IMMOBILIZED *Aspergillus niger* FOR α-AMYLASE PRODUCTION

By

REDA MAHGOUB MOHAMED

B.Sc. Agric. Sci. (Food Science), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 1999

THESIS

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

MASTER OF SCIENCE

In

Agricultural Sciences

(Food Science)

Department of Food Science
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2009

APPROVAL SHEET

IMMOBILIZED *Aspergillus niger* FOR α-AMYLASE PRODUCTION

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Food Science)
By

REDA MAHGOUB MOHAMED
B.Sc. Agric. Sci. (Food Science), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 1999

Approved by:

Dr. NAGWA MOSA HASSAN RASMY
.....
Professor of Food Science, Fac. Agric., Ain Shams University

Dr. ABD EL-RAHMAN MOHAMED KHALAF-ALLAH ……
Professor of Food Science, Fac. Agric., Cairo University

Dr. NAGWA MOHAMED AHMAD EL-SHIMI
……...
Professor of Food Science, Fac. Agric., Cairo University

Date: 9 / 6 / 2009

SUPERVISION SHEET

IMMOBILIZED *Aspergillus niger* FOR α-AMYLASE PRODUCTION

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Food Science)
By

REDA MAHGOUB MOHAMED
B.Sc. Agric. Sci. (Food Science), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt, 1999

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. Nagwa Mohamed El-Shimi
Professor of Food Science, Fac. Agric., Cairo University.

Dr. Wael Ahmad Bazaraa
Professor of Food Science, Fac. Agric., Cairo University.

Name of Candidate: Reda Mahgoub Mohamed **Degree:** M.Sc.
Title of Thesis: Immobilized *Aspergillus niger* for α-amylase production
Supervisors: Dr. Nagwa Mohamed El-Shimi and Dr. Wael Ahmed Bazaraa
Department: Food Science **Approval: 9/ 6/ 2009**

ABSTRACT

Various strains of *Aspergillus niger* were screened for α- amylase synthesis. Strain 3 proved to be the highest producer (1.82 $U.ml^{-1}$) and the largest clear zone (10 mm). Production of α- amylase (E.C. 3.2.1.1. 1, 4-α-D-glucan glucohydrolase) by *Aspergillus niger 3* in batch shaking system using free cells was optimized. Several factors were tested for its effect on enzyme synthesis e.g. source and concentration of carbon, source and concentration of nitrogen, pH in a buffered and un buffered media and incubation temperature. The highest α- amylase production (2.81 U. ml^{-1}) at 30 ºC was achieved after 3 days when *Aspergillus niger 3* was allowed to grow aerobically in a buffered medium (pH 7.0) containing 2 % dextrin and 1.6 % tryptone. The enzyme was found to be highly inducible by dextrin, while the presence of glucose or fructose repressed its synthesis.

Thermostability and pH stability were tested for crude enzyme and the highest stability was recorded at 30 ºC and pH rang 4-5.

Several factors were tested for its effect on enzyme activity e.g. reaction time, reaction temperature, Ca^{+2} ion concentrations, pH and buffer type as well as substrate concentrations. The highest α- amylase activity (0.47 U. ml^{-1}) was achieved at 30 min., pH range of 4.0 to 4.5 in sodium acetate, starch 1% and 10 mmol $CaCl_2.ml^{-1}$. In spite of maximum enzyme activity was reached at 65 ºC, the reaction temperature 30 ºC was chosen to perform the reaction due to enzyme instability at temperature 65 ºC.

Palm tree fiber (PTF) was evaluated for the first time as a novel fungal cells supporting material. Conidiospores were firmly attached onto the rough surfaces of the PTF as proved by SEM photomicrographs. The immobilized preparations were used in batch system for α- amylase production with maximum specific activity of 0.49 $U.ml^{-1}.mg^{-1}$. Such specific activity was improved to 0.8 $U.ml^{-1}.mg^{-1}$ by modifying fermentation medium to contain 0.5 % dextrin and 2.4 % tryptone. Produced α- amylase continuously by repeated batch over 5 cycles using immobilized preparation proved that the enzyme activity was consistently during the first two cycles.

