مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية
المجلد 42 العدد 1 (2026): 71-80

Damascus University Journal of Agricultural Sciences
Vo 41 No.1 (2026): 71-80

استخدام قشور الموز كركيزة لإنتاج الأميلاز من عزلات محلية لبكتيريا *Bacillus* وتحديد الظروف المثلى لعمل الأنزيم

رأفت معين اسماعيل[1*]

[1*]مدرس في قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة – جامعة دمشق. تقانات حيوية
rafat.es@damascusuniversity.edu.sy

الملخص:

نفذ هذا البحث في مخابر قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة – جامعة دمشق، حيث تم الكشف عن انتاج أنزيم الأميلاز من **14** عزلة بكتيرية تم عزلها من عينات تربة مختلفة باستخدام طريقة الوسط الصلب **(Plate assay method)**. أبدت **7** عزلات فقط **(50)%** من هذه العزلات قدرتها على إنتاج أنزيم الأميلاز، اختيرت العزلات الأعلى انتاجاً تبعاً لقطر الهالة المتشكلة حول مستعمراتها على الطبق الصلب فكانت ثلاث عزلات, صنفت هذه العزلات الثلاثة فكانت جميعها من جنس ***Bacillus***، تم تحديد نوعها باستخدام نظام **API 50 CHB** حيث تبين أنها جميعاً من نوع ***B. subtilis***. اختيرت العزلة التي أعطت أعلى فعالية على الطبق وكانت (العزلة **A4**). قدرت فعالية الأنزيم المنتج باستخدام قشور الموز كمصدر وحيد للكربون وكانت الفعالية الأنزيمية **43.17** وحدة أنزيمية/مل. تم توصيف أنزيم الأميلاز الذي تم الحصول عليه من هذه العزلة بدراسة الظروف المثلى لعمل هذا الأنزيم حيث كانت أعلى فعالية لهذا الأنزيم عند درجة **pH 8.0** (**44.09** وحدة أنزيمية/مل) ودرجة الحرارة **45** °م (**44.83** وحدة أنزيمية/مل).

الكلمات المفتاحية: أميلاز – ***Bacillus* sp.** – قشور الموز – توصيف.

تاريخ الايداع:2023/11/12
تاريخ القبول: 2023/12/13

حقوق النشر: جامعة دمشق –سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص **CC BY-NC-SA 04**

Using Banana Peels As a Substrate For the Production of Amylase From Local Isolates of *Bacillus* And Characterization Of The Enzyme

تعليق عليه [m1]: Using banana peels as a substrate for the production of amylase from local isolates of Bacillus and determining the enzyme optimal conditions

Rafat Moeen Esmail[*1]
[1]*Lecturer at Food Science department – Agriculture faculty – Damascus University. Biotechnology rafat.es@damascusuniversity.edu.sy

Received: 12/11/2023
Accepted: 13/12/2023

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Abstract:

This research was carried out in the laboratories of food science department at faculty of agriculture – Damascus University. The amylase enzyme production was detected from 14 bacterial isolates isolated from different soil samples using the plate assay method. Only 7 isolates (50%) of these isolates showed their ability to produce the amylase. The highest-producing isolates were selected based on the diameter of clear hydrolization halo formed around their colonies on the plate, and were three isolates. Based on morphological and chemical characteristics and the API 50 CHB system, 3 strains were identified as *Bacillus subtilis*. The isolate which had the biggest halo on the plate (A4) was selected for further studies. The activity of the enzyme produced using banana peels as the sole carbon source was estimated and the enzyme activity was 43.17 U/ml. Optimum temperature and pH for enzymatic activity of this strain were pH 8.0 (44.09 U/ml) and 45 °C (44.83 U/ml).

Key Words: Amylase – Bacillus Sp. – Banana Peel – Characterization.

عليه تعليق [m2]: the

الدراسة المرجعية:

تعتبر أنزيمات الأميلاز من الأنزيمات الصناعية المهمة وتشكّل حوالي ربع المبيعات الكلية من الأنزيمات عالمياً **(Burhan *et al*., 2003)**. تعمل أنزيمات الأميلاز على تفكيك الروابط الغليكوزيدية في جزيئات النشاء منتجة ديكسترينات وسكريات مركبة **(Sundarram and Murthy, 2014)**.

تُقسم أنزيمات الأميلاز إلى مجموعتين، المجموعة الأولى هي **endoamylase** أو (**α**− أميلاز) والمجموعة الثانية هي **exoamylase** أو (**β**− أميلاز وغلوكوأميلاز و**α**−غلوكوزيداز). تعمل أنزيمات إندوأميلاز على حلمهة سلسلة الغلوكوز في حبيبة النشاء من الداخل منتجة سلاسل ذات أطوال مختلفة، أما أنزيمات إكسوأميلاز فتعمل بالقرب من النهايات غير المرجعة لسلاسل الغلوكوز في جزيئة النشاء وتكون نواتج حلمهتها منخفضة الوزن الجزيئي مثل الغلوكوز والمالتوز **(Dash *et al*., 2015)**.

