Journal of Agricultural, Environmental and Veterinary Sciences
Volume (6), Issue (1): 30 Mar 2022
P: 75 - 90

ISSN: 2522- 3364

مجلة العلوم الزراعية والبيئية والبيطرية
المجلد (6)، العدد (1): 30 مارس 2022م
ص: 75 - 90

Production Pectinases from Some Species of Aspergillus by Solid State Fermentation and Determination of Optimum Parameters for Production

Rasha Ahmad Taowz

Adib Faleh

Fateh Khateeb

Faculty of Agriculture || Aleppo University || Syria

Muhammad Alazm

Faculty of Technical Engineering || Aleppo University || Syria

Abstract: After twenty Fungal isolates belong to Aspergillus Genus were obtained from sixty four samples from Fruits and Vegetables, and election the best according to its production Pectinases on solid medium. The strongest five isolates were chosen to product 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 amount, inoculum volume, Suspension concentrations of spores, Carbon source, Nitrogen source). Four of these isolates were belong to *Aspergillus niger* and one of them were belong to *Aspergillus fumigatus*.

Citrus peels were used in fermentation system as pectin resource. The pectin percentage in peels was 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/ g. When the optimum parameters of production Pectinases were studied, the results showed that the highest activity of pectinases was obtained at 40°C of incubation temperature, 96 hours of incubation period, 2.5g of pectin amount in medium, 10^7 spore/ ml of spores concentration in fungal suspicion, 1.5 ml of indeed suspicion volume, using Citrus pectin as carbon sources, and Ammonium sulfate as nitrogen sources.

Keywords: Aspergillus, Enzymatic activity, Fermentation, Pectinases, Optimization, Pectin.

إنتاج الإنزيمات البكتينية من بعض أنواع فطور Aspergillus بطريقة تخمير الوسط الصلب وتحديد الظروف المثلى للإنتاج

رشا أحمد طاووز

أديب فالح

فاتح خطيب

كلية الزراعة || جامعة حلب || سوريا

محمد العظم

كلية الهندسة التقنية || جامعة حلب || سوريا

المستخلص: بعد أن تم اختيار عشرين عزلة فطرية تتبع جنس Aspergillus من أربع وستين عينة من ثمار الفاكهة والخضار، وانتخاب الأفضل من حيث إنتاجها للإنزيمات البكتينية على الوسط الصلبplate assay method، تم اختيار الخمس عزلات الأقوى من بينها لإنتاج الإنزيمات البكتينية باستخدام نظام تخمير الوسط الصلبSolid state fermentation ، وذلك بهدف معرفة إمكانية العزلات المنتخبة على إنتاج الإنزيمات البكتينية وتحديد العزلة الأكثر إنتاجاً لتلك الإنزيمات، إضافة إلى أمثلة إنتاج الإنزيمات من تلك العزلة من حيث درجة حرارة التحضين، مدة التحضين، تركيز البكتين في وسط التخمير، تركيز المعلق الفطري من الأبواغ، حجم اللقاح الفطري، بالإضافة إلى تحديد المصدر الكربوني والمصدر الآزوتي الأفضل للوصول إلى الإنتاج الأعظمي من الإنزيمات البكتينية، وكانت أربع عزلات من نوع A.niger وواحدة من نوع .A.fumigatus وقد استخدمت قشور البرتقال في عملية التخمير كمصدر للبكتين بعد أن تم حساب البكتين فيها وكان 5%، كما تبين أن فعالية الإنزيمات البكتينية المنتجة من العزلات المأخوذة من ثمار الحمضيات أعلى بالمقارنة مع باقي العزلات وقد وصلت الفعالية إلى51، 52 U/ g، كما تبين من الدراسة المتبعة لتحديد الظروف المثلى لإنتاج هذه الإنزيمات أنه يمكن الحصول على أعلى فعالية إنزيمية عند درجة حرارة تحضين40°C ، ومدة تحضين 96ساعة، وعند استخدام كمية 2.5 غ من البكتين في الوسط وتركيز المعلق الفطري من الأبواغ 107بوغة/ مل، وحجم لقاح (معلق فطري) 1.5 مل، وباستخدام بكتين البرتقال كركيزة للوسط الصلب ومصدر للكربون، وكبريتات الأمونيوم كمصدر للآزوت.

الكلمات المفتاحية: Aspergillus، فعالية إنزيمية، تخمير، الإنزيمات البكتينية، ظروف الإنتاج المثلى، بكتين.

المقدمة.

تعد بعض الإنزيمات عناصر هامة وضرورية في مجال التطبيقات الصناعية بشكل عام وفي مجال الصناعات الغذائية بشكل خاص وذلك من خلال استخدامها في عمليات التصنيع الغذائي، والتي يمكن استخلاصها من مصادر نباتية وهي تشكل 5% من الإنزيمات الموجودة في السوق كإنزيم Papin المستخلص من الباباي و الBromellin المستخلص من الأناناس والمستخدمة في تطرية اللحوم، أو من مصادر حيوانية والتي تشكل 10% من الإنزيمات الكلية في السوق كإنزيم Chymosine المستخلص من معدة العجول الرضيعة والمستخدم في إنتاج الأجبان (Illanes, 2008)، وفي عام 1960 تم استخلاص الإنزيمات من الكائنات الحية الدقيقة وقد استخدمت في بداية الأمر في ترويق العصائر والعمليات التصنيعية التي يدخل فيها الحبوب كالخبز وبعض أنواع المعجنات، ثم بدأت هذه الإنزيمات تحل محل الإنزيمات المستخلصة من المصادر النباتية والحيوانية في العديد من الصناعات الغذائية فقد استبدل إنزيم Chymosine المستخلص من مصادر حيوانية في تصنيع الأجبان بإنزيم المنفحة المستخلص من أنواع الفطر Mucor، كذلك يغزو إنزيم الأميلاز المنتج من الفطور مجالات التصنيع الغذائي بشكل يؤخذ بعين الاعتبار (Adlercreutz, 2013 ;Reed, 1993) وذلك بسبب سهولة الكشف عن قدرة الكائن الحي الدقيق على إنتاجه للإنزيمات وسرعة نموه وسهولة الحصول عليه بالإضافة إلى إمكانية زيادة إنتاج الإنزيمات من خلال التحكم بتركيب وسط التخمر، علاوة على أنها من المواد المساعدة صديقة البيئة.

تعد الإنزيمات البكتينية أو ما يسمى Pectinases واحدة من أهم الإنزيمات التي تنتج على نطاق واسع من الكائنات الحية الدقيقة، فهي تنتج بنسبة 50% من الفطور والخمائر، و45% من الجراثيم والنسبة المتبقية تنتج من مصادر أخرى، فهي تنتج من أنواع عديدة من جرثيم Bacillus وErwinia و Pseudomonas وغيرها من الجراثيم، حيث تم إنتاج إنزيمات البكتيناز من جراثيم Bacillus sp و Erwinia carotovora لأول مرة في عام 1962 كما تنتج هذه الإنزيمات من الخمائر وبشكل خاص Saccharomyces cervisiae و Kluyveromyces marxianus، بينما تنتج الإنزيمات البكتينية من فطور جنس Fusarium، Pencillium، Rhizopus، Aspergillus.....الخ.

