Study of some factors affecting xylanase production of a local isolate of the species *Aspergillus niger*

Dr. Samaher Sakkour*
Dr. Noha Alio**

(Received 25 / 3 / 2026. Accepted 1 / 6 /2026)

□ ABSTRACT □

The ability of a local isolate of *Aspergillus niger* to produce xylanase was tested. The submerged fermentation method was carried out at a temperature of 28°C, and a concentration of 2.5 g/L of corn cobs for a period of 5 days. Enzyme activity was measured using DNS in the presence of the Birchwood xylan substrate. The protein content in the enzyme extract was estimated. Some incubation factors affecting xylanase production were studied using the OFAT method. Where the effect of incubation temperature was tested at four degrees: 20, 25, 30, and 35 °C. Concentrations of 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, and 4 g/L of corn cobs added to the fermentation medium were used as enzyme substrates, and the effect of incubation time of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8 days was also studied.

The isolate showed the ability to produce the enzyme. The enzyme activity of the produced xylanase reached 17.1 unit/ml^{-1}, and the protein concentration in the enzyme extract was 0.25 mg/ml^{-1}. The specific activity reached 68.4 unit/ mg^{-1}. The optimal temperature that gave the highest activity (18.2 unit/ml^{-1}) was 25 °C, while the activity decreased with increasing temperature gradually. The enzyme activity varied depending on the concentration of corn cobs used. The concentration of 3 g/L achieved the highest activity 18.9 unit/ml^{-1}. The enzyme activity gradually increased with the continuation of the incubation time, reaching its maximum value 19.1 unit/ml^{-1} on the sixth day, and then decreased as the incubation time continued.

Keywords: Xylanase, Enzyme Activity, Corn Cobs.

Copyright **:**Latakia University journal (formerly Tishreen) -Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

*Work Supervisor, Faculty of Agricultural Engineering, Latakia University(formerly Tishreen), Latakia, Syria. samaher.sakkour@latakia-univ.edu.sy
**Work Manager, Faculty of Agricultural Engineering, Latakia University(formerly Tishreen), Latakia, Syria. noha.alio2000@latakia-univ.edu.sy,

دراسة بعض العوامل المؤثرة في إنتاج الزيلاناز لعزلة محلية تابعة للنوع *Aspergillus niger*

د. سماهر صقور *

د. نهى عليو **

(تاريخ الإيداع 25 / 3 / 2026. قبل للنشر في 1 / 6 / 2026)

ملخّص

اختُبرت قُدرة عزلة محلية للنّوع *Aspergillus niger* على إنتاج الزيلاناز، حيث استخدمت طريقة التخمير المغمور عند درجة حرارة 28 °س وتركيز 2.5 غ/ ل من كيزان الذرة ولمدة 5 أيام، قدرت الفعاليّة الإنزيمية باستخدام كاشف حمض 3، 5- ثنائي نتروسالسيليك (DNS) وزيلان خشب البتولا كركيزة، وقُدّر تركيز البروتين في المستخلص الإنزيمي. دُرست بعض العوامل المؤثرة في إنتاج الإنزيم باتباع طريقة OFAT، إذ اختُبرت أربع درجات حرارة للتحضين 20، 25، 30، 35 °س، وسبعة تراكيز 1، 1.5، 2، 2.5، 3، 3.5، 4 غ/ ل من كيزان الذرة كركيزة للإنزيم، وأزمنة تحضين مختلفة 1، 2، 3، 4، 5، 6، 7 و8 يوم.

أظهرت العزلة المدروسة قُدرة على إنتاج الإنزيم بفعالية إنزيمية بلغت 17.1 وحدة إنزيمية. مل$^{-1}$، ووصل تركيز البروتين في المستخلص الإنزيمي الخام 0.25 مغ. مل$^{-1}$، وبفعالية نوعية 68.4 وحدة إنزيمية. مغ$^{-1}$. حققت درجة التحضين 25 °س أعلى فعالية 18.2 وحدة إنزيمية. مل$^{-1}$، ولكنها انخفضت مع ارتفاع درجة الحرارة، وتباينت الفعاليّة الإنزيمية باختلاف تراكيز كيزان الذرة وحقق التركيز 3 غ/ ل أعلى فعاليّة 18.9 وحدة إنزيمية مل$^{-1}$، ولوحظ ارتفاع الفعاليّة تدريجياً مع استمرار زمن التحضين لتبلغ حدها الأقصى 19.1 وحدة إنزيمية. مل$^{-1}$ في اليوم السادس ثم انخفضت مع الاستمرار بالتحضين.

الكلمات المفتاحية: الزيلاناز، الفعالية الإنزيمية، كيزان الذرة.

حقوق النشر : مجلة جامعة اللاذقية (تشرين سابقاً)- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

* مشرف على الأعمال، كلية الهندسة الزراعية، جامعة اللاذقية(تشرين سابقاً) ،اللاذقية، سوريا.
samaher.sakkour@latakia-univ.edu.sy،

** مدير أعمال، قسم وقاية النبات، كلية الهندسة الزراعية، جامعة اللاذقية(تشرين سابقاً) اللاذقية ، سوريا
noha.alio2000@latakia-univ.edu.sy

مقدمة:

يُعدّ الزيلاناز (Endoxylanase, EC 3.2.1.8) من الإنزيمات الهامة المستخدمة في الصناعات الغذائية المختلفة كالمخبوزات وذلك لدوره في عملية التحويل الحيوي للزيلان إلى سكريات بسيطة كالزيلوز xylose والزيلوبيوز Xylobiose والزيلوأوليغومير Xylooligomer ، وهو أحد أنواع الهيميسيللوز المتواجد في جدر الخلايا النباتية المسؤولة عن التحلل المائي الداخلي Internal Hydrolyse، حيث يحلل الزيلاناز الروابط الغلوكوزيدية في الزيلان لإنتاج سلاسل كزايلوز عديدة مختلفة الطول (الزيلوأوليغومير) [31، 8].

