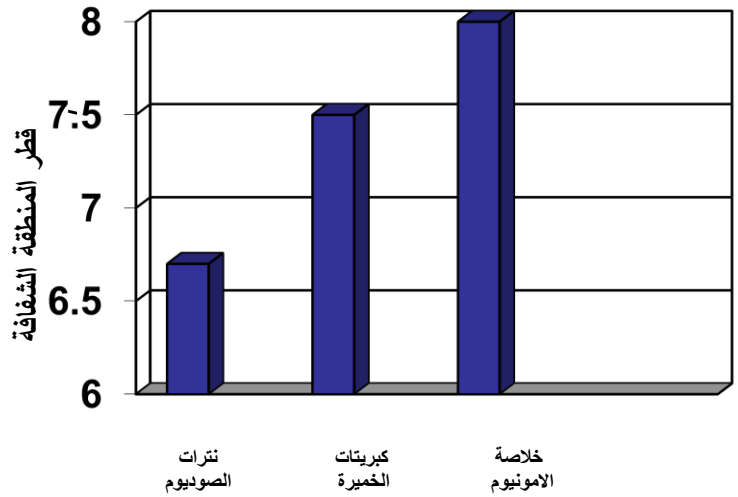
تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه (Ugwa و 8,Odo) فقد اس مخلفات نبات الذرة الصفراء *mays* وحصلوا على أفضل انتاج في حين استخدم جذور بعض8 النباتات (البطاطا، البطاطا الحلوة، نبات اكليل الجبل وهو من النباتات العشبية) وحصلوا على أفضل إنتاج للانزيم باستخدام جذور نبات اكليل الجبل *Rosmarinus officinalis*. في حين حصل كل من (1984,Watson)، (Effiuvwewere و Akoma 1995,).

(Abu واخرون,2005) على أفضل إنتاج باستخدام مخلفات الذرة البيضاء *Soraghum*. اما فيما يخص تركيز المصدر الكربوني فقد أظهرت النتائج وجود فروق معنوية في الإنتاج باستخدام تراكيز مختلفة للمصدر الكربوني وقد كان أفضل إنتاج عند استخدام تركيز 1.5% وكان قطر المنطقة الشفافة 8.0 سم بينما اقل انتاج كان عند استخدام تركيز 0.5 % وتركيز 2% بقطر 7.3 سم 7.5 سم، بالتتابع للمنطقة الشفافة.



شكل -4: تأثير تركيز المصدر الكربوني على إنتاج انزيم الاميليز بأستخدام عزلة *Aspergillus niger* LSD Cons = 0.1538

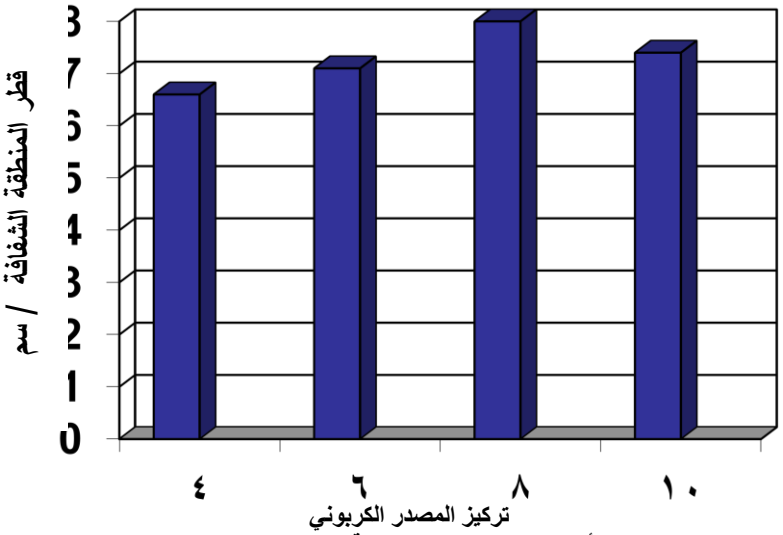
تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه (Watson,1984) فقد حصل على أفضل إنتاج باستخدام تركيز 1.5%. بينما أكد كل من، (Effiuvwewere و Akoma.1995)، (Abu وآخرون 2006) وان أفضل تركيز للإنتاج 1.0%. أما فيما يخص المصدر النتروجيني فيعد إضافة المركبات النتروجينية الى وسط الإنتاج احد المتطلبات الضرورية لبناء المكونات الخلوية كالبروتينات والأحماض النووية، فقد بينت النتائج ان أفضل مصدر نتروجيني لإنتاج الأنزيم خلاصة الخميرة (yeast extract) فقد بلغ قطر المنطقة الشفافة 8.0 سم وقد يعود هذا الى سهولة تحلل واستهلاك هذه المادة من قبل الفطر قيد الدراسة.



