عزل وغربلة الفطريات المنتجة لانزيم الانيولينيز وتحديد الظروف البيئية المثلى لإنتاج الانزيم من الفطر *Aspergillus niger*

أم البشر حميد جابر الموسوي* علي عبد الكاظم الغانمي• ناجح هاشم كاظم•¤

*قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة/جامعة البصرة/البصرة/العراق

• قسم علوم الحياة /كلية العلوم /جامعة كربلاء/كربلاء/العراق

الخلاصة

تم عزل ٦٠ عزلة فطرية من ترب زراعية مختلفة في محافظة كربلاء المقدسة. خضعت العزلات المذكورة لعمليات غربلة أولية وأخرى ثانوية لاختبار قابليتها على إنتاج إنزيم الانيولينيز، وتم اختيار العزلة الأعلى إنتاجاً للإنزيم والتي شخصت فيما بعد على أنها *Aspergillus niger* . تم دراسة الظروف البيئية لإنتاج الانزيم من العزلة المختارة في هذه الدراسة،وأظهرت النتائج إن أفضل هذه الظروف هي الحضن في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة ٣٠ م وبسرعة رج (١٥٠) دورة/دقيقة ولمدة ٩٦ ساعة.

¤ مستل من اطروحة الدكتوراه

المقدمة

ظهر مؤخرا مدى واسع من المحليات الجديدة والمرغوبة لمماشاة الوعي الصحي المتنامي للمستهلكين،وان سكر الفركتوز هو خير مثال لهده المحليات الذي أصبح من الأهمية القصوى ودلك لامتلاكه خصائص وظيفية مرغوبة وكذلك يعد سكر طبيعي أكثر أمانا وحلاوة من سكر المائدة(السكروز) الذي يسبب مشاكل مرتبطة بظهور العديد من المشاكل الصحية لعل في مقدمتها مرض السكر Diabetes والسمنة Corpulence وتصلب الشرايين Atherosclerosis (28).لذا فقد حل الفركتوز بديلا عن السكروز في العديد من الصناعات الغذائية،لقد ازداد الطلب أخيرا على الفركتوز من خلال فوائده لمرضى السكر وإمكانية تمثيله بمستويات بسيطة دون الحاجة للأنسولين وزيادته امتصاص الحديد عند الأطفال، ودوره في إزالة التأثير السمي للايثانول من الدم وزيادته امتصاص الحديد عند الأطفال فضلاً عن لزوجته القليلة وحلاوته وذائبيته العاليتين مقارنة بالسكروز(11) توجد طرائق عدة لإنتاج الفركتوز بيد

أن الطريقة الأنزيمية المتمثلة باستخدام إنزيم الانيولينيز هي المعول عليها نظرا لكفاءتها العالية وكلفتها الواطئة اذ يتم إنتاج إنزيم الانيولينيز من مصادر نباتية وأخرى ميكروبية، وتعد المصادر المايكروبية مصادرا رئيسية لإنتاج الإنزيم تجارياً وتحتل الفطريات موقع الصدارة بالمقارنة مع الخمائر و البكتريا(٢١) ، فمن الفطريات اظهرت انواع الجنس *Aspergillus* موقع الصدارة في إنتاج الانزيم تلتها أجناس *Penicillium* و *Alternaria* و *Rhizopus* ومن الخمائر تمَيز جنس *Kluyveromyces* ،أما من البكتريا فقد تميزت أجناس *Bacillus* و *Clostridium* و *Xanthomonas* بقابليتها العالية على إنتاج الانزيم (22). ونظراً لما يمتلكه إنزيم الانيولينيز من أهمية كبيرة، فضلاً عن قلة الدراسات عن هذا الإنزيم في القطر لذا فقد هدفت هذه الدراسة إلى: عزل الفطريات المنتجة لإنزيم الانيولينيز وانتخاب العزلة الأكفأ منها، وتحديد الظروف البيئية المثلى لإنتاج الإنزيم.

المواد و طرائق العمل

عزل الفطريات وتشخيصها

اختيرت مناطق زراعية مختلفة من محافظة كربلاء المقدسة شملت قضاء الهندية وناحية الحسينية ومنطقة فريحة وقريتي الكمالية والشريعة واختيرت محافظة كربلاء لان البحث اجري في كلية العلوم/جامعة كربلاء لجلب عينات من التربة لاستخدامها في عزل الفطريات المنتجة لإنزيم الانيولينيز، وقد تم العزل لكل عينة على حدة بواقع ٦ اطباق لكل عينة وأجريت عملية جمع العينات حسب الطريقة الموصوفة من قبل (٢٩) كما اعتمدت طريقة (١٣) في عزل الفطريات بطريقة التخافيف المتسلسلة وباستخدام الوسط ألزرعي PDA المضاف إليه المضاد البكتيري الكلورومفنيكول بتركيز100ملغم/لتر والحضن على درجة حرارة 30م لمدة 5–7 أيام.

