الظروف المثلى لانتاج الإنيولينيز بواسطة العفن *Aspergillus niger* و دراسة فعالية العفن ضد بعض أنواع البكتريا المرضية

نور لطفي علي[١] ، كركز محمد ثلج[٢] ، أمين سليمان بدوي[٢]

[١] قسم علوم الحياة ، كلية التربية ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[٢] قسم علوم الأغذية ، كلية الزراعة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق.

(تاريخ الاستلام: ٢ / ١١ / ٢٠١٠ ---- **تاريخ القبول:** ١١ / ٥ / ٢٠١١)

الملخص

أستهدفت هذه الدراسة عزل العفن *Aspergillus niger* محلياً وتطفيرهُ بالأشعة فوق البنفسجية و دراسة الظروف المثلى البيئية من درجة حرارة و أس هايدروجيني، ومدة الحضن و الرج ، وذلك للحصول على أفضل إنتاج من إنزيم الإنيولينيز، و وجد أن الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم كانت متمثلة بدرجة حرارة ٢٠ م وأس هايدروجيني مقداره ٤ ولمدة3 أيام ، تحت ظروف رج 100 دورة/دقيقة ، كذلك وجد أن أعلى إنتاجية للإنزيم كانت من السلالة الطافرة D وعند درجة رج 100 دورة / دقيقة بفعالية إنزيمية قدرها 26.82 وحدة / مل، وتم إختبار مدى الفعالية التثبيطية للنواتج الأيضية لسلالة العفن *A. niger* التي من ضمنها إنزيم الإنيولينيز وتبين أن هناك فعالية تثبيطية متوسطة ضد بعض أنواع البكتريا المرضية التي تضمنت المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* و الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* و الكليبسيلا *Klebseilla pneumoniae* و الإشريشيا القولونية *Escherichia coli* و المتقلبات *Proteus valgaris* و الستروباكتر *Citrobacter freeundii* .

المقدمة

يُعدُّ الإنيولين (الفركتان) Inuline من السكريات المكوثرة ، و هو جزء من الألياف الغذائية ، و ينضوي تحت ما يسمى الأغذية الوظيفية Functional food ، و يُعد تأثير هذا النوع من السكريات متنوعاً في تحسين مقاومة الجسم السليم و تقليل مخاطر الاصابة بالأمراض وحدتها في الشخص المريض، إن مصادره متعددة منها الخرشوف و الهندباء والحنطة و أنواع من الفواكه و الخضراوات [١، ٢، ٣] و للحصول على محاسنه التي أشير اليها فإنه لابد أن تتوفر الإنزيمات المحللة له و المسماة إنزيمات الإنيولينيز Inulinase enzymes و تشمل الإنيولينيز الخارجي Exoinulinase الذي يسمى β- D-fructan fructohydrolase والإنيولينيز الداخلي ويسمى D-fructan fructanohydrolase β-2,1 [٤] . إن أنواعاً عدة من الأحياء المجهرية من بكتريا أو خمائر أو أعفان تتمكن من إنتاج إنزيم الإنيولينيز[٥] و على أن العفن *Aspergillus niger* يُعد الأكثر إنتاجا له من بينها إذ يمكن أن تصل فعالية الإنزيم المنتج من هذا العفن الى حوالي ٧٥ وحدة/ مل [٦]. تتنوع المواد الأساس التي يمكن استخدامها في إنتاج إنزيم الإنيولينيز من الأحياء المجهرية و التي غالبا ما تكون مواد طبيعية غنية بالأنيولين أو سكريات أحادية أو متعددة إلا أن المواد المحتوية على السكروز و الإنيولين تُعدان الأكثر تفضيلاً في إنتاج الإنزيم . إن مكونات الوسط الغذائي فضلاً عن ظروف التنمية تُعد المحدد الرئيس لكفاءة العفن أعلاه على الإنتاج لاسيما المصدر الكاربوني و النايتروجيني و المكونات الاخرى [٧، ٨] و يُعد إنزيم الإنيولينيز الميكروبي من الإنزيمات الصناعية المهمة [٩] لما له من أهمية في التطبيقات الصناعية ، إذ أستخدم مؤخرا في إنتاج شراب الفركتوز Fructose syrup من الإنيولين أو من المواد الغنية به و

يتم إنجاز التفاعل بخطوة واحدة و بإنتاجية عالية من الفركتوز تبلغ بحدود ٩٥ % في حين إن تحول النشا إلى فركتوز يتطلب ثلاثة أنواع من الإنزيمات المختلفة و بإنتاجية تبلغ ٤٥ % من الفركتوز كحدٍ أقصى [٨، ١٠،١١]. ويدخل إنزيم الإنيولينيز في إنتاج الإيثانول من خلال عمليتي التحلل والتخمير [١٢،١٣] فضلاً عن التطبيقات الأخرى التي يستخدم فيها مثل إنتاج إينلو القليل السكريات Inulo-oligo saccharides والذي يدخل أو تعود له فعالية الخلايا البلعمية الكبيرة Macrophage و فعالية إزالة الدهون Lipid –removing activity [١٤،١٥] ويمكن استخدامه في إنتاج حامض الكلوكونك Gluconic acid والبليولان Pullulan والأسيتون Acetone و البيوتانول Butanole [١٧،١٦] .

المواد و طرائق العمل

عزل العفن *A. niger* من التربة

تم إزاحة الطبقة العلوية بحدود ٢ – ٥ سم من تربة الحديقة المنزلية في تكريت ، وأخذ نموذج منها و بعد المزج الجيد له أخذ ١ غم منه ، و أضيف الى دورق بحجم ٢٥٠ مل يحتوي على ٩٩ مل من الماء المقطر المعقم ورج الدورق جيداً لمدة ٣ دقائق، بعدها أخذ ١ مل من المزيج بواسطة ماصة معقمة و نقل الى أنبوبة اختبار معقمة تحتوي على ٩ مل من الماء المقطر المعقم ، ثم أجريت سلسلة التخافيف اللازمة لغاية 10^{-5} وأخذ ٠,١ مل من التخفيفين 10^{-4} و 10^{-5} و نُشر باستخدام الناشر الزجاجي في طبق بتري يحتوي على وسط Malt Extract Agar المعقم و بواقع مكررين لكل عينة ثم حُضِنَت الأطباق في

الحاضنة عند درجة حرارة ٣٠ ±٢ م لمدة ٢ – ٨ أيام بعدها فحصت المستعمرات النامية ثم أجريت عملية نقل منفصل لكل منها على أوساط Malt Extract Agar و Potato Dextrose Agar [١٨] ، إذ شخص جنس العفن بالإعتماد على الشكل و لون المستعمرة في حين شخص النوع اعتماداً على مصادر مفاتيح تشخيص الفطريات [١٩] و بعد عزل مستعمرة العفن *A. niger* ، أعطيت الرمز (B) للدلالة عليها في حين كان الرمز (A) يمثل رمز العزلة القياسية Standard Strain التي تم الحصول عليها من مختبرات قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة / جامعة تكريت .

