---- مجلة علوم الرافدين، المجلد 18، العدد 12، خاص بعلوم الحياة، ص97-104، 2007 ----

# إنتاج إنزيم ألفا-اميليز بوساطة احد العزلات المحلية للفطر *Aureobasidium pullulans*

**محمد بشير إسماعيل قاسم  طه عبدالوهاب خميس  شمال يونس عبدالهادي**

*قسم علوم الحياة*

*كلية التربية*

*جامعة الموصل*

(تاريخ الاستلام 2006/12/13 ، تاريخ القبول 2007/6/6 )

## الملخص

تم الحصول على عزلة محلية من الفطر *Aureobasidium pullulans* عزلت من سقوف بعض المنازل في مدينة الموصل وشخصت العزلة بكونها احد عزلات الفطر *A. pullulans* على أساس تعددية الاشكال في المستعمرات وإنتاج صبغة الميلانين وإنتاج البولولان في مزارع الدوارق الهزازة. قورنت إنتاجية العزلة المحلية للإنزيم ألفا-اميليز مع احد العزلات القياسية للفطر نفسه *A. pullulans* ATCC 42023 . فاق إنتاج العزلة المحلية للإنزيم ألفا-اميليز قليلا ما تم الحصول عليه بواسطة العزلة القياسية للفطر. وقد كان إنتاج العزلة المحلية والقياسية من إنزيم ألفا-اميليز 4.4 و4.08 وحدة / مل على التوالي بعد أربعة أيام من التحضين.

---

# Production of α- Amylase by a local Isolate of the Fungus *Aureobasidium pullulans*

**Mohamad Bashir I. Kassim  Taha A. W. Khmis  Shimal Y. Abdul-Hadi**

*Department of Biology*

*College of Education*

*Mosul University*

## ABSTRACT

A local isolate of the fungus *Aureobasidium pullulans* was obtained from house ceilings in Mosul city . The isolate was identified as *A. pullulans* on the basis of appearance of polymorphism in the colonies , melanin pigment and pullulan production in flask cultures. α- Amylase production by the local isolate was compared with a standard isolate of the fungus *A. pullulans* ATCC 42023 . Production of α- Amylase by the local isolate slightly exceeded that produced by the standard isolate . Production of α-

Amylase by the local and standard isolate was 4.4 and 4.08 unit / ml respectively after four days incubation .

---

## المقدمة

إن الفطر *Aureobasidium pullulans* ( De Bary ) Amand ( كان يسمى سابقا *Pullularia pullulans* ) يتواجد على سطح أوراق النباتات المختلفة وقد ينمو على سقوف المنازل الرطبة ويبدو أثاره في الصبغة السوداء التي تظهر على سقوف بعض المنازل ( قاسم و رشيد , 2004 ) .

إن الصفات الزرعية والمجهرية لهذا الفطر تتضمن مستويات مختلفة من مظهر مستعمرات الفطر السوداء التي تظهر فوق الأوساط الغذائية الصلبة إلى تواجد الهايفات المقسمة والكلاميدوسبورات والخلايا المفردة والمتبرعمة ( Pollock et al. , 1992 ) ومنذ السبعينات ولحد ألان هناك تطور في الخطوط البحثية للاستفادة من هذا الفطر اقتصاديا والتي تشمل إنتاج السكر المتعدد البوليولان ذات التطبيقات الصناعية والغذائية المختلفة ( Sugimoto , 1969 ; Lee et al. , 1999 ) إلى إنتاج الإنزيمات المحللة وبروتين أحادي الخلية إضافة إلى تحمل هذا الفطر لمستويات عالية من التلوث ودوره في التكسير الحيوي لبعض المواد ( Deshpande et al. , 1992 ) .

بالرغم من إن سلالات الفطر *A. pullulans* المتعددة قد تختلف في بعض الصفات الفسيولوجية إلا أنها متشابهة في قدرتها على النمو في أنواع مختلفة من الكاربوهيدرات (Dennis and Buhagiar,1973 ) وكذلك في إنتاج أنواع معينة من الإنزيمات المحللة ( Federici , 1982 ) . إن إنتاج الإنزيمات مثل الاميليز والزايلانيز و β-كلوكوسايديس من قبل السلالات المختلفة للفطر *A. pullulans* قد جذبت انتباه العلماء نظرا لأهمية هذه الإنزيمات في الصناعات المختلفة ( الغذائية والكيميائية وصناعة المنظفات والنسيج ) , حيث تلعب هذه الإنزيمات دورا كبيرا في تحويل الكتل الحيوية النباتية وبالأخص النشا والمواد السليلوزية واللكنينية إلى سكريات بسيطة وبروتين أحادي الخلية والوقود الحيوي . وعلى هذا الأساس فقد تم إجراء دراسات مكثفة على الفطر *A. pullulans* لتحديد إمكانيته في إنتاج بعض الإنزيمات ( Federici and Delia, 1983 ; Saha et al., 1993 ; Saha et al., 1994 ; Okagbue et al., 2001 ) .