يتوجه الاهتمام العالمي اليوم إلى استخدام الإنزيمات المنتجة خارج الخلية من أجل خفض تكلفة إنتاجه إضافة إلى إمكانية الحصول على الإنزيم بنقاوة أعلى وتقليص خطوات عملية التنقية [3، 2]، يتم إفراز الزيلاناز خارج الخلية من قبل البكتيريا وبعض الفطريات والخمائر المختلفة [14]، ولكن يعتبر الزيلاناز المنتج من قبل الفطريات أفضل من حيث التطبيقات الصناعية بالمقارنة مع الزيلاناز المنتج من قبل البكتيريا [12]، إذ تتم إضافته إلى عصائر الفواكه وذلك بهدف تخفيض العكارة إضافة إلى زيادة نسبة السكريات المختزلة في العصير [12]، كما يلعب دوراً أساسياً في خفض اللزوجة أثناء عملية إنتاج الإيتانول والبيرة [23]، وتتم إضافة الزيلاناز إلى العجين في صناعة المخبوزات لتحسين خواص العجينة إذ تصبح أكثر مرونة وأكثر امتصاصاً للماء كما يحسن حجم المنتج النهائي وقوامه [26، 10]، وتستخدم الفطريات بشكل رئيس في إنتاجه لسهولة عزلها من جهة ولقدرتها على إنتاج الإنزيمات بنسب عالية من جهة أخرى، وذلك بعزلها من مصادر مختلفة كالتربة والبذور والثمار وغيرها [7].

تتأثر عملية أمثلة إنتاج الإنزيم بنوع الميكروب المستخدم وخصائصه ومستنبت العزل، درجة حرارة التحضين، رطوبة وقيمة pH وسط التخمير، مدة التخمير، المصادر المغذية في وسط التخمير وبشكل خاص مصدر الكربون، وتركيز المعلق البوغي [28، 5]. وجد Pirota وآخرون (2014) أنّه يمكن إنتاج الزيلاناز بطريقة التخمير الصلب (fermentation solid state) والمغمور (submerged fermentation) [24]، كما يتم إنتاجه باستخدام أوساط تركيبية تحتوي على مواد كيميائية أو باستخدام أوساط طبيعية محتوية على الهيميسيللوز لتحفيز الفطريات على إنتاج هذا الإنزيم [4]. ومنذ بداية الألفية الثانية بدأ الاتجاه نحو استخدام المخلفات الزراعية كمصدر أساسي للكربون في وسط التخمر، كان من أهمها نخالة القمح، كيزان الذرة وبذور الكاسافا [6].

هناك العديد من الأنواع الفطرية التي ثبُت إنتاجها للزيلاناز مثل أنواع الفطر الأخضر التابعة للجنس *Trichoderma*، ففي دراسة Mardawati وآخرين (2020) بلغت الفعالية الإنزيمية حدها الأقصى 672.039 وحدة إنزيمية. مل$^{-1}$ وذلك عند تركيز 8 % من غلاف ثمار شجرة التانغ *Reutealis trisperma* Blanco كركيزة و60 ساعة تخمير وتركيز البروتين 0.590 مغ. مل$^{-1}$، وكانت الفعالية النوعية 1137.638 وحدة إنزيمية. مغ$^{-1}$ [11].

ودُرست كذلك السلالات وأنواع الرشاشية التابعة للجنس *Aspergillus*، كالسلالة DFR-5 التابعة للرشاشية السوداء *A. niger* [4] والرشاشية التوبينغية *Aspergillus tubingensis* حيث دُرس تأثير نوع الركيزة في الفعالية الإنزيمية للكزيلينياز المنتج من قبل هذا النوع إذ أعطت كيزان الذرة أعلى فعالية إنزيمية 111.23±0.3 وحدة إنزيمية/ غ تلتها قشور الرز بفعالية بلغت 101.19±0.72 وحدة إنزيمية/ غ مقارنة مع نخالة القمح وبذور الكاسافا، كما أظهرت الدراسة تأثير قيمة pH وسط التخمير في الفعالية الإنزيمية، إذ بلغت الفعالية الإنزيمية أعلاها 107.97±0.90 وحدة إنزيمية/ غ عند درجة حموضة 6 وبوجود كيزان الذرة كركيزة [16].

وفي دراسة محلية لـ Swidah (2010) أظهر الزيلاناز ألفة عالية تجاه ركائز مختلفة من الزيلان المأخوذ من مصادر متعددة، حيث كان أعلاها تجاه ركيزة Oat spelt إذ بلغت فعالية الإنزيم 347.97±0.87 وحدة إنزيمية. مل$^{-1}$، وذلك باستخدام السلالة SS7 التابعة للرشاشية السوداء *Aspergillus niger* والتي تم عزلها من تربة محلية، وبوساطة مخمر بطريقة التخمير المغمور لمدة سبعة أيام عند درجة حرارة 25 °س، وكانت درجة الحرارة المثلى لعمل الإنزيم 55 °س عند درجة حموضة 4 [25].

أهمية البحث وأهدافه:

تأتي أهمية هذا البحث من أهمية الزيلاناز الذي يُعد من الإنزيمات الهامة في التطبيقات الصناعية المتنوعة ولا سيما الصناعات الغذائية، وبتزايد الحاجة المحلية إلى استخدام هذا الإنزيم في الصناعة ولاسيما المخبوزات من جهة وارتفاع سعر المستحضر التجاري المستورد منه من جهةٍ ثانية فقد أصبح من الضروري إنتاجه محلياً، وذلك باستخدام الأحياء الدقيقة القادرة على إنتاجه والتي يمكن عزلها بسهولة من بيئتنا المحلية، بالإضافة إلى إمكانية تقليص تكاليف عملية الإنتاج وذلك بإعادة تدوير أو استخدام المخلفات الزراعية، لذلك فقد **هدف هذا البحث إلى:** دراسة إمكانية إنتاجه محلياً من خلال الحصول على عزلة نقية للرشاشية السوداء *Aspergillus niger* من تربة محلية في المنطقة الساحلية واختبار قدرتها على إنتاج الزيلاناز، بالإضافة إلى دراسة بعض العوامل المؤثرة على الفعالية الإنزيمية من درجة الحرارة ومدة التحضين وتركيز كيزان الذرة كركيزة للإنزيم في وسط التخمير.