يتم الحصول على أنزيمات الأميلاز من مصادر مختلفة منها مصادر نباتية ومصادر حيوانية ومصادر ميكروبية، تعتبر المصادر الميكروبية أكثر المصادر فعالية في إنتاج الأميلاز مقارنة بالمصادر الأخرى من الناحية الاقتصادية وسرعة وسهولة الإنتاج **(Burhan *et al*., 2003)**. تُفرَز أنزيمات الأميلاز خارجياً من قبل الأحياء الدقيقة وتوجد داخل الخلايا النباتية. تعتبر الفطور والبكتيريا من أهم الأحياء الدقيقة المنتجة للأميلاز **(Sundarram and Murthy, 2014)**. من أهم النباتات القادرة على إنتاج هذا الأنزيم الفاصولياء **(Suarni *et al*., 2007)** والمانجو **(Afiukwa *et al*., 2009)** وأنواع الذرة والبطاطا الحلوة **(Nabubuya *et al*., 2011)** و**(Chalse *et al*., 2016)**. يتم الحصول على أنزيم الأميلاز من النباتات بعملية الاستخلاص بينما يتم الحصول عليها من الأحياء الدقيقة بطريقة العزل من وسط النمو، وقد يحتوي وسط النمو إما ركائز اصطناعية أو ركائز طبيعية نباتية. يمكن أن تستخدم مخلفات بعض الأغذية كركيزة لإنتاج أنزيم الأميلاز بواسطة الأحياء الدقيقة، حيث تشكّل هذه المخلفات المصدر الرئيسي للكربون اللازم لنمو الأحياء الدقيقة وإفراز الأنزيم.

يعرف الجنس ***Bacillus*** بقدرته على الإفراز الخارجي لأنواع مختلفة من أنزيمات الأميلاز ذات الأهمية الصناعية الكبيرة **(Swain *et al*., 2006)**. الأنواع الرئيسية من بكتيريا ***Bacillus*** المستخدمة في إنتاج الأنزيمات الصناعية هي ***Bacillus subtilis*** و***Bacillus amyloliquefaciens*** و***Bacillus licheniformis*** **(Das *et al*., 2004)**.

تعد بكتيريا ***Bacillus sp.*** من البكتيريا المنتجة لأنزيم الأميلاز بكميات مرتفعة والتي يتم عزلها عادة من التربة **(**Rehman and Saeed**., 2015)**. تستخدم الأنزيمات المنتجة من مصادر ميكروبية بشكل واسع في المجالات الصناعية المختلفة بسبب انخفاض تكاليف إنتاجها وفعاليتها المرتفعة وثباتها الكيميائي وتوفرها **(Mishra and Behera, 2008)**.

تنتج حالياً على المستوى التجاري كميات كبيرة من أنزيمات الأميلاز الميكروبية ويعتمد عليها في عمليات حلمهة النشاء بدلاً من الطرائق الكيميائية المتبعة سابقاً **(Pandey *et al*., 2000)**.

لأنزيم الأميلاز استخدامات صناعية مهمة كما في صناعات النسيج والورق والمنظفات **(Angelia *et al*., 2019)** والصناعات التخميرية مثل تخمير الكحول **(Verma et al., 2011)**، إضافة إلى أهميته في الصناعات الغذائية كما في تحضير المخبوزات وصناعة الشوكولا **(Saini *et al*., 2017)** وإنتاج الشرابات عالية الفركتوز **(Baltaci *et al*., 2017)**. عمل **Ardhi** وآخرون **(2020)** على انتاج أنزيم الأميلاز من بكتيريا ***Bacillus licheniformis*** المتحملة لدرجات الحرارة المرتفعة والمعزولة من مياه نبع حار بفعالية **200** وحدة أنزيمية/مل. كما أنتج **Angelia** وآخرون **(2019)** أنزيم الأميلاز من فطر ***Aspergillus niger*** تم عزله من مخلفات نباتية استخدمت في تركيب وسط النمو. توصل **Ire** وآخرون **2020** إلى إنتاج أنزيم الأميلاز من فطر ***Aspergillus flavus*** المعزول من التربة ومن مواقع مختلفة لمعالجة مخلفات المياه، حيث أبدى الأنزيم فعالية قدرها **2.3** وحدة أنزيمية/مل. بينما أكد **Deljou** و**Arezi 2016** أن استخدام المصادر البكتيرية لإنتاج أنزيم الأميلاز أفضل من استخدام المصادر الفطرية بسبب قدرة خلاياها على النمو السريع وتضاعفها.

