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

تحديد الظروف المز رعية المثلى لإنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر *Aspergillus niger* المعزول محليا

أ. م. د. علي عبد الكاظم جاسم الغانمي- جامعة كربلاء- كلية العلوم
ا.د. أم البشر حميد جابر الموسوي- جامعة البصرة - كلية الزراعة
*[1]م.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 الانيولينيز من عزلة محلية للفطر *Aspergillus niger* وأوضحت النتائج إن أفضل هده الظروف تمثلت باستخدام وسط مكّون من المستخلص الخام لمسحوق الكراث بنسبة 1.5% ، المدعم بـ 0.1% كبريتات المغنيسيوم برقم هيدروجيني ابتدائي 4.2 وحجم لقاح 10^6 X1.5 بوغ /مللتر 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 الآصرة الموجودة بين هذه الوحدات إضافة إلى موقع جزيئة الكلوكوز(1).

تتواجد الفركتانات في النباتات وتميزت عائلة Liliaceae (مثل الكراث والبصل و الثوم و الهليون) وكذلك العائلة المركبة Compositae (مثل خرشوفة القدس **والداليا والهند باء** البرية) في كونهما العائلتين النباتيتين الأكثر خزناً للفركتانات(2). ويعد الانيولين احد انواع الفركتانات ويكون بشكل سلسلة خطية لعديد الفركتوز الذي ترتبط وحداته بأواصر كلايكوسيدية من نوع $\beta(2-1)$ ، ويمكن أن تتواجد جزيئة الكلوكوز في بداية السلسلة مرتبطه بآصرة كلايكوسيدية من نوع $\alpha(2-1)$ مع جزيئة الفركتوز المجاورة مكونة جزيئة سكروز، وقد يكون طول السلسلة الخطية في الانيولين 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 النشأ إنزيمياً وذلك بمساعدة إنزيمي الالفا اميليز ($\alpha-$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 مناسبا عن كروماتوغرافيا العمود إلى ان هده المادة يمكن ان تكون سامة (7).

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

ونظراً لما يمتلكه إنزيم الانيولينيز 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 ألمجهري وظروف إنتاج الانزيم

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) (10)مع بعض التحوير في تحديد الظروف المزرعية المثلى لانتاج الانيولينيز إذ تم تحضير الوسط بإذابة المكونات الآتية في لتر واحد من الماء المقطر(NH_4NO_3) (2.3) غم، [$(NH_4)_2HPO_4$] (3.7) غم، (KH_2PO_4) (1.0) غم، ($MgSO_4.7H_2O$) (0.5) 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 التنمية في الحاضنة الهزازة على درجة حرارة 30م بسرعة رج 150 دورة/دقيقة ولمدة 96 ساعة. وبعد انتهاء فترة الحضن رشحت نواتج التخمر واستخدم الراشح في تقدير الفعالية الإنزيمية والبروتين لاستخراج الفعالية النوعية للإنزيم والتي اعتمدت مؤشرا على قابلية العزلة لإنتاج إنزيم الانيولينيز.

تقديرألفعالية ألإنزيمية والبروتين

قدرت فعالية إنزيم الانيولينيز باستخدام مادتي تفاعل هما الانيولين والسكروز،تم تقدير الفعالية الإنزيمية للانيولينيز المنتج من الفطر *Aspergillus niger* ***22*** وذلك بتقدير كمية السكريات المختزلة بالطريقة المتبعة من قبل(Singh *et al*.,(2007a (11) مع بعض التحوير، ودلك بمزج 0.1 مللتر من المستخلص الأنزيمي مع 0.9 من محلول منظم خلات الصوديوم تركيز 0.1مولر ورقم هيدروجيني4.8 الحاوي على 1 % من مادة التفاعل(انيولين أو سكروز) 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) واعتمادا 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 كميـــة الإنزيم اللازمة لتحرير مايكرومول واحد من السكرياتالمختزلة(الفركتوز و الكلوكوز) من السكـــروز في الدقيقة الواحدة وتحت ظروف التقدير.