أظهرت الدراسات التي أجريت على إنتاج الإنزيمات البكتينية من الكائنات الحية الدقيقة بأنواعها المختلفة أن أفضل مصدراً لإنتاج هذه الإنزيمات 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 الإنزيمي الناتج عن هذا الفطر بشكل آمن في الصناعات الغذائية والصناعات الأخرى أيضاً لأن هذا الفطر GRAS (generally recognized as safe) أي معترف بهذا الفطر ومنتجاته من قبل منظمة الدواء والغذاء (FDA) على أنها أمنة الاستخدام في العديد من الصناعات (Saranraj, et al., 2012 ; Patil & Dayanand, 2006)

مشكلة الدراسة:

تعد عملية الحصول على الإنزيمات البكتينية من مصادر نباتية أمر في غاية الصعوبة، نظراً لتكلفتها العالية، وصعوبة التحكم بإنتاج النباتات لهذه الإنزيمات، الأمر الذي دفع العديد من الباحثين للبحث عن مصادر أخرى كالمصادر الميكروبية لإنتاج تلك الإنزيمات، ونظراً لأهمية الإنزيمات البكتينية في المجال الصناعي بشكل عام وفي مجال التصنيع الغذائي، فإن هذا يساعد في تطوير الصناعات الغذائية.

فرضيات الدراسة: تفترض الدراسة ما يلي:

1- إنتاج الإنزيمات البكتينية بطريقة تخمير الوسط الصلب من عزلات فطرية لها القدرة على إنتاج هذه الإنزيمات.
2- تحديد المصدر الكربوني والمصدر الآزوتي وكمية البكتين الأفضل في وسط نمو فطور Aspergillus لإنتاج الإنزيمات البكتينية بالفعالية العظمى.
3- تحديد الشروط البيئية المثلى لنمو فطور Aspergillus وإنتاجها للإنزيمات البكتينية بأعلى فعالية من حيث درجة حرارة التحضين، مدة التحضين، حجم اللقاح الفطري المضاف، وتركيز الأبواغ في المعلق الفطري.

أهمية الدراسة:

نظراً لقدرة أنواع جنس الفطر Aspergillus العالية على إفراز الإنزيمات البكتينية ذات الدور الهام في العديد من الصناعات الغذائية وبشكل خاص في تصنيع عصائر الفاكهة لزيادة مردودها وترويقها لتحسين مظهرها، علاوة على إمكانية إنتاج هذه الإنزيمات من الفطور المعزولة من مواد رخيصة الثمن كمخلفات التصنيع الغذائي (قشور ثمار الفاكهة الناتجة عن تصنيع العصائر والمربيات والحاوية على البكتين)، وبالتالي تحويل المواد ذات القيمة الغذائية المنخفضة إلى مواد حيوية هامة، كما يعتبر إنتاج الإنزيمات البكتينية من الفطور ولاسيما فطور Aspergillus موضوع في غاية الأهمية، وذلك بسبب سهولة الكشف عن قدرة هذه الفطور لإنتاج الإنزيمات بالإضافة إلى رخص ثمن مصادرها، وإمكانية التحكم بإنتاجها، ولندرة الأبحاث المحلية عن ذلك جاءت أهمية البحث.

2- الإطار النظري والدراسات السابقة.

أولاً- الإطار النظري:

تشكل الإنزيمات البكتينية والتي تدعى إنزيمات البكتيناز Pectinases%25 تقريباً من إجمالي المستحضرات الإنزيمية المحضرة تجارياً في العالم، وهي الإنزيمات التي تحفز تحطيم البكتين والذي يشكل الجزء الرئيسي من الجدر الخلوية للنبات ويربط الخلايا مع بعضها البعض (Khatri, et al., 2012) تضم إنزيمات البكتيناز عدة إنزيمات وهي (Pectinmethyle esterase و Pectinesterase و Pectate lyase و exo- Polygalacturonase و endo- Polygalacturonase)، (فالح، 2012)، يلعب كل منها دور معين فعندما تهاجم هذه الإنزيمات جزيء البكتين يتم العمل عليه من عدة جوانب (George, 2014)، حيث يعمل إنزيم Polygalacturonase على تحفيز حلمهة الرابطة

الغليكوزيدية بين وحدتي حمض الغالاكتورونيك، بينما تقوم إنزيمات Pectinlyase بكسر الرابطة الغليكوزيدية ولكن بطريقة النزع (Elemination) (فالح، 2012)، أما إنزيم Pectinesterase فيحفز نزع مجموعة الميتيل من وحدات االبكتين (Doughari, et al., 2009) 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 تستخدم 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) و تضاف لأغذية الماشية والدواجن لتساعدها على الهضم وتسمح لها بتناول علف أو أطعمة غير معالجة بشكل كبير وبالتالي تصبح تكلفتها أقل (Thomas, et al., 2000)، كذلك تستخدم كمواد مساعدة في استخلاص الزيوت وذلك من خلال تهتيك النسج النباتية لزيادة كفاءة الضغط على الثمار لاستخلاص الزيت (Helga, et al., 2014) كما تم استخدام الإنزيمات البكتينية في صناعة منتجات التخمير كإنتاج البيرة والنبيذ منذ عام 1960، ويكون دور هذه الإنزيمات في مثل هذه الصناعات دوراً مضاعفاً فهي تساعد أولاً على تحطيم الجدر الخلوية أثناء هرس الثمار وبالتالي زيادة الإنتاجية كما تساعد على استخلاص النكهة من المالت أو الهريس، وثانياً تفيد 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 تعكير وزيادة لزوجة عصائر الفاكهة لذا يتم استخدام الإنزيمات المحللة للبكتين والأميلاز لتصفية ذلك العصير المعكر حيث تقوم هذه الإنزيمات 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 والتي تعتمد على إضافة الإنزيمات المحللة للبكتين أثناء مرحلة هرس الثمار إذ يزيد ذلك من مردود العصير بنسبة تصل إلى 20% و يحسن الإنتاجية كماً ونوعاً (الوزير، 2008).

ومن الجدير بالذكر أن إنزيمات البكتين تفرز من الكائنات الحية الدقيقة خارجياً، حيث لم تلاحظ لها أي فعالية داخل الخلية (Chadha, et al., 2005).

ثانياً- الدراسات السابقة:

- دراسة (Chadha Urmilla, et al., 2005) التي أنجزت في الهند وهدفت إلى إنتاج pectinase و polygalacturonase من سلالة فطرية محبة للحرارة تم اختيارها بعد غربلة أولية لـ120عزلة فطرية وحددت هويتها *Aspergillus fumigatus* Fres. MTCC 4163 ثم استخدمت في إنتاج الإنزيمات بالتخمير الصلب، وقد تم الحصول على الفعالية الإنزيمية بمستوياتها العظمى عند نمو الفطر في وسط مكون من نخالة القمح، سكروز، مستخلص الخميرة، كبريتات الأمونيوم، وذلك بعد 3- 2 أيام من الحضن عند درجة الحرارة C° 50، و حيث بلغت الفعالية الإنزيمية لإنزيم pectinase g/ U 1116 و g/ U 1270 لإنزيم polygalacturonase عند pH 4، 5 على التوالي.
- دراسة (Maldona & Strasser, 2008) تناولت إنتاج إنزيم Pectinesterase و Polygalacturonase من *Aspergillus niger* باستخدام أنظمة التخمير المختلفة وكانت النتائج جيدة مع اختلاف نسبة الإنتاج بين أنظمة التخمير المدروسة حيث أكدت النتائج تفوق نظام التخمير الصلب على الأنظمة الأخرى في إنتاجه للإنزيمات المذكورة.

