

Determining the typical cultural conditions for production of inulinase enzyme from local isolate of *A. niger*.

تحديد الظروف المزرعية المثلى لإنتاج إنزيم الانبولىنيز من الفطر *Aspergillus niger* المعزول محليا

أ.م. د. علي عبد الكاظم جاسم الغانمي- جامعة كربلاء- كلية العلوم

إ.د. أم البشر حميد جابر الموسوي- جامعة البصرة - كلية الزراعة

*¹م. ناجح هاشم كاظم- جامعة كربلاء- كلية العلوم

¹* البحث مستل من اطروحة طالب الدكتوراه ناجح هاشم

Summary

The cultural conditions for inulinase production from local isolate of *Aspergillus niger* were studied. The results showed that the optimum conditions were using a medium containing leek extract 1.5% supplemented with magnesium sulfate 0.1%, adjusted to pH 4.2, and inoculated with 1.5×10^6 spore/ ml of medium .

الخلاصة

درست الظروف المزرعية لإنتاج إنزيم الانبولىنيز من عزلة محلية للفطر *Aspergillus niger* وأوضحت النتائج إن أفضل هذه الظروف تمثلت باستخدام وسط مكوّن من المستخلص الخام لمسحوق الكراث بنسبة 1.5% ، المدعم بـ 0.1% كبريتات المغنيسيوم بـرقم هيدروجيني ابتدائي 4.2 وحجم لقاح 1.5×10^6 بوغ/ملتر من الوسط.

المقدمة Introduction

الفركتانات (Fructans) عبارة عن مواد كاربوهيدراتية متعددة لسكر الفركتوز مع جزيئة كلوكوز طرفية وهي تخلق من قبل مدى واسع من البكتريا وعدد محدود من الفطريات وعدد كبير من النباتات وتختلف الفركتانات فيما بينها بدرجة بلمرة الفركتوز ونوع الأصرة الموجودة بين هذه الوحدات إضافة إلى موقع جزيئة الكلوكوز (1). تتواجد الفركتانات في النباتات وتميزت عائلة Liliaceae (مثل الكراث والبصل والثوم والهلين) وكذلك العائلة المركبة Compositae (مثل خرشوفة القدس والبداليا والهندباء البرية) في كونهما العائلتين النباتيتين الأكثر خزنًا للفركتانات (2). وبعد الانبولىن أحد انواع الفركتانات ويكون بشكل سلسلة خطية لعدد الفركتوز الذي ترتبط وحداته بأواصر كلايكوسيدية من نوع $\beta(2-1)$ ، ويمكن أن تتواجد جزيئة الكلوكوز في بداية السلسلة مرتبطه بأصرة كلايكوسيدية من نوع $\alpha(2-1)$ مع جزيئة الفركتوز المجاورة مكونة جزيئة سكروز ، وقد يكون طول السلسلة الخطية في الانبولىن من (2-60) وحدة فركتوز أو أكثر (3).

على الرغم من تواجد الفركتانات في النباتات والبكتريا والفطريات إلا ان عملية استخلاصها تكاد تقتصر على النباتات. وأشارت العديد من الدراسات إلى إمكانية استخدام الماء الدافئ وفق ظاهرة الانتشار (Diffusion) لاستخلاصها بسهولة من النباتات (4).

تبدأ الطرق التقليدية لإنتاج الفركتوز بتحليل النشا إنزيمياً وذلك بمساعدة إنزيمي الالفا اميليز (α - amylase) ثم الاميلوكلوكوسايديز (Amyloglucosidase) وتنتهي بتحويل الكلوكوز إلى فركتوز بعملية يحفزها إنزيم الكلوكوز ايزوميريز (glucose isomerase) وتبلغ نسبة الفركتوز الناتج بهذه الطريقة حوالي 42% ويبقى حوالي 50% كلوكوز و 8% سكريات قليلة الوحدات (Oligosaccharides) (5) ، بيد ان الفركتوز المنتج بالطرق التقليدية يحتاج إلى تركيز باستخدام تقنية كروماتوغرافيا العمود والتي تعد غالية الثمن (6) ، وعلى الرغم من أن إضافة مادة البوريت (Borate) تعد بديلا مناسباً عن كروماتوغرافيا العمود إلى ان هذه المادة يمكن ان تكون سامة (7).

أما في العقود الثلاثة الأخيرة فقد طورت عملية إنتاج الفركتوز عن طريق التحلل الإنزيمي للانبولىن المحفز بوساطة انزيم الانبولىنيز (Inulinase) و تعد هي العملية الواعدة في الإنتاج إذ بالإمكان الحصول من خلالها على فركتوز بنسبة 95% بخطوة واحدة (8).

ونظراً لما يمتلكه إنزيم الانبولىنيز من أهمية كبيرة، فضلاً عن ندرة الدراسات عن هذا الإنزيم في العراق لذا فقد هدفت هذه الدراسة إلى: محاولة إيجاد وسط اقتصادي مناسب لإنتاج الإنزيم من الفطر *Aspergillus niger* وتحديد الظروف المزرعية المثلى لإنتاج الإنزيم.

المواد و طرائق العمل

الكائن المجهرى وظروف إنتاج الإنزيم

استخدمت عزلة فطرية محلية معزولة في دراسة سابقة ومشخصة ومعطاة الرقم 22 لتكون *Aspergillus niger* 22 (9). استخدم الوسط الإنتاجي المقترح من قبل (Ongen-Baysal et al., 1994) مع بعض التحوير في تحديد الظروف المزرعية المثلى لإنتاج الانبولىنيز إذ تم تحضير الوسط بإذابة المكونات الآتية في لتر واحد من الماء المقطر (NH_4NO_3) (2.3) غم، $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ (3.7) غم، (KH_2PO_4) (1.0) غم، $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ (0.5) غم، غم، (yeast extract) (1.5) غم و (Inulin) (15) غم وتم تعديل الرقم الهيدروجيني للوسط إلى 4.8 ثم عقم بجهاز المؤصدة (Autoclave) لمدة 10 دقائق، وبعد تبريد الوسط إلى درجة حرارة الغرفة لقح بقرص واحد من الفطر *A. niger* 22 النامي على الوسط PDA، وتمت عملية التخمير في الحاضنة الهزازة على درجة حرارة 30م بسرعة رج 150 دورة/دقيقة ولمدة 96 ساعة. وبعد انتهاء فترة الحضانة رشت نواتج التخمر واستخدم الراشح في تقدير الفعالية الإنزيمية والبروتين لاستخراج الفعالية النوعية للإنزيم والتي اعتمدت مؤشراً على قابلية العزلة لإنتاج إنزيم الانبولىنيز.