تشعيع العفن *A. niger*

بعد أن تم اكتمال النمو و تكوين السبورات من المستعمرات للعزلة *A. niger* (B) في وسط Malt Extract Agar تم تحضير معلق السبورات للعفن في أنابيب (فيالات) عدد ٢ حاوية على وسط ماء البيتون و عُرِّضت الأنابيب للأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي ٢٥٤ نانومتر بصورة عمودية من جهاز توليد الأشعة فوق البنفسجية لمدة ١٥ دقيقة وعند إنتهاء مدة التشعيع غُلفت الأنابيب برقائق الألمنيوم بصورة محكمة و تركت لمدة ٤٥ دقيقة و ذلك لتجنب حدوث إعادة التنشيط الضوئي photo reactivation ثم سحب واحد مل من معلق كل أنبوب زجاجي وزرع في وسط Malt Extract Agar بطريقة الأطباق المصبوبة Pouring plates ، بعدها حُضِنت عند درجة حرارة ٣٠±٢ م لمدة أسبوع. و رُمز للعزلتين الطافرتين الجديدتين الناتجتين من العزلة (B) بالرمز (C) و (D) .

وسط إنتاج إنزيم الإنيولينيز

أُختير وسط إنتاج إنزيم الإنيولينيز بوصفه من الأوساط الكيمياوية الداعمة لإنتاج عالٍ من إنزيم الإنيولينيز الذي يتكون من الآتي: (غم/لتر من الماء المقطر) ، 33.3 السكروز و 19.7 خلاصة الخميرة Yeast extract و 3.65 نترات الصوديوم $NaNO_3$ و 3.15 فوسفات البوتاسيوم K_2HPO_4 و ٠,١٥ كبريتات المغنيسيوم $MgSO_4$ و تم ضبط الأس الهايدروجيني عند ٦,٥ [٢٠].

الظروف الزرعية

بعد تحضير وسط إنتاج إنزيم الإنيولينيز ، تم توزيعه بمقدار ٥٠ مل في كل من الدوارق الزجاجية المخروطية ذات السعة ٢٥٠ مل و بمعدل مكررين لكل سلالة، إذ أستخدمت السلالة (A) و هي السلالة القياسية والسلالة (B) المحلية و السلالتين (C) و(D) الطافرتين ، ثم سدت الدوارق بسدادات قطنية بإحكام و تم التعقيم باستخدام جهاز المؤصدة Autoclave عند ضغط ١ باوند/انج^2 ودرجة حرارة ١٢١م لمدة ١٥ دقيقة، و بعد أن تركت الدوارق لتبرد لقحت باللقاح الفطري و ذلك بأخذ قرص من النمو لكل من السلالات الأربعة قيد الدراسة المنماة على وسط Malt Extract Agar بعمر خمس أيام بواسطة ثاقب فليني قطر ٦ ملم وزرعها في الوسط الزرعي المعد لتنمية العفن وإنتاج الإنزيم، ثم أضيفت ٢ – ٣ قطرات مادة Tween 80 المعقم الى الوسط الزرعي المُلقح و رُجت الدوارق بصورة جيدة لغرض نشر سبورات الفطر ثم حُضنت الدوارق بالحاضنة الثابتة و بدرجة حرارة ٣٠ ±٢ م لمدة ٤ أيام [٢١] .

دراسة تأثير الظروف البيئية على إنتاج الإنزيم والكتلة الحيوية

حُضر الوسط الزرعي بالمكونات كافة و زرع بالسلالات الفطرية قيد الدراسة وحضن تحت ظروف بيئية مختلفة شملت:

١– درجات حرارية مختلفة (٢٠ و٢٥ و٣٠ و٣٥ و٤٠ و٤٥) م.

٢– قيم مختلفة من الأس الهايدروجيني (٣,٥ و٤ و٤,٥ و٥ و٥,٥ و ٦ و ٦,٥ و٧).

٣– التحضين عند فترات زمنية مختلفة (٣ و٥ و٧) أيام

٤– التحضين بسرع رج مختلفة (٥٠ و١٠٠ و١٥٠) دورة / دقيقة.

تقدير الكتلة الحيوية

بعد إنتهاء مدة التحضين لكل من المعاملات و لكل من السلالات قيد الدراسة ، تم سحب الدوارق من الحاضنة وفُصلت الكتلة الحيوية عن الراشح باستخدام النبذ المركزي بسرعة ١٦٠٠ دورة / دقيقة و لمدة ١٠ دقائق [٢٢] ، إذ جُمعت خلايا العفن و وضعت في أطباق زجاجية معلومة الوزن عند درجة حرارة ٦٠ م لمدة ٢٤ ساعة ، بعدها وزنت الأطباق مع الخلايا و قِيست الكتلة الحيوية من خلال الفرق بين الوزنين بعدها تم حِساب نسبة الرطوبة بأخذ 0.1غرام من الكتلة الحيوية الجافة وتجفيفها عند درجة حرارة ١٠٥ م و من خلال الفرق بين الوزن النهائي والأولي تم إحتساب الوزن الجاف للكتلة الحيوية [٢٣] .

تقدير فعالية إنزيم الإنيولينيز

تُعرف وحدة الفعالية الإنزيمية للإنيولينيز بأنها كمية الإنزيم التي تحرر ١ مايكرومول من الفركتوز لكل دقيقة تحت ظروف التقدير القياسية . و لغرض تقدير فعالية الإنزيم تم أخذ ٠,١ مل من محلول الإنزيم الخام Crude enzyme ومُزج مع ٠,٩ مل من محلول الإنيولين المحضر في محلول الخلات المنظم ٠,١ مل بتركيز ٢ % عند أس هايدروجيني ٥ ثم حُضن المزيج بدرجة حرارة ٥٠ م لمدة ١٥ دقيقة بعدها وضع المزيج في حمام مائي Water bath بدرجة حرارة ١٠٠ م لمدة ١٠ دقائق ثم ترك ليبرد بدرجة حرارة الغرفة ، ثم خُفف المزيج الى ٣ مل بواسطة محلول الخلات المنظم وأضيف اليه ٣ مل من كاشف ٣،٥ ثنائي نايترو حامض السالسلك و وضع المزيج في حمام مائي بدرجة حرارة ١٠٠ م لمدة ١٥ دقيقة لحين تغير اللون بشكل كامل بعد ذلك قُرأت الكثافة الضوئية عند طول موجي ٥٧٥ نانومتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي للأشعة المرئية Spectrophotometer وقُدرت فعالية الإنزيم باستخدام المنحنى القياسي للفركتوز[٢٤].

العزلات البكتيرية

تم الحصول على العزلات البكتيرية المرضية من مختبرات قسم علوم الحياة / كلية التربية و مختبرات قسم علوم الحياة / كلية العلوم (جامعة

تكريت) و هي بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebseilla pneumoniae* و *Escherichia coli* و *Proteus valgaris* و *Citrobacter freeundii* وأجريت عليها الاختبارات التشخيصية و كما جاء في أنظمة التشخيص المعتمدة [١٨،٢٥، ٢٦] . لغرض التأكد من صحة التشخيص وحُفظت في موائل على وسط الأكار المغذي Nutrient agar بدرجة حرارة ٤ م وتم تنشيط العزلات كل أسبوعين لضمان المحافظة عليها لحين إجراء التجربة المطلوبة .