طرائق البحث ومواده:

1-العزل والتنقية: تم الحصول على عزلة تابعة للنوع *Aspergillus niger* وذلك بعد عزلها من عينات تربة جُمعت من بستان زيتون في منطقة البهلولية التابعة لمحافظة اللاذقية خلال شهر أيلول من العام 2024، حيث أُخذت خمس عينات من التربة على عمق 5-10 سم وخُلطت للحصول على عينة مركبة أُخذ منها عينة ممثلة تراوح وزنها 200-400 غ، نُقلت هذه العينة إلى مختبر الأمراض الفطرية التابع لقسم وقاية النبات في كلية الهندسة الزراعية، حيث وضعت في صواني وجُففت هوائياً ضمن ظروف المختبر لمدة 48 ساعة، ومن ثم طُحنت وأُخذ منها 1غ وضع في دورق مخروطي وأضيف له 9 مل من الماء المقطر المعقم، حُرّك هذا المعلق بسرعة دوران 200 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق، وزرع 1 مل من الراشح الطافي في أطباق بتري معقمة تحتوي على مستنبت آغار البطاطا والديكستروز PDA، وحُضنت الأطباق عند درجة حرارة 25 °س لمدة خمسة أيام حتى ظهور المستعمرات، ليتم بعد ذلك تسجيل المواصفات المورفولوجية والفحص المجهري للتأكد من النوع الذي تم الحصول عليه وفق [29، 1]، ومن ثم أجريت عملية التنقية بأخذ جزء من ميسليوم الفطر إلى أطباق بتري جديدة على نفس نوع المستنبت المذكور سابقاً، وكررت العملية للحصول على عدة مكررات من العزلة النقية تماماً لاستخدامها في الاختبارات اللاحقة، وحُفظ بعضها في البراد بدرجة حرارة 4 °س [16].

2-الغربلة الأولية للعزلة الفطرية: اختُبرت قدرة العزلة الفطرية المدروسة على إنتاج الزيلاناز، وذلك من خلال زراعتها على مستنبت آغار الزيلان xylan agar الذي يتكون من: ($NaNo_3$ %0.5، KH_2PO_4 %0.136، %0.05 $MgSO_4.7H_2O$، $Ca(NO_3)_2$ %0.001، $FeCl_3$ %0.0001، birchwood xylan %1، tryptone %0.1، yeast extract %0.05، K_2HPO_4 %0.174، Agar %1.2)، وضُبطت درجة حموضة المستنبت عند 5.5،

وحضنت الأطباق بعد الزراعة عند درجة حرارة 25 °س لمدة خمسة أيام، ثم تم الكشف عن تشكل هالات التحلل حول المستعمرات الفطرية بعد إضافة أحمر الكونغو 0.1 غ/ 100 مل لمدة 20 دقيقة، لتغُسل بعدها بمحلول كلوريد الصوديوم 1 مولار لمدة 20 دقيقة، ثم بحمض كلور الماء 1 عياري لمدة 20 دقيقة وذلك بغرض جعل هالة التحلل المائي أكثر وضوحاً، أُخذ المتوسط الحسابي لقطر هالة التحلل لخمسة مكررات [15].

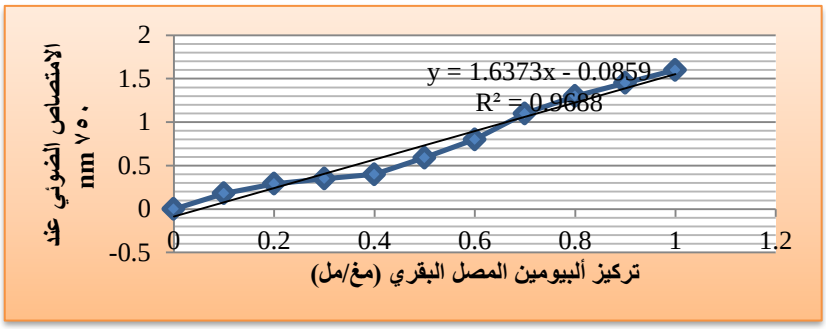
3- إنتاج الزيلاناز:

3-1- تحضير المعلق البوغي: حُضّر المعلق البوغي من مستعمرات الفطر المتبوغة بعد سبعة أيام من التحضين، حيث غُمرت المستعمرات بـ 20 مل ماء مقطر مع 0.1 % من التوين Tween-80، وتُركت الأطباق لحوالي 20 دقيقة لتحرير الأبواغ، ضُبط تركيز المعلق البوغي باستخدام شريحة العد Thoma–Kammer للحصول على معلق بوغي بتركيز 2×10^6 بوغة/ مل ، أُخذ منه 1 مل وأُضيف إلى 100 مل من مستنبت دكستروز البطاطا السائل PDB في دورق مخروطي سعة 250 مل، وتركت عند درجة حرارة المختبر وبسرعة دوران 150 دورة/ دقيقة لمدة تسعة أيام [9].

3-2- تحضير الركيزة: جُففت كيزان الذرة في فرن التجفيف عند درجة حرارة 80 °س لمدة ساعتين، ومن ثم طُحنت باستخدام مطحنة مخبرية، نُخّل المسحوق الناتج باستخدام هزاز المناخل للحصول على حبيبات بحجم 0.5 مم لاستخدامها في الوسط المعد لإنتاج الزيلاناز [16].

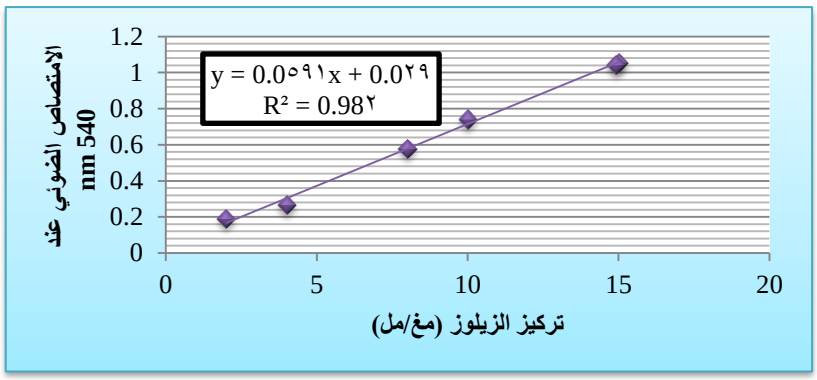
3-3- تحضير الطافي الحاوي على الزيلاناز الخام: تمّ إنتاج الزيلاناز بطريقة التخمير المغمور، باستخدام دورق مخروطي سعة 250 مل، حيث حُضّر ليتر من الوسط Mandels وSternberg الجاهز بأخذ 5 غ/ل والمؤلف من (1.4غ $(NH_4)_2SO_4$، 2غ KH_2PO_4، 0.3غ Urea، 0.3 غ $MgSO_4.H_2O$، 0.3غ $CaCl_2$، 0.005 غ $FeSO_4.7H_2O$، 0.0016 غ $MnSO_4.H_2O$ ، 0.0014 غ $ZnSO_4.7H_2O$، 0.002غ $CoCl2.6H_2O$، 0.75غ ببتون)، وأضيف له 2.5 غ/ ل من الركيز الصلبة (كيزان الذرة)، تم إضافة معلق بوغي بتركيز 2×10^6 بوغة/ مل، ضبطت قيمة الـ pH عند 5.5، حُضّن الدورق في حاضنة هزازة بسرعة دوران 150 دورة/دقيقة، عند درجة حرارة 25 °س لمدة خمسة أيام [8]، ومن ثم أُخذ الراشح و أُجريت له عملية طرد مركزي بسرعة 10000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق ليؤخذ السائل الناتج أو الطافي الحاوي على الإنزيم [22].