تقدير الفعالية الإنزيمية والبروتين

قدرت فعالية إنزيم الانبولىنيز باستخدام مادتي تفاعل هما الانبولىن والسكروروز، تم تقدير الفعالية الإنزيمية للانبولىنيز المنتج من الفطر *Aspergillus niger* 22 وذلك بتقدير كمية السكريات المختزلة بالطريقة المتبعة من قبل (Singh et al., 2007a) (11) مع بعض التحوير، وذلك بمزج 0.1 مللتر من المستخلص الأنزيمي مع 0.9 من محلول منظم خلات الصوديوم تركيز 0.1 مولر ورقم هيدروجيني 4.8 الحاوي على 1 % من مادة التفاعل (انبولىن أو سكروروز) وحضن المزيج في حمام مائي درجة حرارته 40 م لمدة 15 دقيقة، أوقف التفاعل بإضافة 1 مللتر من محلول (3, 5 Dinitro Salicylic Acid, (3, 5 DNSA) لكل أنبوبة اختبار واستكمل تقدير السكريات المختزلة حسب طريقة (Miller, 1959) (12) واعتماداً على المنحنى القياسي للفركتوز. وتعرف وحدة الفعالية الإنزيمية لإنزيم الانبولىنيز بأنها كمية الإنزيم اللازمة لتحرير مايكرومول واحد من الفركتوز في الدقيقة الواحدة وتحت ظروف التقدير. وقدرت الفعالية الإنزيمية باستخدام السكروروز كمادة تفاعل بنفس الطريقة السابقة ماعدا استبدال الانبولىن بالسكروروز كمادة تفاعل، وتعرف وحدة الفعالية الإنزيمية لإنزيم الانبولىنيز بأنها كمية الإنزيم اللازمة لتحرير مايكرومول واحد من السكريات المختزلة (الفركتوز و الكلوكوز) من السكروروز في الدقيقة الواحدة وتحت ظروف التقدير. استخدمت طريقة (Bradford, 1976) (13) في تقدير البروتين باستخدام ألبومين المصل البقري (Bovine Serum Albumin, BSA) بروتينا قياسيا. واستخدمت الفعالية النوعية كمقياس لإنتاج الإنزيم والمقارنة.

تحديد الظروف المزرعية المثلى لإنتاج إنزيم الانبولىنيز من الفطر

A. niger 22

تمت دراسة عدد من العوامل المؤثرة في إنتاج إنزيم الانبولىنيز من الفطر *A. niger* 22، اشتملت هذه العوامل على:

1- تأثير المصدر الكربوني

أ- تأثير نوع المصدر الكربوني

اختبرت خمسة مصادر كربونية إضافة إلى المعاملة الخالية من المصدر الكربوني وذلك لتحديد أفضلها في إنتاج إنزيم الانبولىنيز من الفطر *A. niger* 22، اشتملت هذه المصادر على سكري الانبولىن والسكروروز النقيين إضافة إلى مستخلصات الكراث والهندباء البرية والبصل. إذ أضيفت هذه المصادر إلى وسط الإنتاج بالإضافة إلى بقية مغذيات الوسط، وقد أضيف سكر الانبولىن والسكروروز كمساحيق (وزن/حجم)، أما بالنسبة لمصادر الكربون الأخرى (جذور الهندباء البرية وساق البصل والجزء الخضري للكراث) فقد غسلت الأجزاء النباتية جيداً بماء الحنفية ثم قطعت إلى قطع صغيرة ووضعت في الفرن على درجة حرارة 80 م لعدة ساعات حتى الجفاف ثم طحنت في مطحنة كهربائية للحصول على مساحيق لهذه الأجزاء النباتية وأضيفت المساحيق المذكورة بنسبة 1.5 % (وزن/حجم) إلى الماء المقطر وسخن المزيج على درجة حرارة 75 م لمدة 5 دقائق للحصول على مستخلص الانبولىن الخام الذي اعتبر وسطاً لإذابة بقية مكونات الوسط الإنتاجي (14).

ب- تحديد التركيز الأفضل من المصدر الكربوني

استخدمت عدة تراكيز من مسحوق الكراث هي (0.5 و 1.5 و 2.5 و 3.5 و 4.5 و 5.5 و 6.5) % ودعمت ببقية المغذيات المشار إليها سابقاً وذلك لمعرفة أفضل هذه التراكيز لإنتاج إنزيم الانبولىنيز من الفطر *A. niger* 22.

ج- تحديد زمن الاستخلاص الأفضل للانبولىن الخام من الكراث

تم تحديد الزمن الأنسب لاستخلاص الانبولىن الخام من الكراث لإعطاء كمية الانبولىن التي تحقق أعلى إنتاج للإنزيم من الفطر، إذ تمت عمليات عملية الاستخلاص باستخدام مدة زمنية (5 و 10 و 15 و 30 و 45 و 60 و 75 و 90 دقيقة ودرجة حرارة 75م.

2- تأثير نوع المصدر النيتروجيني

درست سبعة مصادر نيتروجينية إضافة إلى المعاملة الخالية من المصدر النيتروجيني لتحديد الأفضل منها لإنتاج إنزيم الانبولىنيز من الفطر *A. niger 22* المنمى على مستخلص الكراث الخام، اشتملت هذه المصادر على : نترات الامونيوم ،خلاصة الخميرة، فوسفات الامونيوم، كبريتات الامونيوم، اليورياو كلوريد الامونيوم.