تحديد الفعالية التثبيطية للنواتج الأيضية للعفن *A. niger*

تم تنشيط البكتريا المرضية السالبة والموجبة لصبغة كرام بنقل مستعمرة نقية من كل نوع جرثومي الى أنابيب تحتوي ٥ مل من وسط ماء الببتون عند درجة حرارة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة ، بعد ذلك غُمرت مسحة قطنية معقمة في أنبوب النمو الجرثومي وأزيل الفائض من الوسط الزرعي بضغط المسحة القطنية على الجزء العلوي لجدار الأنبوبة الداخلي و نثر العالق الجرثومي على سطح الأكار مولر هنتون Muller Hinton agar و بثلاث إتجاهات مختلفة لتكوين طبقة رقيقة متجانسة من النمو الجرثومي على الوسط وتُركت الأطباق لمدة ٥– ١٠ دقائق بدرجة حرارة الغرفة لتجف ، ثم عُملت ٥ ثقوب بواسطة ثاقب فليني قطر ٦ ملم ووضع ٠,١ مل من النواتج الأيضية الخام في الحفر الأربعة وتُركت الحفرة الخامسة بدون إضافة للمقارنة مع باقي الحفر وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة ، ثم قيست أقطار التثبيط حول الثقوب الأربعة بالميلمتر و أجريت التجربة بواقع ثلاث مكررات لكل نوع جرثومي .

النتائج و المناقشة

إن تطفير العزلة المحلية B بالأشعة فوق البنفسجية أدى في الحصول على عزلات طافرة جديدة و ذات قدرة إنتاجية عالية نسبياً من الإنزيم و معدل نمو أفضل عند مقارنتها مع السلالة الأبوية Parental strain والسلالة القياسية Standard strain ، إذ أظهرت كل من السلالتين الطافرتين C و D تفوقاً على السلالة القياسية A والأبوية B من ناحيتي النمو و الإنتاجية.

إن التحسين بإستعمال UV يمكن إيعازه الى التغيرات المحتملة في تسلسلات مناطق المثيرات Promotors في الجينات المشفرة لهذه الإنزيمات و إن الأشعة كان لها تأثير في إعادة تنظيم إستنساخ الحامض النووي الرايبوسومي الرسولي mRNA في هذه الإنزيمات مؤدية الى زيادة الإنتاجية إذ أن أشعة UV يكون تأثيرها على الآواصر الهايدروجينية للقواعد (T + C) كما أن التتابع التنظيمي في DNA يجب أن يحتوي على تركيز عالي من (T + C) ، وأشارت الدراسات الى التأثير الإيجابي للتطفير على تحسين إنتاجية العفن *A. niger* من الإنزيمات المختلفة مثل الإنيولينيز Inulinase و الكلوكوز أوكسديز Glucose Oxidase ، و فضلاً عن زيادة الفعالية الأيضية لإنزيمات عديدة ومنها Cellulolytic activity و Hemicellulolytic [27، 28 ، 29] ، كما لوحظ زيادة إنتاجية العفن *A. niger* من إنزيم اللايبيز Lipase بمقدار ٢,٥ مرة أكثر من السلالة الأبوية [٣٠] كما أن كل سلالة فطرية تكون أستجابتها بصورة مختلفة عن الأخرى من ناحية تحسين إنتاجيتها الإنزيمية بعد التعرض للأشعة و مثال ذلك ، السلالة الطافرة للفطر *Penicillium chrysogenum* التي أظهرت أيضاً أعلى فعالية في إنتاج الأميليز Amylase و اللايبيز Lipase و سلالة الفطر *Aspergillus fumigatus* الطافرة التي أظهرت أيضاً فعالية عالية في إنتاج السيليوليز Cellulose مقارنةً مع الفطريات الأخرى. في حين أن السلالة الطافرة للفطر *A.fumigatus* و *Verticillium terrestre* لم تظهر أي تحسن في إنتاج إنزيم اللايبيز[٣١] كما أشارت الأبحاث إن سلالة *A. niger* الطافرة تظهر فعالية إنزيمية أكثر وإن الشكل المورفولوجي ربما يؤثر على الإنتاج الأيضي و يؤدي الى سرعة النمو كمياً و نوعياً أو تحسين إنتاجية الإنزيم من السلالة المتغيرة مورفولوجياً، و قد أظهرت السلالة الطافرة تغيراً وإزدياداً في أبعاد الرؤوس الكونيدية و طول الهايفا وأبعادها مقارنةً بالسلالة الأصلية [٢٨]، وكلما إزدادت التفرعات سببت في زيادة مناطق التداخل مع المادة الأساس في السلالات ذات الإنتاجية العالية و هذا ما يفسر الزياده المستحصله في الفعاليه الإنزيمية للسلالة الطافرة للفطر التي قد تعود الى التغيرات في الأبعاد المجهرية للسلالة نتيجة التعرض للأشعة فوق البنفسجية.

يُعد المدى الحراري الذي تنمو فيه الفطريات مدى واسع ، إذ تتمكن من أن تنمو في درجات حرارة متغايرة ليس بالإعتماد فقط على التركيب الوراثي للأنواع و إنما أيضا على عوامل النمو الفيزيائية و نوعية و كمية المغذيات المتوفرة في الوسط الزرعي [٣٢].

إن تأثير درجة حرارة التنمية في إنتاج إنزيم الإنيولينيز و الكتلة الحيوية من سلالات العفن *A. niger* قد تم توضيحها في الجدول (١). ولقد أتضح من النتائج أن المدى الحراري المفضل لإنتاج الإنزيم يقع بين درجة حرارة ٢٠ – ٢٥ م، و كانت المثالية عند درجة حرارة ٢٠ م لجميع السلالات الفطرية و أظهرت السلالة D تفوقا في فعالية الإنزيم ١٥,٣٢ وحدة/ مل من كتلة حيوية مقدارها ١٢,٨٢غم/ لتر تليها السلالة C بفعالية مقدارها ١٤,٧٤ وحدة / مل من كتلة حيوية بلغت ٧,٣٦غم/ لتر ثم تلتها السلالة A و B بفعالية ١٢,٩٤ وحدة/ مل من كتلة حيوية مقدارها ١٠,١٢ غم/ لتر و ١٢,٨٣ وحدة / مل من كتلة حيوية مقدارها ٥,٩٣ غم / لتر على التوالي ، و قد أتفقت هذه النتائج مع ما ذكره Ertan و kinci [٣٣]. و إن فعالية الإنزيم قد أنخفضت مع إرتفاع درجة الحرارة إذ لم يحصل أي نمو للعفن عند درجة حرارة ٤٥ م وهذا توافق مع دراسة Poorna و Kulkarni [٧] اللذان وجدا بأن درجة حرارة ٤٥ م كانت سبباً في تعطيل نمو العفن و إنتاج الإنزيم .

إن تعرض الفطريات الى ضغط حراري عالي ناتج عن أرتفاع درجة الحرارة يؤدي الى حدوث خلل في الأواصر الهايدروجينية مؤدياً الى حصول عملية تمسخ Denaturation لكل من البروتينات و الحوامض النووية ، و بما أن الفطريات لا تمتلك وسائل تنظيمية لدرجة

حرارتها الداخلية فإن الخلل الخلوي يكون أكثر مع إنحدار في حيوية الخلية لاسيما مع إزياد درجات الحرارة بعد فترة طور النمو الأمثل للفطر [٣٢] ، كذلك فإن زيادة معدل النمو يسبب في إنتاج كميات كبيرة من الحرارة الأيضية مما يسبب في أن تكون الإنزيمات التي تدخل في العمليات الأيضية للمادة الأساس لاسيما المحللة للمصادر الكاربونية و النايتروجينية غير فعالة مؤدية الى إنتاج واطىء من الإنزيمات ، كذلك الحال عند تنمية الفطر في درجات الحرارة الواطئة الأقل من درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم فإن إنتقال المغذيات خلال الغشاء الخلوي تعاق و بالتالي تتسبب في إنخفاض الإنتاج من الإنزيم الميكروبي [٢٩].