Key words: α- amylase, Production, *Aspergillus niger*, immobilized, Palm tree fiber (PTF)

استمارة معلومات الرسائل التى تمت مناقشتها

الكلية / المعهد : الزراعة القسم : الصناعات الغذائية

1 – الدرجة العلمية : ماجستير [√] [ ]

2 – بيانات الرسالة :

عنوان الرسالة باللغة العربية :

انتاج انزيم الالفا اميليز من خلايا فطر *Aspergillus niger* المقيدة

عنوان الرسالة باللغة الأجنبية :

Immobilized *Aspergillus niger* for α- amylase production

التخصص الدقيق : ميكروبيولجى اغذية

تاريخ المناقشة : 2009/6/9

3 – بيانات الطالب :

الاسم : رضا محجوب محمد ابو العلا الجنسية : مصرية

النـوع : انثى

العنوان : شبرامنت – طريق سقارة السياحى– الهرم– محافظة 6 اكتوبر

رقم التليفون :0103699230

جهة العمل : كلية الزراعة– جامعة القاهرة رقم الفاكس :

البريد الإلكترونى :reda_karrim @ yahoo.com

4 – المشرفون على الرسالة :

الاسم	القسم	الكلية	الجامعة

1 ا.د/ نجوى محمد احمد الشيمى صناعات غذائية الزراعة القاهرة

2 ا.د/ وائل احمد بازرعة صناعات غذائية الزراعة القاهرة

3

4

5 – مستخلص الرسالة (Abstract)

5 – 1 باللغة العربية : بشرط ألا يزيد عن 7 أسطر

تم اختبار العديد من سلالات *Aspergillus niger* من حيث قدرتها على انتاج الالفا اميليز. تم اختبار الظروف المثلى باستخدام المزارع المهتزة بنظام الدفعات لأنتاج انزيم الالفا اميليز باستخدام الخلايا الحرة لسلالة *Aspergillus niger 3* و تم الحصول على أعلى أنتاج من الانزيم (3.10 وحدة انزيم. مل$^{-1}$) عند تنمية الفطر فى بيئة تحتوى على 2٪ دكسترين, 1.6٪ تربتون و درجة حرارة 30م° عند درجة أس هيدروجينى 7.0 كذلك تم دراسة الثبات الحرارى و الثبات على درجات مختلفة من الاس الهيدروجينى و اظهرت النتائج اعلى ثبات للانزيم عند و درجة حرارة 30م° و درجة أس هيدروجينى يتراوح بين 4 - 5 . كان اعلى نشاط للانزيم (0.47 وحدة انزيم. مل$^{-1}$) بعد 30 دقيقة من التفاعل عند درجة اس هيدروجينى 4 – 4.5 باستخدام محلول منظم من اسيتات الصوديوم و تركيز 10 مل مول من كلوريد الكالسيوم و 1٪ نشا.. و تم أنتاج انزيم الالفا اميليز عن طريق خلايا الفطر المقيدة على ليف النخيل باستخدام نظام الدفعات كما تم انتاج الانزيم بصورة مستمرة

(**الكلمات الدالة :** انزيم الالفا اميليز- الاسبرجلس نيجر- انتاج- تحميل او تقيد- ليف النخيل)

5 – 2 باللغة الأجنبية : بشرط ألا يزيد عن 7 أسطر

Various strains of *Aspergillus niger* were screened for α- amylase synthesis. Strain 3 proved to be the highest producer (1.82 $U.ml^{-1}$). Several factors were tested for its effect on enzyme synthesis. The highest α- amylase production (2.81 $U. ml^{-1}$) at 30 ºC was achieved after 3 days when *Aspergillus niger 3* was allowed to grow aerobically in a buffered medium (pH 7.0) containing 2 % dextrin and 1.6 % tryptone. Thermostability and pH stability were tested for crude enzyme and the highest stability was recorded at 30 ºC and pH rang 4-5. The highest α- amylase activity (0.47 $U. ml^{-1}$) was achieved at 30 min., pH range of 4.0 to 4.5 in sodium acetate, starch 1% and 10 mmol $CaCl_2.ml^{-1}$. The immobilized preparations were used in batch system and repeated batch.

(Key Words: α- amylase, Production**,** *Aspergillus niger*, immobilized, Palm tree fiber (PTF).

6 – <u>أهم النتائج التطبيقية التى تم التوصل إليها</u> :

(لا تزيد عن سطرين لكل منها)

6 – 1 و أظهرت سلالة *Aspergillus niger*3 اعلى انتاج للانزيم بينما سجلت *Aspergillus niger*8 اقل قيمة. عند تركيز 2٪ افضل مصدر كربون هو الدكسترين و 1.6% تربتون افضل مصدر نيتروجين حيث اعطي اعلي انتاجية للإنزيم (2.8 وحده/ مل) خلال اليوم الثالث للتخمر.

6 – 2 أظهرت النتائج أن أعلى ثبات كان على 30 درجة مئوية ز جاءت درجة الـ pH 3 بافضل نتيجة لثبات انزيم الالفا اميليز عند درجة حرارة 30 درجة مئوية.