استخدمت طريقة Bradford (1976) (13) في تقدير البروتين باستخدام ألبومين المصل ألبقري (Bovine Serum Albumin, BSA) بروتينا قياسيا.واستخدمت الفعالية النوعية كمقياس لإنتاج الانزيم والمقارنة.

تحديد الظروف المزرعية المثلى لإنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر ***A.niger 22***

تمت دراســة عدد من العوامل المؤثرة في إنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطــر *A. niger22*، اشتملت هذه العوامل على:

1- تأثير المصدر الكربوني

ا- تأثير نوع المصدر الكربوني

اختبرت خمسة مصادر كربونية إضافة إلى المعاملة الخالية من المصدر الكربوني وذلك لتحديد أفضلها في إنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر *A. niger* ***22*** ،اشتملت هذه المصادر على سكري الانيولين والسكروز النقيين إضافة إلى مستخلصات الكراث والهندباء البرية والبصل. إذ أضيفت هذه المصادر إلى وسط الإنتاج بالإضافة إلى بقية مغذيات الوسط، وقد أضيف سكر الانيولين والسكروز 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 الانيولين الخام الذي اعتبر وسطاً لإذابة بقية مكونات الوسط الإنتاجي (14) .

ب- تحديد التركيز الأفضل من المصدر الكربوني

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

ج- تحديد زمن الاستخلاص الأفضل للانيولين الخام من الكراث

تم تحديد الزمن الأنسب لاستخلاص الانيولين الخام من الكراث لإعطاء كمية الانيولين التي تحقق أعلى إنتاج للإنزيم من الفطر، إذ تمـــت عمليـــة الاســـتخلاص باســـتخدام مـــدد زمنيـــة (5و 10و 15و30و45و60و75و90) دقيقة وبدرجة حرارة 75م.

2- تأثير نوع المصدر النيتروجيني

درست سبعة مصادر نيتروجينية إضافة إلى المعاملة الخالية من المصدر النيتروجيني لتحديد الأفضل منها لإنتاج إنزيم الانيولينيز 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 0.1و 0.2 و 0.4) % من كبريتات المغنيسيوم $MgSO_4.7H_2O$ لتحديد التركيز الأفضل منها لإنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر*A. niger 22* (حيث استخدم تركيز 0.1% من كبريتات المغنيسيوم في الوسط الإنتاجي المقترح من قبل Ongen-Baysal *et al.*(1994) (10))

4- تأثير الرقم الهيدروجيني (pH) الابتدائي لوسط الإنتاج

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

5- تأثير حجم اللقاح

لقح وسط انتاج الانزيم بحجوم لقاح مقدارها(0.5و 1و 2و3و4) قرص من الأقراص الفطرية المستحصل عليها بوساطة الثاقب الفليني والتي تحوي عدد ابواغ
(7.5×10^5 و 1.5×10^6 و3×10^6 و 4.5×10^6 و6×10^6) بوغ/مللتر من الوسط، على التوالي.