3- تأثير نوع وتركيز الأملاح المعدنية

- نوع الأملاح المعدنية

درست ثلاثة أنواع من الأملاح المعدنية إضافة إلى المعاملة الخالية من المعادن لمعرفة تأثيرها في إنتاج الإنزيم، اشتملت هذه الأملاح على: كبريتات المغنسيوم تركيز 0.1% وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين تركيز 0.05%.

- تركيز الملح المعدني الأفضل

درست التراكيز (0.05 و 0.1 و 0.2 و 0.4) % من كبريتات المغنسيوم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ لتحديد التركيز الأفضل منها لإنتاج إنزيم الانبولىنيز من الفطر *A. niger 22* (حيث استخدم تركيز 0.1% من كبريتات المغنسيوم في الوسط الإنتاجي المقترح من قبل (10) Ongen-Baysal et al. (1994))

4- تأثير الرقم الهيدروجيني (pH) الابتدائي لوسط الإنتاج

تم توزيع الوسط الإنتاجي في دوارق وعدل الرقم الهيدروجيني في الدوارق إلى 3.5 و 4.0 و 4.2 و 4.5 و 4.8 و 5.0 و 5.5، لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم.

5- تأثير حجم اللقاح

لحق وسط انتاج الانزيم بحجوم لقاح مقدارها (0.5 و 1 و 2 و 3 و 4) قرص من الأقراص الفطرية المستحصل عليها بوساطة الثاقب الفليني والتي تحوي عدد ابواغ $10^5 \times 7.5$ و $10^6 \times 1.5$ و $10^6 \times 3$ و $10^6 \times 4.5$ و $10^6 \times 6$ و $10^6 \times 10$ بوغ/ملتر من الوسط، على التوالي.

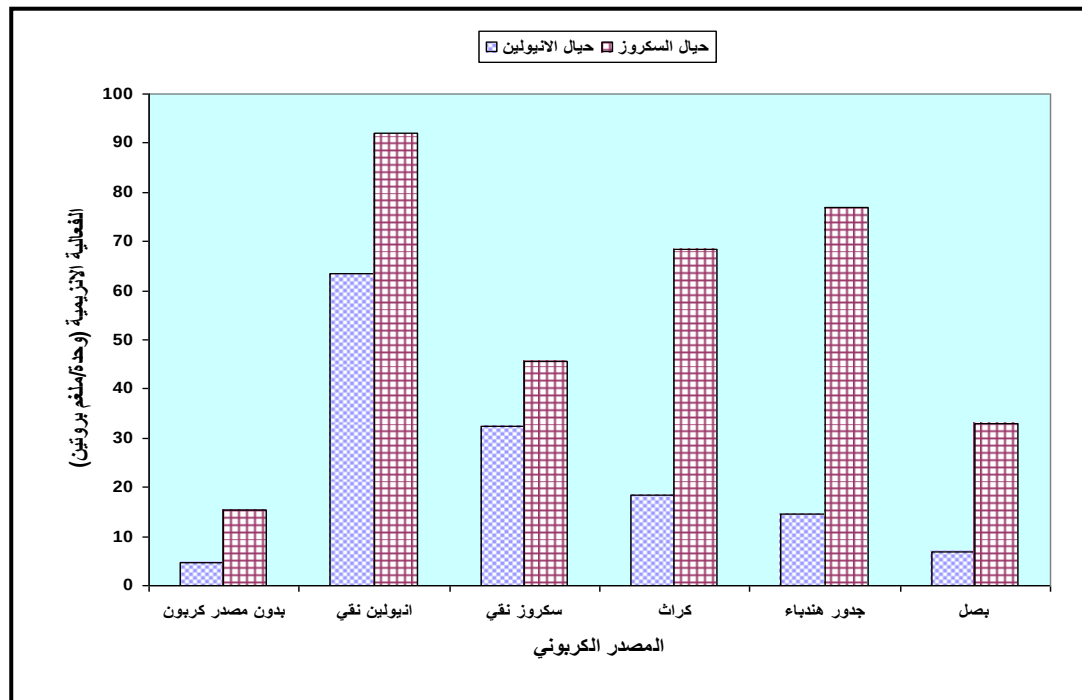
النتائج والمناقشة

تحديد الظروف المزربية المثلى لإنتاج إنزيم الانبولىنيز من الفطر *A. niger 22*

1: تأثير مصدر الكربون

أ- نوع مصدر الكربون

يلاحظ من الشكل (1) وجود تباين في تأثير نوع المصدر الكربوني في إنتاج إنزيم الانبولىنيز، حيث أدى استخدام مصادر الكربون النقية في إنتاج الإنزيم إلى تحقيق فعالية نوعية عالية مقارنة باستخدام المصادر الطبيعية، إذ تم الحصول على أعلى فعالية نوعية باستخدام الانبولىن النقي والتي بلغت (63.57 و 91.96) وحدة/ملغم بروتين باستخدام الانبولىن والسكروز كمادتي تفاعل ،على التوالي.



الشكل (1): تأثير نوع المصدر الكربوني في إنتاج إنزيم الانبولىنيز من الفطر *A. niger 22*

عند التمعن في الجدول (1) يتضح ارتفاع قيم الفعالية الإنزيمية باستخدام المصادر الطبيعية كمصادر كربونية مقارنة بالمصادر النقية، فقد بلغت فعالية إنزيم الانبولىنيز باستخدام مستخلص الكراث في إنتاج الإنزيم حوالي 10 مرات بقدر فعالية الإنزيم باستخدام الانبولىن النقي، لهذا يبدو واضحا إن ارتفاع قيم الفعالية النوعية باستخدام المصادر النقية جاء نتيجة لانخفاض تركيز البروتين في وسط التخمر مقارنة بالمصادر الطبيعية.