أما حصول التحسن الطفيف عند درجة حرارة ٣٥ م فقد قارب ما أشارت اليه بعض الدراسات إذ أن فعالية الإنزيم من بعض أجناس الفطريات بلغت ٩,٢٠ وحدة / مل عند درجة حرارة ٣٥ م [٣٤] . كما أن درجة الحرارة المثالية لإنتاج الإنزيم من *K.matrix* كانت عند درجة حرارة ٣٦ م في مزارع التخمرات الصلبة ، و كذلك الحال مع تخمرات المزارع المغمورة [٣٥]. و إن المدى الحراري الأفضل دعماً لإنتاج الإنزيم يختلف من سلالة فطرية الى أخرى و هذا يبين التباين الواضح في درجة الحرارة المثالية للفعالية بين سلالات النوع الفطري الواحد ، إذ أن الدرجة الحرارية المثالية للإنتاج كانت ٣٠م [٧، ٣٦] . و أكدت دراسات أخرى إن أفضل إنتاجية كانت عند درجة حرارة ٢٨ م [٣٧] كما أن بعض السلالات الطافرة للفطريات كانت أقصى فعالية لها من الإنزيم في درجات حرارة عالية بين٤٥ – ٥٠ م، و سلالات طافرة أخرى كانت أقصى إنتاجية لها في درجة حرارة ٥٦ م و وصلت بعض أجناس *Aspergillus* Sp في فعاليتها من الإنزيم في الحد الأعلى عند درجة حرارة ٦٠ م [٣٨]. يلاحظ أن أقصى نمو للعفن كان عند درجة حرارة ٣٠ م وأظهرت السلالة C أكبر كتلة حيوية بلغت٣٤,١٠ غم / لتر تلتها السلالة D بكتله حيوية مقدارها ٣٢,١٦ غم / لتر ثم السلالتين A و B بكتله حيوية ٢٣,٣٠ غم / لتر و ١٩,٨٥غم/ لتر على التوالي .

الجدول (١) تأثير درجة حرارة التنمية في إنتاج إنزيم الإنيولينيز و الكتلة الحيوية من سلالات العفن *A. niger* عند التنمية لمدة أربعة أيام.

رمز العزلة	الفحص	درجة الحرارة (م)				
		٢٠	٢٥	٣٠	٣٥	٤٠
A	فعالية الإنزيم وحدة / مل	a 12.94 ± 1.38	b 10.74 ± 0.11	d 5.54 ± 0.69	c 7.62 ± 0.92	d 5.66 ± 0.35
	الكتلة الحيوية غم / لتر	e 10.12 ± 0.04	b 18.23 ± 2.60	a 23.30 ± 005	c 17.27 ± 1.18	d 13.64 ± 1.12
B	فعالية الإنزيم وحدة / مل	a 12.83 ± 0.35	b 10.28 ± 0.11	c 5.95 ± 0.06	c 6.35 ± 0.57	c 6.87 ± 1.09
	الكتلة الحيوية غم / لتر	d 5.93 ± 0.03	b 11.39 ± 0.05	a 19.85 ± 1.88	a 19.63 ± 1.07	c 9.92 ± 0.94
C	فعالية الإنزيم وحدة / مل	a 14.74 ± 2.02	a 14.59 ± 1.59	c 7.21 ± 0.28	b 9.27 ± 0.54	c 7.44 ± 0.36
	الكتلة الحيوية غم / لتر	e 7.36 ± 0.09	d 13.34 ± 0.24	a 34.10 ± 0.15	b 24.46 ± 0.44	c 22.76 ± 0.06
D	فعالية الإنزيم وحدة / مل	a 15.32 ± 0.29	b 12.14 ± 0.07	d 6.73 ± 0.81	c 9.32 ± 2.24	d 7.37 ± 0.58
	الكتلة الحيوية غم / لتر	c 12.82 ± 0.06	c 12.38 ± 1.27	a 32.16 ± 1.18	b 23.63 ± 1.41	b 22.35 ± 0.53

A : السلالة القياسية ، B : السلالة المحلية ، C : السلالة الطافرة الأولى ، D : السلالة الطافرة الثانية .

e-a: الأحرف المختلفة في السطر الواحد تعني حصول اختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05 .

كل قيمة تمثل معدل لمكررين ، ± تمثل قيمة الخطأ القياسي .

وقد تبين من النتائج إن الإنتاج الأفضل من الإنزيم لم يكن متوافقاً مع النمو المثالي للعفن من خلال تقدير كتلته الحيوية و هذا ما تبين في الإختلاف في درجات الحرارة لأفضل إنتاج لكل منهما ، الذي أكد أن الإنزيم المنتج من المنتجات الأيضية الثانوية التي أزداد إنتاجها عندما تعرض العفن لإجهاد حراري.

إن تأثير الاختلافات في الأس الهايدروجيني عند تنمية سلالات العفن *A. niger* المختلفة في إنتاج إنزيم الإنيولينيز و الكتلة الحيوية قد تم توضيحها في الجدول (٢).

الجدول (2) تأثيراختلاف الأس الهايدروجيني للوسط الزرعي في إنتاج إنزيم الإنيولينيز و الكتلة الحيوية من سلالات العفن *A. niger* عند التنمية لمدة أربعة أيام.

رمز العزلة	الفحص	الأس الهايدروجيني							
		٣,٥	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	**7.0**
A	فعالية الإنزيم وحدة / مل	c 10.86 ± 1.61	a 14.33 ± 0.46	b 12.25 0.23±	d 6.68 ± 0.21	d 7.16 ± 0.23	d 7.97 ± 1.04	e 5.66 ± 1.73	**b 11.33 ± 0.23**
	الكتلة الحيوية غم / لتر	f 10.05 ± 0.66	e 13.75 ± 2.67	d 19.26 ± 0.07	c 21.50 ± 0.08	b 23.51 ± 2.34	b 24.02 ± 0.69	a 27.50 ± 0.51	**c 22.45 ± 0.23**
B	فعالية الإنزيم وحدة / مل	a 11.32 ± 0.69	a 10.86 ± 0.23	a 10.63 ± 0.92	c 5.31 ± 0.69	b 6.35 ± 0.34	b 6.22 ± 0.67	b 7.18 ± 0.71	**b 6.35 ± 0.34**
	الكتلة الحيوية غم / لتر	d 23.04 ± 1.55	d 24.22 ± 2.66	d 24.26 ± 0.66	c 30.58 ± 0.08	c 30.72 ± 0.07	b 32.24 ± 0.06	a 36.89 ± 0.05	**c 29.64 ± 1.01**
C	فعالية الإنزيم وحدة / مل	a 15.03 ± 0.58	a 15.61 ± 0.08	b 13.29 ± 0.09	c 7.35 ± 0.16	c 7.22 ± 0.29	c 7.65 ± 0.14	c 8.81 ± 0.72	**c 7.22 ± 0.06**
	الكتلة الحيوية غم / لتر	d 29.48 ± 0.05	b 33.55 ± 1.85	b 34.31 ± 0.78	b 34.77 ± 0.08	b 34.92 ± 0.06	a 36.07 ± 0.62	a 36. 45 ± 1.70	**c 31.87 ± 0.04**
D	فعالية الإنزيم وحدة / مل	b 13.00 ± 0.28	b 13.44 ± 0.72	a 15.60 ± 1.73	e 5.19 ± 1.73	d 8.81 ± 2.74	d 7.53 ± 0.35	c 11.48 ± 1.08	**d 7.94 ± 0.43**
	الكتلة الحيوية غم / لتر	**g 22.20 ± 1.58**	**f 23.58 ± 0.04**	**e 24.96 ± 0.02**	**d 28.27 ± 0.08**	**b 35.45 ± 0.05**	**b 36.12 ± 0.58**	**a 41.89 ± 0.07**	**c 31.35 ± 1.47**

A: السلالة القياسية ، B : السلالة المحلية ، C : السلالة الطافرة الأولى ، D : السلالة الطافرة الثانية .

g-a : الأحرف المختلفة في السطر الواحد تعني حصول اختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05 .