تسهّل عملية غربلة العزلات الميكروبية وانتخاب العزلات الأعلى قدرة على إنتاج أنزيمات الأميلاز من اكتشاف أنزيمات مميزة مناسبة للاستخدام في تطبيقات صناعية محددة **(Wanderley *et al*., 2004)**.

تعتبر قشور الموز من المخلفات النباتية التي ترمى بعد استهلاك ثمار الموز أو استخدامها في تحضير منتجات غذائية مختلفة مما يجعلها مصدراً للتلوث البيئي. للاستفادة من هذه القشور والحد من تأثيرها السلبي في البيئة بمكن استخدامها في تطبيقات صناعية مختلفة مثل إنتاج الكحول وبعض الأنزيمات مثل اللاكاز والأميلاز **(Johann *et a*l., 2007)**.

هدف هذا البحث إلى دراسة إمكانية الاستفادة من قشور ثمار الموز في انتاج أنزيم الأميلاز بواسطة عزلات بكتيرية معزولة محلياً واختيار العزلات الأعلى إنتاجاً للأنزيم وتوصيف هذا الأنزيم لتحديد أفضل ظروف عمله من حيث درجة الحرارة ودرجة الـ **pH**.

مواد البحث وطرائقه:

نفذ هذا البحث في مخابر قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة – جامعة دمشق في النصف الثاني من عام **2023**.

جمع العينات

جُمعت عينات التربة من مناطق مختلفة من مدينة دمشق وريفها، وضعت في أكياس معقمة من البولي إيتيلين، ونقلت مباشرة إلى مخابر قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة – جامعة دمشق لحفظها مبردة إلى حين إجراء التجربة.

العزلات البكتيرية

تم الحصول على عزلات بكتيرية مجهولة لاختبار قدرتها على انتاج أنزيم الأميلاز تم عزلها من عينات تربة جمعت من مناطق مختلفة من مدينة دمشق وريفها (برزة، العدوي، دوما).

نُفذت عملية العزل بتحضير معلق من هذه العينات في ماء معقم ومزجت جيداً، وحضنت بدرجة حرارة **100** ºم لمدة **5** دقائق للتخلص من البكتيريا غير المتبوغة والإبقاء على البكتيريا المتبوغة فقط، ثم زرعت على وسط مغذي صلب **(LB Agar)** بدرجة حرارة **37** ºم لمدة **24** ساعة.

الحصول على المزرعة النقية

زرعت المستعمرات المختلفة عن بعضها بالشكل على وسط مغذي صلب بنفس الظروف السابقة، وحفظت العزلات النقية في وسط مغذي يحتوي **40%** غليسرول في الدرجة (**−20** ºم). للوصول إلى جنس العزلات البكتيرية تم دراسة الاختبارات الشكلية والحيوية للعزلات المختارة (التي أعطت أعلى فعالية على الطبق الصلب) اعتماداً على **(Bergey and Holt, 2000)**، وباستخدام نظام **API 50 CHB** لتحديد نوعها.

الركيزة وتحضير وسط الإنتاج:

تم الحصول على ثمار الموز الناضجة من السوق المحلية في مدينة دمشق، قُشّرت وتم فصل اللب عنها. نُظفت القشور بغسلها بتيار من الماء الجاري ومن ثم قطعت إلى قطع صغيرة، وطحنت باستخدام مطحنة صناعية محلية الصنع. تم تعقيم ناتج عملية الطحن بالأوتوغلاف للتخلص من أي تلوث ميكروبي ولتثبيط أنزيم بولي فينول أوكسيداز والأنزيمات الأخرى الموجودة فيه. حُضّر وسط الإنتاج من كبريتات الأمونيوم $(NH_4)_2SO_4$ **1%**، نترات الأمونيوم NH_4NO_3 **1%**، كبريتات المغنيزيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$ **1%**، استخدمت كل من كبريتات الأمونيوم ونترات الأمونيوم كمصدر للآزوت بينما استخدمت كبريتات المغنيزيوم كمصدر للشوارد المعدنية **(Benabda *et al*., 2009)**.

غربلة العزلات المنتجة للأميلاز بطريقة الوسط الصلب Plate Assay Method

تم تحديد قدرة العزلات البكتيرية الـ **(14)** على إنتاج أنزيم الأميلاز عن طريق زراعة معلق بكتيري **(10^6 cell/ml)** من كل عزلة (تم تنشيطها لمدة **24** ساعة) على وسط مغذ صلب **(pH 6.0)** معقّم بدرجة حرارة **121** ºم لمدة **15** دقيقة، يحتوي هذا الوسط على النشاء كمصدر وحيد للكربون، وحضنت الأطباق بدرجة حرارة **30** ºم لمدة **48** ساعة. يتركب هذا الوسط من **10**غ نشاء و**5**غ ببتون و**2**غ مستخلص خميرة و**0.1**غ كلوريد الكالسيوم و**0.25**غ كبريتات المغنيزيوم و**13.5**غ آغار وأكمل الحجم إلى **500** مل ماء مقطر **(Kanimozhi *et al*., 2014)**.