استخدم المجهر الضوئي في تشخيص الفطريات، كما تم استخدام بعض المفاتيح التصنيفية لتحديد الجنس أو النوع للعزلات المتحصل عليها اعتماداً على (٤) و (12).

لغرض تشخيص العزلة المنتخبة التي تميزت بأعلى إنتاج من إنزيم الانيولينيز، أرسلت هذه العزلة إلى الإستاذ المساعد الدكتور زيدان خليف عمران /كلية العلوم بنات /جامعة بابل.

الغربلة الأولية (شبه الكمية) للعزلات الفطرية المنتجة لإنزيم الانيولينيز:

استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل (27) لغربلة العزلات التي لها القابلية على إنتاج إنزيم الانيولينيز باستخدام الوسط ألزرعي Czapek Agar Medium(CZA) المحور باستبدال السكروز بالانيولين حيث نقل قرص واحد من كل عزلة بوساطة ثاقب فليني معقم إلى سطح الوسط (CZA)المحور المجهز في أطباق وحضنت هذه الإطباق على درجة حرارة 30م وتم

قياس قطر المستعمرة الفطرية بعد فترة حضن مقدارها ٧أيام وذلك لتقييم نمو مستعمرة الفطر، فاذا كان قطر المستعمرة٢٠ ملم او اكثر يعد النمو جيد واذا كان القطر اقل من ٢٠ ملم يعد النمو ضعيف .

الغربلة الثانوية(الكمية) للعزلات الفطرية المنتجة لإنزيم الانيولينيز

استخدم الوسط المقترح من قبل (20) مع بعض التحوير في الغربلة الكمية للعزلات الفطرية المنتجة لإنزيم الانيولينيز إذ تم تحضير الوسط بإذابة المكونات الآتية في لتر واحد من الماء المقطرNH_4NO_3 2.3 غم، $[(NH_4)_2HPO_4]$ 3.7غم، KH_2PO_4 1.0 غم، $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 غم، yeast extract 1.5 غم وInulin 15غم وتم تعديل الرقم الهيدروجيني للوسط إلى 4.8 وزع بعدها الوسط في دوارق سعة 250 مللتر بواقع 50 مللتر لكل دورق، ثم عقم بجهاز المؤصدة Autoclave لمدة10 دقائق، وبعد تبريد الوسط إلى درجة حرارة الغرفة واعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل (26) في تنمية العزلات، إذ لقحت الدوارق بأقراص من العزلات الفطرية المراد اختبار إنتاجيتها لإنزيم الانيولينيز وحضنت في حاضنة هزازة Shaker incubator بدرجة حرارة30م وسرعة رج 150 دورة/دقيقة لمدة 96 ساعة.

تقديرألفعالية ألإنزيمية والبروتين

قدرت فعالية إنزيم الانيولينيز باستخدام مادتي تفاعل هما الانيولين والسكروز،تم تقدير الفعالية الإنزيمية للانيولينيز المنتج من قبل الفطر *Aspergillus niger* وذلك بتقدير كمية السكريات المختزلة وفق ما ذكره (23) مع بعض التحوير، ودلك بمزج 0.1 مللتر من المستخلص الأنزيمي مع 0.9 من محلول منظم خلات الصوديوم(0.1 مولر ورقم هيدروجيني4.8) الحاوي على 1% من مادة التفاعل (انيولين أو سكروز) وحضن المزيج في حمام مائي بدرجة حرارة40م لمدة15 دقيقة، أوقف التفاعل بإضافة 1 مللتر من محلول 3, 5 Dinitro Salicylic Acid(DNSA) لكل أنبوبة اختبار واستكمل تقدير السكريات المختزلة بطريقة (16) ، وتم حساب الفعالية الإنزيمية بالاعتماد على المنحنى القياسي للفركتوز. وتعرف وحدة الفعالية الإنزيمية لإنزيم الانيولينيز بأنها كمية الإنزيم اللازمة لتحرير مايكرومول واحد من الفركتوز في الدقيقة الواحدة وتحت ظروف التقدير.وقدرت الفعالية الإنزيمية باستخدام السكروز كمادة تفاعل بنفس الطريقة السابقة ماعدا استبدال الانيولين بالسكروز كمادة تفاعل، وتعرف وحدة الفعالية الإنزيمية لإنزيم الانيولينيز بأنها كميـــــــــــة الإنزيم اللازمة لتحرير مايكرومول واحد من السكريات المختزلة(الفركتوز و الكلوكوز) من السكـــــــروز في الدقيقة