3-4- تقدير البروتين: يُعد تقدير البروتينات في الوسط ضرورياً لأنه مؤشراً هاماً على إفراز الإنزيمات خارج الخلايا من جهة، ومن جهة أخرى يتم استخدامه لحساب الفعالية الإنزيمية النوعية، لذلك قُدّر البروتين بطريقة Lowry وأخرين (1951) [21]، حيث رسم المنحني القياسي بأخذ 0.2 مل من عدة تراكيز من محلول ألبيومين المصل البقري BSA أُضيف له 2 مل من كاشف كبريتات النحاس القاعدي، وحُضنت الأنابيب عند درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق، ومن ثم أضيف 0.2 مل من كاشف فولين سيوكالتو إلى أنابيب الاختبار ليتم ملاحظة تشكل اللون الأزرق، تُركت الأنابيب لمدة نصف ساعة عند درجة حرارة الغرفة لإتمام حدوث التفاعل، وبعدها قِيس الامتصاص الضوئي باستخدام مقياس الطيف الضوئي Jascov-530 عند طول موجة 750 نانومتر، ويوضح الشكل1 المنحنى القياسي الذي يربط بين التراكيز المختلفة لمحلول BSA والامتصاص الضوئي. قُدر البروتين في الرشاحة الإنزيمية بأخذ 0.2 مل من الرشاحة الإنزيمية بدلاً من محلول BSA وإجراء الخطوات سابقة الذكر.



الشكل1. المنحني القياسي لألبومين المصل البقري.

3-5- تحضير السلسلة العيارية لسكر الزايلوز: نُفّذ هذا الاختبار بالاعتماد على طريقة DNS (dinitrosalicylic acid) [13]، حيث حُضرت سلسلة عيارية من سكر الزيلوز ($C_5H_{10}O_5$) تركيز 2 مغ . مل$^{-1}$ بأخذ 0.5 مل من كل تخفيف وأُضيف له 1 مل من محلول السترات المنظم، ووضعت الأنابيب في حمام مائي عند درجة حرارة 50°س لمدة 30 دقيقة، ثم أُضيف 2 مل من حمض ثنائي نترو سالسيليك DNS، ومن ثم أُعيدت الأنابيب إلى الحمام المائي عند درجة حرارة 90 °س لمدة 10 دقائق، قيس الامتصاص الضوئي باستخدام مقياس الطيف الضوئي عند طول موجة 540 نانومتر، أما بالنسبة للشاهد فقد استبدل الزيلوز بمقدار 0.5 مل من محلول السترات المنظم، ويوضح الشكل2 الرسم البياني الذي يربط بين تركيز الزيلوز والامتصاص الضوئي على طول موجة 540 نانومتر.



الشكل2. المنحنى القياسي للزيلوز

3-6-مراحل قياس الفعالية الإنزيمية للزيلاناز: أُخذ 0.5 مل من محلول الإنزيم الخام إلى 1 مل من محلول السترات الموقي 0.05 مولار، وأضيف 0.5 مل من محلول الركيزة Birchwood xylan 1%، حضنت العينة مع الركيزة في حمام مائي 50 °س لمدة 30 دقيقة، ومن ثم أضيف 2 مل من DNS ووضعت الأنابيب في حمام مائي 90 °س لمدة 10 دقائق، وقِيس الامتصاص الضوئي عند طول موجة 540 نانومتر، وذلك للحصول على الفعالية الإنزيمية والتي هي كمية الإنزيم اللازمة لتحرير ميكرومول واحد من السكريات المختزلة "معبراً عنها بصورة الزيلوز" من الزيلان الركيزة خلال دقيقة واحدة تحت شروط التجربة مقدرة بـ (وحدة إنزيمية. مل$^{-1}$) وفق المعادلة:

الفعالية الإنزيمية (وحدة إنزيمية.مل$^{-1}$)= تركيز الزيلوز/ زمن التحضين × معامل التمديد [9]

أما الفعالية النوعية فهي عدد وحدات الإنزيم في الميليغرام الواحد من البروتين، والتي حُسبت من العلاقة التالية:

الفعالية النوعية (وحدة إنزيمية. مغ$^{-1}$ بروتين)= الفعالية الإنزيمية (وحدة إنزيمية.مل$^{-1}$) ÷تركيز البروتين (مغ.مل$^{-1}$) [18].

4-دراسة العوامل المؤثرة في إنتاج الزيلاناز: تم دراسة تأثير عوامل مختلفة في الفعالية الإنزيمية للزيلاناز المنتج من قبل العزلة الفطرية للنوع *A. niger* باتباع طريقة OFAT، والتي تعتمد على تغيير عامل واحد في كل مرة وإبقاء العوامل الأخرى ثابتة وذلك لتحديد تأثير كل عامل على حدا [19]، وفيما يلي أهم العوامل التي تمت دراستها:

4-1- تأثير درجة حرارة التحضين: تم دراسة تأثير التحضين عند أربع درجات حرارة مختلفة 20، 25، 30، 35 °س لمدة 5 أيام وبتركيز 2.5 غ/ ل من كيزان الذرة المضافة إلى وسط التخمير.

4-2- تأثير تركيز كيزان الذرة: تم دراسة تأثير تركيز كيزان الذرة المضافة إلى وسط التحضين باستخدام سبعة تراكيز مختلفة 1، 1.5، 2، 2.5، 3، 3.5، 4 غ/ ل، وذلك لمدة 5 أيام عند درجة حرارة 28 °س.