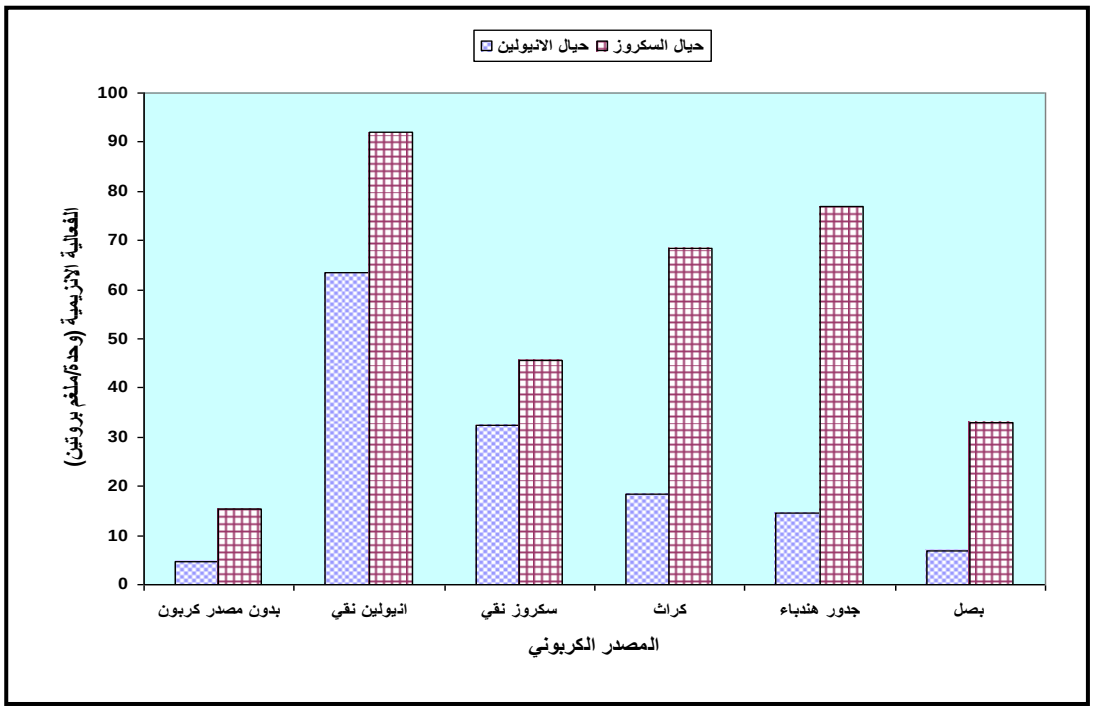
النتائج والمناقشة

تحديد الظروف المزرعية المثلى لإنتاج إنزيم الانيولينيز 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 الانيولينيز،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 الانيولين النقي والتي بلغت (63.57و 91.96) وحدة/ملغم بروتين باستخدام الانيولين والسكروز كمادتي تفاعل ،على التوالي.



الشكل (1): تأثير نوع المصدر الكربوني في إنتاج إنزيم الانيولينيز 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 الانيولينيز باستخدام مستخلص الكراث في إنتاج الإنزيم حوالي 10 مرات بقدر فعالية الإنزيم باستخدام الانيولين 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 الانيولينيز المنتج من الفطر*A. niger 22* باستخدام مصادر كربون مختلفة

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

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

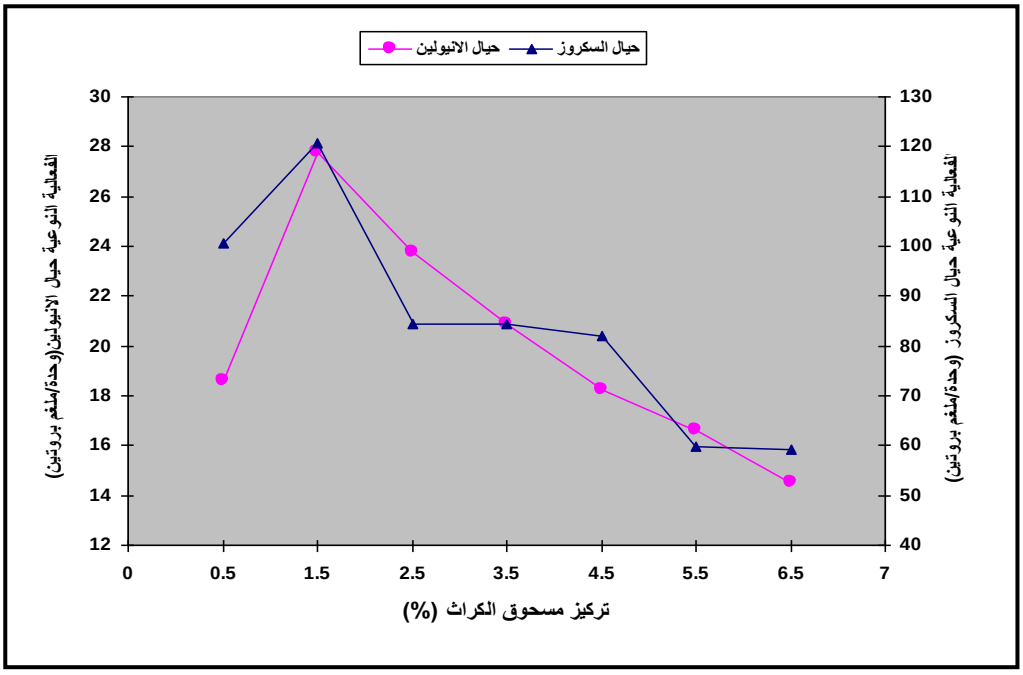
يحتوي الكراث على 7.3% كاربوهيدرات منها 0.5% سكروز، كما يحتوي على 0.3% بروتين و 0.2% دهن و 1.5% ألياف و 1.2% رماد، فضلاً عن مجموعة فيتامينات A و C و B1 و B2 بكميات (0.03 ، 0.2 ، 0.06و 0.014) ملغم /100 غرام ،على التوالي(16). يشكل سكر الانيولين (3- 10)% من مجموع الوزن الجاف للمواد الصلبة الكلية في الكراث(17).