الواحدة وتحت ظروف التقدير. استخدمت طريقة (3) باستخدام ألبومين المصل ألبقري Bovine Serum Albumin (BSA) بروتينا قياسيا. واستخدمت الفعالية النوعية كمقياس لإنتاج الانزيم والمقارنة.

تحديد الظروف البيئية المثلى لإنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر *A. niger*

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

1- تأثير مدة الحضن

تمت متابعة إنتاج الانيولينيزمن الفطر *A. niger* لمدة 5 أيام ، إذ تم إنتاج الإنزيم تحت الظروف المثبتة في الغربلة الثانوية للعزلات الفطرية.

2- تأثير سرعة الرج

لقح الوسط الإنتاجي باللقاح الفطري وتمت التنمية في الحاضنة الهزازة بسرع رج (0.0و 50و 100و 150و 200) دورة/دقيقة ولمدة 96 ساعة وذلك لتحديد سرعة الرج المناسبة لإنتاج الإنزيم.

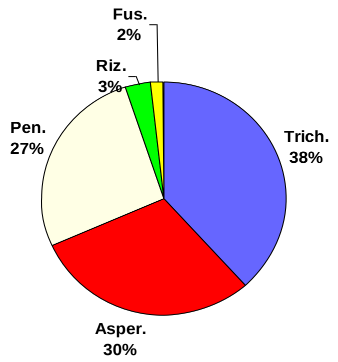
3 - تأثير درجة حرارة الحضن

تم حضن الدوارق الحاوية على الوسط الإنتاجي الملقح بالفطر *A. niger* على الدرجات الحرارية (25و 30و 35)م لمدة 96 ساعة وعلى سرعة رج 150 دورة/دقيقة ، لتحديد درجة حرارة الحضن المثلى لإنتاج الإنزيم.

النتائج والمناقشة

عزل وغربلة الفطريات المنتجة لإنزيم الانيولينيز

اظهرت نتائج عزل الفطريات من الترب الزراعية المختارة في هذه الدراسة عن الحصول على (٦٠) عزلة فطرية، وبملاحظة المظهر الخارجي للمستعمرات وألوانها وبعض الخصائص الأخرى، صنفت العزلات المختارة إلى الاجناس الفطرية الموضحة بالشكل (١).



الشكل (١): الأجناس الفطرية المعزولة من ترب لاماكن مختلفة في محافظة كربلاء المقدسة

ويلاحظ من الشكل (١) سيادة جنس ألـــ *Trichoderma* من بين الفطريات المعزولة إذ شكل أعلى نسبة ٣٨.٣% من مجموع العزلات، وتأتي هذه النتيجة متوافقة مع ما ورد في بعض الدراسات و التي أشارت إلى شيوع انتشار الأنواع التابعة لهذا الجنس في التربة(١)، أما جنسا الـــ *Aspergillus* و الـــ *Penicillium* فقد احتلتا نسبتين متقاربتين واللتين بلغتا ٣٠.٠ و ٢٦.٧% من الفطريات المعزولة، على التوالي. ويعد جنس الـــ *Aspergillus* من الفطريات ذات الانتشار العالمي وفي مختلف أنواع الترب وقد حسبت النسبة المئوية كما يلي (8).