كل قيمة تمثل معدل لمكررين ، ± تمثل قيمة الخطأ القياسي .

وضحت النتائج أن مدى الأس الهايدروجيني المثالي الداعم لإنتاج الإنزيم من العفن تراوح بين٣,٥ – ٤,٥. إذ أن أقصى فعالية للإنزيم من العفن كانت عند أس هايدروجيني مقداره٤,٥ من السلالة C بواقع ١٥,٦١ وحدة/ مل من كتلة حيوية ٣٣,٥٥ غم/ لتر، ثم تلتها السلالة D بفعالية ١٥,٦٠ وحدة / مل عند أس هايدروجيني مقداره ٤,٥ و بكتله حيوية ٢٤,٩٦ غم/ لتر، ثم السلالة A بفعالية ١٤,٣٣وحدة/ مل عند أس هايدروجيني مقداره ٤ من كتلة حيوية مقدارها ١٣,٧٥ غم/ لتر وجاءت أخيراً السلالة B التي بلغت فعالية الإنزيم المنتج منها ١١,٣٢ وحدة/ مل بكتلة حيوية مقدارها٢٣,٠٤ غم/ لتر عند أس هايدروجيني مقداره٣,٥.

أشارت النتائج إن أفضل إنتاجية للإنزيم كانت عن تنمية العفن في بيئة حامضية وهذا ما أتفق مع ما وجده Kango [21] الذي أشار أن أفضل إنتاجية للإنزيم قد حصلت في وسط حامضي عند قيم أس هايدروجيني تراوحت بين٤,٥ – ٦ وأقصى فعالية للإنزيم المنتج من العفن *A. niger* كانت عند أس هايدروجيني مقداره ٥,٤ [٧] و إن الأس الهايدروجيني المثالي لإنتاج الإنيولينيز بواسطة العفن *A.niger* OS-20 وجد عند أس هايدروجيني مقداره ٦ [36]. كما لوحظ حُصول إنتاجية عالية من سلالات الفطر *Penicillium* sp TN88 عند تنميتها في وسط تخمري عالي الحامضية بين ٣,٠ – ٤,٠ [٣٥].

وضحت نتائج الدراسة الحالية حُصول تناقص إنتاجية إنزيم الإنيولينيزمع زيادة الأس الهايدروجيني للوسط الزرعي وهذا أتفق مع ما أشار إليه Poorna و Kulkarni [7] اللذان ذكرا أن إنتاجية الإنزيم قد إنخفضت عند أس هايدروجيني مقداره ٧ ، كما أظهرت السلالة D و C أقصى إنتاجية للكتلة الحيوية حيث بلغت ٤١,٨٩ و٣٦,٤٥غم/ لتر على التوالي عند التنمية في أس هايدروجيني مقداره ٦,٥ وهو الأس الهايدروجيني المثالي لجميع السلالات المستخدمة قيد الدراسة تلتها السلالة B بكتلة حيوية مقدارها ٣٦,٨٩ غم / لتر و أخيراً السلالة A التي كانت كتلتها الحيوية ٢٧,٥٠ غم / لتر. و هذا اتفق مع بعض الدراسات التي أشارت بأن أقصى إنتاجية للكتلة الحيوية للعفن *A. niger* كانت عند أس هايدروجيني مقداره ٦ [٣٣]، و قد يعود السبب في ذلك الى أن تغير مستوى الأس الهايدروجيني

بين ٥,٠ – ٦,٠ يمكن أن يتسبب في إتجاه الفطر الى تكوين السبورات من ٢,٥×١٠^٥ الى ٢,٥×١٠^٧ سبور/ مل الذي بدوره يؤدي في زيادة خروج السبورات الى الوسط و نمو أكبر كمية من المايسيليوم و بالتالي زيادة الكتلة الحيوية [٧]. إن الإحتفاظ بالأس الهايدروجيني الواطىء يعد اساساً للحصول على أقصى إنتاجية من الإنزيم فضلاً عن فائدته المتأتية من إستبعاد التلوث و منع تكوين بعض المواد السامة [٣٩]، و إن أي تغير في حموضة الوسط يؤدي الى التغير في طبيعة الفعاليات الحيوية التي تحدث في الخلية ، إذ سوف تؤثر على نفاذية الخلية [٤٠] ، وإن هذا التغيير في النفاذية الخلوية يؤثر بدوره على نقل بعض العناصر المغذية الضرورية لتكامل تكوين الإنزيم وبالتالي قلة إنتاجه و فضلاً عن تأثير الأس الهايدروجيني على الخلية و قدرتها على إنتاج الإنزيم ، إلا أن تأثير الأس الهايدروجيني يكون ذو قوة أكبر على جزيئة الإنزيم المنتجة من قبل الخلية من خلال تأثيره على الحالة الأيونية للأحماض الأمينية الرابطة لجزيئة الإنزيم و المسؤولة عن التركيب الفراغي لجزيئة الإنزيم ، مما قد يؤدي الى إحداث تغيير في تركيب الموقع الفعال المسؤول الأول عن فعالية الإنزيم في المادة الأساس التي يعمل عليها ، كما قد يكون تأثير الأس الهايدروجيني على مادة التفاعل التي تعطي الناتج المعتمد عليه في تقدير الفعالية الإنزيمية .

يوضح الجدول (٣) تأثير الإختلاف في مدة الحضن لسلالات العفن *A. niger* في إنتاج إنزيم الإنيولينيز و الكتلة الحيوية بعد التنمية على درجة حرارة ٣٠ م .