4-3- تأثير زمن التحضين: تم دراسة تأثير زمن التحضين في إنتاج الزيلاناز بتحضير وسط التخمير مضافاً له كيزان الذرة تركيز 2.5% مع التحضين عند درجة حرارة 28 °س على فترات متلاحقة بفاصل يوم واحد 1، 2، 3، 4، 5، 6، 7، 8 أيام.

5- التحليل الإحصائي: تم حساب المتوسطات الحسابية وانحرافاتها المعيارية بواقع ثلاثة مكررات لكل عامل، باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS (SPSS statistics for Windows, Version 25) وذلك بإجراء تحليل التّباين (One-way ANOVA) واختبار Tukey عند مستوى المعنويّة 1%.

النتائج والمناقشة:

1- الخصائص المورفولوجية للعزلة المدروسة:

تم اعتماد عزلة نقية واحدة للرشاش الأسود *A. niger* حيث تشابهت الخصائص المورفولوجية لهذه العزلة مع التوصيف الخاص بالنوع *Aspergillus niger* مرجعياً [29، 1]، حيث شكّل الفطر على مستنبت آغار البطاطا والديكستروز مستعمرة ذات مشيجة بيضاء اللون خلال الأيام الأولى من التحضين والتي ما لبثت أن تحولت للون الأسود مع بداية تشكل الأبواغ الكونيدية، السطح السفلي للمستعمرة بلون أصفر باهت ومع تقدم عمر المستعمرة ظهرت شقوق شعاعية على السطح السفلي، الهيفات شفافة مقسمة بحواجز، الحوامل الكونيدية شفافة غير مقسمة طويلة تنتهي بالرؤوس الكونيدية ثنائية الطبقة Biseriate والتي تتألف من طبقة الميتولا metulae وعليها طبقة الفياليدات phialides التي تحمل عليها سلاسل الأبواغ الكونيدية الخشنة الكروية الشكل ذات لون داكن بني مسود، وكافة القياسات البيومترية لمواصفات العزلة موجودة في الجدول1.

الجدول 1: القياسات البيومترية للعزلة الفطرية المدروسة.

	قطر المستعمرة/ مم	الهيفات/ميكرون	الحامل الكونيدي/ ميكرون	الرأس الكونيدي/ميكرون
العزلة المدروسة	70 -45 [c]1.4± 53.6	[a]2-1 1.1 ± 1.4	[b]18 -8 × 2800-387 1.3 ± 14.8 × 11.2 ± 525.3	77 -32 5.7 ± 54.2
مرجعياً[29]	70-40	5-1	20-8 ×3000-150	100-20

a.الحد (الأدنى- الأعلى)، b. الطول × العرض، c. المتوسط± الإنحراف المعياري (200 قراءة لكل خاصّيّة).

2- اختبار قدرة العزلة المدروسة على إنتاج الزيلاناز وقياس الفعالية الإنزيمية:

اختبرت قدرة العزلة الفطرية المدروسة على إنتاج الزيلاناز خارج الخلية على مستنبت آغار الزيلان، حيث أظهرت النتائج قدرة هذه العزلة على إنتاج الزيلاناز بدليل التحلل المائي للزيلان والذي انعكس من خلال قطر هالة التحلل والذي بلغ بالمتوسط 13 ±0.1 مم.

بلغت الفعالية الإنزيمية للزيلاناز المنتج بالمتوسط 17.1±0.03 وحدة إنزيمية. مل$^{-1}$، ووصل تركيز البروتين في المستخلص الإنزيمي بالمتوسط 0.25 ±0.01 مغ. مل$^{-1}$، وعليه حسبت الفعالية النوعية والتي بلغت بالمتوسط 68.4 ±0.01 وحدة إنزيمية. مغ$^{-1}$، وهذا يتفق مع ما توصل إليه Tan وآخرون (2021) والذي أكد على قدرة النوع *Aspergillus niger* على إنتاج الزيلاناز بنفس شروط التخمير المطبقة في هذه الدراسة [9]، ولكن بفعالية إنزيمية أقل 0.597 ±0.009 وحدة إنزيمية. مل$^{-1}$ بالمقارنة مع دراستنا الحالية.

3- دراسة العوامل المؤثرة في إنتاج الزيلاناز:

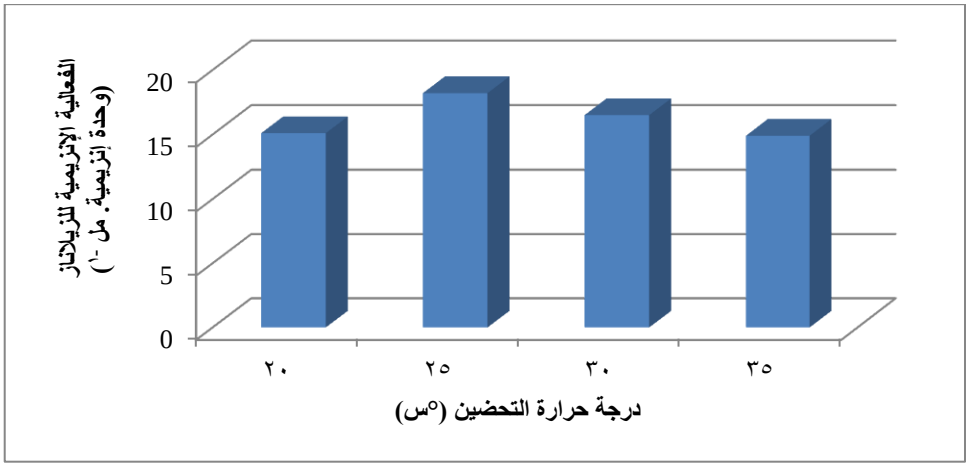
2-1- تأثير درجة حرارة التحضين:

تبيّن لدى دراسة تأثير أربع درجات حرارة مختلفة في الفعالية الإنزيمية للزيلاناز وجود فروق معنوية للفعالية الإنزيمية بين الدرجات المدروسة إذ أن قيمة P كانت أصغر من 0.01 كما هو ظاهر بالجدول 2، حيث كانت درجة الحرارة 25 °س هي المثلى بإعطاء أعلى فعالية إنزيمية 18.2 وحدة أنزيمية. مل$^{-1}$، كما تبين انخفاض الفعالية الإنزيمية مع ارتفاع درجة حرارة التحضين بعد بلوغها الحد الأقصى (الشكل 3)، وهذا يعود إلى أن إرتفاع درجة الحرارة يحدّ من اصطناع البروتينات اللازمة لنمو الفطور إضافة إلى إتمام العمليات الاستقلابية المختلفة والتي تتضمن إفراز الإنزيمات [30]، وهذا ما سجله Subramaniyan وPrema (2002) إذ أن الزيلاناز المنتج من قبل فطريات العفن لا يتحمل درجات الحرارة المرتفعة التي تزيد عن 50 °س [27]. وتتفق نتائج هذه الدراسة مع الدراسة المعدة من قبل Swidah وآخرين (2010) فقد كانت درجة الحرارة 25 °س مثالية لإنتاج الزيلاناز من قبل العزلة *Aspergillus niger* SS7 المعزولة من التربة السورية بواسطة مخمر على طريقة الزراعة العميقة خلال سبعة أيام [25].