- دراسة (Suresh & Viruthagiri, 2010) في جامعة Annamalai في الهند تناولت إنتاج Pectinases من فطور *Aspergillus niger* وفق نظام التخمير الصلب باستخدام نخالة القمح بنسبة 90% و مخلفات قصب السكر بنسبة 10% كركيزة أساسية في عملية التخمير، وقد تمكنوا من الحصول على الإنتاجية العظمى من الإنزيم بعد 96 ساعة من التخمير بدرجة حرارة 40˚ C، و pH.=5.
- دراسة (Benoit, et al.,2012) التي أجريت على أنواع من فطر Aspergillus إمكانية استخلاص إنزيمات البكتين من *A.oryzae* و *A.niger* حيث كانت قدرة هذه الأنواع على إنتاج الإنزيمات المحللة للبكتين كبيرة وبمعدلات نمو جيدة.
- دراسة (Amande, et al., 2013) في نيجيريا والتي هدفت إلى إنتاج إنزيمي polygalacturonase و Pectinlyase من فطور *A.tamarii* بالتخمير الصلب في وسط نمو يحوي قشور المانجو كركيزة، ودراسة ثباتهما تجاه الحرارة ودرجات الـ pH، فتبين أن إنزيم polygalacturonase يمكن إنتاجه بفعالية عظمى بلغت 141.09 U /g بعد ثلاثة أيام من الحضن وكانت درجات الحرارة و pH المثلى لعمله ˚ C 70 -40 و pH=5، على التوالي، بينما أنتج إنزيم Pectinlyase بفعالية وصلت إلى 5670.5 U /g بعد ستة أيام من الحضن وكانت درجة الحرارة المثلى لعمله ˚ C 60 و pH=7.5.
- دراسة (Ezik, et al., 2014) في نيجيريا تضمنت استخلاص البكتين من قشور البرتقال واستخدامه كمصدر للكربون في عمليات التخمير المغمور لإنتاج Pectinases من ثلاث أنواع من فطرAspergillus، أنه تم الحصول على البكتين من قشور البرتقال بنسبة 15.5% عند درجة الحرارة ˚C 70و pH =2.2، وأن فطر *Aspergillus niger* قد تفوق على باقي الأنواع الفطرية في إنتاجه Pectinases، كما أشار الباحثون إلى أن استخدام قشور البرتقال او البكتين المستخلص منه في عمليات التخمير أمر ذو فائدة اقتصادية وبيئية وحيوية هامة وخاصة في حال استخدام الإنزيمات المنتجة في ترويق عصائر الفاكهة ولاسيما البرتقال.
- دراسة (Khatri, et al., 2015) بينت إمكانية نشاط الإنزيمات البكتينية في الوسط القلوي حيث تم الحصول على أعلى فعالية إنزيمية عندpH=8.2، كما أظهرت هذه الدراسة ثباتية الإنزيمات البكتينية تجاه الحرارة فقد حافظت هذه الإنزيمات على فعاليتها الكاملة حتى درجة حرارة ˚C 70 وقد حافظت على 82% من فعاليتها عند حرارة 100°C.
- دراسة (Naveed, et al., 2016) تقتضي المعالجة الحيوية لمخلفات البرتقال وإنتاج Pectinases من فطر *Aspergillus niger* وفق تقنية التخمير المغمور في وسط Czapeck مع قشور البرتقال كمصدر للكربون، وقد تبين أن أعلى إنتاجية للإنزيمات كانت عند اليوم الخامس من التخمير عند درجة حرارة 30°C و pH=5.5 وتركيز الركيزة (قشور البرتقال) 4% ووصلت الفعالية الإنزيمية عندها إلى (117.1 μM /ml /min)، وبلغت الفعالية النوعية 97.2 U /mg وذلك بعد عملية التنقية للإنزيمات التي تمت من خلال الترسيب بكبريتات الأمونيوم والتنقية باستخدام كروماتوغرافيا العمود (التبادل الشاردي)، ثم كروماتوغرافيا العمود (الفصل الجزيئي)، وقدر الوزن الجزيئي للإنزيمات النقية30 KDa ، كما كانت درجة الحرارة و pH المثلى للإنزيمات المنتجة هي ˚C 55، 7 على التوالي.
- دراسة (Sudeep, et al., 2020) في جامعة Macau في الصين بحثاً يتضمن إنتاج الإنزيمات البكتينية من 14سلالة *Aspergiluus* spp. Gm معزولة من التربة باستخدام بكتين البرتقال كمصدر للكربون، أثبتت النتائج إمكانية 4 سلالات فقط على إنتاج هذه الإنزيمات واستطاعت سلالة واحدة من بينها إعطاء أعلى إنتاجية من الإنزيم بعد 48 ساعة من الحضن عند 30°Cو تركيز 1% من بكتين البرتقال.

- دراسة (Ajayi, et al., 2021) هدفت إلى معالجة الكمية الهائلة من مخلفات الأناناس الموجودة في نيجيريا من خلال استخلاص البكتين من قشور الأناناس واستخدامه كركيزة في إنتاج Pectinases من فطر *Aspergillus niger* بطريقة التخمير المغمور ثم تنقية Pectinases باستخدام الفحم النشط 3%، واستخدام الإنزيمات الناتجة في استخلاص زيت جوز الهند ومقارنة النتيجة بتلك المتحصل عليها باستخدام Pectinases التجاري، وبينت النتائج أن نسبة البكتين في قشور الأناناس كانت 24.8%، وأن أعلى فعالية إنزيمية تم الحصول عليها في اليوم الخامس من التخمير، وعند درجة حرارة 40°C و pH=5 و تركيز 1% من الركيزة، وقد حث وجود شوارد المغنزيوم في وسط النمو على زيادة الفعالية الإنزيمية.
- دراسة (Jalil & Ebrahim, 2021) في جامعة Sains في ماليزيا تناولت إنتاج إنزيم Pectinase من *Aspergillus niger* LFP- 1 بالتخمير الصلب وبالاعتماد على قشور البرتقال الهندي (الكريب فروت) كركيزة للوسط الصلب ومصدر للكربون، وتنقيته باستخدام الترسيب بكبريتات الأمونيوم ثم استخدام كروماتوغرافيا عمود التبادل الشاردي ثم استخدام كروماتوغرافيا عمود الفصل الجزيئي، ووجد أن الفعالية النوعية للإنزيم بعد التنقية وصلت إلى U/ mg 61.54 وكانت درجة الحرارة وpH المثلى لعمله هي 50°C، 3.5 على التوالي، وكان ثابتاً في مجال من الـ pH 3.5- 4.5 ومجال حراري مرتفع نسبياً 50°C -40 ولمدة 100 دقيقة، كما تم حساب الثوابت الحركية للإنزيم المنتج Km وVmax وكانت 3.89 و1701 U / mg على التوالي.

3- منهجية الدراسة وطرائقها.

منهجية الدراسة:

استخدمت عزلات من فطور Aspergillus التي اختبرت مقدرتها على إنتاج الإنزيمات البكتينية على الوسط الصلب بشكل مسبق، حيث تم الحصول على العزلات الفطرية المستخدمة من بعض ثمار الفاكهة التي تحتوي على البكتين بنسب متفاوتة (المشمش والدراق وقشور الحمضيات والتفاح والكرز والفريز والخوخ) بعد أن تركت حتى ينمو فطر Aspergillus عليها.

طرائق البحث:

أ- بعد ان تم عزل 20 عزلة فطرية من جنس Aspergillus أبدت 13 عزلة منها قدرتها على إفراز الإنزيمات البكتينية على الوسط الصلب والذي تكون من وسط Czapek Dox Agar مع إضافة البكتين كمصدر للكربون، ولكن تميزت خمس عزلات منها بقدرتها العالية على إفراز الإنزيمات البكتينية، وهذا ما تم نشره في بحث سابق، وقد أخذت العزلات الخمس السابقة الذكر وتم تنفيذ هذا البحث عليها كما هو موضح بالمراحل التالية:

ب- تحضير الوسط الصلب: تم الحصول على ثمار البرتقال من الأسواق المحلية لمدينة حلب حيث تم تقشيرها وتقطيعها وتجفيفها وحساب نسبة البكتين فيها وفق الطريقة التالية:

ج- تم وزن 100 غرام من قشور البرتقال ووضعت في خلاط وأضيف إليها 400 مل ماء مقطر و 1.2 غرام من هيكساميتا فوسفات الصوديوم، وبعد الانتهاء من عملية الخلط والتنعيم للعينة عدلت قيمة الpH إلى القيمة 4.5 وتم التسخين على درجة 90 -95C مع التحريك لمدة ساعة والمحافظة على حجم الماء وعلى قيمة الpH ثابتة بإضافة حمض الستريك أو هيدروكسيد الصوديوم، بعد ذلك رشح المزيج بسرعة بواسطة ورق ترشيح سريع وبرد الراشح وأضيف إليه ثلاثة أضعاف حجمه أسيتون يحوي 0.5 M حمض كلور الماء المركز (يجب أن تكون قيمة الـ pH تساوي 7 -1، وبعد التحريك لمدة 30دقيقة فصل الراسب بالترشيح وغسل عند نفس قيمة الـ pH

وغسل الراسب بشكل متكرر بالأسيتون حتى أصبحت قيمة الـpH أعلى من 4، ثم غسل الراسب في 400 مل أسيتون وجفف على درجة الحرارة 400°C حتى ثبات الوزن (Christensen, et al., 2006).