شكل-5: تأثير نوع المصدر النتروجيني على إنتاج أنزيم الاميليز باستخدام عزلة *Aspergillus niger* LSD N=0.3052

تتفق هذه النتائج مع ما أكده (Oshoma واخرون، 2010) فقد حصل على افضل انتاج باستخدام خلاصة الخميرة بينما كان اقل انتاج عند استخدام نترات الصوديوم. كما اكد (Narasimha وآخرون, 2006) ان خلاصة الخميرة تعطي أفضل إنتاج مقارنة بالببتون.

اما فيما يتعلق بمدة الحضن فقد اظهرت النتائج وجود فروق معنوية في كمية الإنتاج فعند تنمية الخلايا في بيئة صناعية ملائمة من حيث الظروف فسوف ينتج في تلك البيئة عدد كبير من الخلايا الحية نتيجة لانقسامها وتكاثرها، ان اعلى كثافة او عدد للخلايا الحية ينتج في طور النمو اللوغارتمي. ان أفضل إنتاج للإنزيم فقد كان في مدة الحضن 8 أيام فقد بلغ قطر المنطقة الشفافة 8.0 سم كما موضح في (الشكل-6) اما زيادة مدة الحضن أكثر من ذلك يؤدي الى انخفاض الإنتاج وربما يعود السبب الى تراكم المواد الايضية للفطر ونفاذ مكونات الوسط الغذائي (Watson ، 1984) . تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه Prakasham وآخرون، 2007) فقد حصلوا على أفضل إنتاج بعد مدة حضن 8 أيام ،أما (Sivaramakrishnan,2006) فقد اكد ان 5 أيام مدة حضن تكون الأفضل لإعطاء أفضل إنتاج .



شكل-6: تأثير مدة الحضن على إنتاج أنزيم الاميليز باستخدام عزلة *Aspergillus niger* LSD Time = 0.765

REFERENCE:

Abu ,E,A,S.A.Ado and Janes D.B, 2005. Prodction of the raw starch digesting amylase of Aspergillus. African Journal of Biotechnology vol .4(8), PP.785-780.

Barnate. H.L, 1960. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing ComU.S.A, PP.331-553.

Barron ,G.L. 1983. The genera of hydromycetes from soil .Reborte Krieger Publishing Company Florida.

BhargavS,PaandaBP, Ali M,JavedS, 2008. Solid-Statefermentation:an verview. Chem.. Biochem. Eng. 22:42-70 .

Domsch, K.H. Grams,W. and Aderson,T.H, 1980. Compendium of Soil Fungi. Vol.L. Acudemic press. London.

Effiuvwewere BJO, Akoma O. 1995, The microbiology of kunun-zakiy a beverage from Northern Nigeria durng the fermentation (production) process. world J.Microbiol. Biotechnol. 11:491-493.

EllaiahP, AdinarayanaK, Bhavani Y, PadmajaP, SrinivasuluB, 2002. Optimizationof process parameter for glucoamylase production under solid state fermentation by a new isolated Aspergil lusniger. Process Biochem. 38:615-620.

Francis F, Sabu A, nampoothiri K M, Ramachandran S, Ghosh S, Szakacs G, Pandey A, 2003. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of amylase by Aspergillus. Biochem. Eng. J. 15:107-115.

Enneth, B. R. Dorothy, andI. Fennel, 1965. The Genus Aspergillus, The Williama and Wilkins Company. Baltimore Composed and Printed in the Woverly press Inc. U. S. A.

.Narasimha G, Sridevi A. Buddolla V, Subhosh CM, Rajasekhar RB, 2006. Nutrient effects on production of amylase enzymes by Aspergillus niger. Afri. J. Biotechn. 5 (5):472-476.

Oshoma. E, E. E.lmarhiagbe, M. J. Lkenebomeh and Eigbaredon H. E, 2010. African Journal of Biotechn. vol. 9 (5), PP. 682-686.

Prakasham, R. S. C. S. Rao and P. N. Sarme, 2007. Enhancement of acid amylase product Applied microbiol.,102:204 -211.

Salas M, Rodringuez M, Guerra NP,Perez R, 2006. Amylase production by Aspergillus niger in submerged cultivation on two wastes from food industries. J food Eng. 73:93-100.

Sivaramakrishnan, S., D.Gangadharan, K. M. Nampoothiri, C.R.Soccol and A. Pandey, 2006. Production of amylase fromApergillus. Alpi Technol. Biotechnol . 44:173-175.

Ugwa FM, Odo Mo, 2008. Effect of Cassava variety on the quality and shelf stability of soy-garri, Pak.J.nutr.7 (2):381-384.

Uma Maheswer Rao JL, Satyanarayana T., 2007. Improving Production of hyperthermost able and high maltose-forming amylase by an extreme thermophile using response surface methodology and its application Biores. Techn. 98:345-352

Watson S.A., 1984. Corn and Soraghum star cges production. in:starch chemistry and technology, Ed whistler RL,Bemiller JW, Paschal. EF. Acad. Pressnly, U. S. A. pp. 417-464.

Yeoh, H.H., Khow, E. and Lim, G. 1985. A simple method for Screening fungi mycologyia .77:161-162.