الجدول (1): الفعالية النوعية لإنزيم الانبولىنيز المنتج من الفطر *A. niger 22* باستخدام مصادر كربون مختلفة

الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين) حيال الانبولىن		تركيز البروتين (ملغم/مللتر)	الفعالية الإنزيمية (وحدة/مللتر) حيال الانبولىن		مصدر الكربون
السكروز	الانبولىن		السكروز	الانبولىن	
91.96	63.67	0.0028	0.2575	0.1783	انبولىن نقي
45.71	32.44	0.0063	0.288	0.2044	سكروز نقي
68.46	18.33	0.097	6.641	1.778	مستخلص أوراق الكراث
77.03	14.47	0.037	2.85	0.5355	مستخلص جذور الهندباء
32.93	6.84	0.082	2.7	0.561	مستخلص أبصال البصل

ونظرا لعدم توفر سكري الانبولىن والسكروز النقيين بكميات كافية وارتفاع أثمان شرائهما فضلاً عن ان احد الأهداف المهمة لهذه الدراسة هو إيجاد وسط زرعى اقتصادى مناسب ومتوفر لإنتاج الإنزيم، فقد تم اختيار مستخلص الكراث كمصدر كربوني مناسب لإنتاج الإنزيم وتم استخدامه في جميع مراحل الدراسة اللاحقة.

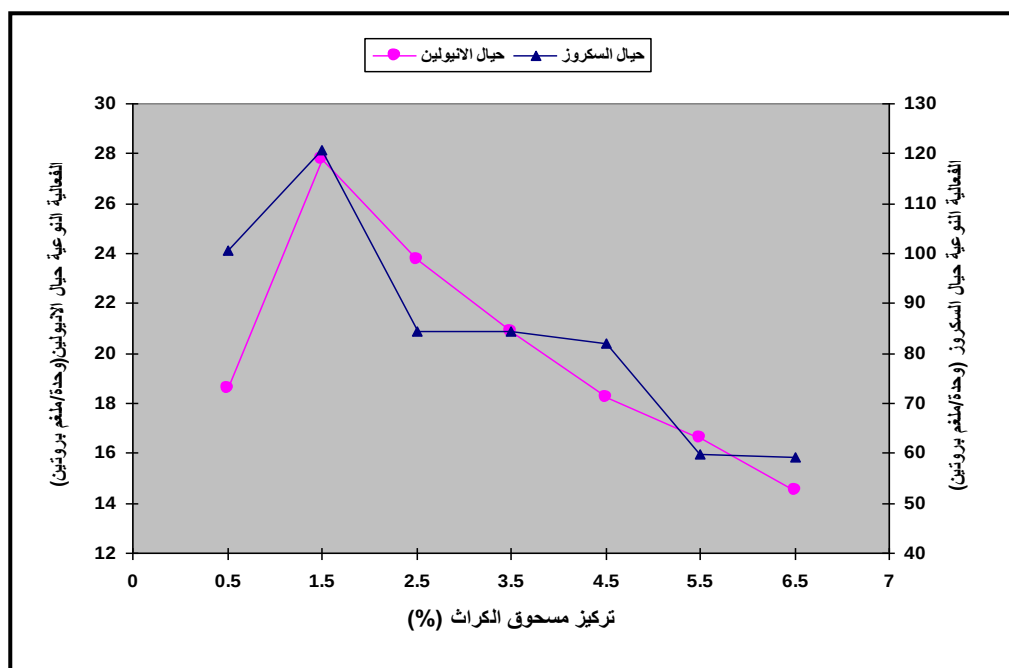
يحتوي الكراث على 7.3% كاربوهيدرات منها 0.5% سكروز، كما يحتوي على 0.3% بروتين و 0.2% دهن و 1.5% ألياف و 1.2% رماد، فضلاً عن مجموعة فيتامينات A و C و B1 و B2 بكميات (0.03 ، 0.2 ، 0.06 و 0.014) ملغم/ 100 غرام ، على التوالي (16). يشكل سكر الانبولىن (3-10)% من مجموع الوزن الجاف للمواد الصلبة الكلية في الكراث (17).

وقد تناولت دراسات عديدة إنتاج إنزيم الانبولىنيز من الأحياء المجهرية باستخدام مصادر كربون نقية وأخرى طبيعية حيث تم مقارنة إنتاج الإنزيم من الفطر *A. tamaritii* باستخدام سبعة مصادر كربون نقية وأخرى طبيعية، اشتملت النقية منها على الكلوكوز والفركتوز والمالتوز و السكروز والرافينوز والنشأ والانبولىن في حين اشتملت الطبيعية على درنات خرشوفة القدس وأبصال الداليا وجذور الهندباء وأبصال البنجر وقشور البرتقال و مولاس قصب السكر و مولاس البنجر، وأوضحت نتائج الدراسة تفوق مصادر الكربون الطبيعية في إنتاج الإنزيم بفعالية إنزيمية (26.5 و 25.8) وحدة/مللتر باستخدام أبصال الداليا وجذور الهندباء، على التوالي. في حين بلغت الفعالية الإنزيمية 23.63 وحدة/مللتر باستخدام الانبولىن النقي (17).

ب- تركيز مسحوق الكراث

تبين النتائج الموضحة في الشكل (2) ان أفضل تركيز لإنتاج الإنزيم هو 1.5%، إذ تم الحصول على أعلى فعالية نوعية للإنزيم والتي بلغت (27.8 و 120.77) وحدة/ملغم بروتين، حبال الانبولىن والسكروز كمادتي تفاعل، على التوالي. لذا فقد اعتمد التركيز 1.5% من مسحوق الكراث كأفضل تركيز لإنتاج الإنزيم من الفطر *A. niger 22* وتم استخدامه في جميع المراحل اللاحقة من هذه الدراسة.