واعتماداً على هذه النسبة تم وزن 10 غرام من قشور البرتقال ووضعها في دوارق سعة 100 مل لتستخدم كركيزة أساسية (مصدر البكتين) في عملية التخمير وإنتاج الإنزيمات البكتينية ثم أضيف إليها 0.1%(NH4)2SO4 كبريتات الأمونيوم الثنائية، 0.6% K2HPO4 فوسفات البوتاسيوم الثنائية، 0.2%KH2PO4 فوسفات البوتاسيوم الأحادية، 0.2%MgSO4·7H2O كبريتات المغنيزيوم، ثم ضبطت pH الوسط عند 6، وعقم الوسط في الأوتوغلاف عند درجة حرارة 121ه C لمدة 20 دقيقة.

د- تحضير المعلق الفطري: تم تحضير المعلقات الفطرية من العزلات الفطرية الخمس ذات الإنتاج الأعلى للإنزيمات البكتينية بتركيز (1×107) بوغة/ مل باستخدام شريحة Hymocetometer، وأضيف لها بضع نقاط من مادة Tween 20، ومن الجدير بالذكر أن هذه العزلات كانت تنتمي إلى نوعي A.niger, A.fumigatus.

هـ- تلقيح الوسط الصلب: لقح الوسط الصلب المعقم بـ 3 مل من المعلقات الفطرية السابقة.

و- تحضين الوسط الملقح: حضنت الدوارق الحاوية على الوسط الصلب الملقح عند درجة حرارة 30ه C لمدة 96 ساعة.

ز- تحضير الإنزيم الخام: بعد انتهاء مدة التخمير (التحضين) تم إضافة 25 مل من الماء المقطر المعقم لكل دورق على حدة، وضعت جميع الدوارق في حاضنة متحركة (هزازة) بحركة 150 rpm بدرجة حرارة 30°C لمدة ساعة، رشح الناتج بورق ترشيح (Wattman 1) وذلك لفصل الكتلة الحيوية النامية، بعد ذلك تم الحصول على الإنزيم بتثفيل الرشاحة بسرعة 10000 rpm مدة 10دقائق عند درجة حرارة 4ه C، أخذ الطافي وأطلق عليه اسم المستخلص الإنزيمي الخام الذي أجريت عليه الدراسة لاحقاً (Tariq & Latif, 2012).

ح- قياس الفعالية الإنزيمية: اعتمدت طريقة ثنائي نترو حمض الساليسيليك (DNS) لتقدير فعالية الإنزيم (المستخلص الإنزيمي 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 الإنزيمي الخام، وحضن مزيج التفاعل عند درجة حرارة 40ه 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 نترو حمض الساليسيليك (DNS)، ويتم الاعتماد على منحنى 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).

ط- تحديد الظروف المثلى لإنتاج الإنزيمات البكتينية:

ي- تحديد درجة الحرارة المثلى: حضرت سبع عينات ذات تركيب متجانس يحوي على الأوساط الزرعية المعقمة والملقحة عند درجات حرارة مختلفة C(ه25، ه 30، ه40، ه45، ه50، ه55، ه60) وقيست الفعالية الإنزيمية للمستخلص الإنزيمي الناتج كما هو موضح في الفقرة ح.

ك- 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 (48،72،96،120،144) ساعة وقيست الفعالية الإنزيمية للمستخلص الإنزيمي الخام الناتج كما هو موضح في الفقرة ح.

ل- تحديد حجم اللقاح (المعلق الفطري) الأمثل: حضرت ست عينات ذات تركيب متجانس يحوي على الأوساط الزرعية المعقمة ولكن بأحجام مختلفة من المعلق الفطري (0.5،1،1.5،2،3،4،5) مل وتحضينها عند درجة الحرارة المثلى وللمدة الزمنية المثلى وقيست الفعالية الإنزيمية للمستخلص الإنزيمي الناتج كما هو موضح في الفقرة ح

م- تحديد كمية البكتين المثالي: حضرت ثمان عينات من أوساط زرعية ذات محتوى مختلف من البكتين (0.5،1،1.5،2،2.5،3،3.5،4) غرام حيث استخدم كميات مختلفة من قشور البرتقال (20،30،40،50،60،70،80،90) غرام على التوالي ولقحت بحجم اللقاح الأمثل وحضنت عند درجة الحرارة المثلى 40°C وللمدة الزمنية المثلى 96 ساعة، وقيست الفعالية الإنزيمية للمستخلص الإنزيمي الناتج كما هو موضح في الفقرة ح

ن- تحديد التركيز الأمثل من الأبواغ في المعلق الفطري: حضرت ست عينات من الأوساط الزرعية ولقحت بالمعلق الفطري ذو التراكيز المختلفة من الأبواغ (104105,،106،107،108،109) بوغة/ مل حضنت عند درجة الحرارة المثلى والمدة الزمنية المثلى، وقيست الفعالية الإنزيمية للمستخلص الإنزيمي الناتج كما هو موضح في الفقرة ح

س- تحديد المصدر الكربوني الأمثل: استخدمت في هذه الدراسة مصادر كربون مختلفة (سكروز، غالاكتوز، نشاء، كربوكسي متيل السيللوز، غلوكوز)، حيث أضيفت هذه المصادر إلى وسط إنتاج الإنزيمات البكتينية بتركيز 0.5%، ثم حضنت الدوارق التي تحتوي أوساط الإنتاج المزودة بمصادر الكربون السابقة ولقحت بالمعلق الفطري في ظروف الإنتاج المثلى التي حددت سابقاً، قيست الفعالية الإنزيمية للمستخلص الإنزيمي الناتج كما هو موضح بالفقرة ح.

ع- استخدمت مصادر آزوتية مختلفة في وسط إنتاج الإنزيمات البكتينية حيث أضيفت بتركيز 0.1%، استخدم في هذه الدراسة مصادر الآزوت التالية: مستخلص الخميرة، كبريتات الأمونيوم، ببتون، خلات الأمونيوم، يوريا، كربونات أمونيوم، كلور الأمونيوم، فوسفات ثنائية الأمونيوم، تم حضن الدوارق التي تحتوي أوساط الإنتاج المزودة بمصادر الآزوت المختلفة والتي تم تلقيحها في ظروف الإنتاج المثلى التي تم تحديدها سابقاً، قيست الفعالية الإنزيمية للمستخلص الإنزيمي كما هو موضح بالفقرة ح.

ف- التحليل الإحصائي: تم التحليل الإحصائي بواسطة برنامج Genstat 12 عند مستوى معنوية 1%.

4- النتائج ومناقشتها.

اولاً- نسبة البكتين: كانت نسبة البكتين في قشور البرتقال 10% وبالتالي فإن 10 غرام من قشور البرتقال تحوي 1 غرام من البكتين، وبناءً على تلك النسبة تم تحديد وزن قشور البرتقال المستخدمة في عملية التخمير وفقاً لكمية البكتين المراد إضافتها.