تم الكشف عن إنتاج أنزيم الأميلاز بغمر سطح الطبق الذي نمت عليه البكتيريا بمحلول يود لوغول (يود **0.1%** ويود بوتاسيوم **1%**) الذي يعتبر دليلاً على وجود النشاء، عند تلامس اليود مع الوسط المحتوي على النشاء يصبح لونه أزرق. في حال تحلّل النشاء أنزيمياً فإن الوسط سيكون عديم اللون وتظهر هالة شفافة حول العزلات المنتجة لأنزيم الأميلاز. يتم التخلص من محلول يود لوغول الفائض عن الطبق ويلاحظ تشكل هالات شفافة حول المستعمرات البكتيرية النامية على الوسط ذو اللون الأزرق. يشير تشكل الهالات الشفافة هذه إلى إنتاج أنزيم الأميلاز. لتحديد العزلات البكتيرية الأعلى إنتاجاً للأنزيم تم قياس قطر الهالة المتشكلة حول كل عزلة وتم حساب معدل الحلمهة بتقسيم قطر الهالة المتشكلة على قطر المستعمرة واستخدمت كدليل على فعالية العزلات في إنتاج الأنزيم حيث يتناسب قطر الهالة المتشكلة مع قدرة العزلة البكتيرية على إنتاج أنزيم الأميلاز **(Batista *et al*., 2018)**.

تحضير الأنزيم الخام:

وفقاً لطريقة **(Kanimozhi *et al*., 2014)** لقح معلق بكتيري يحتوي **10^6 Cell/ml** من العزلة المختارة (التي أبدت أعلى فعالية على الطبق) في دورق سعة **125** مل فيه **50** مل وسط مغذي سائل **(PH 6.0)** يحتوي على قشور الموز **0.5%** كركيزة، وضع الدورق في حاضنة متحركة بسرعة **150** دورة/دقيقة بدرجة حرارة **30** ºم لمدة **72** ساعة، تم الحصول على الطبقة الطافية الحاوية على الأنزيم بتثفيل الوسط بسرعة **10000** دورة/دقيقة لمدة **10** دقائق بدرجة حرارة **4** ºم، واعتبرت مستخلصاً للأنزيم الخام الذي أجريت الدراسة عليه لاحقاً.

تقدير الفعالية الأنزيمية:

تم تقدير الفعالية الأنزيمية لأنزيم الأميلاز بطريقة المطيافية الضوئية باستخدام النشاء المنحل كركيزة. اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل **Gomes** وآخرون **(2001)** مع تعديل بسيط، حيث حُضّر محلول نشاء بتركيز **1%** في موقي فوسفات الصوديوم **(0.05 M)** بدرجة **pH 6.9**. تم تجهيز مزيج التفاعل بإضافة **0.5** مل محلول الركيزة إلى **0.5** مل من المستخلص الأنزيمي، حضن المزيج لمدة **10** دقائق بدرجة حرارة **50** ºم، ومن ثم تم إيقاف التفاعل بإضافة **1** مل من حمض **DNSA** (ثنائي نترو حمض الساليسيليك) وضعت الأنابيب في حمام مائي بدرجة الغليان لمدة **5** دقائق ثم بردت بدرجة حرارة الغرفة. تم قياس الامتصاصية الضوئية لتقدير السكريات المرجعة عند طول موجة **540** نانوميتر وفقاً لطريقة **Miller (1959)**. تم التعبير عن الوحدة الأنزيمية لأنزيم الأميلاز من خلال تقدير كمية الأنزيم اللازمة لتحرير **1** ميكرومول من السكر المرجع (المالتوز) في الدقيقة.

توصيف أنزيم الأميلاز الخام:

حُدّدت الظروف المثلى لعمل أنزيم الأميلاز الخام بتحضين الأنزيم لمدة **10** دقائق عند قيم مختلفة من درجات الـ **pH** ودرجات الحرارة. قدرت الفعالية الإنزيمية عند درجات **pH** بين **(4-10)** حيث استخدمت محاليل موقية مختلفة، منها موقي **(0.1M Tris-HCl)** لمجال الـ **pH** بين **(8-10)** وموقي **0.1M Citrate-Phosphate** لمجال الـ **pH** بين **(4-7)**. كما قُدّرت الفعالية الأنزيمية عند درجات حرارة مختلفة **(25-70)** ºم **(Rashmi *et al*., 2020)**.