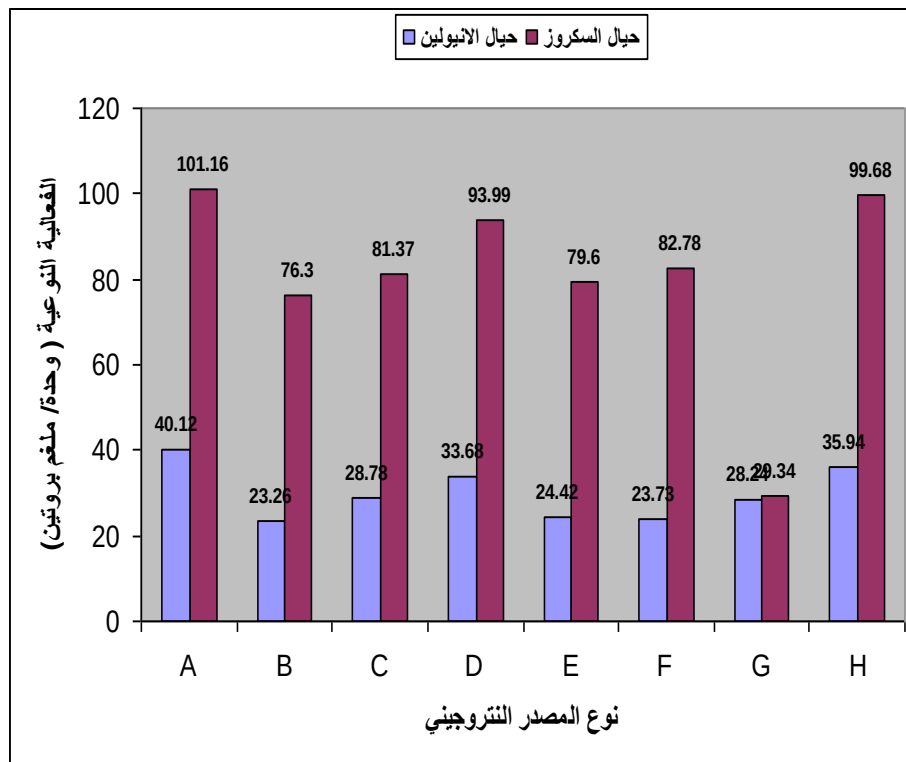
وتتفق هذه النتائج مع الدراسة التي وجدت إن تركيز 1.5 % انبولىن هو الأمثل لإنتاج الإنزيم من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* YS-1 إذ بلغت فعالية الإنزيم المنتج 5.1 وحدة/مللتر (14). وعلل انخفاض إنتاج الإنزيم باستخدام التراكيز العالية من المصدر الكربوني إلى ان تلك التراكيز تؤدي إلى كبح هدمي يتسبب في خفض فعالية الإنزيم (18).



الشكل(2): تأثير تركيز مسحوق الكراث في إنتاج إنزيم الانبولىنيز من الفطر *A. niger 22*

2: تأثير المصدر النيتروجيني

تم اختيار عدد من المصادر النيتروجينية منها عضوية وأخرى غير عضوية لدراسة تأثيرها في إنتاج إنزيم الانبولىنيز من الفطر *A. niger 22*. وأظهرت النتائج الموضحة في الشكل (3) عدم وجود تأثير محفز للمصدر النيتروجيني في إنتاج الإنزيم، حيث كانت المعاملة الخالية من المصدر النيتروجيني هي المثلى للإنتاج إذ بلغت الفعالية النوعية (101.16 و 40.12) وحدة/ملغم بروتين حبال الانبولىن والسكرورز كمادتي تفاعل، على التوالي . واعتماداً على هذه النتائج فقد جرت عملية إنتاج الإنزيم في الخطوات اللاحقة من الدراسة دون إضافة مصدر نيتروجيني للوسط ويمكن تفسير النتيجة المستحصلة من هذه الدراسة، بأن الوسط الطبيعي (الكراث) المستخدم في إنتاج الإنزيم قيد الدراسة يحوي مصادر نيتروجينية بدرجة كافية لتلبية متطلبات الفطر وإنتاج الإنزيم، إذ يحتوي الكراث على 0.3 % بروتين في تركيبه (15). إن نتائج تثبيط إنتاج الانبولىنيز من الفطر *A. niger 22* بوجود مركبات الامونيوم تتفق مع الدراسة التي وجدت أن جميع المركبات الحاوية على نيتروجين مع الامونيا في تركيبها لها تأثيراً مثبطاً في إنتاج إنزيم الانبولىنيز من الفطر *Fusarium oxysporium*، وبينت نتائج هذه الدراسة إن أفضل مصدر نيتروجيني لإنتاج الإنزيم هو استخدام نترات الصوديوم (19). وتم التأكيد على ان المصادر النيتروجينية الحاوية على النيتروجين مع الامونيا تبدي تأثيراً مثبطاً في إنتاج الإنزيم من الفطر *A. fumigatus* (20) .



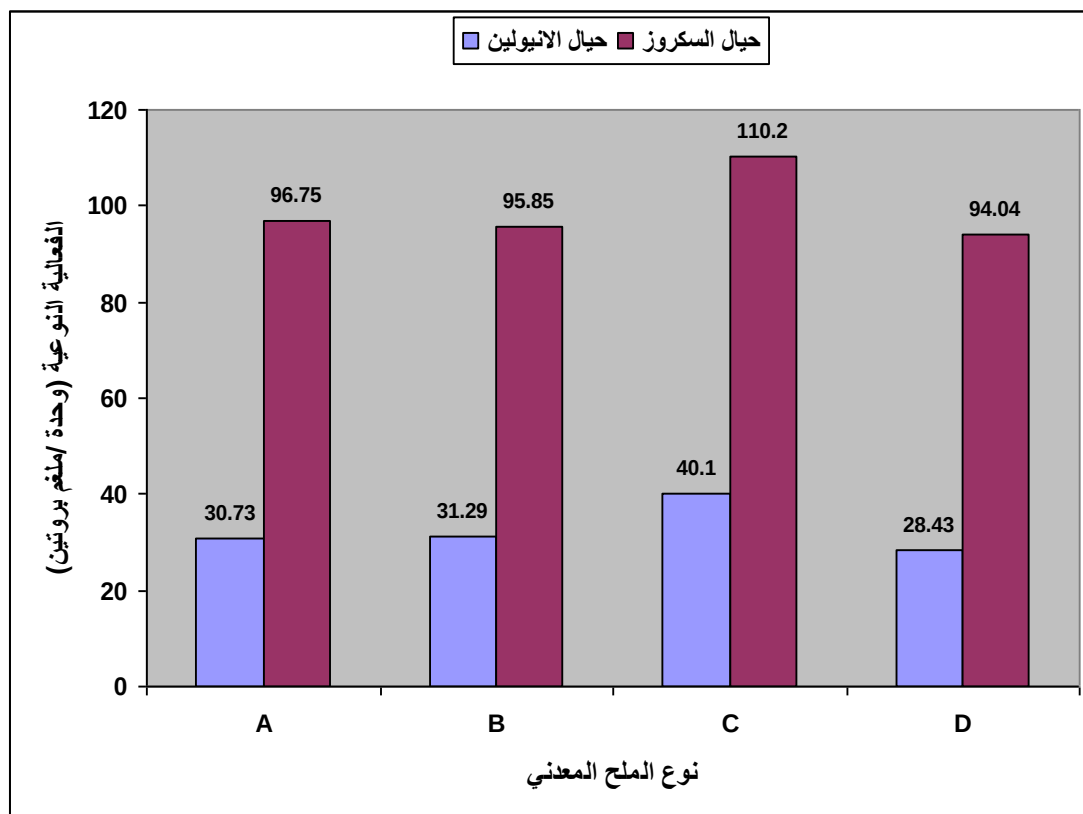
الشكل (3): تأثير نوع المصدر النتروجيني في إنتاج إنزيم الانبولىنيز من الفطر *A. niger*