ثانياً- الفعالية الإنزيمية للمستخلصات الإنزيمية الخام:

يبين الجدول (1) الفعالية الإنزيمية للمستخلصات الإنزيمية الخام التي تم الحصول عليها من العزلات الفطرية الخمس المستخدمة في البحث ذات الإنتاج الأعلى من الإنزيمات البكتينية، ويلاحظ من النتائج المدونة في الجدول وبعد التحليل الإحصائي أن المستخلص الإنزيمي المنتج من العزلة A5 قد تفوق معنوياً على المستخلصات الأخرى المنتجة من باقي العزلات في فعاليته الإنزيمية والتي صلت إلى 52 U/ ml، ليه المستخلص الإنزيمي المنتج من العزلة A1 بفعالية إنزيمية قدرها 51 U/ ml، ولوحظ انخفاض واضح ومعنوي في الفعالية الإنزيمية للمستخلص الإنزيمي المنتج من الفطور المعزولة من الدراق وهي تنتمي إلى النوع الفطري *Aspergillus fumigatus*

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

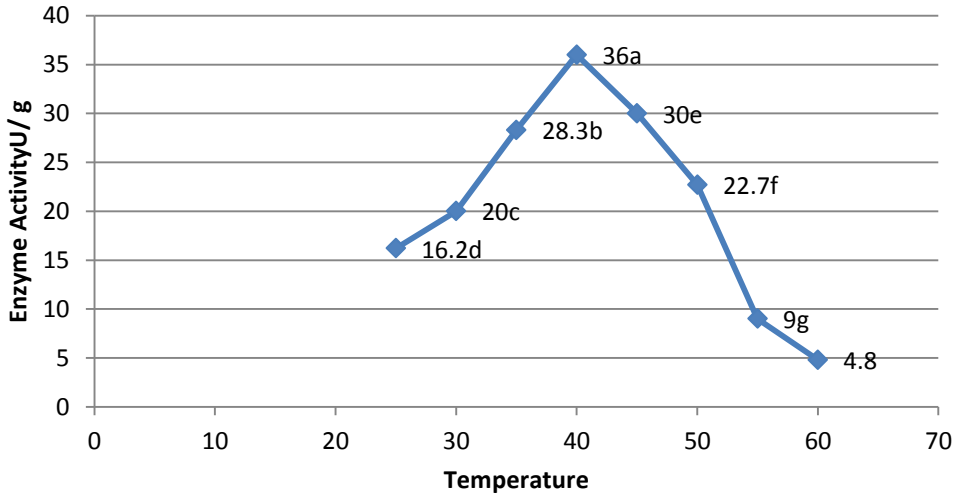
العزلة	المصدر	الفعالية الإنزيمية U/ ml
A1	قشور البرتقال	51[d]
A2	التفاح	43[c]
A3	الدراق	4.5[a]
A4	الخوخ	5[b]
A5	قشور الليمون	52[e]

أي معاملتين تشتركان بحرف واحد لا يوجد فرق معنوي بينهما عند مستوى معنوية 0.01%.

رابعاً- تحديد الظروف المثلى للإنتاج: تم أخذ العزلة A5 التي أنتجت الإنزيمات البكتينية بفعالية عالية مقارنة بالإنزيمات المنتجة من العزلات الأخرى، وذلك من أجل تحديد الشروط المثلى لإنتاج الإنزيمات البكتينية.

- **درجة الحرارة المثلى:**

يبين الشكل (1) الفعالية الإنزيمية للإنزيمات البكتينية المنتجة ضمن درجات حرارة مختلفة والمتبعة لتحديد درجة الحرارة المثلى للإنتاج.



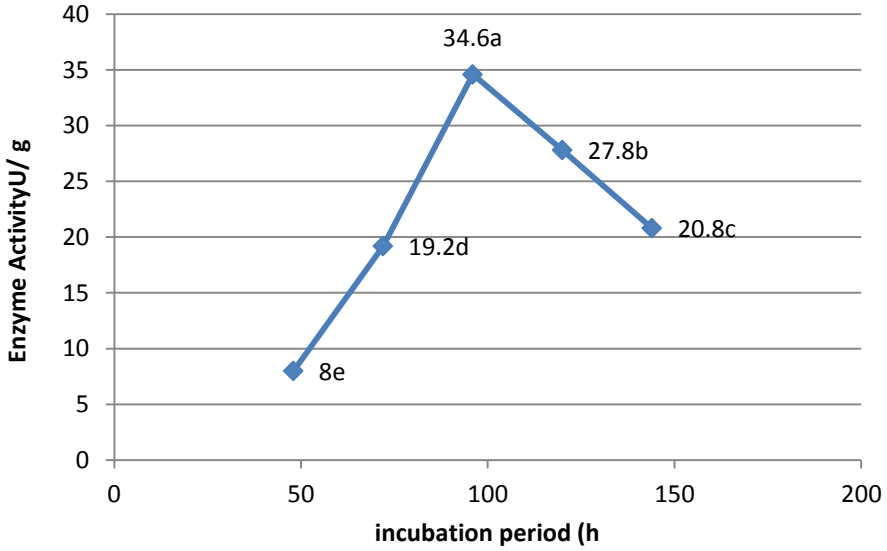
الشكل (1) الفعالية الإنزيمية عند إنتاج الإنزيمات البكتينية في درجات حرارة مختلفة.

أي معاملتين تشتركان بحرف واحد لا يوجد فرق معنوي بينهما عند مستوى معنوية 0.01%.

يلاحظ من الشكل السابق وبعد التحليل الإحصائي تدرج الفعالية الإنزيمية بالزيادة مع زيادة درجة حرارة التحضين حتى وصلت أعلى مستوياتها (36 U/ g) عند درجة الحرارة 40ºC وبفروق معنوية واضحة مقارنة بباقي المعاملات ثم بدأت بالانخفاض إلى أدنى مستوياتها (4.8 U/ g) عند درجة الحرارة 60ºC، ويفسر ذلك بأن زيادة درجة الحرارة يؤدي إلى تحفيز العمليات الاستقلابية التي تتم داخل الخلية حتى تصل درجة الحرارة إلى الحد الذي يتحمله الكائن الحي الدقيق ومن المعروف أن فطور Aspergillus (الرشاشيات) تتحمل درجات حرارة حتى 40ºC، وبالتالي فإن ارتفاع الحرارة عن تلك الدرجة سيؤدي إلى انخفاض نشاطها الاستقلابي، وتجدر الإشارة إلى أن هذه النتيجة تتوافق مع نتائج البحث الذي أجراه (Chadha, et al., 2005)، فقد أكدوا أن درجة الحرارة 40°C هي الدرجة المثلى لإنتاج الإنزيمات البكتينية وأن إنتاج تلك الإنزيمات عند درجة حرارة أعلى من ذلك يؤدي إلى انخفاض فعالية الإنزيمات المنتجة، كما أكد هذه النتيجة Deshmukh (Deshmukh, et al., 2012) وزملائه عام 2012.

- مدة التحضين (التخمير) المثلى:

يوضح الشكل (2) نتائج قياس الفعالية الإنزيمية للإنزيمات البكتينية المنتجة عند تحضينها لفترات زمنية مختلفة عند درجة الحرارة 40ºC بغية تحديد فترة التحضين (التخمير) المثلى لإنتاج هذه الإنزيمات.