نسبة الظهور% = (عدد العزلات التابعة للجنس / العدد الكلي للعزلات) × ١٠٠

رقم العزلة	قطر المستعمرة (ملم) في الغربلة الاولية	الفعالية النوعية (وحدة/ ملغم بروتين) في الغربلة الثانوية	التشخيص المقترح
٦	٥٥	٣.٨٢٨	*Aspergillus* sp.
١٨	٢٥	١٧.٢٥٨	*Aspergillus* sp.
٢١	٢١	٢٧.٢٢	*Aspergillus* sp.
٢٢	٣٠	٨٠	*Aspergillus* sp.
٢٤	٢٠	٢٠.٩٨	*Aspergillus* sp.
٣٥	٢٠	18.37	*Aspergillus* sp.
٣٩	٢٥	٣٤	*Aspergillus* sp.
٤٠	٢٠	٩.٥	*Aspergillus* sp.
١٥	٣٤	0.00	*Penicillium* sp.
١٧	٢٨	27.85	*Penicillium* sp.
٢٨	٢٤	0.00	*Penicillium* sp.
٢٩	٢٠	١٤.٣٣٤	*Penicillium* sp.
٣٠	٢٧	3.85	*Penicillium* sp.
٣١	٢٥	٢٦.٨٩	*Penicillium* sp.
٣٢	٢٢	0.00	*Penicillium* sp.
٣٣	٢٤	١١.٦٠٣	*Penicillium* sp.
٥٥	٣٥	0.00	*Penicillium* sp.
٤	٣٤	0.00	*Rhizopus* sp.
٧	٥٥	٢٢.٣٧١	*Trichoderma* sp.
١٢	٢١	١٣.٧٢٢	*Trichoderma* sp.
١٦	٣٨	٢٨.٨٨٩	*Trichoderma* sp.
٢٠	٢٠	0.00	*Trichoderma* sp.
٣٦	٥٥	45.59	*Trichoderma* sp.
٤٣	٢٠	4.86	*Trichoderma* sp.

Trichoderma sp.	14.286	٣٥	٤٤
Trichoderma sp.	١٩.٦١	٤٧	٤٥

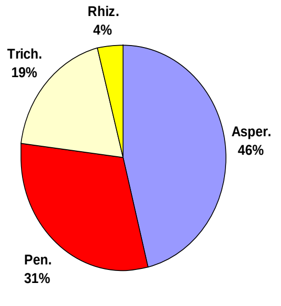
جدول(١) الغربلة الثانوية للعزلات الفطرية المحلية المنتجة لانزيم الانيولينيز

غربلة العزلات لإنتاج انزيم الانيولينيز

أظهرت نتائج الغربلة الأولية تفاوت نمو المستعمرات بين الضعيف (قطر المستعمرة اقل من ٢٠ ملم) والجيد (قطر المستعمرة ٢٠ ملم او اكثر) على وسط الغربلة Czapek Dox Agar(CZA)، اذ بلغ عدد العزلات ذات النمو الضعيف ٣٤ عزلة بنسبة ٥٦.٧% من المجموع الكلي للعزلات لذلك تم استبعادها بالغربلة الاولية، في حين بلغ عدد العزلات ذات النمو الجيد (٢٦) عزلة على التوالي، بنسبة بلغت43.3% من المجموع الكلي للعزلات، على التوالي أيضاً.

وبناءاً على ما تقدم فقد استبعدت العزلات ذات النمو الضعيف، في حين خضعت بقية العزلات لدراسات لاحقة، وتوزعت العزلات المختارة بين أجناس *Aspergillus* و *Penicillium*و *Trichoderma* و *Rhizopus* في حين غاب جنس *Fusarium* عنها، وكما موضح في الشكل (٢). وتشير نتائج الغربلة الثانوية الموضحة في الجدول (1) إلى تفوق العزلة رقم ٢٢ بإنتاجها للإنزيم مقارنة مع بقية العزلات المستخدمة في الدراسة، إذ بلغت الفعالية النوعية لإنزيم الانيولينيز ٨٠ وحدة /ملغم بروتين، في حين تراوحت الفعالية النوعية للإنزيم المنتج من بقية العزلات بين ٣.٨٣- ٤٥.٥٩ وحدة /ملغم بروتين، مما يشير إلى زيادة إنتاج

العزلة المذكورة بما يعادل ٤٣% عن إنتاج اقرب العزلات لها(العزلة رقم ٣٦) لذلك وقع الاختيار على العزلة رقم ٢٢ وتم استخدامها في مراحل الدراسة اللاحقة. اعتمادا على المفاتيح التصنيفية من قبل(17) و(10) تبين أن التشخيص المقترح للعزلة (٢٢) هي *Aspergillus niger* اذ شخصت العزلة المنتجة لاعلى كمية من الانزيم في العفن *A.niger* بالاعتماد على