يهدف هذا البحث إلى الحصول على عزلة محليـة مـن الفطـر *A. pullulans* والتحـري علـى قابليتها في إنتاج الإنزيم ألفا-اميليز ( EC 3.2.1.1 ) ومقارنة العزلة المحلية مع العزلة الأجنبيـة للفطـر *A. pullulans* ATCC 42023 .

المواد وطرائق العمل

**الكائن المجهري والظروف الزرعية :-**

استخدمت عزلة الفطر *A. pullulans* والتي تم عزلها من سقوف بعض المنازل وكذلك العزلة *A. pullulans* ATCC 42023 والتي تم الحصول عليها من مركز American Type Culture Collection . تم الحصول على العزلة المحلية للفطر *A. pullulans* وذلك بأخذ كشطات من المناطق الداكنة لسقوف بعض المنازل في مدينة الموصل. نقعت الكشطات (1 غم ) في 25 مل من الماء المقطر المعقم لمدة ثلاثة أيام عند درجة حرارة 25 م°. بعد ذلك اخذ 0.1 مل من محلول النقع ونقل إلى 10 مل من الوسط الملحي الأدنى والذي يتكون من المواد التالية (لكل لتر من الماء المقطر ):- $(NH_4)_2 HPO_4$ 1 غم , 0.5 NaCL غم , 2 $K_2HPO_4$ غم , 0.05 $MgSO_4.7H_2O$ غم , 0.01 $FeSO_4$ غم , $MnSO_4$ 0.01 غم , سكروز 10 غم, و 10 ملغم كلورمفينكول. ضبط الأس الهيدروجيني عند 4 باستخدام حامض HCl (Pollock et a.l , 1992 ). وزع الوسط في دوارق زجاجية سعة 250 مل بواقع 50 مل / دورق حضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 25 م° وبمعدل هز (150 دورة / دقيقة) لمدة يومين بعد ذلك تركت المزارع المتعكرة لتستقر بدون حركة لمدة 20 دقيقة لغرض ترسيب التجمعات الخيطية أسفل الدورق بعد ذلك اخذ 20 مايكروليتر من الجزء العلوي الرائق الغني بالخلايا ( تشبه الخميرة ) ونشر في أطباق بتري تحتوي نفس الوسط المذكور أعلاه بعد إضافة 2% أكار وضبط الرقم الهيدروجيني عند 5.0. حضنت الأطباق عند درجة حرارة 25 م° لمدة أربعة أيام. بعد ذلك عزلت المستعمرات النامية ونقيت واختيرت العزلات النقية من الفطر *A. pullulans* لغرض التأكد من إنتاج الفطر للسكر المتعدد ( البوليولان ) وكذلك تعدد الشكل وتكوين صبغة الميلانين. حفظت الفطريات في المزارع المائلة للوسط PDA عند درجة حرارة 4 م° وتم تجديد المزارع كل أسبوعين.

نميت اللقاحات في دوارق زجاجية بحجم 250 مل يحتوي كل منها على 50 مل من الوسط الغذائي المتكون من المواد التالية (لكل لتر من الماء المقطر):- مالتوز 10.0 غم , $NaNO_3$ 0.2 غم , $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 غم, $FeSO_4.7H_2O$ 0.01غم , ومستخلص الخميرة 0.4 غم (Okagbue et al. , 2001 ) . ضبط الرقم الهيدروجيني عند 7.0 , بعد التعقيم لقحت الدوارق بأخذ جزء من حافة مستعمرة الفطر *A. pullulans* النامية على طبق بتري يحتوي PDA بعمر خمسة أيام حضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 25 م° وبمعدل هز (150 دورة / دقيقة) لمدة يومين.

استخدم نفس الوسط أعلاه الخاص بإنتاج اللقاح لإنتاج إنزيم ألفا-اميليز حيث وزع الوسط في دوارق زجاجية سعة 500 مل بواقع 100 مل / دورق, عقمت الدوارق ولقحت من لقاح الفطر

*A. pullulans* بتركيز 2 % حضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 25 م° وبمعدل هز (200 دورة / دقيقة) لمدة أربعة أيام .