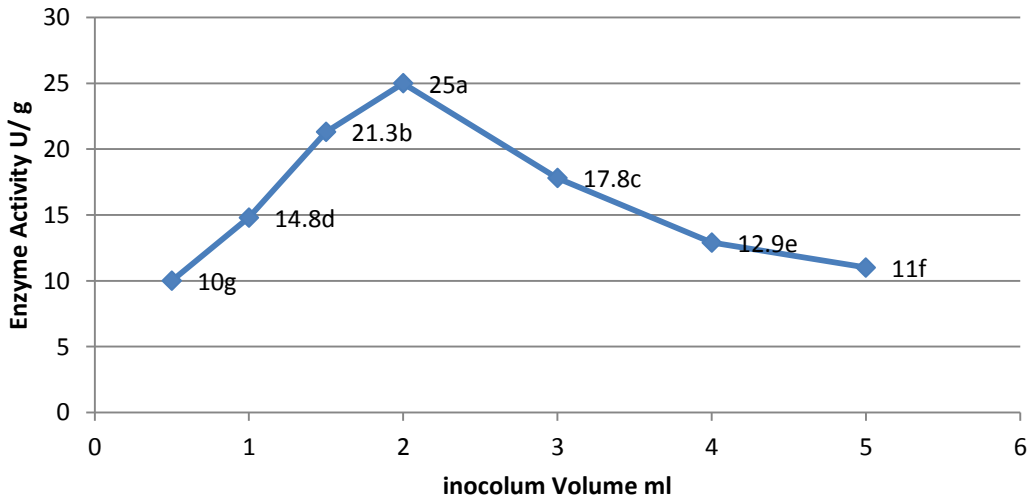
الشكل (2) الفعالية الإنزيمية عند إنتاج الإنزيمات البكتينية في فترات زمنية مختلفة.

أي معاملتين تشتركان بحرف واحد لا يوجد فرق معنوي بينهما عند مستوى معنوية 1%.

أظهر التحليل الإحصائي أن المدة المثلى لإنتاج الإنزيمات البكتينية هي 96 ساعة حيث أبدت تلك الإنزيمات الفعالية الإنزيمية العظمى عند إنتاجها خلال الفترة الزمنية السابقة وبفروق معنوية واضحة مقارنة بباقي الفترات الزمنية وهذا ما أشار إليه (Dourghai & Omyebarachi, 2019) فقد أكدوا أن المدة المثلى لإنتاج الإنزيمات البكتينية بأعلى فعالية إنزيمية هي 96 ساعة، كما تتوافق هذه النتيجة مع ما ذكره (Banakar & Thippesway, 2012) من أن المدة الزمنية اللازمة لإنتاج إنزيمات بكتينية ذات نشاط أعظمي هي مدة 96 ساعة.

- حجم اللقاح (المعلق الفطري) الأمثل:

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



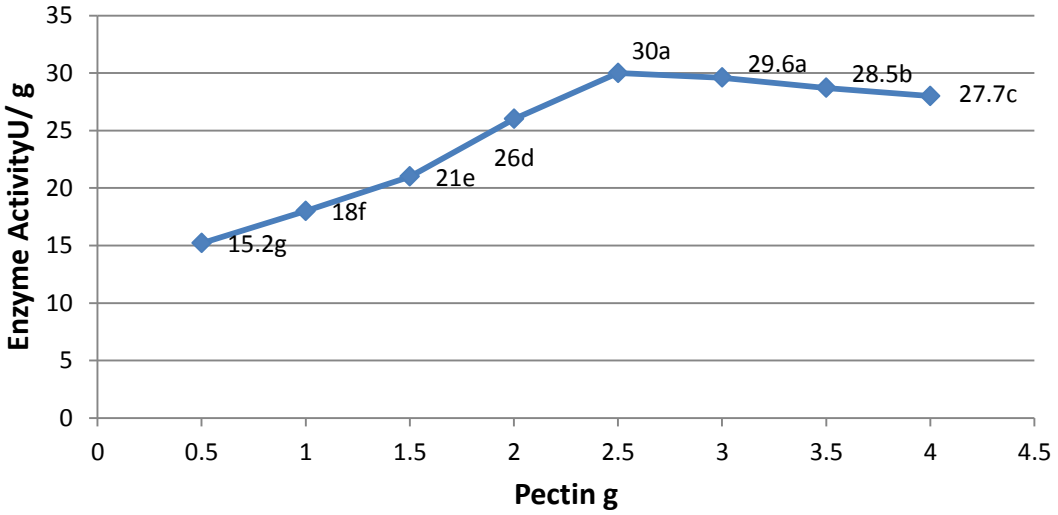
الشكل (3) الفعالية الإنزيمية عند إنتاج الإنزيمات البكتينية بإضافة حجوم من اللقاح الفطري مختلفة.

أي معاملتين تشتركان بحرف واحد لا يوجد فرق معنوي بينهما عند مستوى معنوية 1%.

بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية في الفعالية الإنزيمية للمستخلص الإنزيمي المنتج عند إضافة المعلق الفطري بحجوم مختلفة، فعند إضافة المعلق الفطري بحجم 2 مل كانت الفعالية الإنزيمية أعلى ما يمكن، بينما كانت الفعالية الإنزيمية أدنى ما يمكن عند إضافة المعلق الفطري بحجم 0.5 مل. وتتوافق هذه النتيجة مع ما ذكره (Okonji, et al., 2019) الذين درسوا في بحثهم حجم اللقاح الفطري المستخدم لإنتاج الإنزيمات البكتينية وأكدوا أن حجم اللقاح 2 مل هو أفضل حجم لإنتاج تلك الإنزيمات بفعالية عظمى.

- كمية البكتين الأمثل:

أظهر التحليل الإحصائي تغيرات معنوية ملحوظة في الفعالية الإنزيمية للمستخلص الإنزيمي المنتج تبعاً لكمية البكتين المستخدمة، ووجد أن استخدام 2.5غ من البكتين أعطى أعلى فعالية إنزيمية وبفروق معنوية واضحة بالمقارنة مع المعاملات التي استخدم فيها كميات أقل من البكتين ولكن لم يلاحظ أي فروق معنوية في فعالية الإنزيمات المنتجة عند زيادة كمية البكتين إلى 3 غ ثم أخذت الفعالية الإنزيمية تدريجياً بالانخفاض المعنوي عند زيادة كمية البكتين عن 3 غ وهذا ما يوضحه الشكل رقم (3).

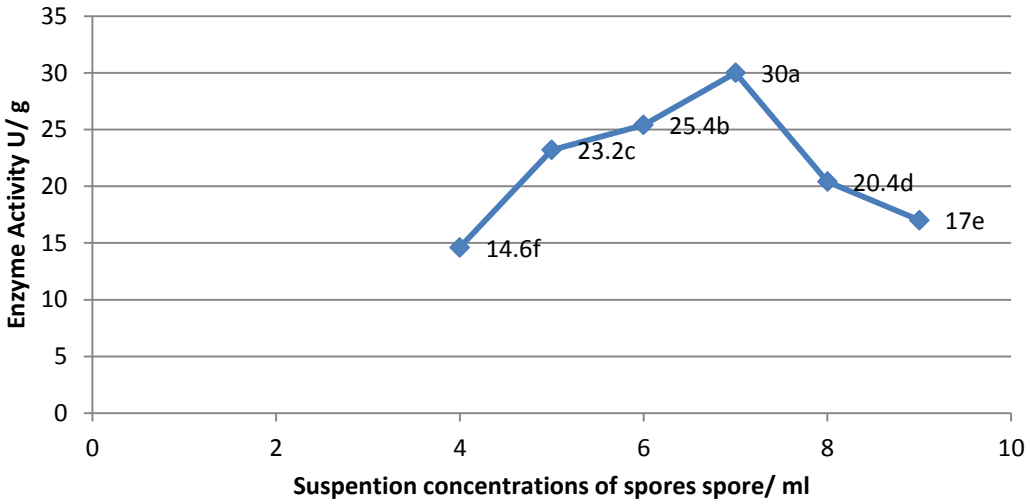


الشكل (4) الفعالية الإنزيمية عند إنتاج الإنزيمات البكتينية باستخدام كميات مختلفة من البكتين.

أي معاملتين تشتركان بحرف واحد لا يوجد فرق معنوي بينهما عند مستوى معنوية 1%.