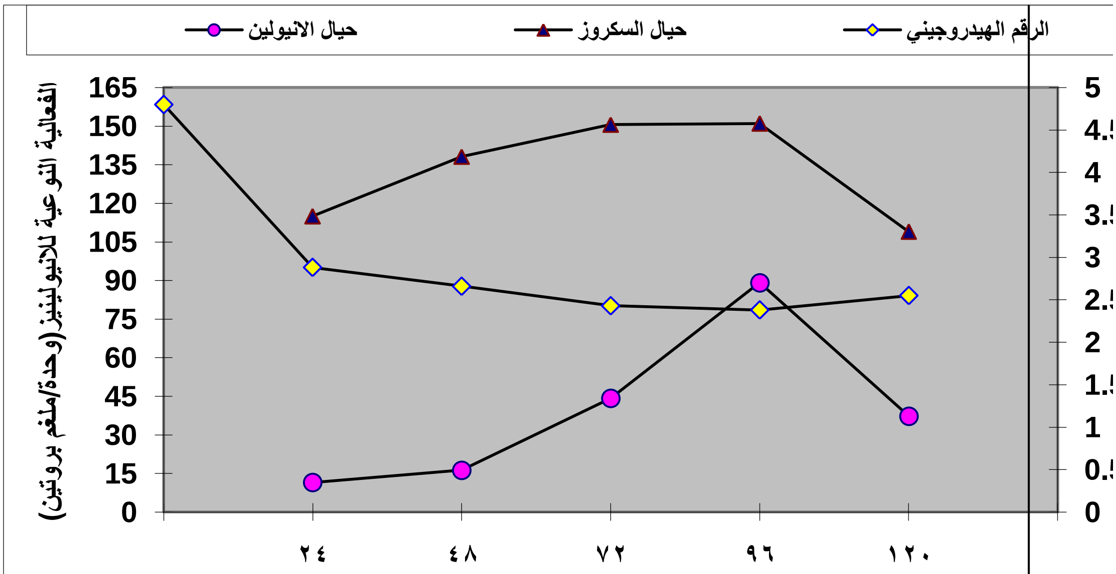
الشكل (٢): الغربلة الأولية للأجناس الفطرية المنتجة لأنزيم الانيولينيز

تحديد الظروف البيئية المثلى لإنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر *A. niger*

١ – تأثير مدة الحضن

يتضح من الشكل (3) إن الفعالية النوعية للإنزيم حيال سكر الانيولين (كمادة تفاعل) وصلت إلى أقصاها بعد ٩٦ ساعة من الحضن، إذ بلغت ٨٩.١٥ وحدة/ملغم بروتين ثم انخفضت بعد ذلك إذ بلغت ٣٧.٣٢ وحدة/ملغم بروتين بعد ١٢٠ ساعة من الحضن، في حين وصلت الفعالية النوعية للإنزيم حيال السكروز (كمادة تفاعل) إلى ١٥٠.٦و ١٥١.٠٥ وحدة/ملغم بروتين بعد٧٢و ٩٦ ساعة على التوالي ثم انخفضت بعد ذلك إلى ١٠٩.٠١ وحدة/ملغم بروتين في اليوم الخامس.وفي ضوء هذه النتائج اختيرت مدة حضن ٩٦ ساعة لإنتاج الأنزيم من الفطر *A. niger* واستخدمت في جميع مراحل الدراسة اللاحقة.

وتعد النتيجة المتحصلة من هذه الدراسة موافقة لما ورد في بعض الدراسات(19و20) إذ أن مدة حضن مقدارها ٩٦ ساعة كانت المثلى لإنتاج الإنزيم من الفطر *A. niger* والفطر *A. fumigatus*، على التوالي.