الجدول 2. تأثير درجة الحرارة في الفعالية الإنزيمية للزيلاناز.

درجة الحرارة °س	20	25	30	35
الفعالية الإنزيمية وحدة إنزيمية. مل$^{-1}$	0.07 ±15.11 *^{c}	0.03 ±18.2^{a}	0.04 ± 16.5^{b}	0.05 ±15^{c}
قيمة P	0.001			

*** متوسط 3 مكررات± الإنحراف المعياري، المتوسطات التي تحمل حروفاً مختلفة تختلف معنوياً عند مستوى 1%.**



الشكل3. تأثير درجة حرارة التحضين في الفعالية الإنزيمية للكزيليناز.

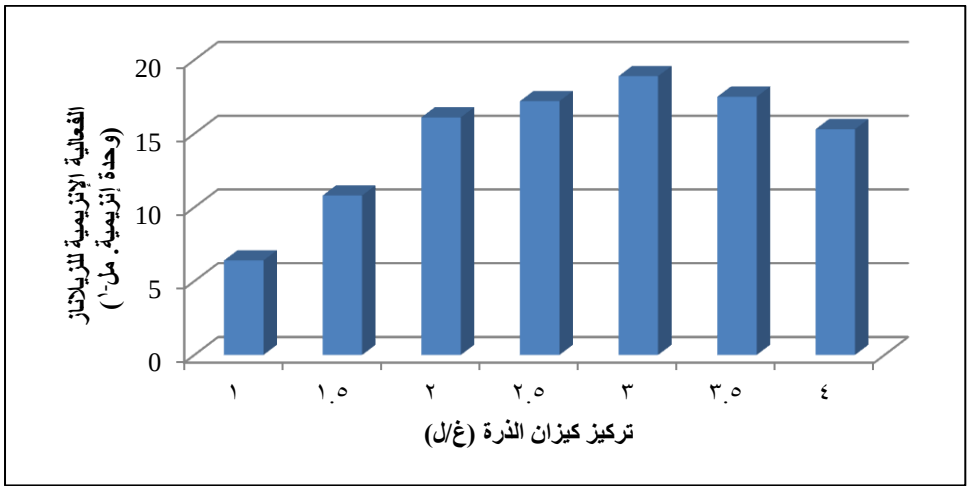
2-2- تأثير تركيز الركيزة:

تعد كيزان الذرة مصدر الكربون الذي تعتمد عليه الفطور في وسط التخمير والذي يعد بمثابة محفز لإنتاج الإنزيمات الخلوية فيه [20]، ويوضح الشكل 4 تأثير التراكيز المتسلسة من كيزان الذرة في الفعالية الأنزيمية للزيلاناز، والتي ظهر بينها فروق معنوية إذ أعطى التركيز 3 غ/ ل من كيزان الذرة أعلى فعالية، وانخفضت الفعالية الأنزيمية مع ارتفاع التركيز بعدها (الجدول 3)، وهذا بسبب انخفاض الرطوبة إذ أن ارتفاع نسبة الرطوبة يؤثر في انتقال الأوكسجين وفي مسامية الوسط كما يؤثر في بنية جزيئات الركيزة وهذا بدوره يؤثر في التهوية ونمو الفطريات [30]، واختلفت هذه النتائج مع الدراسة المعدة من قبل Tan وآخرون (2021) إذ سُجلت أعلى فعالية للزيلاناز بالمتوسط بقيمة 0.012±0.789 وحدة إنزيمية. مل$^{-1}$ عند التركيز 3.5 غ/ ل من كيزان الذرة [9]، قد يعود هذا الاختلاف البسيط بسبب اختلاف العزلة الفطرية المدروسة من جهة واختلاف صنف الذرة المستخدم ونسبة الكربون فيه.

الجدول 3. تأثير تركيز كيزان الذرة في الفعالية الإنزيمية للزيلاناز.

تركيز كيزان الذرة غ/ ل	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
الفعالية الإنزيمية وحدة إنزيمية. مل$^{-1}$	0.1±6.5*^{f}	0.05±10.8^{e}	0.04±16.1^{c}	0.03±17.2^{b}	0.05±18.9^{a}	0.02±17.5^{b}	0.06±15.3^{d}
قيمة P	0.001						

*** متوسط 3 مكررات± الإنحراف المعياري، المتوسطات التي تحمل حروفاً مختلفة تختلف معنوياً عند مستوى 1%.**



الشكل 4. تأثير تركيز كيزان الذرة المستخدمة في الفعالية الإنزيمية للزيلاناز.

2-3- تأثير زمن التحضين:

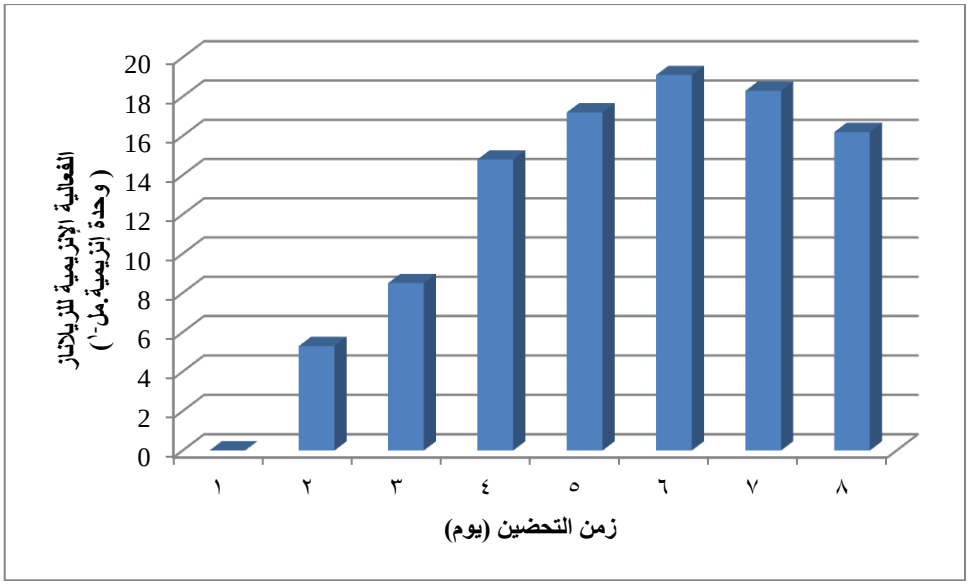
بعد دراسة تأثير زمن التحضين في الفعالية الإنزيمية للزيلاناز ضمن فترات تحضين متسلسلة فقد بينت الدراسة عدم ظهور أي فعالية إنزيمية خلال اليوم الأول من التحضين (الجدول 4)، ليبدأ الفطر بإنتاج الزيلاناز في اليوم الثاني بفعالية إنزيمية تزايدات مع استمرار التحضين لتبلغ حدها الأقصى خلال اليوم السادس حيث بلغت بالمتوسط 19.1 وحدة إنزيمية. مل$^{-1}$، ثم انخفضت مع استمرار عملية التحضين (الشكل 5)، وهذا قد يعود إلى حدوث تعطيل في أنظمة إفراز الإنزيمات نتيجة انخفاض نسبة المغذيات في وسط التخمير إضافة إلى تراكم منتجات الاستقلاب الثانوي في وسط التخمير والتي قد تتضمن مركبات سامة بالنسبة للفطر مما يسبب حدوث ظاهرة تشوه التركيب الطبيعي للبروتين الإنزيمي، أي يفقد هذا البروتين خصائصه الوظيفية [17]، وهذا يختلف مع الدراسة المعدة من قبل Hoda وآخرون (2012) والتي أظهرت بأن الفعالية الإنزيمية للكزيلينياز المنتج من قبل

عزلة تابعة للنوع *Aspergillus niger* بلغت حدها الأقصى خلال اليوم الثاني من التخمير وقد يعود ذلك إلى استخدام طريقة التخمير SSF (solid state fermentation) في تلك الدراسة إضافة إلى استخدام نخالة الشعير كركيزة لإنتاج الزيلاناز [20]، وكذلك تختلف نتائج هذه الدراسة مع الدراسة المعدة من قبل kolade وآخرون (2021) حيث بلغت الفعالية الإنزيمية للزيلاناز 0.31±111.23 وحدة إنزيمية/ غ باستخدام كيزان الذرة كركيزة ولكن باستخدام طريقة التخمير SSF كذلك [16].

الجدول 4. تأثير زمن التحضين في الفعالية الإنزيمية للزيلاناز.

زمن التحضين يوم	1	2	3	4	5	6	7	8
الفعالية الإنزيمية وحدة إنزيمية.مل$^{-1}$	0^{h}	0.04±5.3^{g}	0.05±8.5^{f}	0.02±14.8^{e}	0.05±17.3^{c}	0.08±19.1^{a}	0.09±18.3^{b}	0.05±16.2^{d}
قيمة P	0.001							

*** متوسط 3 مكررات± الإنحراف المعياري، المتوسطات التي تحمل حروفاً مختلفة تختلف معنوياً عند مستوى 1%.**



الشكل 5. تأثير زمن التحضين في الفعالية الإنزيمية للزيلاناز.

الاستنتاجات والتوصيات:

1. تفوقت الفعالية الإنزيمية للزيلاناز المنتج من عزلة محلية تتبع للنوع *Aspergillus niger* على ماهو مسجل مرجعياً (17.1±0.03 وحدة إنزيمية. مل$^{-1}$) ضمن نفس شروط التخمير.
2. تعد درجة حرارة التحضين 25 °س هي الدرجة المثلى لإنتاج الزيلاناز، والتركيز 3 غ/ ل من كيزان الذرة المضاف لوسط التخمير هو الأمثل للحصول على أعلى إنتاج له، كما بلغ إنتاجه الأعظمي بعد اليوم السادس من التحضين عند درجة pH 5.5.

3. نوصي باختبار قدرة عزلات فطرية أخرى تابعة لنفس الجنس أو لأجناس مختلفة معزولة من بيئتنا المحلية على إنتاج الزيلاناز، ودراسة تأثير العوامل المختلفة التي تؤثر في إنتاجه كالتهوية ونسب المواد المغذية المختلفة كمصادر الكربون والنتروجين بغية الوصول لأعلى فعالية إنزيمية.

4. نوصي باستخدام منهجية سطوح الاستجابة RSM (Response Surface Methodology) لتحديد الشروط المثلى لإنتاج الزيلاناز من قبل العزلات التابعة لنفس النوع المذكور في هذه الدراسة أو أنواع أخرى.

References:

[1] A. H. S. Onion, D. Allsopp and O. W. Eggins, "Smith's introduction to industrial mycology", 7th ed. London: British Library Cataloguing in Publication data, (1981).

[2] A. Mandal, "Review on microbial xylanases and their applications", *international journal of life science*, vol. 4, no. 3, pp. 178- 187, (2015).

[3] A. Manivannan, and R. Narendhirakannan, "Response surface optimization for co-production of cellulase and xylanase enzymes by *Trichoderma reesei* NRRL–3652", *Int. J. ChemTech Res*, vol. 6, no.7, pp. 3883, (2014).

[4] A. Pal and F. Khanum, "Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: Individual and interactive effect of temperature and PH on its stability", *Process Biochem*, vol. 46, pp. 879- 887, (2011).

[5] A. Pandey, "Solid-state fermentation", *Biochemical Engineering Journal*, vol. 13, pp. 81-84, (2003).

[6] A. R. Shah and D. Madamwar, "Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization", *Process Biochemistry*, vol. 40, no.5, pp.1763-1771, (2005).

[7] A. S. Walia, P. Guleria, A. Mehta, P. ChauhanJ, "Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review", *Biotech*, vol.7, no.11, pp. 1- 12, (2017).

[8] A. W. Omar, M. H. Khataibeh and K. Abu-Alruz, "The use of xylanases from different microbial origin in bread making and their effects on bread quality", *Journal of Appl Sci*, vol. 8, pp. 672- 676, (2008).