**طرائق التحليل**

**تقدير الكتلة الحيوية :** بعد انتهاء فترة التحضين سحبت الدوارق من الحاضنة وتم قياس الاس الهيدروجيني النهائي لكل دورق بعدها أجريت عملية النبذ المركزي لمحتوى كل دورق عند 9000 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة بعد الترسيب ترك الرائق جانبا باعتباره محلول الإنزيم ألفا-اميليز . جمعت الخلايا في أطباق زجاجية معلومة الوزن جففت في فرن كهربائي عند درجة حرارة 80 م° لمدة 24 ساعة وتم قياس الكتلة الحيوية بفارق الوزنين باستخدام ميزان حساس.

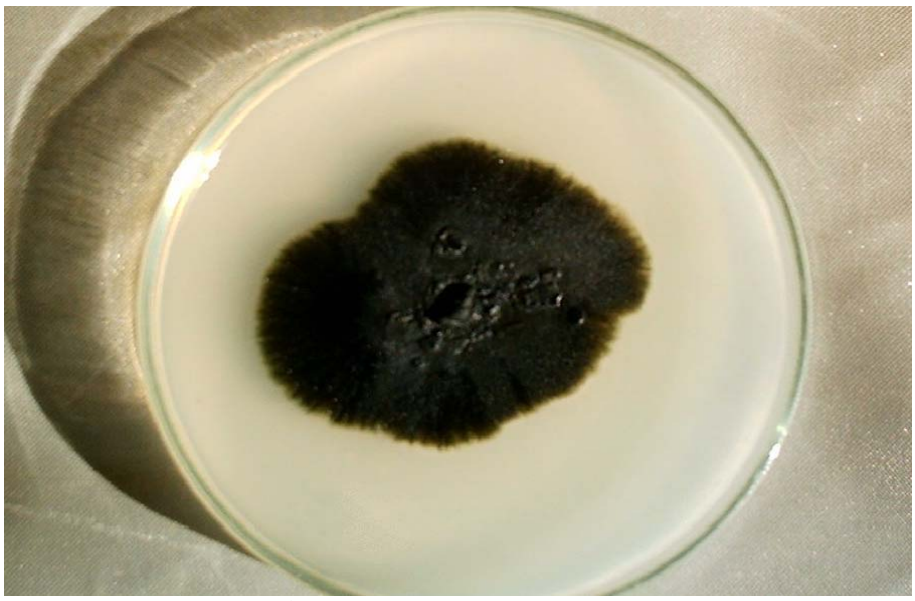
**اختبار إنتاج البوليولان** : اخذ 10 مل من رائق المزرعة الخالي من خلايا الفطر وأضيف إليه حجمان ( 20 ) مل من الأسيتون وعزل الراسب المتكون بعملية النبذ المركزي عند 9000 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة ( Leathers et al , 1988 ; Kassim and Sultan , 1997 ).

**اختبار إنتاج إنزيم ألفا-اميليز** : لتقدير فعالية إنزيم ألفا-اميليز المنتج استخدم محلول التفاعل الذي يحتوي على ا مل من محلول سكر المالتوز بتركيز 1 % و 1 مل من محلول Acetate buffer (50 ملي مول) وأضيف إلى محلول التفاعل 1 مل من محلول الإنزيم الخام ( رائق المزرعة بعد التحضين والخالي من خلايا الفطر). بعد ذلك حضن محلول التفاعل عند درجة حرارة 50 م° لمدة نصف ساعة بعد ذلك تم تقدير الكلوكوز المتحرر خلال تحلل المالتوز بواسطة إنزيم ألفا-اميليز باستخدام محلول حامض داي نايتروساليسليك DNSA ( Miller, 1959 ) حيث أضيف 1 مل من حامض داي نايتروساليسليك و 0.3 مل من ملح روشل ( ترترات الصوديوم والبوتاسيوم ) وتم غلي المزيج لمدة خمسة دقائق. بعد تبريد المزيج إلى درجة حرارة المختبر تم قياس كمية الكلوكوز المتحرر باستخدام جهاز المكتاف الضوئي Spectrophotometer طراز (CECIL, CE1021) عند طول موجي 575 نانوميتر واستخدم المنحني القياسي للكلوكوز النقي لتقدير الكلوكوز المتحرر. إن الوحدة الواحدة One Unit لإنزيم ألفا-اميليز ( EC3.2.1.1 ) تحدد بقيمة الإنزيم التي تحرر 1 مايكرومول من السكر المختزل ( D-glucose ) لكل دقيقة من الوقت تحت ظروف طريقة الاختبار المستخدمة أنفا, وقد تم أيضا تحديد وحدة الإنزيم المتكونة / غرام من الكتلة الحيوية على أساس الكتلة الحيوية المنتجة / لتر من الوسط الغذائي والتي تم تقديرها كما ذكر سابقا.