24	48	72	96	120

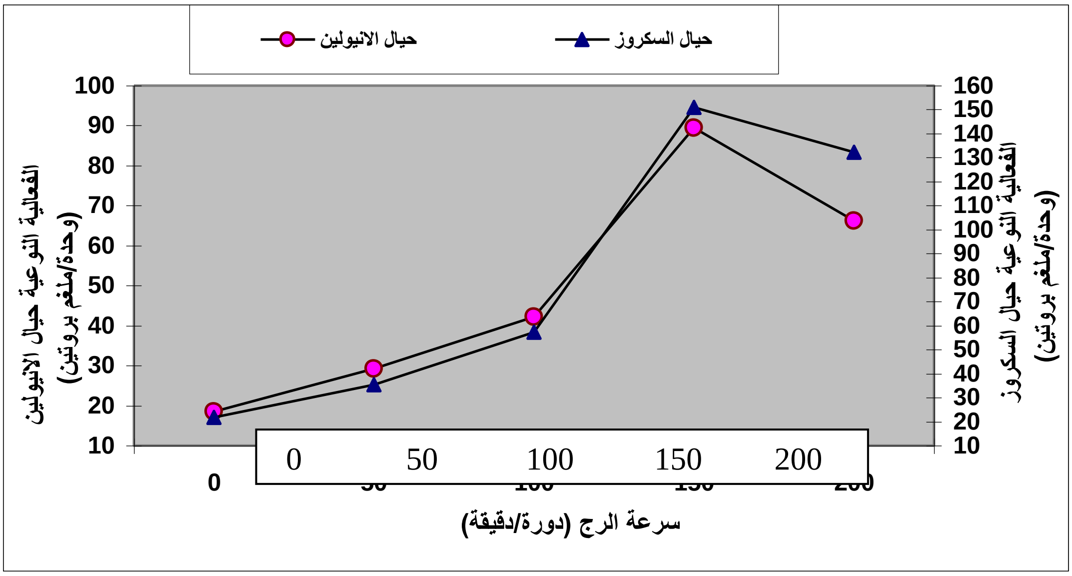
الشكل (3): تأثير مدة الحضن في إنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر *A. niger*

ويلاحظ من الشكل (3) انخفاض إنتاج الإنزيم بعد فترة محددة من التخمر، ويمكن ان يعزى ذلك إلى أن زيادة تركيز السكريات المختزلة (الفركتوز والكلوكوز) في الوسط ألزرعي في أثناء نمو الفطر قد يؤدي إلى كبح تخليق الإنزيم (28) ,كما فسَر انخفاض الفعالية الإنزيمية أيضا بحدوث نقصان للمواد الغذائية في الوسط ألزرعي فضلاً عن كبح الإنزيم نتيجة لتراكم نواتج الايض ألهدمي catabolic repression of enzyme (٢٦) وكذلك ينخفض pH باستمرار مدة الحضن وذلك لانتاج حوامض عضوية في الوسط كما توضح النتائج في الشكل ان الفعالية الانزيمية حيال السكروز افضل من الانيولين.

٢ – تأثير سرعة الرج

استخدمت الحاضنة الهزازة بسرع رج مختلفة فضلاً عن الحاضنة الساكنة لدراسة تأثير سرعة الرج في إنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر *A. niger*. ويلاحظ من الشكل (4) إن لسرعة الرج تأثيراً كبيراً في إنتاج الإنزيم، إذ تزداد الفعالية النوعية للإنزيم بزيادة سرعة الرج وصولاً إلى سرعة رج ١٥٠ دورة/دقيقة إذ بلغت الفعالية النوعية للإنزيم إلى ٨٩.٥ و ١٥١.٠٥ وحدة/ملغم بروتين حيال الانيولين والسكروز كمادتي تفاعل ،على التوالي.وتعد النتيجة المستحصلة من هذه الدراسة موافقة لعدد من الدراسات(٢٣,١٨,٥) التي أشارت إلى استخدام سرعة رج ١٥٠ دورة/دقيقة لإنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر *A. niger* والخميرة *Kluyveromyces marxianus* والبكتريا *Xanthomonas oryzae* على التوالي.

الشكل (4):تأثير سرعة الرج في إنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر *A. niger*