بينت النتائج أن أقصى فعالية للإنزيم كانت بعد مرور ٣ أيام من بدأ عملية الحضن وأظهرت السلالة D تفوقاً في إنتاج الإنزيم ، إذ بلغت فعالية الإنزيم ١٥,٨٩ وحدة / مل من كتلة حيوية ١٧,٣٠ غم / لتر ثم السلالة B بفعالية ١٤,٦٨ وحدة / مل من كتلة حيوية مقدارها ١٥,١٦ غم / لتر ثم تلتها السلالة A التي بلغت فعالية الإنزيم المنتج منها ١٤,٣٣ وحدة / مل من كتلة حيوية مقدارها ٩,٤٥ غم / لتر و أخيراً السلالة C التي انتجت إنزيماً بفعالية مقدارها ١٣,٧٣ وحدة / مل من كتلة حيوية مقدارها ١٢,٦٩ غم / لتر. وقد توضح أن إنتاج الإنزيم قد حصل في نهاية الطور اللوغارتمي لنمو العفن الذي أتفق مع بعض الدراسات التي أشارت الى أن تخليق الإنزيم في العفن *A. niger* 245 يحدث بالتزامن مع نهاية الطور اللوغارتمي لنموالمايسيليوم بعد ٢٤ ساعة و إن كميات كبيرة من الإنزيم قد حدث تحريرها بين ٤٨ – ٦٠ ساعة من بدأ عملية التخمير [٥ ، ٤١] . و كذلك مع دراسات أخرى التي ذكرت أن أقصى إنتاجية للإنزيم كانت بعد مرور ٣ أيام [٣٧] ، و أتفقت كذلك مع ما وجده Kango [2] الذي أشار الى أن أقصى إنتاجية للعفن *A. niger* van Tighem UV1 من الإنزيم كانت بعد ٣ أيام من بدأ عملية الحضن ، إلا أن النتائج اختلفت مع Nandagopal و Kumari [38] ، اللذان ذكرا أن أعلى إنتاجية للإنزيم سجلت بعد خمسة أيام ومع الدراسات التي وجدت أن أقصى انتاجية للعفن *A. niger* UV817 في مزارع التخمرات المغمورة كانت عند خمسة أيام [٨] .

و من خلال نتائج هذه الدراسة لوحظ حصول هبوط في إنتاجية الإنزيم مع زيادة مدة الحضن بصورة عامة لجميع السلالات، وقد أتفقت هذه النتائج مع بعض الدراسات التي أشارت الى أن فعالية إنزيم الإنيولينيز قد انخفضت مع زيادة مدة الحضن [٣٣] ، و يمكن أن يعزى ذلك الى الى وجود السكر المختزل في وسط الإنتاج و زيادته مع نمو العفن في كونه المسؤول عن كبح فعالية الإنزيم كلما أزدادت مدة التحضين [٤٢] . كما لوحظ من النتائج المستحصل عليها أن أقصى إنتاجية للكتلة الحيوية كانت بعد مرور٧ أيام من بدأ الحضن لجميع السلالات ، وأفضل إنتاجية للكتلة الحيوية كانت للسلالة A ، إذ بلغت ٣٦,٧٥ غم/ لتر تليها السلالة D بواقع ٣٤,٧١ غم / لتر ثم السلالة C وB بكتلة حيوية مقدارها ٣٠,٣٣ غم / لتر و ٢٦,٧٦ غم/ لتر على التوالي وهذا أتفق مع Ertan و Ekinci [٣٣] اللذان أشارا الى أن الكتلة الحيوية تبدأ بالإزدياد تدريجياً من اليوم الأول لتصل الى أقصاها في اليوم الرابع من تنمية العفن *A. niger* .

الجدول (٣) تأثير اختلاف مدة الحضن في إنتاج إنزيم الإنيولينيز و الكتلة الحيوية من سلالات العفن *A. niger*.

رمز العزلة	الفحص	مدة الحضن (أيام)		
		3	5	7
A	فعالية الإنزيم وحدة / مل	a 14.33 ± 0.46	b 12.13 ± 1.74	c 6.81 ± 0.11
	الكتلة الحيوية غم / لتر	c 9.45 ± 1.26	b 21.57 ± 1.48	a 36.75 ± 0.05
B	فعالية الإنزيم وحدة / مل	a 14.68 ± 1.04	b 6.93 ± 0.07	b 6.01 ± 0.23
	الكتلة الحيوية غم / لتر	b 15.16 ± 0.08	a 26.06 ± 1.64	a 26.76 ± 0.06
C	فعالية الإنزيم وحدة / مل	a 13.73 ± 1.88	b 6.88 ± 0.07	b 7.18 ± 0.10
	الكتلة الحيوية غم / لتر	c 12.69 ± 0.04	b 26.83 ± 0.06	a 30.33 ± 1.55
D	فعالية الإنزيم وحدة / مل	a 15.89 ± 0.86	b 12.44 ± 2.18	c 8.08 ± 0.44
	الكتلة الحيوية غم / لتر	c 17.30 ± 1.20	b 27.99 ± 2.02	a 34.71 ± 0.75

A : السلالة القياسية ، B : السلالة المحلية ، C : السلالة الطافرة الأولى ، D : السلالة الطافرة الثانية .

c-a : الأحرف المختلفة في السطر الواحد تشير الى وجود اختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05 .

كل قيمة تمثل معدل لمكررين ، ± تمثل قيمة الخطأ القياسي.

تحتاج الأحياء المجهرية الهوائية الأوكسجين لكونه المستقبل النهائي للإلكترونات لذلك فإنه يُعد المادة الاساس لعملية التنفس و لعمل إنزيمات الأكسدة و تخليق الأحماض الدهنية غير المشبعة في الفطريات الهوائية [٣٢]. إن من أهم العوامل في عملية التخمير هي التهوية التي تسبب الوصول الى كثافة للمايسيليوم عالية عند توفر الكميات المثالية من الأوكسجين [٣٦].

و يوضح الجدول (٤) الإختلاف في ظروف الرج ٥٠ و ١٠٠ و ١٥٠ دورة / دقيقة في إنتاج إنزيم الإنيولينيز و الكتلة الحيوية عند تنمية العفن *A. niger* على درجة حرارة ٣٠ م لمدة ٤ أيام .

بينت النتائج أن درجة الرج المثلى لإنتاج الإنزيم كانت عند ١٠٠ دورة / دقيقة و قد أظهرت السلالة D في أنها الأكفأ أنتاجاً للإنزيم إذ بلغت فعالية الإنزيم ٢٦,٨٢ وحدة / مل من كتلة حيوية مقدارها ٢٣,٥٢غم/ لتر ثم تلتها السلالة C بفعالية قدرها ١٩,٣٩ وحدة / مل من كتلة حيوية ٢٢,٩٩ غم / لتر ثم السلالة B بفعالية ١٨,٩٤ وحدة/ مل من كتلة حيوية ١٣,٢٦غم/ لتر و أخيراً السلالة A بفعالية ١٣,٢٢ وحدة/ مل من كتلة حيوية ١٤,٦٦ غم/لتر .

إتفقت هذه النتائج مع بعض الدراسات التي أثبتت أن التهوية أو الرج يسبب في دعم أفضل لإنتاج الإنزيم من الظروف الثابتة [٧] ، والتي أشارت الى أن عملية حضن بعض أنواع *A.niger* في مزارع مغمورة تحت ظروف ثابتة وأخرى متحركة عند درجة حرارة ٣٠ م أدت الى الحصول على أعلى فعالية للإنزيم بعد مرور أربعة أيام تحت ظروف الرج وبعد٩ أيام تحت الظروف الثابتة، وكذلك لوحظ تراكم تركيز عالي من السكروز بعد مرور يومين مع زيادة وقت التخمير بينما اختفى السكر المتراكم بصورة أسرع في حالة الرج عنه في الظروف الثابتة وهذا يوضح كون فعالية الإنزيم تكون في أقصاها عند اليوم التاسع من التحضين تحت ظروف ثابتة لكون التراكيز العالية من السكر المختزل تثبط فعالية الإنزيم [٣٥] .كذلك أتفقت النتائج مع الدراسات الأخرى التي أشارت الى أن أقصى فعالية للإنزيم كانت بعد ٦٠ ساعة بسرعة رج ١٥٠ دورة / دقيقة و تحت نفس الفترة الزمنية وبدون رج وجد أنها أقل بمقدار ٢,٦٥ مرة من إنتاج الإنزيم تحت ظروف الرج [٧] ، كما وجد إن درجة الرج المثلى للنمو كانت ٥٠ دورة/ دقيقة و تناقصت تدريجياً عند درجة رج ١٠٠ دورة/ دقيقة و بلغت أقلها عند درجة رج١٥٠ دورة/ دقيقة و أظهرت السلالة C أقصى نمو لها إذ بلغت الكتلة الحيوية لها ٢٩,١٥ غم/ لتر ثم تلتها السلالة D 27.11 غم/ لتر ثم السلالة B و A بكتلة حيوية مقدارها ٢١,٤٣ غم / لتر و ٢٠,٥٤ غم / لتر على التوالي.