وقد تناولت دراسات عديدة إنتاج إنزيم الانيولينيز من الأحياء المجهرية باستخدام مصادر كربون نقية وأخرى طبيعية حيث تم مقارنة إنتاج الإنزيم من الفطر *A. tamarii* باستخدام سبعة مصادر كربون نقية وأخرى طبيعية، اشتملت النقية منها على الكلوكوز والفركتوز والمالتوز و السكروز والرافينوز والنشأ والانيولين في حين اشتملت الطبيعية على درنات خرشوفة القدس وأبصال الداليا و جذور الهندباء وأبصال البنجر وقشور البرتقال و مولاس قصب السكر و مولاس البنجر، وأوضحت نتائج الدراسة تفوق مصادر الكربون الطبيعية في إنتاج الإنزيم بفعالية إنزيمية (26.5و 25.8) وحدة/مللتر باستخدام أبصال الداليا وجذور الهندباء، على التوالي. في حين بلغت الفعالية الإنزيمية 23.63 وحدة/مللتر باستخدام الانيولين 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، حيال الانيولين 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 % انيولين هو الأمثل لإنتاج الإنزيم من الخميرة *Kluyveromyces marxianus* YS-1 إذ بلغت فعالية الإنزيم المنتج 5.1 وحدة/مللتر(14).وعلّل انخفاض إنتاج الإنزيم باستخدام التراكيز العالية من المصدر الكربوني إلى ان تلك التراكيز تؤدي الى كبح هدمي يتسبب في خفض فعالية الإنزيم(18).



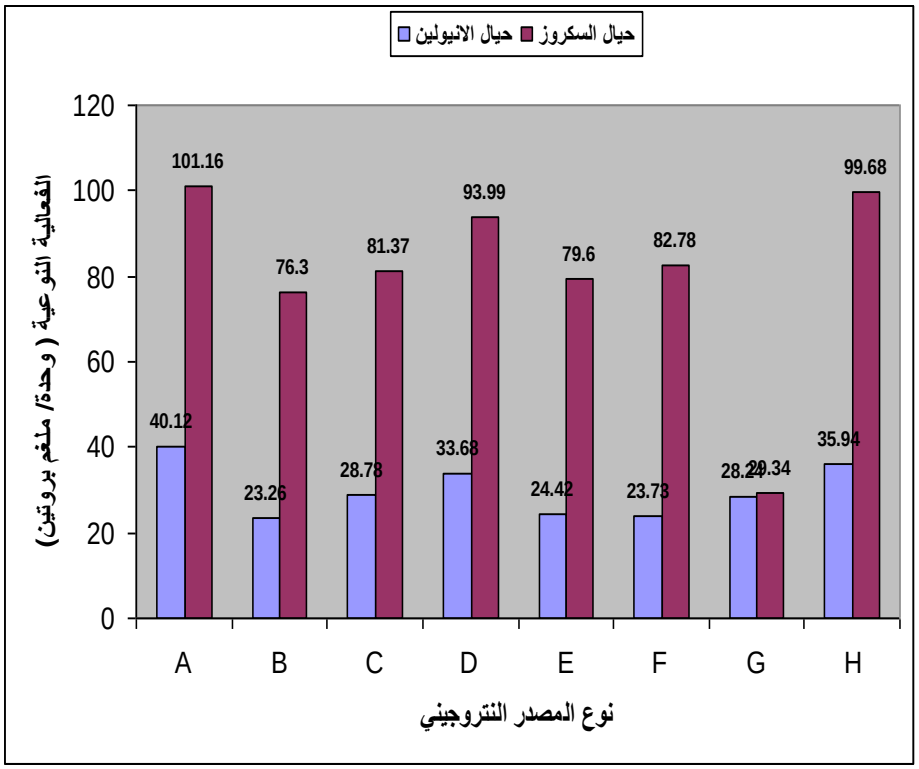
الشكل(2): تأثير تركيز مسحوق الكراث في إنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر *A. niger 22*