- تركيز المعلق الفطري من الأبواغ:

يلاحظ من الشكل رقم (5) تدرج الفعالية الإنزيمية بالزيادة المعنوية مع زيادة تركيز الأبواغ في المعلق الفطري بدءاً من 104 حتى 107 بوغة/ مل نحو الأعلى ثم بدأت بالانخفاض لتبلغ أقل قيمة عندما أصبح تركيز الأبواغ في المعلق الفطري 109 بوغة/ مل ويعود ذلك إلى زيادة تركيز الابواغ 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 & Silveria, 2018) حيث قاموا بإنتاج الإنزيمات البكتينية باستخدام معلق فطري ذو تركيز 107 بوغة/ مل.

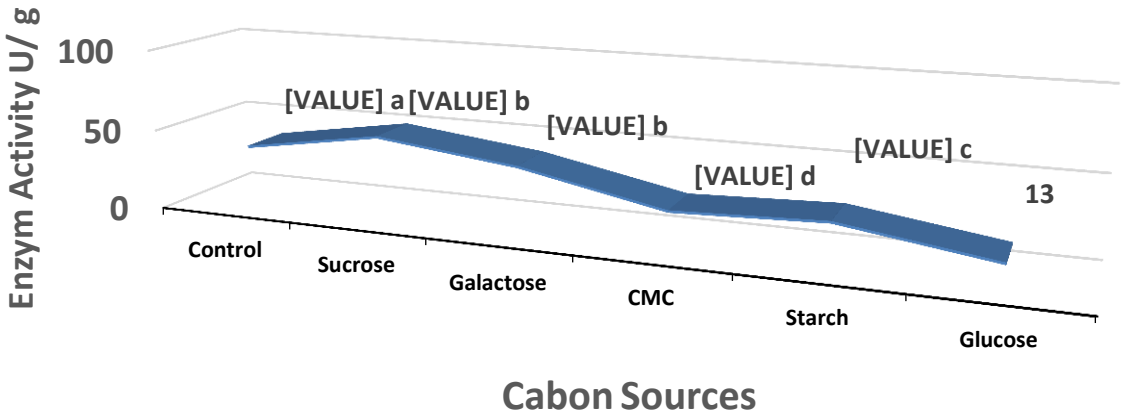


الشكل (5) الفعالية الإنزيمية عند إنتاج الإنزيمات البكتينية باستخدام تراكيز مختلفة من الأبواغ في المعلق الفطري.

أي معاملتين تشتركان بحرف واحد لا يوجد فرق معنوي بينهما عند مستوى معنوية1%.

- المصدر الكربوني الأمثل:

أشارت النتائج المبينة في الشكل (16) اختلاف الفعالية الإنزيمية باختلاف المصدر الكربوني المستخدم، وقد لوحظ أن السكروز (Sucrose) هو أفضل مصدر كربوني لإنتاج الإنزيمات البكتينية مقارنة بالمصادر الكربونية الأخرى المستخدمة، حيث وصلت الفعالية الإنزيمية للمستخلص الإنزيمي الخام إلى أعلى مستوياتها (50.7 U/ g) عند استخدام السكروز (Sucrose) وبفروق معنوية واضحة بالمقارنة مع الشاهد و باقي المصادر، يليه الغالاكتوز (Galactose) بفعالية إنزيمية وصلت إلى (40.4 U /g)، كما لوحظ انخفاض شديد في الفعالية الإنزيمية لدى استخدام الغلوكوز (Glucose) كمصدر للكربون فلم تتعد الفعالية الإنزيمية قيمة 13 U /g، وذلك مقارنة بالشاهد الذي وصلت فيه الفعالية الإنزيمية إلى 37 U/ g، ومقارنة بباقي المصادر الكربونية التي تفوقت معنوياً على الغلوكوز وحققت فعالية إنزيمية أكبر من (13 U/ g)، وقد توافقت هذه النتيجة مع ما توصل إليه (Chadha, et al., 2005) بأن استخدام السكروز كمصدر كربوني لإنتاج الإنزيمات البكتينية بطريقة التخمير الصلب زاد من الفعالية الإنزيمية زيادة ملحوظة، بينما خفض استخدام الغلوكوز من الفعالية الإنزيمية وبشكل واضح، وقد جاءت هذه النتيجة على خلاف ما ذكرته Pereira وزملاؤها عام 1993 بأن إضافة الغلوكوز كمصدر كربوني في عملية إنتاج الإنزيمات البكتينية بالتخمير الصلب لم يخفض من الفعالية الإنزيمية بل زادت الفعالية الإنزيمية بزيادة تركيز الغلوكوز من 3% إلى10%.

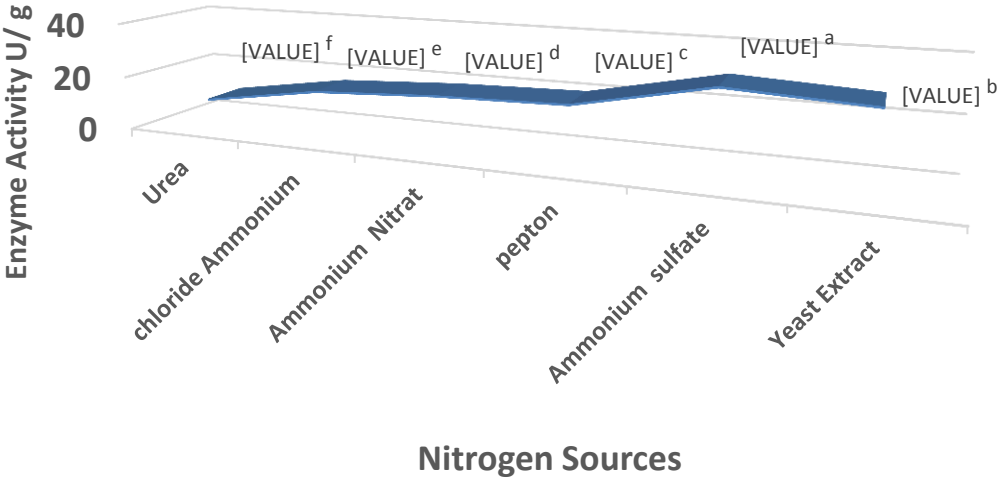


الشكل (6) الفعالية الإنزيمية عند إنتاج الإنزيمات البكتينية باستخدام مصادر كربونية مختلفة.

أي معاملتين تشتركان بحرف واحد لا يوجد فرق معنوي بينهما عند مستوى معنوية 0.01%.

- المصدر الأزوتي الأمثل:

تشير النتائج المبينة في الشكل (7) أن أفضل مصدر أزوتي مستخدم في إنتاج الإنزيمات البكتينية هو كبريتات الأمونيوم الذي حقق فعالية إنزيمية بلغت 30.3 U/ g، يليه مستخلص الخميرة بفعالية إنزيمية بلغت/ 28 U g، بينما كانت اليوريا هي أقل مصدر أزوتي كفاءة في زيادة الفعالية الإنزيمية مقارنة بباقي المصادر الآزوتية المستخدمة في إنتاج الإنزيمات البكتينية ولم تتجاوز الفعالية الإنزيمية عند استخدامها أكثر 10 U/ g.



الشكل (7) الفعالية الإنزيمية عند إنتاج الإنزيمات البكتينية باستخدام مصادر آزوتية مختلفة.

أي معاملتين تشتركان بحرف واحد لا يوجد فرق معنوي بينهما عند مستوى معنوية 0.01%.

مناقشة النتائج.