- A: المعاملة الخالية من المصدر النتروجيني
 B: خليط نترات الامونيوم بتركيز 0.23% وخلاصة الخميرة بتركيز 0.15% وفوسفات الامونيوم 0.37%
 C: خليط خلاصة الخميرة وفوسفات الامونيوم D: خليط نترات الامونيوم وفوسفات الامونيوم
 E: خليط نترات الامونيوم وخلاصة الخميرة F: كبريتات الامونيوم بتركيز 0.23%.
 G: اليوريا بتركيز 0.23% H: كلوريد الامونيوم بتركيز 0.23%

3 : تأثير الأملاح المعدنية

يتضح من الشكل (4) ان كبريتات المغنيسيوم أظهرت تفوقاً على بقية الأملاح المستخدمة في الدراسة حيث تحقق أفضل إنتاج من الإنزيم باستخدام الملح المذكور بفعالية نوعية بلغت (40.1 و 110.02) وحدة/ملغم بروتين باستخدام الانبولىن والسكروز كمادتي تفاعل، على التوالي.

ولغرض تحديد التركيز الأمثل من كبريتات المغنيسيوم تمت دراسة أربعة تراكيز منها هي (0.05، 0.1، 0.2 و 0.4)%، وأوضحت النتائج ان تركيز 0.1% هو الأفضل لإنتاج الإنزيم من الفطر *A. niger*، إذ بلغت الفعالية النوعية (48.77 و 120.77) وحدة/ملغم بروتين للإنزيم حيال الانبولىن والسكروز كمادتي تفاعل، على التوالي (الشكل 5). وفي ضوء النتائج أعلاه فقد تم استخدام كبريتات المغنيسيوم بتركيز 0.1% بإضافتها إلى وسط الإنتاج في المراحل اللاحقة من الدراسة.



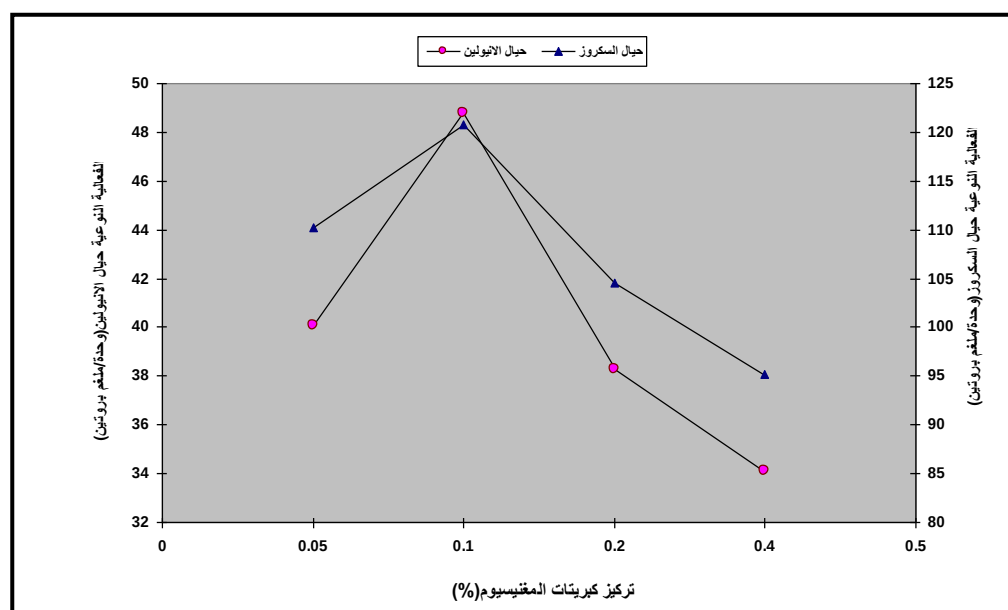
الشكل (4): تأثير نوع الملح المعدي في إنتاج إنزيم الانيونين من الفطر *A. niger* 22

A: المعاملة الخالية من الملح المعدي

B: خليط كبريتات المغنيسيوم بتركيز (0.05) % وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين بتركيز (0.1) %

C: كبريتات المغنيسيوم (0.05) % D/ : فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين بتركيز (0.1) %