2: تأثير المصدر النيتروجيني

تم اختيار عدد من المصادر النيتروجينية منها عضوية وأخرى غير عضوية لدراسة تأثيرها في إنتاج إنزيم الانيولينيز 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 (40.12و 101.16) وحدة/ملغم بروتين حيال الانيولين والسكروز 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، بان الوسط الطبيعي (الكراث) المستخدم في إنتاج الإنزيم قيد الدراسة يحوي مصادر نيتروجينية بدرجة كافية لتلبية متطلبات الفطر وإنتاج الإنزيم، إذ يحتوي الكراث على0.3 % بروتين في تركيبه(15).

إن نتائج تثبيط إنتاج الانيولينيز من الفطر *A. niger 22* بوجود مركبات الامونيوم تتفق مع الدراسة التي وجدت أن جميع المركبات الحاوية على نيتروجين مع الامونيا في تركيبها لها تأثيرا مثبطاً في إنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر *Fusarium oxysporium*، وبينت نتائج هذه الدراسة إن أفضل مصدر نيتروجيني لإنتاج الإنزيم هو استخدام نترات الصوديوم(19). وتم التاكيد 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 النيتروجيني في إنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر*A. niger 22*

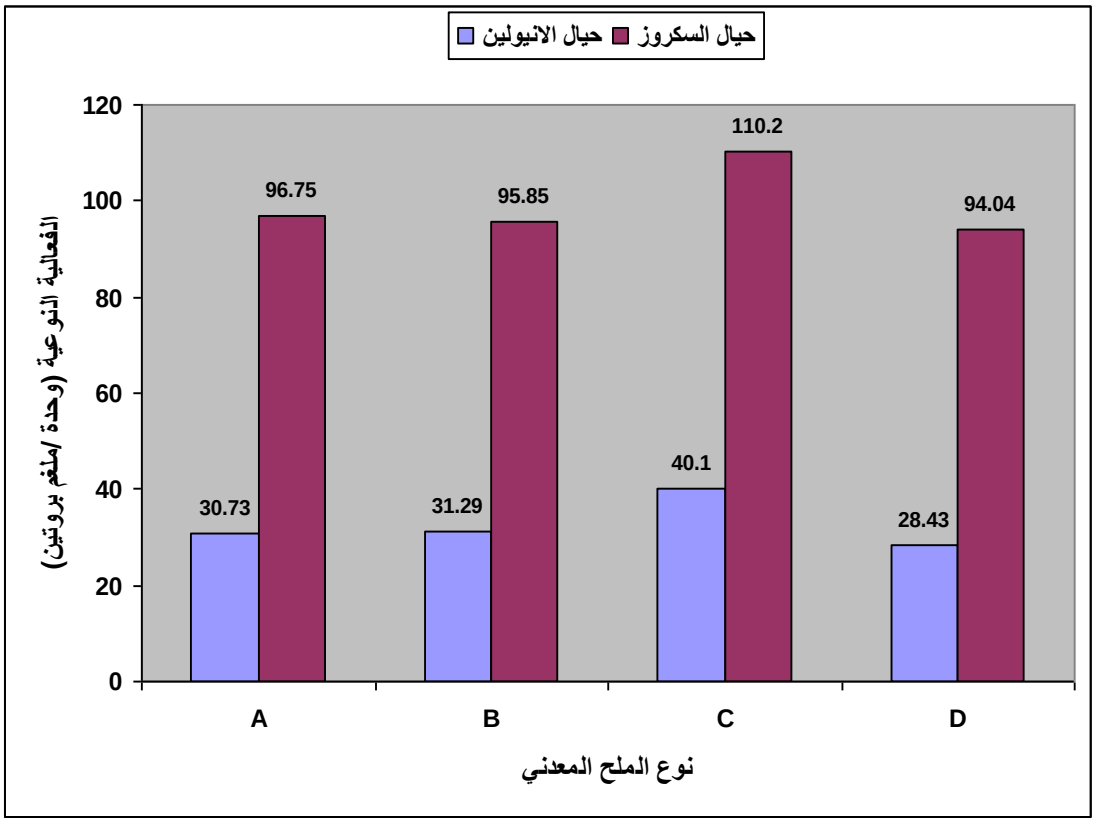
A: المعاملة الخالية من المصدر النيتروجيني
B: خليط نترات الامونيوم بتركيز 0.23% وخلاصة الخميرة بتركيز 0.15% وفوسفات الامونيوم0.37%
C: خليط خلاصة الخميرة وفوسفات الامونيوم D: خليط نترات الامونيوم وفوسفات الامونيوم
E: خليط نترات الامونيوم وخلاصة الخميرة F: كبريتات الامونيوم بتركيز 0.23%.
G: اليوريا بتركيز 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 (40.1و 110.02) وحدة/ملغم بروتين باستخدام الانيولين والسكروز كمادتي تفاعل، على التوالي.

ولغرض تحديد التركيز الأمثل من كبريتات المغنيسيوم تمت دراسة أربعة تراكيز منها هي(0.05، 0.1، 0.2و 0.4)%، وأوضحت النتائج ان تركيز 0.1% هو الأفضل لإنتاج الإنزيم من الفطر*A. niger 22*، إذ بلغت الفعالية النوعية (48.77و 120.77) وحدة/ملغم بروتين للإنزيم حيال الانيولين والسكروز كمادتي تفاعل، على التوالي (الشكل 5).

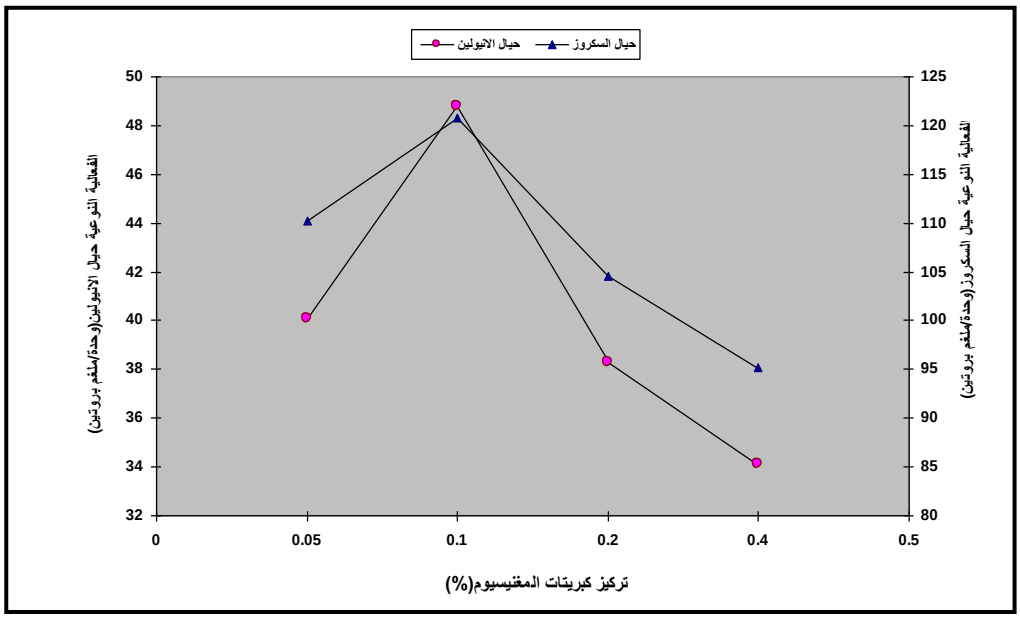
وفي ضوء النتائج أعلاه فقد تم استخدام كبريتات المغنيسيوم بتركيز 0.1% بإضافتها إلى وسط الإنتاج في المراحل اللاحقة من الدراسة .