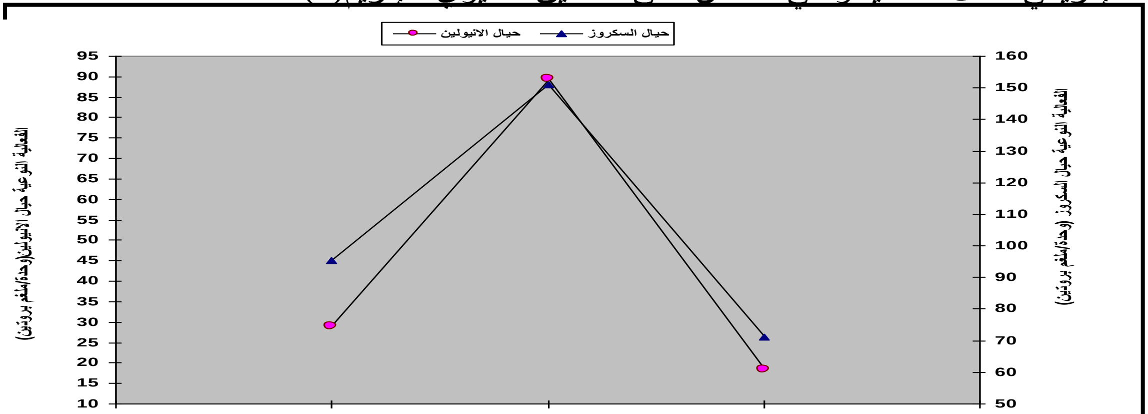


الشكل (٤): تأثير سرعة الرج في إنتاج انزيم الانيولينيز من الفطر *A. Niger*

في حين استخدمت سرعة رج مقدارها ٢٠٠ دورة /دقيقة لإنتاج الإنزيم من الفطر *A. niger* (٢٥)،وقد عزيت زيادة إنتاج إنزيم الانيولينيز من البكتريا *Xanthomonas campesrtis* pv *phaseoli* عند استخدام الحاضنة الهزازة بكونه يعود إلى التجهيز الثابت من الأوكسجين لهذه البكتريا اللازم لفعالياتها الحيوية مما يعجل من هدم سكر الانيولين(٢). وقد أشارت دراسة أخرى إلى أن معدل التهوية لا يؤثر فقط في توفر الأوكسجين وإنما كان له تأثير على توفر المغذيات في الوسط ألزرعي، وعزى(٢٤) انخفاض إنتاج الإنزيم في معدلات التهوية المرتفعة إلى تأثير القص(shear stress) الذي يتعرض له تركيب الإنزيم وخلايا الخميرة *Kluyveromyces marxianus* في الوقت نفسه.

3 – تأثير درجة حرارة الحضن

يتضح من الشكل (٥) أن أعلى إنتاج لإنزيم الانيولينيز من الفطر *A. niger* كان عند درجة حرارة ٣٠م، ، إذ بلغت الفعالية النوعية ٨٩.٥ و ١٥١.٠٥ وحدة/ملغم بروتين حيال الانيولين والسكروز كمادتي تفاعل، على التوالي. إن انخفاض إنتاج الإنزيمات بارتفاع وانخفاض درجة الحرارة يرجع إلى التأثيرات الحرارية على نمو الأحياء وسرعة التفاعل الإنزيمي داخل الخلايا والتي تنعكس على التخليق الحيوي للإنزيم(6) .



الشكل (5): تأثير درجة حرارة الحضن في إنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر *A.niger*

وقد وجد إن درجة الحرارة ٣٠- ٣٣م هي المثلى للحصول على أفضل إنتاج لإنزيم الانيولينيز من الفطر *Aspergillus ficuum* (٧)، الذي قام بعزل وتنقية انزيم الانيولينيز من بعض الخمائر و الفطريات وفضلت درجة حرارة الحضن المرتفعة لفائدتها في زيادة ذوبان سكر الانيولين فضلاً عن منع التلوث المايكروبي في وسط الإنتاج، إذ وجدا أن درجة حرارة (٥٠)م هي المثلى لإنتاج الإنزيم من الفطر *Aspergillus niveus* والفطر *Penicillium purpurogenum*(٢٨).

المصادر

١-**احمد، محمد علي والنواوي، محمد عبد الرزاق.** (١٩٩٩). الفطريات الصناعية. الدار العربية للنشر والتوزيع.

2- **Ayyachamy, M.; Khelawan, k.; Pillay, D.; Permaul, K. and Singh, S. (2007).** Production of inulinase by *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* using onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) peels in solid state cultivation. Letters in Applied Microbiology 45: 439-444

3- **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.