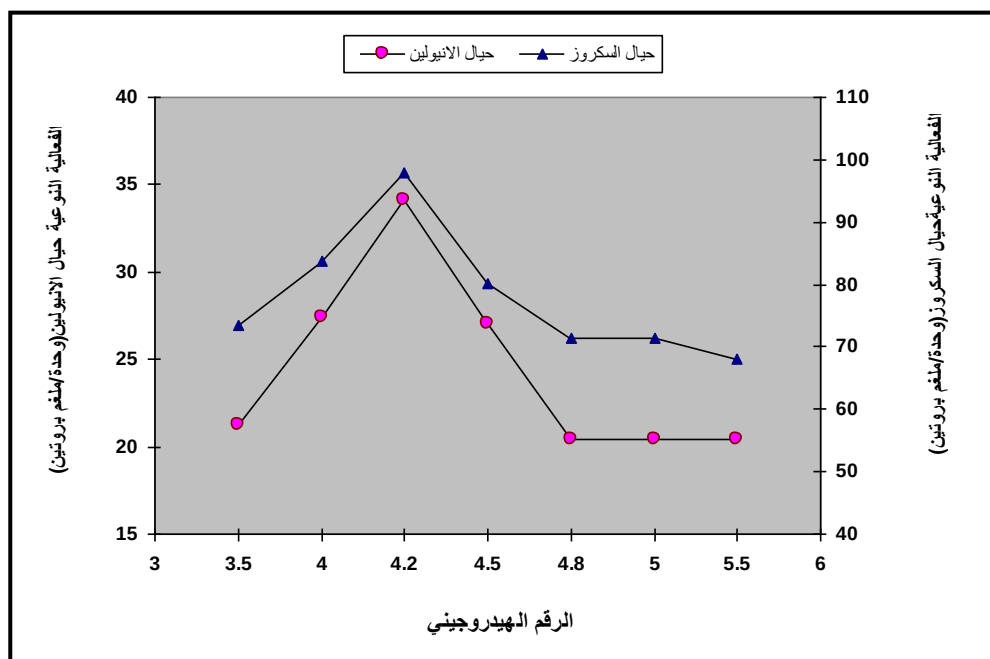
في دراسة لإنتاج إنزيم الانيونين من الفطر *A. niger* 22 تبين ان إضافة أملاح كبريتات المغنيسيوم ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) بتركيز 0.025% وفوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين (K_2HPO_4) بتركيز 0.5% إلى وسط الإنتاج تؤدي إلى الحصول على أفضل إنتاج للإنزيم، وان الزيادة القليلة عن هذه التراكيز لن يكون لها تأثير حاشاً للإنتاج بيد ان الزيادة الكبيرة تؤدي إلى تثبيط إنتاج الإنزيم (21).



الشكل (5): تأثير تركيز كبريتات المغنيسيوم في إنتاج إنزيم الانيونين من الفطر *A. niger* 22

4: تأثير الرقم الهيدروجيني (pH) الابتدائي

يلاحظ من الشكل (6) ان أعلى إنتاج لإنزيم الانبولىينيز من الفطر *A. niger* 22 قد تحقق عند رقم هيدروجيني 4.2 إذ وصلت الفعالية النوعية إلى (34.14 و 97.97) وحدة/ملغم بروتين حيال الانبولىين والسكروروز كمادتي تفاعل، على التوالي.



الشكل (6): تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج إنزيم الانبولىينيز من الفطر *A. niger* 22

يختلف الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل لإنتاج الإنزيم باختلاف الكائن المجهرى المستخدم في الإنتاج إذ أن الرقم الهيدروجيني الابتدائي 5 هو الأمثل لإنتاج إنزيم الانبولىينيز من الفطر *Aspergillus niger* (22). وتحققت فعالية لإنزيم الانبولىينيز مقدارها

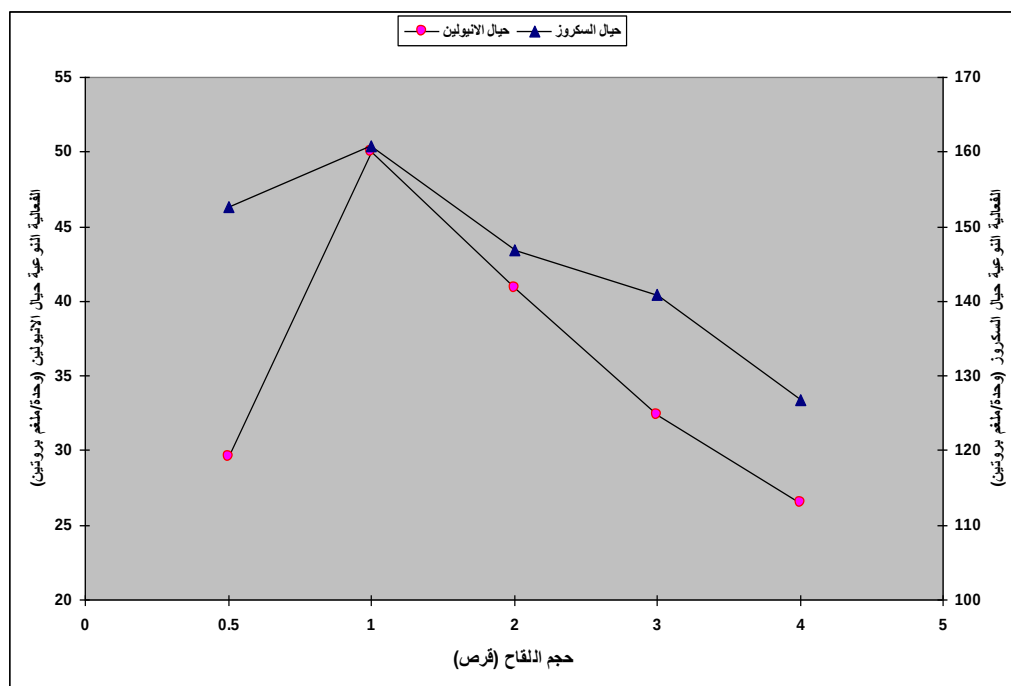
(3.81 و 0.45) وحدة/مللتر حيال الانبولىين والسكروروز، على التوالي باستخدام رقم هيدروجيني 6 في دراسة لإنتاج الإنزيم من الفطر *A. fumigatus* (20). في حين كان الرقم الهيدروجيني الأمثل 5.6 لإنتاج الإنزيم من الفطر *Penicillium rugulosum* (23).