النتائج والمناقشة:

تم الحصول على **(14)** عزلة بكتيرية مجهولة لاختبار قدرتها على إنتاج أنزيم الأميلاز عُزلت من **(49)** عينة تربة تم جمعها من مناطق مختلفة من مدينة دمشق وريفها.

يبين الجدول **(1)** أن **7** عزلات بكتيرية فقط من أصل **14** عزلة بكتيرية (تشكل **50%**) كانت قادرة على إنتاج أنزيم الأميلاز من خلال وجود هالات شفافة متشكلة حول مستعمراتها على الطبق.

تشير الأقطار المختلفة للهالات المتشكلة حول المستعمرات البكتيرية على الطبق إلى قدرة العزلات البكتيرية على حلمهة النشاء الموجود في وسط النمو من خلال إفرازها لأنزيم الأميلاز **(Gopinath *et al.*, 2003)**. توضح النتائج الواردة في الجدول **(1)** أن العزلات **A4** و**A6** و**A1** أبدت أعلى معدل حلمهة للنشاء **1.92** و**1.60** و**1.38** على الترتيب، والتي تتوافق مع أقطار الهالات المتشكلة حول مستعمراتها على الطبق بمقدار **25** مم و**24** مم و**22** مم على التوالي، بينما افتقرت العزلات التي لم تُظهر هالات شفافة حول مستعمراتها على الطبق إلى القدرة على إفراز أنزيم الأميلاز. تتوافق هذه النتائج مع كل من **(Singh *et al.*, 2015)** و**(Garba *et al.*, 2021)** الذين استخدموا وسط النشاء مع محلول اليود لكشف العزلات البكتيرية المنتجة لأنزيم الأميلاز من خلال تشكل هالات شفافة حول مستعمراتها على الطبق.

الجدول (1): أقطار الهالات المتشكلة حول المستعمرات البكتيرية.

رمز العزلة	قطر المستعمرة (مم)	قطر الهالة (مم)	معدل الحلمهة
A1	**16**	**22**	**1.38**
A2	**18**	**21**	**1.17**
A3	**14**	**17**	**1.21**
A4	**13**	**25**	**1.92**
A5	**14**	**15**	**1.07**
A6	**15**	**24**	**1.60**
A7	**13**	**15**	**1.15**

عليه تعليق [m3]: كيف تم تحديد معدل الحلمهة؟

تحديد هوية العزلة البكتيرية الأعلى انتاجاً

صُنّفت العزلات البكتيرية التي شكلت أكبر هالات على الطبق، حيث اعتمد تصنيف **(Bergey and Holt, 2000)** لتحديد جنس هذه العزلات، بينت نتائج دراسة الصفات الشكلية والحيوية لهذه العزلات أن جميعها من جنس ***Bacillus***. يوضح الجدول **(2)** الصفات الشكلية والحيوية لهذه العزلات. لتحديد نوع هذه العزلات استخدم نظام **API 50 CHB** فكانت العزلات الثلاثة من نوع ***B. subtilis***.

الجدول (2): نتائج الاختبارات الشكلية والحيوية للعزلات المختارة.

الاختبار	النتيجة
الشكل	عصوية
الأبواغ	متبوغة
صبغة غرام	موجبة
هوائية	+
الحركة	متحركة
اختبار الكاتالاز	+
اختبار الأوكسيداز	+
إرجاع النترات	+
غاز H_2S	+
الإندول	–
تخمير اللاكتوز	+
تخمير الغلوكوز	+
اختبار اليوريا	+

الفعالية الأنزيمية:

قدرت الفعالية الأنزيمية وكمية سكر المالتوز المتحررة بواسطة العزلات البكتيرية بعد **24** ساعة من التحضين. يُظهر الجدول **(3)** الفعاليـة الأنزيميـة للعـزلات البكتيريـة **A1** و**A4** و**A6**. كـان للعزلـة **A4** أعلـى فعاليـة لأنـزيم الأمـيلاز بمقـدار **(43.17)** وحـدة أنزيمية/مل، وللعزلة **A6** فعالية أنزيمية قدرها **(41.99)** وحدة أنزيمية/مل، ثم العزلة **A1** بفعالية قدرها **(40.47)** وحدة أنزيمية/مل، في حين كانت أقل فعالية أنزيمية **(35.84)** وحدة أنزيمية/مل) للعزلة **A5**. استخدم **Noreen** وآخرون **(2002)** قشور الموز لإنتاج أنزيم الأميلاز من بكتيريا ***Bacillus subtilis*** بطريقة التخمير بالوسط الصلب وكانت الفعالية الأنزيمية **10.25** وحدة أنزيمية/مل. تقاربت نتائج الفعالية الأنزيميـة للعزلات البكتيريـة المدروسـة مـن النتـائج التـي حصـل عليهـا **Dike** وآخـرون **(2022)** وكانـت أعلـى ممـا توصـل اليـه **(Pranay *et al.*, 2019)** الذي عزل **6** عزلات بكتيرية ***Bacillus* sp.** من التربة بفعالية أنزيمية حوالي **18** وحدة أنزيمية/مل.