## النتائج والمناقشة

### تشخيص العزلة المحلية للفطر *Aureobasidium pullulans*

تم عزل مستعمرات الفطريات السوداء التي نمت على سطح الاكار حيث أن الفطر *A. pullulans* يتميز بإنتاجه لصبغة الميلانين السوداء ( Shabtai and Mukmenev , ; Gadd , 1980 1995 ) (الشكل 1 ). كما تم فحص المستعمرات مجهريا (أخذت الصورة المجهرية في وحدة تصوير قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة الموصل, باستخدام كاميرا رقمية طراز Benq DCE 30) وبينت هذه العزلات ظاهرة تعدد الأشكال Polymorphism للفطر *A. pullulans* وهي تواجد الطور الخميري Yeast phase والطور ألخيطي Filament phase وطور والكلاميدوسبور Chlamydospore phase ( الشكل 2 ) ( Pollock et al , 1992 ) . كما تم أيضا اختبار العزلات لقابليتها على إنتاج السكر المتعدد البوليولان في المزارع السائلة ( Leathers et al, 1988 ) وبهذا فقد تم التأكد من أن المستعمرات المعزولة هي بالفعل تعود للفطر *A. pullulans* .



الشكل 1 :- مستعمرة الفطر ***A. pullulans*** بعمر خمسة أيام المنماة على وسط PDA .

### إنتاج إنزيم ألفا-اميليز

أظهرت نتائج مقارنة إنتاجية الإنزيم ألفا-اميليز بين العزلة المحلية للفطر *A. pullulans* والعزلة الأجنبية ATCC 42023 بعد تنميتها على وسط الإنتاج وبعد أربعة أيام من التخمير (جدول 1 ) إن كل من العزلتين لها القابلية على إنتاج إنزيم ألفا-اميليز وبمستويات جيدة وقد فاق إنتاج الإنزيم بواسطة العزلة المحلية قليلا ما تم إنتاجه من قبل العزلة الأجنبية ATCC 42023 سواء على أساس كل مل من الوسط الغذائي أو أساس الكتلة الحيوية المتحصلة خلال فترة التخمير وهي 4.4 وحدة / مل , 709.68 وحدة / غم كتلة حيوية و 4.08 وحدة / مل, 595.62 وحدة / غم كتلة حيوية على التوالي

وبمقارنة إنتاجية إنزيم ألفا-اميليز لهاتين العزلتين مع عزلات أخرى للفطر *A. pullulans* فقد أشار Okagbue et al. , 2001 إلى إنتاج إنزيم ألفا-اميليز بواسطة سبع عزلات من الفطر *A. pullulans* تراوح بين 0.68 – 1.4 وحدة / مل من الوسط الغذائي بينما كانت الانتاجية على اساس الكتلة الحيوية بين 226.67 - 500.0 وحدة / غم من الكتلة الحيوية . وقد استطاع الباحث نفسه بتحفيز إنتاج إنزيم ألفا-اميليز إلى 5.7 وحدة / مل و 2035.71 وحدة / غم كتلة حيوية بإضافة 0.4 % من مادة الـ Tween 80 إلى الوسط الغذائي , كما أشار Moreira et al., 2001 إلى انه تم الحصول على إنتاجية لأنزيم الاميليز تراوحت بين 1-37 وحدة / مل من الإنزيم عند دراسته لعشرة أنواع من الفطر *Aspergillus* باستخدام ثلاثة أنواع من المصادر الكاربونية هي النشا , المالتوز وألفا-مثيل كلوكوز. وفيما يتعلق بالأس الهيدروجيني النهائي للمزارع فانه لم يتغير كثيرا عن الأس الهيدروجيني الأولي للمزرعة (7.0) لكلا العزلتين وقد يعزى هذا الى عدم تراكم أية مواد ايض ثانوية قد تؤدي إلى انخفاض أو ارتفاع في الأس الهيدروجيني النهائي. وفي الختام يمكن القول انه من الممكن إجراء تحفيز كبير في إنتاج الإنزيم ألفا-اميليز وذلك من خلال تغيير الظروف الزرعية وإحداث تغيرات في الوسط الغذائي الخاص بإنتاج إنزيم ألفا اميليز .


الشكل 2 : صورة مجهرية للفطر *A. pullulans* (A- الطور ألخيطي, B- طور الكلاميدوسبور , C - الطور الخميري ) عند قوة تكبير 400X , دقة الصورة 575 بكسل/انج .