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

A: المعاملة الخالية من الملح المعدني
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) %

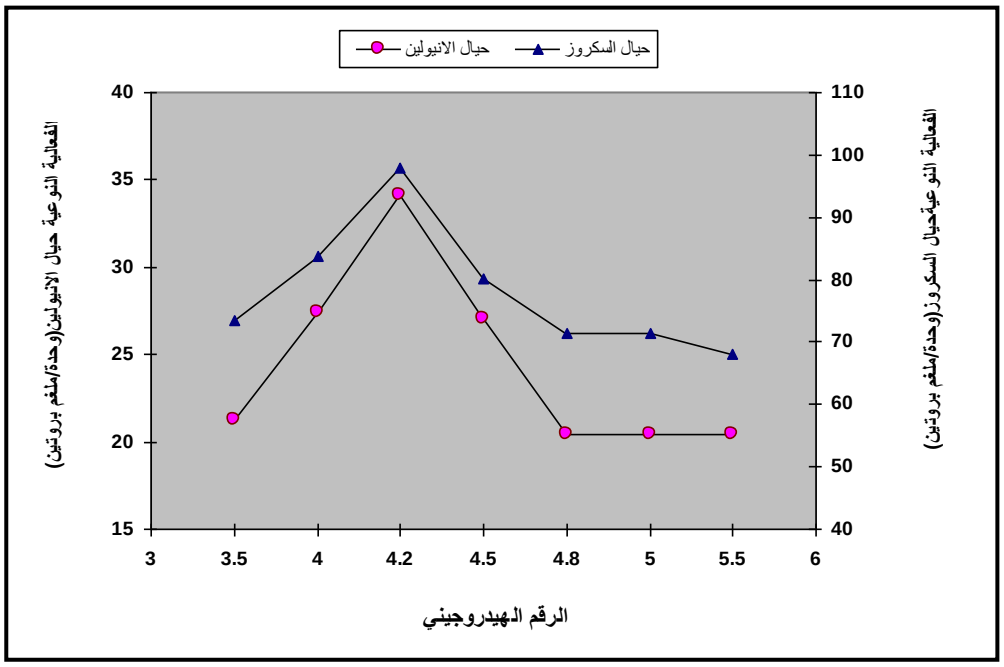
في دراسة لإنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر*A. niger* 22 تبيّن ان إضافة أملاح كبريتات المغنيسيوم($MgSO_4.7H_2O$) بتركيز 0.025%وفوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين (K_2HPO_4) بتركيز 0.5% إلى وسط الإنتاج تؤدي إلى الحصول علىأفضل إنتاج للإنزيم، وان الزيادة القليلة عن هذه التراكيز لن يكون لها تأثير حاثاً للإنتاج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