الجدول (3): الفعالية الأنزيمية للعزلات البكتيرية المدروسة.

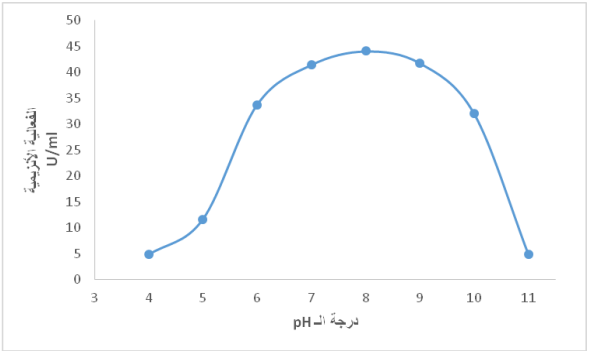
العزلة البكتيرية	كمية سكر المالتوز المتحررة (ميكرومول/مل)	الفعالية الأنزيمية (وحدة أنزيمية/مل)
A1	61.13	40.47
A2	59.52	39.16
A3	56.73	37.06
A4	65.16	43.17
A5	54.48	35.84
A6	64.25	41.99
A7	55.67	36.63

توصيف أنزيم الأميلاز:

حُدّدت الظروف المثلى لفعالية أنزيم الأميلاز المُنتج من العزلة **A4** بدراسة تأثير عدد من المتغيرات (درجة الـ **pH** ودرجة الحرارة) في فعالية هذا الأنزيم.

تأثير درجة الـ pH في فعالية أنزيم الأميلاز:

بدراسة تأثير درجة الـ **pH** في فعالية أنزيم الأميلاز (المنتج من العزلة **A4**) في مجال من درجات **pH** يتراوح بين **(4-11)** عند درجة حرارة **50** °م، كانت درجة الـ **pH** المثلى لعمل الأنزيم هي **8.0 pH** حيث سجلت **(44.09** وحدة أنزيمية/مل)، وكانت أقل فعالية أنزيمية **(4.81** وحدة أنزيمية/مل) عند درجة **4.0 pH**، تراجعت الفعالية مع ارتفاع درجة الـ **pH** عن الدرجة المثلى كما يوضح الشكل **(1)**، اختلفت هذه النتائج عما توصل إليه **Hamilton** وآخرون **(1999)** بأن درجة الـ **pH** المثلى لأنزيم الأميلاز المنتج بواسطة بكتيريا ***Bacillus sp.*** كانت **6.0** وقد يعزى ذلك الى اختلاف مصدر الحصول على العزلات البكتيرية وبالتالي تغير صفاتها الوراثية.



الشكل (1): تأثير درجة الـ PH على فعالية أنزيم الأميلاز.

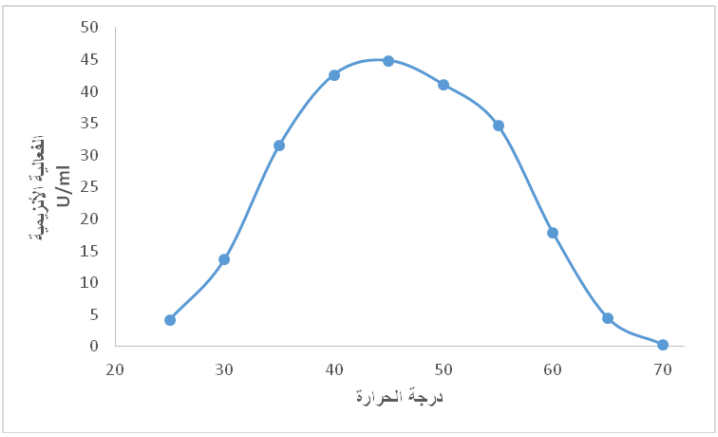
عليه تعليق [m4]: كيف تم تقدير سكر المالتوز؟

عليه تعليق [m5]: ما هي درجة الحرارة المستخدمة؟

عليه تعليق [m6]: ما هو السبب؟

تأثير درجة الحرارة في فعالية أنزيم الأميلاز:

أظهرت نتائج دراسة تأثير درجة الحرارة في فعالية أنزيم الأميلاز المُنتج من العزلة **A4** والتي أجريت في مجال من درجات الحرارة بين **(25-70)** ºم وعند درجة **pH 8.0**، أن فعالية الأنزيم ازدادت مع ارتفاع درجة الحرارة حتى وصلت إلى أعلى قيمة **(44.83** وحدة أنزيمية/مل) عند درجة الحرارة **45** ºم ثم انخفضت مع استمرار ارتفاع درجة الحرارة حتى انعدمت الفعالية عند درجة الحرارة **70** ºم. كانت درجة الحرارة المثلى لعمل أنزيم الأميلاز أقل مما ذكره **Mamo** وآخرون **(1999)** لنفس الأنزيم المنتج بواسطة بكتيريا ***Bacillus sp.*** حيث كانت **55** ºم، ويعود ذلك الى اختلاف الصفات الوراثية بين العزلات البكتيرية المدروسة. يوضح الشكل **(2)** تأثير درجة الحرارة في فعالية الأنزيم حيث يبين أن درجة الحرارة **45** ºم هي المثلى لعمل أنزيم الأميلاز، كما يبين انخفاض الفعالية مع ارتفاع درجة الحرارة حيث لم تُسجّل أي فعالية عند درجة الحرارة **70** ºم، وهذا يعود إلى تشوه بنية الأنزيم البروتينية عند درجات الحرارة المرتفعة حيث يصبح غير قادر على تحفيز التفاعل الكيميائي.



الشكل (2): تأثير درجة الحرارة على فعالية أنزيم الأميلاز.

الاستنتاجات:

1. إنتاج أنزيم الأميلاز من عدة عزلات بكتيرية معزولة من مصادر محلية مختلفة.
2. العزلات البكتيرية التي شكلت أكبر هالات على الطبق كانت ***Bacillus subtilis***.
3. إمكانية استخدام قشور الموز لإنتاج أنزيم الأميلاز بفعالية عالية.
4. الظروف المثلى لعمل أنزيم الأميلاز المنتج من العزلة **A4** هي **pH 8.0** ودرجة حرارة **45** م.

معلومات التمويل: تم تمويل هذا البحث من قبل جامعة دمشق وفق رقم الممول 501100020595.

References:

1. Afiukwa C., Ibiam U., Edeogu C., Nweke F., Chukwu U. (2009). Determination of amylase activity of crude extract from partially germinated mango seeds (*Mangifera oraphila*). African *Journal of Biotechnology*, 8(14), pp. 3294–3296.
2. Angelia C., Sanjaya A., Tanudjaja E., Victor H., Cahyani A.D., Tan T.J., Pinontoan R.. (2019). Characterization of Alpha-Amylase from *Aspergillus niger* Aggregate F Isolated from a Fermented Cassava Gatot Grown in Potato Peel Waste Medium. *Microbiol. Biotechnol. Lett*. 47(3): 364–371.
3. Ardhi A, Sidauruk AN, Suraya N, Pratiwi NW, Pato U, Saryono. (2020). Molecular identification of amylase-producing thermophilic bacteria isolated from Bukit Gadang Hot Spring, West Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas*. 21: 994-1000.
4. Baltaci MO, Genc B, Arslan S, Adiguzel G, Adiguzel A. (2017). Isolation and Characterization of thermophilic Bacteria from Geothermal Areas in Turkey and Preliminary Research on Biotechnologically Important Enzyme Production. *Geomicrobiol J*. 2017; 34(1): 53-62.
5. Batista E., Watanabe JYM, Oliveira VM, Passarini MRZ. (2018). Avaliaçao da produçao de amilase e protease por bacterias da Antartica. *Revista Brasileira de Iniciaçao Científica*. 5: 13–29.
6. Benabda O., Mhir S., Kasmi M., Mnif W., Hamdi M. (2009). Optimization of protease and amylase of Biotechnology, 8(14), pp. 3294–3296.
7. Bergey, D.H., and Holt, J.G. (2000). Bergey's manual of determinative bacteriology: Philadelphia, *Lippincott Williams & Wilkins*.
8. Burhan A, Nisa U, Gokhan C, Ashabil A, Osmair G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable thermophilic alkaline and chelator resistant amylase from an alkaphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Proc. Biochem*. (38): 1397–1403.
9. Chalse M.N, Suryawanshi D.K., Kharat R.B., Mundhe T.S., Shinde P.P., Jogdand K.B, Rathod R.V. (2016). Extraction and partial purification and kinetic study of beta amylase from sweet potato. *Journal of Global Bioscience*, 5(4), pp. 3892–3901.
10. Das K., Doley R., Mukherjee A.K. (2004). Purification and biochemical characterization of a thermostable, alkalophilic, extracellular α-amylase from *Bacillus subtilis* DM-03, a strain isolated from the traditional fermented foods of India. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 40:291-298.
11. Dash BK, Rahman MM, Seker PK (2015). Molecular identification of a newly isolated *Bacillus subtilis* BI19 and optimization of production conditions for enhanced production of extracellular amylase. *Biomed Res Int*. 859805: 9.
12. Deljou A, Arezi I. (2016). Production of thermostable extracellular a-amylase by a moderate thermophilic *Bacillus licheniformis*-AZ2 isolated from Qinarje Hot spring (Ardebil prov. of Iran). *Period Biol*. 118(4): 405-416.
13. Garba L, Ibrahim MM, Sahara EK, Adamu MT, Isa S, Yarma AA. (2021). Preliminary Investigation of Amylase Producing-Bacteria from Soil in Gombe Metropolis. *Journal of Environmental Bioremediation and Toxicology*. 4(1): 1-3.
14. Gomes I., Sultana M., Uddin K., Gomes J., Steiner W., Gomes D.J., (2001). Nutrient composition and fermentation conditions for α-amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bangladesh J. Microbiol.*, 18, 141–150.
15. Gopinath SCB, Hilda A, Lakshmi PT, Annadurai G, Anbu P. (2003). Purification of lipase from Geotrichum candidum: conditions optimized for enzyme production using Box-Behnken design. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19(7): 681–689.
16. Hamilton L.M., Kelly CT., Fogarty W.M. (1999). Production and properties of the raw starch digesting alpha-amylase of *Bacillus sp.* Ind. 435. *Process Biochemistry*. 35 (1-2):27-31.
17. Ire FS, Wokoma SI, Okoli AO. (2020). Isolation, Screening and Time Course Study of Amylase-producing Fungi from Garri Processing Environment. *Journal of Life and Bio-sciences Research*. 1(2): 68 –75.
18. Johann F O, Jose L, Herrera T, Couto S R. (2007). Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration, *Dyes Pigm*, 75: 32 – 37.