[9] C. Z. Tan, W. T. Chang, M. Tarrsini, Y. P. Teoh, K. C. Lee, B. Ng, Q. H. Kunasundari, Z. X. Ooi, and C. Y. Low, "Xylanase production via *Aspergillus niger*: Effect of carbon source and composition", *Journal of physics: Conference series*, (2021). Doi:10.1088/1742-6596/2080/1/012001.

[10] D. Kumar, S. S. Kumar, J. Kumar, O. Kumar, S. V. Mishra, R. Kumar, S. K. Malyan, "Xylanase and their industrial applications: A review", *Biochemical and Cellular Archives*, vol. 17, no. 1, pp. 353-360, (2017).

[11] E. Mardawati, Y. Sinurat, T. Yuliana, "Production of crude xylanase from *Trichoderma* sp. using *Reutealis trisperma* exocarp substrate in solid state fermentation" [International Conference of Sustainability Agriculture and Biosystem: Earth and Environmental Science], 515, 1-10, (2020).

[12] G. Adiguzel, O. Faiz, M. Sisecioglu, B. Sari, O. Baltaci, S. Akbulut, B. Genc, A. Adiguzel. " A novel endo-β-1,4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25; purification, characterization and application in clarification of fruit juices". *Int J Biol Macromol*, vol. 15, no. 129, pp. 571-578, (2019).

[13] G. L. Millar, "Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar", *Analytical chemistry, vol. 31, pp. 426- 428, (1959).

[14] G. S. Lakshmi, P. L. Bhargavi and R. S. Prakasham, "Sustainable Bioprocess Evaluation for Xylanase Production by Isolated *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus* Under Solid -State Fermentation Using Oil Palm Empty Fruit Bunch Fiber", *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, vol. 5 no. 4, pp. 1434–1444, (2011).
[15] H. A. Akinyele, R. A. Gabriel-Ajobiewe, O. M. Ukhureigbe, A. A. Adebesin, and T. L. Omotayo, "Xylanase-production potential of *Trichoderma asperellum* NG-T161 and NG-T163 isolated from banana farm soils in South Western Nigeria", *Journal of Fungal Biology*, vol. 9, no. 1, pp. 301-312, (2019).
[16] I. O. Kolade, M. B. Yousuf, K. A. Ajijolakewu, T. Agbabiaka, T. A. Abdulkareem, and I. O. Faniyi, "Optimization of condition for Xylanase production using *Aspergillus tubingensis* under different carbon sources", *Fountain journal of Natural Applied sciences*, vil. 10, no. 1, pp. 34-44, (2021).
[17] J. A. Elegbede, and A. Lateef, "Optimization of the production of xylanases in corncob-based media by *Aspergillus niger* and *Trichoderma longibrachiatum* using Taguchi approach", *Acta Biologica Szegediensis*, vol. 63, no.1, pp. 51-58, (2019).
[18] J. Y. Sun, M. Q. Liu, X. Y. Weng, L. C. Qian and S. H. Gu, "Expression of recombinant *Thermomonospora fusca* xylanase A in Pichia pastoris and xylooligosaccharides released from xylans by it", *Food chemistry*, vol. 104, pp.1055-1064, (2007).
[19] K. A. Ajijolakewu, C. K. Lee, Nw. N. W. Abdullah and C. P.L. EH, "Enhanced ethanol production from mild alkali-treated oil-palm empty fruit bunches via co-fermentation of glucose and xylose", *Renewable Energy*, vol. 107, pp.113-123, (2017).
[20] M. S. Hoda, A. S. Abdel-Dayem, and B. E. L. T. Arafat, "Production of Xylanase by Aspergillus niger and Trichoderma viride using Some Agriculture Residues", *International Journal of Agricultural Research*, vol. 7, pp. 46–57, (2012).
[21] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *Journal biolchem*, vol. 193, pp. 265-275, (1951).
[22] P. S. Jampala, S. Tadikamalla, M. Preethi, S. Ramanujam and K. B. Uppuluri, "Concurrent production of cellulose and exylanase from *Trichoderma reesei* NCIM 1186: enhancement of production by desirability-based multi-objective method", *Biotech*, vol. 7, pp.1-14, (2017).
[23] R. Deutschmann and R. F. H. Dekker, "From plant biomass to bio-based chemicals: Latest developments in xylan research ", *Biotechnol Adv*, vol. 30, pp. 1627–1640, (2012).
[24] R. D. P. B. Pirota, P. S. Delabona and C. S. Farinas, "Simplification of the biomass to ethanol conversation process by using the whole medium of filamentous fungi cultivated under solid-state fermentation", *Bioenergy Res*, vol. 7, pp. 744-752, (2014).
[25] R. Swidah, "Characterization of the xylanase enzyme produced by the fungus *Aspergillus niger* isolated from Syrian soil", Master's thesis, Dept. of Food Sciences, Faculty of Agriculture Engineering, Damascus University, Damascus, Syria, 2010.
[26] S. B. Masood, T. N. Muhammad, A. Zulfiqar and T. S. Muhammad, "Xylanases and their applications in baking industry", *Food technol, Biotechnol*, vol. 46, no. 1, pp. 22-31, (2008).
[27] S. Subramaniyan and P. Prema, "Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application", *Critical Reviews Biotechnol*, Vol. 22, no. 1, pp. 33–64, (2002).
[28] U. S. P. Uday, T. K. Choudhury, B. Bandyopadhyay, "Classification mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth", *International journal of Biological Marcomolecules*, vol. 82, pp. 1041-1054, (2016).

[29] V. J. A. Arx, "The genera of fungi sporulating in pure culture", Third fully revised edition. Germany: Carmer, (1981).
[30] Z. Azzouz, A. Bettache, N. Boucherba, Z. Amghar, and S. Benallaou, "Optimization of xylanase production by newly isolated strain *Trichoderma afroharzianum* isolate AZ 12 in solid state fermentation using response surface methodology", *Cellulose Chemistry and Technology*, vol. 54, no. 5, pp. 451-462, (2020).
[31] Z. Y. Zhu, L. Zhao, X. R. Ge, Y. L. Tang, L. J. Chen, W. Pang and Y. Zhang, "Prepration characterization and bioactivity of xylobiose and xylotriose from corncob xylan by xylanase", *Eur food Res Technol*, vol. 241, pp. 27-35, (2015).