الجدول (٤) تأثير اختلاف سرعة الرج في إنتاج إنزيم الإنيولينيز والكتلة الحيوية عند تنمية العفن *A. niger* عند درجات رج مختلفة و لمدة أربعة ايام.

رمز العزلة	الفحص	سرعة الرج (دورة / دقيقة)		
		٥٠	١٠٠	١٥٠
A	فعالية الإنزيم وحدة / مل	c 6.33 ± 0.25	a 13.22 ± 0.06	b 8.01 ± 0.61
	الكتلة الحيوية غم / لتر	a 20.54 ± 0.47	b 14.66 ± 1.32	c 12.04 ± 0.04
B	فعالية الإنزيم وحدة / مل	b 7.97 ± 1.50	a 18.94 ± 0.07	b 7.07 ± 0.005
	الكتلة الحيوية غم / لتر	a 21.43 ±1.41	b 13.26 ± 0.04	c 6.31 ± 0.07
C	فعالية الإنزيم وحدة / مل	c 7.07 ± 0.14	a 19.39 ± 0.05	b 11.09 ± 1.34
	الكتلة الحيوية غم / لتر	a 29.15 ± 0.22	b 22.99 ± 0.05	c 7.77 ± 0.11
D	فعالية الإنزيم وحدة / مل	b 7.51 ± 0.29	a 26.82 ± 2.11	b 8.91 ± 1.92
	الكتلة الحيوية غم / لتر	a 27.11 ± 1.96	b 23.52 ± 0.07	c 12.37 ± 1.98

A : السلالة القياسية ، B : السلالة المحلية ، C : السلالة الطافرة الأولى ، D : السلالة الطافرة الثانية .

c-a : الأحرف المختلفة في السطر الواحد تشير الى وجود اختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05 .

كل قيمة تمثل معدل لمكررين ، ± تمثل قيمة الخطأ القياسي .

يمكن أن يعود السبب في تباين النمو الى أن درجة الرج القليلة ٥٠ دورة / دقيقة تسبب في أن المحتوى الأوكسجيني للوسط يكون أقل من محتواه في الأوساط المحضنة عند درجة تحريك ١٠٠ و ١٥٠ دورة / دقيقة و إن قلة التهوية تسبب في زيادة عملية تكون السبورات و إطلاقها في الوسط الزرعي و بالتالي نمو كميات أضافية من المايسيليوم في الوسط وهذا يؤدي الى زيادة الكتلة الحيوية.

إن الزيادة الحاصلة في إنتاج الإنزيم عند تحضين العفن *A. niger* في ظروف رج تعود لكون نوع العفن المذكور أعلاه من الأحياء المجهرية الهوائية التي تتطلب كميات وفيرة من الاوكسجين لنموها و ذلك لكونه يدخل في العديد من العمليات الأيضية و عمل الإنزيمات التنفسية ، لذا فإن إنتاج الإنزيم هو مرتبط بوفرة وجود الأوكسجين المذاب في الوسط السائل و إن قلة الاوكسجين يؤدي الى جعل الظروف البيئية للوسط غير ملائمة لنمو الفطر و بالتالي زيادة تكون السبورات و إطلاقها الى الوسط الزرعي مما يؤدي الى حصول زيادة في الكتلة الحيوية بصورة كبيرة مؤدية الى حدوث تنافس فيما بينها على الأوكسجين و بذلك يصبح غير كافي للنمو المثالي و التأثير على إنتاج الإنزيم و قلته [٣٦].

أظهرت النواتج الأيضية للعفن *A. niger* و التي من ضمنها إنزيم الإنيولينيز غير المنقى فعالية تثبيطة متوسطة ضد بعض أنواع البكتريا المرضية السالبة و الموجبة لصبغة كرام و كانت النتائج كما في الجدول (٥) ، إذ كانت بكتيريا *Klebseilla pneumoniae* الأكثر تأثراً بالفعالية التثبيطية للنواتج الأيضية للعفن من الأنواع البكتيرية الأخرى.

الجدول (٥) التأثير التثبيطي للنواتج الأيضية للعفن *A. niger* و بضمنها إنزيم الإنيولينيز غير المنقى ضد بعض أنواع البكتريا المرضية.

أنواع البكتريا المرضية	أقطار مناطق التثبيط مقاسة (ملم)
Staphylococcus aureus	c 17.12 ± 2.15
Klebseilla pneumoniae	a 26.25 ± 3.43
Psudomonas aeruginosa	c 16.75 ± 5.07
Escherichia coli	c 16.91 ± 2.44
Proteus valgaris	b 19.75 ± 3.27
Citrobacter freeundii	c 17.81 ± 5.07

c-a: الأحرف المختلفة تشير الى وجود اختلافات معنوية عند مستوى إحتمالية 0.05 .
كل قيمة تمثل معدل لثلاثة مكررات ، ± تمثل قيمة الخطأ القياسي .

و أتفقت هذه النتائج مع بعض الدراسات التي أشارت إلى أن عدة نواتج أيضية للعفن *A. niger* تمتلك القابلية على تثبيط بعض أنواع البكتريا المرضية [٤٣] ، وإن سبب الفعالية التثبيطية التي تمتلكها النواتج الأيضية للعفن *A. niger* ضد هذه الأحياء المجهرية المرضية قد تعود الى الإنزيمات الخارج خلوية Exoenzymes الذي يفرزها العفن وكذلك الحوامض العضوية مثل حامض الأوكزاليك والستريك . إن التثبيط يكون من خلال التأثير على غشاء الخلية البكتيرية مسبباً في حدوث ثقوب فيه ، أو من خلال عبور الحامض بشكل غير ذائب الى داخل الخلية و ذوبانه في داخله مؤدياً الى إنخفاض مستوى الأس الهايدروجيني للسايتوبلازم فيها وبالتالي تثبيط فعالية الإنزيمات الموجودة فيها من خلال حصول عملية مسخ لها (Denaturation) أو من خلال التفاعل مع مكونات الخلية وبالتالي حل الخلية و موتها .