6 – 3 و تم الحصول على أعلى نشاط نوعى (0.49وحدة إنزيم. مل$^{-1}$. ملجم$^{-1}$) عند وجود 1جم ليف نخيل/ 50 مل من بيئة التخمر و ازداد إلى 0.8 وحدة إنزيم. مل$^{-1}$. ملجم$^{-1}$ عند استخدام 0.5 جم ليف نخيل/ 50 مل من بيئة التخمر المعدلة (تحتوى على 0.5 ٪ دكسترين, 2.4٪ تربتون).

6 – 4 تم انتاج انزيم الالفا اميليز باعادة استخدام خلايا الفطر المقيدة على ليف النخيل (مادة دعامية) لعدد 5 دورات متتالية. و اوضحت النتائج ثبات انتاج الانزيم خلال الدورة الاولى و الثانية ثم انخفاضها فى الدورات التالية.

7 – ما هى الجهات التى يمكن أن تستفيد من هذا البحث :

(اذكر هذه الجهات مع شرح أهمية البحث لهذه الجهة بما لا يزيد عن أربعة سطور لكل جهة)

7 – 1 فى مجال تصنيع الخبز و منتجات المخابز حيث يعمل الانزيم على تحسين خواص الخبز و منتجاته

7 – 2

7 – 3

7 – 4

8 – هل توجد علاقة قائمة بإحدى هذا الجهات : نعم [√]

فى حالة نعم اذكر هذه الجهات :

8 – 1

8 – 2

8 – 3

ما هى طبيعة العلاقة :

مشروع بحثى ☐

تعاون أكاديمى ☐

مشروع ممول من جهة ☐ (اذكر ما هى :
)

أخرى (تذكر ☐
)

9 – <u>هل توافق على التعاون مع جهات مستفيدة من خلال الجامعة :</u>

(لماذا

√

نعم

(I) لتطبيق البحث : √

(II) لاستكمال البح

(ج) أخرى (**تذكر**

)

10 – <u>هل تم نشر بحوث مستخرجة من الرسالة فى مجلات أو مؤتمرات علمية</u>

(تذكر مع جهة النشر و المكان و التاريخ)

10 – 1 بحث فى مجلة كلية الزراعة – جامعة المنصورة 2007/7

10 – 2

10 – 3

11 – <u>هل سبق التقدم لتسجيل براءات اختراع</u> (تذكر مع الجهة و المكان و التاريخ)

لا

12 – <u>هل توافق على إعطاء البيانات المذكورة فى هذه الاستمارة لجهات أخرى</u>

نعم √

توقيع الطالب : توقيع المشرفين :

–

–

–

–

وكيل الكلية (المعهد) للدراسات العليا و البحوث :

التاريخ

DEDICATION

I dedicate this work to whom my heart felt thanks; to my father ; Mr. Mahgoub Mohamed , my mother, my husband Mustafa , my daughter Omnia, my lovely baby Karim, my brothers and sisters for all the support they lovely offered along the period of my post graduation.

ACKNOWLEDGEMENT

*In the name of **God** most gracious, most merciful, all praise be to **God**, the Lord of the universe, without whose bounty I would not has completed this work.*

*I wish to express my sincere thanks, deepest gratitude and appreciation to Dr. **NAGWA M. El- SHIMI** Professor of Food Science, Faculty of Agriculture, Cairo University for suggesting the problem, supervision, continued assistance and their guidance through the course of study and revision the manuscript of this thesis.*

*Sincere appreciation and deep gratitude are extended to **Dr. WAEL A. Bazaraa** Professor of Food Science, Faculty of Agriculture, Cairo University for his great help and assistance. I really appreciate his continuous effort throughout conducting my*

laboratory work, performing statistical analysis and writing the manuscript paper. Big thanks for their excellent advice in science and life.

Grateful appreciation is also extended to all staff members of Food Science Department, Faculty of Agriculture, Cairo University.

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION	**1**
REVIEW OF LITERATURE	**5**
1. Alpha amylase enzyme	**5**
a. Alpha amylase family	**5**
b. Characteristics of Catalytic Domain of α –Amylases	**7**
2. Microorganisms producing α –amylases	**9**
a. Fungi	**9**
b. Bacteria	**11**
c. Yeasts	**13**
3. Factors Regulation α- amylase Production	**13**
a. Carbon sources	**14**
b. Nitrogen sources	**17**
c. Initial pH - value	**20**
d. Incubation temperature	**21**
e. Incubation period	**24**
4. Enzyme Characteristics	**25**
a. Effect of temperature on α- amylase activity	**25**
b. Effect of pH on α- amylase activity	**27**
c. Effect of metal ions on α- amylase activity	**29**
d. Effect of substrate on α- amylase activity	**31**
5. Fermentation Techniques	**33**
a. Liquid batch system	**33**
b. Solid state fermentation	**34**
c. Fed-batch system	**34**