19. Kanimozhi M, Midhusha J, Gayathri N, Subashkumar R. (2014). Optimization and Production of α - Amylase from Halophilic Bacillus Species Isolated from Mangrove Soil Sources. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*. 2(3): 70-73.
20. Mamo G., Gashe BA., Gessesso A. (1999). A highly thermostable amylase from a newly isolated thermophilic *Bacillus sp.* Wanll. *J. Appl. Microbial*. 86(4):557-560.
21. Miller G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, 31, 426–428.
22. Mishra S. and Behera N. (2008). Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving Kitchen wastes. *African Journal of Biotechnology* 18:3326-3331.
23. Nabubuya A., Namutebi A., Byaruhanga Y., Narvhus J., Stenstrom Y., Wicklund T. (2011). Amylolytic activity in selected sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) varieties during development and in storage. *Food and Nutrition Sciences*, 3, pp. 660–668.
24. Noreen R., Asghar M., Asad M.J.and Adedayo O. (2002). Production of a-Amylase from Banana Peel by *Bacillus subtilis*. *Pak.* J. *Agri. Sci., Vol.* 39(4).
25. Pandey A, Nigam P, Soccol C, V Singh and Mohan R (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 31:133-152.
26. Pranay K, Padmadeo SR, Jha V, Prasad B. (2019). Screening and identification of amylase producing strains of Bacillus. *J Appl Biol Biotech*. 0 (00): 1-6.
27. Rashmi Rathour, Juhi Gupta, Bhawna Tyagi, Indu Shekhar Thakur (2020). Production and characterization of psychrophilic α-amylase from a psychrophilic bacterium, *Shewanella* sp. ISTPL2. *De gruyter*. 4: 1-10.
28. Rehman A., Saeed A. (2015). Isolation and screening of amylase producing *Bacillus* species from soil. *International Journal of Advanced Research*. 3(4): 151-164.
29. Saini R., Saini H.S., Dahiya A. (2017). Amylases: characteristics and industrial applications. *Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(6), pp. 1865–1871.
30. Singh V, Sharma R, Sharma P. (2015). Isolation, screening and optimization of amylase producing Bacillus sp. from soil. *Asian Pac J Health Sci*. 2015; 2(3): 94-103.
31. Suarni, R. Patong, T. (2007). Potency of mung bean sprout as enzyme source (alpha-amylase). *Indo. J*., pp. 332–336.
32. Sundarram, T.P. Murthy K. (2014). Alpha amylase production and applications: a review. *Applied & Environmental Microbiology*, 2(4): 166–175.
33. Swain M.R, Kar S., Padmaja G., Ray R.C. (2006). Partial purification and optimization of production α-amylase from *Bacillus subtilis* isolated from culturable cow dung microflora. Polish. *Journal of Microbiology* 55:289-296.
34. Verma V, Avasti MS, Gupta AR, Singh M, Kushwaha A. (2011). Amylase production and purification from bacterial isolates from a waste potato dumpsite in district Farrukhabad U.P State India. Eur. *J. Experimental Bio*. 1(3): 107-113.
35. Wanderley KJ, Torres FAG, Moraes VK, Ulhoa CJ (2004). Biochemical characterization of α-amylase from yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiological Letters.* 231:165-169.