الجدول 1: مستويات إنتاج الإنزيم ألفا-اميليز بواسطة العزلة المحلية والأجنبية للفطر *A. pullulans*

| العزلة | الكتلة الحيوية غم / لتر | ألفا-اميليز | | الأس الهيدروجيني النهائي |
|---|---|---|---|---|
| | | وحدة / مل | وحدة / غم كتلة حيوية | |
| العزلة المحلية | 6.20 (0.089) | 4.4 (0.008) | 709.68 | 7.38 (0.076) |
| العزلة الأجنبية | 6.851 (0.125) | 4.08 (0.026) | 595.62 | 6.83 (0.097) |

كل قيمة هي معدل لثلاث مكررات ..... أما الارقام بين القوسين تمثل الانحراف المعياري (S.D.).

## المصادرالعربية

قاسم , محمد بشير إسماعيل ورشيد صفاء إسماعيل , 2004. إنتاج السكر المتعدد البوليولان من عزلات محلية للفطر *Aureobasidium pullulans* . المجلة العراقية للعلوم الزراعية . المجلد 5 , ص 58-62.

## REFERENCES

Dennis, C. and R. W. M . Buhagiar, 1973 . Comparative study of *Aureobasidium pullulans , A . pranorum sp.* nov and *Thichosporon pullulans* . Trans. of British Mycol. Society . 60 : pp.567-575 .

Deshpande, M. S. ; V. B. Rale, and V. B. Lynch, 1992 . *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology : A status report . Enzyme and Microbial Technology. 14 : pp.514 – 527 .

Federici, F. and M. Delia, 1983 . Growth and amylotic activity of *Aureobasidium pullulans* in starch – limited culture . Enzyme and Microbial Technology. 5 : pp.225-226 .

Federici, F. ,1982 . Extracellular enzymatic activities in *Aureobasidium pullulans* . Mycologia . 74 : pp.738-743

Gadd, G. M. , 1980. Melanin production and differentiation in batch cultures of polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*. FEMS Microbiology Letters . 9 : pp.237 – 240 .

Kassim, M. B. I. and R. H. Sultan, 1997 . Pullulan production from sugar beet molasses. Qatar University Science Journal. 17 : pp.313 – 320 .

Leathers, T. D. ; Nofsinger, G. W. ; Kurtzman, C. P. and R. J. Bothast, 1988. Pullulan production by color variant of *Aureobasidium pullulans* . J. of Industrial Microbiology . 3 : pp.231-239 .

Lee, J. W. ;Yeomans W. G. ; Allen, A. L. ; Deng, F. ; Gross, R. A. and D. L. Kuplan ,1999. Biosynthesis of novel exopolymers by *Aureobasidium pullulans* . Appl. Environ. Microbiol. 65 : pp.5265-5271.

Miller, G. L. , 1959. Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry . 31 : pp. 426 – 428 .

Moreira, F. G. ; Lenartovicz V. ; Desouza, C. G. M. ; Ramos, E. P. and R. M. Peralta, 2001. The use of α-Methyl-D-glucoside, a synthetic analogue of maltose, as inducer of amylase by *Aspergillius sp.* in solid-state and submerged fermentation . Brazilian J. of Microbiology. 32 : pp. 15-19.

Okagbue, R. N. ; Mwenje, T. ; Kudange, T. ; Siwela, M. and T. Sibanda, 2001. Isolation of *Aureobasidium pullulans* from Zimbabwean sources and glucosidase activities selected isolates . South African Journal of Botany. 67 : pp.157-160 .

Pollock, T. J. ; Thorne, L. and R. W. Armentrout, 1992. Isolation of new *Aureobasidium* strains that produce high molecular weight pullulan with reduced pigmentation . Appl. Environ. Microbiol. 58 : pp.877- 883 .

Saha, B. C. ; Silman, R. W. and R. J. Bothast, 1993. Amylolytic enzymes production by a color variant strain of *Aureobasidium pullulans* . Current Microbiology. 26 : pp.267 – 273 .

Saha, B. C. ; Freer, S. N. and R. J. Bothast, 1994. Production, purification and properties of thermostable β–glucosidase from a color variant strain of *Aureobasidium pullulans* . Appl. Environ. Microbiol. 60 : pp.3774-3780 .

Shabtai, Y. and I. Makmenev, 1995. Enhanced production of pigment-free pulllan by a morphogenetically arrested *Aureobasidium pullulans* (ATCC 42023) in a two-stage fermentation with shift soybean oil to sucrose. Appl. Microbial. Biotechnol. 43 : pp.595-603 .

Sugimoto, K. , 1979. Pullulan, production and application . J. of Fermen. Assoc. of Japan . 36 : pp.98 – 108 .