المصادر

1- de Leenheerl, L. [[Production and Use of Inulin: Industrial Reality With a Promising Future. Carbohydrates as Organic Raw Materials]]. V.C.H. Publications, New York, USA. (1996).
2- Roberfroid, M. B., Br. J. Nutr., 93 (2005) 13-25.
3- Velázquez-Hernández, M. L., Baizabal-Aguirre, V. M., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, M. P. and Valdez-Alarcón, J. J., J. of Appl. Microbiol., 106 (2009) 1763 - 1778.
4- Chen, H.-Q., Chen, X.-M., Li, Y., Wang, J., Jin, Z.-Y., Xu, X.-M., Zhao, J.-W., Chen, T. X. and Xie, Z. J., Food chem., 115 (2009) 1206- 1212.
5- Souza-Motta, C. M. S., Cavalcanti, M. A. Q., Porto, A. L. F., Moreira, K. A. and Filho, J. L. L., Brazilin Arch. of Biol. Technol., 48 (2005) 343-350.
6- Viswanathan, P. and Kulkarni, P. R., Indian J. Microbiol., 36 (1996) 117- 118.
7- Poorna, V. and Kulkarni, P. R., Bioresource Technol., 54 (1995) 315-320.
8- Nakamura, T., Ogata,Y., Shitara, A., Nakamura, A. and Ohta, K., J. Ferment. Bioeng., 80 (1995) 164–169.
9- Storey, K. B. and Schafhauser, S. D. Y., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 12 (1994) 409–465.
10- Vullo, D. L., Coto, C. E. and Sineriz, F., Appl. Environ. Microbiol., 57 (1991) 2392–2394.
11- Partida, V. Z., Lopez, A. C. and Gomez, A. J. M., World Intellectual Property Organization. Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 97/34017. (1997).
12- Pejin, D., Jakovljevic, J., Razmovaski, R. and Berenji, J., J. Ferment. Bioeng., 75 (1993) 79–81.
13- Nakamura, T., Ogata, Y., Hamada, S. and Ohta, K., J. Fermen. Bioeng., 81 (1996) 564–566.
14- Yokota, A., Yamauchi, O. and Tomita, F., Lett. Appl. Microbiol., 21 (1995) 330-333.
15- Yun, J. W., Kim, D. H., Uhm, T. B. and Song, S. K., Biotechnol. Lett., 19 (1997) 935–938.

16- Rouwenhorst, R. J., Visser, L. E., van der Baan, A. A., Scheffers, W. A. and Van Dijken, J. P., Appl. Environ. Microbiol., 54 (1988) 1131–1137.
17- Kim, D. M. and Kim, H. K., Biotechnol. Bioeng., 39 (1992) 336–342.
18- Benson. [[Microbiological Applications Lab Manual]]. 8th ed., The McGraw- Hill companies, USA. (2001).
19- Samson, R. A., Hoekstra, E. S. and Oorschot, C. A. [[Introduction to Food – Borne Fungi]]. Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. Baarn, Netherlands. (2002).
20- Skowronek, M. and Fiedurek, J., Food Technol. Biotechnol., 44 (2006) 53 – 58.
21- Kango, N., J. Food Engineering, 85 (2008) 473-478.
22- Ongen-Baysal, G., Sukan, S. S. and Vassilev, N., J. Biotechnol. Lett., 16 (1994) 275-280.
23- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). [[Official methods of analysis]]. 4 th ed., Assoc. Offic. Anal. Chem. Virginia, USA. (2002).
24- Miller, G. L., Anal. Chem., 31 (1959) 426-428.
25- Prescott, L. M., Harley, J. P. and Klein, D. A. [[Microbiology]]. 3rd ed., The McGraw Hill Comp. Inc., USA. (2002).
26- Vandepitte, J., Verhaegen, J., Engback, K., Rohnerp, P., Piot, P. and Heuck, C. C. [[Basic Laboratory Procedure in Clinical Bacteriology]]. World Health Organization Geneva, Singapore. (2003).
27- Viswanathan, P. and Kulkarni, P. R., J. Appl. Bacteriol., 78 (1995) 384-386.
28- Nicolase-Santiago, S. D., Regalado-Gonzalez, C., Garcia-Almendarez, B., Fernandex, F. J., Tellez-Jurado, A. and Huerta-Ochoa, S., Electro. J. of biotechnol., 9 (2006) 51-60.
29- Zia, M. A., Mutagenesis of *Aspergillus niger* For Hyperproduction of Glucose Oxidase To Prepare Glucose Diagnostic Kit, M.Sc Thesis University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan. (2007).
30- Sandana Mala, J. G., Kamini, N. R. and Puvanakrishnan, R., J. Gen. Appl. Microbiol., 47 (2001) 181-186.
31- Parekh, S., Vinci, V. A. and Strobel, R. J., Appl. Microbiol. Biotechnol., 54 (2000) 287-301.
32- Kavanagh, K. [[Fungi Biology and Applications]]. John Wiley and Sons Ltd., England. (2005).
33- Ertan, F. and Ekinci, F., J. Marmara Pure Appl. Sci., 18 (2002) 7-15.
34- Naidoo, K., Ayyachamy, M., Permaul, K. and Singh, S., Bioprocess Biosyst Eng., 32 (2009) 689-695.
35- Gounda, M. K., Biolo. Sci., 5 (2002) 589-593.
36- Skowronek, M. and Fiedurek, J., J. Enzyme and Microbial Technology, 38 (2006) 162-167.
37- Kumar, G. P., Kunamneni, A., Prabhakar, T. and Ellaiah, P., J. Microbiol. Biotechnol., 21 (2005) 1359-1361.
38- Nandagopal, S. and Kumari, B. D. R., American Eurasian J. Agric & Environ. Sci., 1 (2006) 225-228.
39- Shadafza, D., Ogawa, T. and Fazeli, A., Hakko Kogaku Zasshi, 54 (1976) 65 – 75.
40- Rose, A. H. [[Chemical Microbioloy, an Introduction to Microbial Physiology]]. Butter worths, London. (1976).
41- Cruz V. D., Belote, J.G., Belline, M. Z., Rev. Microbiol., 29 (1998) 301 - 306.
42- Viswanathan, P. and Kulkarni, P. R., Bioresource Technol., 54 (1995) 117 - 121.
43- Bugni, T. S., Abbanat, D., Bernan, V. S., Maiese, W. M., Greenstein, M., Wagoner, R. M. V. and Ireland, C. M., J. Org. Chem., 65 (2000) 7195-7200.

Optimal conditions for the production of inulinase by *Aspergillus niger* and study the effectiveness of its against some pathogenic bacterial species

N. L. Ali[1] , K. M. Thalij[2] , A. S. Badawy[2]

[1] *Depth biology, College of Education, University of Tikrit , Tikrit , Iraq*
[2] *Agriculture College , Tikrit University , Tikrit , Iraq*

(**Received:** 2 / 11 / 2010 ---- **Accepted:** 11 / 5 / 2011)

Abstract

This study was aimed to isolate *Aspergillus niger* locally and mutagenesis by ultraviolet radiation. The optimal environmental conditions of temperature, pH, incubation period and shaking were studied in order to get the best inulinase productivity. The optimal conditions for the enzyme production was found to be at temperature of 20° C and the pH 4 for 3 day with shaking at 100 rpm. The maximum enzyme activity of 26.82 U/ml was found for D mutant strain.

The inhibition action of the *Aspergillus niger* strain metabolites including inulinase enzyme was also tested .It was found that there is an inhibition action against pathogenic bacterial species which included, *Staphylococcus aureus , Pseudomonas aeruginosa , Klebseilla pneumoniae, Escherichia coli , Proteus valgaris* and *Citrobacter freeundii.*