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

4: تأثير الرقم الهيدروجيني (pH) الابتدائي

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



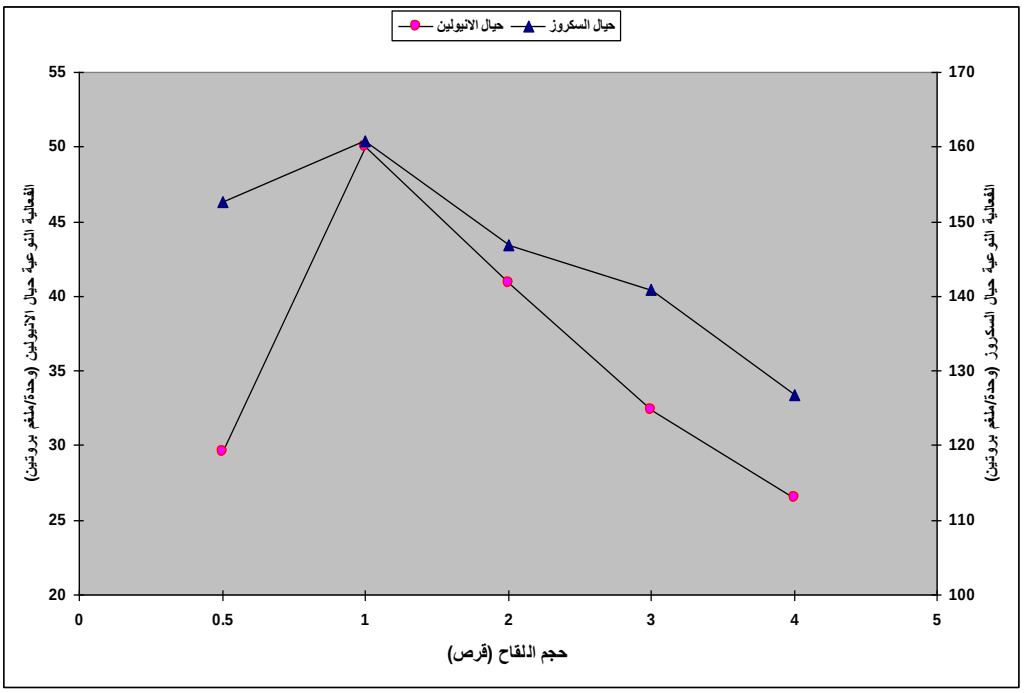
الشكل (6): تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر*A.niger*22

يختلف الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل لإنتاج الإنزيم باختلاف الكائن المجهري المستخدم في الإنتاج إذ أن الرقم الهيدروجيني الابتدائي 5 هو الأمثل لإنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر *Aspergillus niger* (22). وتحققت فعالية لإنزيم الانيولينيز مقدارها
(3.81و 0.45) وحدة/مللتر حيال الانيولين والسكروز، على التوالي باستخدام رقم هيدروجيني 6 في دراسة لإنتاج الإنزيم من الفطر *A. fumigatus* (20). في حين كان الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل 5.6 لإنتاج الإنزيم من الفطر *Penicillium rugulosum* (23) .

5: تأثير حجم اللقاح

استعملت حجوم لقاح مختلفة لإنتاج إنزيم الانيولينيز من الفطر *A. niger* 22 ويظهر الشكل (7) ان استخدام حجم لقاح مقداره 1.5×10^6 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 الانيولين والسكروز 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 تزاحم بسبب تنافسها على العناصر الغذائية المتوفرة بصورة محدودة(24).

تباينت حجوم اللقاح المستخدمة في إنتاج إنزيم الانيولينيز 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 الانيولينيز 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. I'n 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).** Fruttosio .in: Encyclopedia Della Chimica. ISEDl, 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 Agriculture79:549-554.
7. **Fleming, S. E. and GrootWassink, W. D. (1979).** Preparation of high fructose syrup from the tuber so f the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). C RC 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، الظويهري، ناجح هاشم (2011) عزل وغربلة الفطريات المنتجة لأنزيم الأنيولينيز وتحديد الظروف البيئية المثلى لأنتاج 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. M.icrobiol. 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 lorio, G. (2007).** The State of the Art in the Production of Fruclose from Inuliun Enzymatic Hydrolysis , Critical Reviews in Biotechnology , 27:129-145.
17. **Saber, W.I.A. and El- Naggar, (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 fro 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.Biotecnol.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.