تشير نتائج دراسة إلى ما يلي:

1- إمكانية الحصول على الإنزيمات البكتينية من بعض أنواع فطور Aspergillus باستخدام نظام تخمير الوسط الصلب.
2- قدرة فطر A.niger على إنتاج الإنزيمات البكتينية بفعالية أكبر من مثيلاتها المنتجة من فطر A.fumigatus.
3- أبدت الإنزيمات البكتينية المنتجة من فطور معزولة من مصادر غنية بالبكتين (كالحمضيات) فعالية أعلى من تلك المعزولة من مصادر ذات محتوى بكتيني أقل.
4- إمكانية الحصول على أعلى فعالية للإنزيمات البكتينية المتحصل عليها من فطر A.niger عند إنتاجها بدرجة حرارة 40ºC، ولمدة 96 ساعة، بحيث يكون تركيز الأبواغ في المعلق الفطري 107 بوغة/ مل، وكمية البكتين في وسط التخمير 2.5غ، وعند تلقيح الوسط بلقاح فطري حجمه 1.5 مل، وباستخدام بكتين الحمضيات كمصدر للكربون، وكبريتات الأمونيوم كمصدر للآزوت.

التوصيات والمقترحات.

بناءً على النتائج التي تم التوصل إليها يوصي الباحثون ويقترحون الآتي:

1- تحديد درجة الحرارة ودرجة الحموضة المثلى لعمل المستخلص الإنزيمي.
2- استخدام المستخلص الإنزيمي في الصناعات الغذائية كصناعة العصائر.
3- تحديد هوية العزلات الفطرية ذات المقدرة الأكبر على إنتاج الإنزيمات البكتينية باتباع تقنية التفاعل التسلسلي للبوليميراز (PCR)

قائمة المراجع.

أولاً- المراجع بالعربية:

- الوزير، دريد (2008). تقانة الخضار والفواكه (القسم النظري). مطبعة جامعة البعث: حمص. سوريا.
- فالح، أديب، (2012). تقانات التقطير والتخمير. منشورات جامعة حلب. سوريا.

ثانياً- المراجع بالإنجليزية:

- Adlercreutz, P., (2013), Enzymes in food processin. Third edition. Acadimic, Inc: New York. America.
- Ajayi, A. Oniha, M. Onibokun, A. Salubi, E. Lawal, B and Ajayi, O.M. (2021). Pectinase Production by Aspergillus niger using Pineapple peel pectin and Its application in Coconut oil extraction. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 655.
- Amande, T. Bukola, A.T. Uduak, N.N. and Benjamin, A. (2013). Production and Partial Characterization of Pectinases From Mango Peels By Aspergillus Tamarii. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 3 (1): 59- 62.
- Banakar, SP. and Thippesway, B. (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 Journal. 3(5): 138- 143.
- Benoit, I. Coutinho, P. Schols, A. Gerlach, J. Henrissat, B. and Devries, R. (2012). Degradation of different pectins by fungi. BMC Genomics Journal. 13: 321- 471.

- Cao, J. Zheng, L. Chen, S. (1992). Scrreening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on its potential application in degumming of ramie. Journal of Enzyme and Microbial Technoogy.14(12): 1013- 1016.
- Chadha., U. Vikram, D. Shobhna Sandhu, B. and Phutela, S. (2005). Pectinase and Polygalacturonase Production By A Thermophilic Aspergillus Fumigatus Isolated From Decomposting Orange Peels. Brazilian Journal of Microbiology. 36:63- 69.
- Christensen, E. Kreiberg, D. Thorsoe, H. Buchholt, C. Rasmussen, P. and Nielsen, J. (2006). Use of a high- ester pectin in acidic protein- containing foodstuffs. European patent Journal.1:625- 796.
- Deshmukh, N. Talkal, R. Jha, K. Sinh, PG. and Prajapati, DC. (2012). Production, Purification, Characterization and Comparison of Polygalacturonase from various strains of Aspergillus. International Journal of Scientific & Technology Researc Journal. 1(9): 85- 91.
- Doughari, H. &Onyebarachi, G.C. (2019). Production, Purification and Characterization of Polygalacturonase from Aspergillus flavus Grown on Orange Peel. Appli Microbiol Journal.4(3).
- Ezike, C.T. Eze, O.S, Nsude, and A. Chilaka, F. (2014). Production of Pectinases from Aspergillus niger using submerged fermentation with orange peels as carbon source. Sylwan. 158(8): 434- 440.
- George, M. (2014). Pectinase. Food Processing Journal. 4(2): 567- 589.
- Helga, G. and Michelle, A. (2014). Pectinase. Wise geek Journal. 234- 267.
- Illanes, A. (2008). Enzyme Biocatalysis Principles and Applications. Springer Science Journal. 3(5): 118- 126.
- Jalil, T.M. and Ebrahim, D. (2021). Partial Purification and Characterisation of Pectinase Produced by Aspergillus niger LFP- 1 Grown on Pomelo Peels as a Substrate. Science Research Journal. 32(1): 1– 22.
- Jayani, R. Saxena, S. and Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes. Processing. Biochemistry Journal. 40(9): 2931- 2944.
- Khatri, B. Bhattarai, T. Shrestha, S. and Maharjan, J. (2015). Alkaline thermostable pectinase enzyme from spergillus niger strain MCAS2 isolated from Manaslu Conservation Area, Gorkha, Nepal. Springerplus Journal, 4: 488.
- Kiran, S. (2007). Applications of pectinases. J Pectinase database. 1060 – 1080.
- Maldona, M. and Strasser, S. (2008). Production of pectinasesterase and polygalacturonase by Aspergillus niger. Microbiol Biotechnology Journal. 20(1): 8- 34.
- Marcia, M. Silva, R. and Gomes, E. (1999). Screeing of bacterial strain for pectinolytic activity characterization of the Polygalacturonase produced from Bacillus.sp. Review.Microbiol Journal.13(4).

- Naveed, M. Akram, Z. Hussain, M.A. Zia, M. Nowrouzi, A. (2019). Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by Aspergillus niger; its purification and characterization. Journal of Radiation Research and Applied Science. 9(2).
- Okonji, R. Itokorod, B. Ovumedia, J. and Adedeji, O. (2019). Purification and biochemical characterization of pectinase produced by Aspergillus fumigatus isolated from soil of decomposing plant materials. Applied Biology & Biotechnology Journal. 7(03): 1- 8.
- Patil, S. and Dayanand, A. (2006). Exploration of Regional Agrowastes for the Production of Pectinase by Aspergillus niger. Food Technology, Biotechnology Journal. 44 (2): 289–292.
- Reed, G. (1993). Enzymes. Agric Biol Chem Journal.55:23–30.
- Sandri, G. and Silveira, M. (2018). Production and Application of Pectinases from Aspergillus niger Obtained in Solid State Cultivation. Beverages Journal. 4- 48.
- Saranraj, P. Geetha, M. Mahalakshmi, S. and Eetha, D. (2012). Screening of Pectinase Producing Bacteria and Fungi For Its Pectinolytic Activity Using Fruit Wastes. Biochemistry & Biotech Science Journal. 1: 30- 42.
- Sudeep, K. Jitendra, U. Dev, R.J. Binod, L. Dhiraj, K. Bhoj ,R. Tirtha, R.B. and Rajiv, D. (2020). Production, Characterization, and Industrial Application of Pectinase Enzyme Isolated from Fungal Strains. Fermentation. 6: 59.
- Suresh, B. and Viruthagiri, Th. (2010). Optimization and kinetics of pectinase enzyme using Aspergillus niger by solid- state fermentation. Indian Journal of Science and Technology. 3(8): 867- 870.
- Tankano, J. (2014). Importance of enzymes. Free health Journal. 5: 108- 113.
- Tariq, A. and Latif, Z. (2012). Isolation and biochemical characterization of bacterial isolates producing different levels of polygalacturonase from various sources. Microbiology Research Journal. 6(45): 7259- 7264.
- Thomas, J. Michael, J. and Rose, M. (2000). Pectinases. J Agricultural and food chemistry. 44(10): 2977- 2981.