4- **Champion, R.; Bwton, J.; Burns, D. and Breachanch, S. (1998).** Textbook of dermatology. 6 th ed. Blackwell science Ltd. P.1277-1376.
5- **Cho, Y.J. and Yun, J.W. (2002).** Purification and characterization of an endo inulinase from *Xanthomonas oryzae* No.5 Process Biochemistry. 37: 1325-1331.
6- **Cornish, B.A. and Powden, L.K. (1979).** Fundamental of enzyme kinectics, London, Butter worth.
7- **Darija, V.Z.K.; Santos, M.P.A. and Francisco, M. (2002).** Optimization of inulinase production by *kluyveromyces bulgaricus*. Food technel .Biotechnol. 40: 67-73.
8- **Domach, D.H.; Games, W. and Enderson A.T. (1980).** Compendium of soil fungi. Academic press, London; pp: 859.
9- **Gouda, M. K. (2002) .** Some properties of inulinase from *Aspergillus fumigatus*. Pakistan Journal of Biological Sciences 5: 589-593.
10- **Gugnani; H.C. (2003).**Ecology and Taxonomy of Pathogenic Aspergilli.Fornties in Bioscience, 8:346-357.
11- **Gupta, A.K.; Singh, D.P.; Kaur, N. and Singh, R. (1994).** Production, Purification and Immobilisation of inulinase from *Kluyveromyces fragilis*. J. of chem. Technol & Biotechnol. Vol.59, Iss.4, PP.377-385.
12- **Hoogde, G.S. and Guarra, J. (1995).** Atlas of clinical fungi. Center albureau roorshimmel- culture and universital Rovivai Virgili. Spain,720 p.
13- **Johnsson, L.F; Curl, E.A.; Bond, J.H. and Fribourg, H.A. (1959).** Methods for studying soil micro flora – plant diseases relationships, Burgess Pub. Co, Minn, U.S.A.
14- **Kango, N. (2008).** Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. J. of Food Engineering. 85: 473-478.
15- **Klich, M.A.(2002).** Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht. The Netherlands.
16- **Miller, G.I. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 3r. 426-428.
17- **Mustafa; A.F. (1982).**Taxonomic studies on the fungi of Kuwait, II *Aspergillus* .J. Univ. of Kuwait(Sci).9:245-260.
18- **Nakamura, T.; Kurokawa, T.; Nakatsu, S. and Ueda, S. (1978).** Crystallization and general properties of an extra cellular Inulinase from *Aspergillus* sp. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 52: 159-166.

19-Nandogobal, S. and Kumari, B.D.R. (2006). Enhancement of Inulinase production from chicory and Rhizosphere soil. American Eurasion J. Agric. & Environ. Sci.1 (3): 225-228.

20-Ongen-Baysal, G.; Sukan, S. and Vrassilev, N. (1994). Producti and properties of inulinase from *Aspergillus niger* .Biotech Lett. 16: 275-280.

21- Pessoni, R.A.B.; Figueiredo-Ribeiro R.L.C. and Braga, M.R. (1999). Extracellular inulinase from *Penicillium janczewskii*, a fungus isolated from the rhizosphere of *Vernonia herbacea* (*Asteraceae*). J. Appl. Microbiol. 87: 14l-147.

22- Singh, P. and Gill, P.K. (2006). Production of Inulinases: Recent Advances. Food Technol.Biotechnol.44 (2)151-162.

23- 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. M.icrobiol. Biotechnol. 17(5): 733-738.

24- 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.

25- Skowronek, M. and Fidurek, J. (2006). Purification and properties of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* 20 OSM. Food Technol. Biotechnol. 44(1): 53-58.

26- Souza - Motta, C.M.; Cavalcanti, M.A.Q.; Porto, A.L.F.; Moreira, K.A. and Filho, J.L.L. (2005). *Aspergillus niveus* Blochwiz 4128URM: New Source for Inulinase Production. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol.48, No.3:pp.343-350.

27- Souza - Motta, C.M.; Caralcanti, M.A.Q; Santi, M.J.; Lima, D.M.M; Nascimento, T.P. and laranjeira, D. (2003). Identification and characterization of filamentous fungi isolated from the sun flower (*Helianthus annus* L.) rhizosphere according to their capacity to hydrolysis inulin. Braz. J. Microbiol. Vol.34 no.3.

28- Vandamme, E. J. and Derycke, D. G. (1983). Microbial inulinases: fermentation process, properties and applications Adv. Appl. Microbiol. 29:139- 176.

29- Widden, P. (1985). Fungal communities in soils along on elevation gradient in northern England. Mycology. 79:298-309.

Basrah . J.Agric.Sci., 20 (2)2007

Isolation and screening of fungi which Produced Inulinase enzyme and determined the typical environmental conditions for produce enzyme from *Aspergillus niger*

Aum-El-Basher H. Al-mossawi* Ali A.Al-Ganimi• Najeh H.Al-Dawahery•¤

******Food Sci. Dep./Agriculture College/ Basra Univ. /Basra/Iraq.***
•Biology Dep./Science College/Karballa Univ./Karballa/Iraq.

SUMMARY

Sixty fugal isolates were isolated from different agricultural soils in sacred Karbala governorate and subjected to primary and secondary screening to test their abilities for inulinase production. The highest inulinase producer isolate was identified as *Aspergillus niger* . The environmental conditions for enzyme production from the selected isolate

were studied. The results showed that the best conditions included incubation by shaking incubator at 30 °C with 150 rpm for 96 hrs.

¤ **Part of Ph.D. Thesis**