5: تأثير حجم اللقاح

استعملت حجوم لقاح مختلفة لإنتاج إنزيم الانبولىينيز من الفطر *A. niger* 22 ويظهر الشكل (7) ان استخدام حجم لقاح مقداره $10^6 \times 1.5$ بوغ/مللتر من الفطر في تلقيح الوسط الإنتاجي أدى إلى الحصول على أعلى فعالية نوعية والتي بلغت (50 و 160.69) وحدة/ملغم بروتين حيال الانبولىين والسكروروز كمادتي تفاعل، على التوالي. ومن الضرورة استخدام عدد ابواغ ملائم بدرجة تمكن الأبواغ من النمو وتغطية معظم دقائق المادة الأساس من غير ان تنشأ حالة تزامح بسبب تنافسها على العناصر الغذائية المتوفرة بصورة محدودة (24).

تباينت حجوم اللقاح المستخدمة في إنتاج إنزيم الانبولىينيز من الأحياء المجهرية فقد استخدم قرصاً واحداً حاوي على ابواغ الفطر *A. niger* المنمى على الوسط الصلب

Potato Dextrose Agar (PDA) بعمر 5 أيام لتلقيح وسط التخمر لإنتاج الإنزيم (25).



الشكل (7): تأثير حجم اللقاح في إنتاج إنزيم الأنابولينيز من الفطر *A. niger*

المصادر

1. Banguela, A. and Hernandez, L. (2006). Fructans: from natural sources to transgenic plants. *Biotechnologia Aplicada*, 23:202-210.
2. Hendry, G. and Wallace, R. (1993). The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. In Suzuki, M., Chatterton, N.J., Eds, *Science and Technology of fructans*. CRC press, Boca Raton, FL, pp.119-139.
3. Sirisansaneeyakul, S.; Worawuthiyanan, N., Vanichsriratana, W.; Srinophakun, P. and Chisti, Y. (2007). Production of fructose from inulin using mixed inulinases from *Aspergillus niger* and *Candida guilliermondii*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23:543-552.
4. Percival, E. (1976). Fructosio .in: *Encyclopedia Della Chimica*. ISEDI, Milan.
5. Zittan, L. (1981). Enzymatic hydrolysis of inulin: an alternative way to fructose production. *Starch*. 33: 373-377.
6. Kochhar, A.; Gupta A. K. and Kaur, N. (1999). Purification and immobilization of inulinase from *Aspergillus candidus* for producing fructose. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79:549-554.
7. Fleming, S. E. and Groot Wassink, W. D. (1979). Preparation of high fructose syrup from the tuber of the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 12: 1 – 28.
8. Rhee, S.K. and Kim, C. H. (1989). Fructose production from Jerusalem artichoke by inulinase immobilized on chitin. *Biotechnol. Lett.* 11: 201-206.
9. جابر، ام البشر حميد جابر، الغانمي، علي عبد الكاظم، الطويهي، ناجح هاشم (2011) عزل وغرلة الفطريات المنتجة لأنزيم الأنابولينيز وتحديد الظروف البيئية المثلى لإنتاج الأنزيم من فطر *A. niger*. مجلة البصرة للعلوم الزراعية ، العدد 2 ، المجلد 24 ، مقبول النشر
10. Ongen-Baysal, G.; Sukan, S. and Vrassilev, N. (1994). Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger*. *Biotech Lett.* 16: 275-280.

11. **Singh, R.S.; Dhaliwal, R. and Puri, M. (2007a).** Partial purification and characterization of exo inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for preparation of High- Fructose Syrup. J. Microbiol. Biotechnol. 17(5): 733-738.
12. **Miller, G.I. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 3r. 426-428.
13. **Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein- Dye Binding. Anal. Biochem. 72,248- 254.
14. **Singh, R.S.; Sooch, B.S. and Puri, M. (2007b).** Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. Bioresource Technology 98: 2518-2525.
15. **مطلوب، عدنان ناصرومحمد، عز الدين سلطان وعبدول، كريم صالح. (1989).** إنتاج الخضروات. الجزء الأول، مطابع التعليم العالي جامعة الموصل الطبعة الثانية.
16. **Ricca, E.; Calabro, V.; Curcio, S. and Iorio, G. (2007).** The State of the Art in the Production of Fructose from Inulin Enzymatic Hydrolysis , Critical Reviews in Biotechnology , 27:129-145.
17. **Saber, W.I.A. and El- Naggari, (2009).** Optimization of fermentation conditions of the Biosynthesis of Inulin by *Aspergillus tamarii* and hydrolysis of some inulin containing agro-wastes. Biotechnology. 8: 42: 425-433.
18. **Jing, W.; Zhengyn, J; Bo, J. and Augustine, A. (2003).** Production and separation of exo and endo inulinase from *Aspergillus ficuum*. Process Biochemistry, 39:5-11.
19. **Gupta, A. K.; Kaur, M.; Kaur, N., and Singh R. (1992).** A comparison of properties of inulinases of *Fusarium oxysporum* immobilized on various supports J. Chem. Technol. Biotechnol 53: 293-296 .
20. **Gouda, M. K. (2002).** Some properties of inulinase from *Aspergillus fumigatus*. Pakistan Journal of Biological Sciences 5: 589-593.
21. **Skowronek, M. and Fidurek, J. (2004).** Optimization of Inulinase Production by *Aspergillus niger* using simplex and classical Method. Food Technol. Biotechnol. 42(3): 141-146.
22. **Ertan, F. and Ekinci, F. (2002).** The production of inulinase from *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* and *Trichoderma harzianum*. Journal of Marmara for pure and applied science 18: 7-15. Marmara University printed in Turkey.
23. **Barthomeuf, C.; Regerat, F.; and pourat, H. (1991).** Production of inulinase by a new mold of *Penicillium rugulosum*. J. ferm. Bioeng.72 (6): 491-494.
24. **Abdullah, A.L.; Tengerdy, R.P. and Murphy, V.G. (1985).** Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw. Biotechnol. Bioeng. 27:20-27.
25. **Huitron, C.; Perez, R.; Sanchez, A.E.; Lappe, P. and Zavaleta, L.R. (2008).** Agricultural waste from the tequila industry as substrate for the production of commercially important enzymes. J. of Environ. Biology 29(1): 37-41.