مجلة البصرة للعلوم الزراعية، المجلد 27 (1)،116-127 ، 2014

عزل وتشخيص عفن *Aspergillus niger* وتقدير انتاجيته لحامض الكلوكونيك

رائد سعيد خضير و آمال كاظم غضبان

قسم علوم الاغذية، كلية التربية للعلوم الصرفة، كلية الزراعة، جامعة ذي قار، العراق

المستخلص: عزلت 23 عزلة محلية من مصادر مختلفة (الذرة الصفراء والرز وفستق الحقل والدخن والخبز والتربة والعنجاص والخوخ والموز والتفاح والليمون والرمان والبرتقال) ، وقد اجريت لها عمليات التنقية والتشخيص وتبين انها تضم ثمانية عزلات لعفن *Aspergillus niger* وعزلة واحدة *Fusarium sachari* وثمانية عزلات *Aspergillus flavus* وعزلة واحدة *Aspergillus fumigatus* وعزلة واحدة *Alternaria alternata* وعزلة واحدة *Rhizopus sp* وعزلة واحدة *Mucor sp* وعزلتين *Aspergillus terreus* . بعدها اختبرت قابلية العزلات على انتاج ذيفان الافلاتوكسين اذ استبعدت العزلات المنتجة للافلاتوكسين وهي عزلات العفن *Aspergillus flavus* و *Aspergillus terreus* و *Aspergillus fumigatus* ، وتبين ان العزلات غير السمية هي 12 عزلة ثم اجريت عملية الغربلة لأنتقاء العزلة الأكفأ انتاجاً لحامض الكلوكونيك ، ولوحظ ان العزلة An3 لعفن *Aspergillus niger* المعزولة من الخوخ اذ بلغت كمية انتاج الحامض 38.38 غم/لتر . اذ استعملت تخمرات المزارع المغمورة submereged cultures باستعمال تقنية الدوارق المهزوزة .

الكلمات الدالة: submerged fermentation , *Aspergillus niger* , gluconic acid.

المقدمة

إن حامض الكلوكونيك Gluconic acid والذي يمكن تسميته بنتا هيدروكسي حامض الكابرويك Pentahydroxycaproic acid ينتج من أكسدة سكر الكلوكوز خلال تحفيز تفاعل نزع ذرة هيدروجين بوساطة أنزيم الكلوكوز أوكسيديز Gox (11). يمتاز حامض الكلوكونيك بانه حامض عضوي متعدد الوظائف وله مشتقات عديدة أهمها كلوكونات الصوديوم وكلوكونات الكالسيوم وهو متاح في السوق العالمي كمحلول مائي 50% . اكتشف حامض الكلوكونيك سنة 1870 م ويقدر الانتاج العالمي 50000 – 60000 طن سنوياً (4) .بسبب الخصائص الكيميائية والفيزيائية لحامض الكلوكونيك واملاحه وتطبيقاتهما الواسعة يستعمل في توليفة متنوعة من الصناعات الغذائية مثل صناعة الشرابت والعصائر المثلجة كما يعمل على ازالة المرارة من المواد الغذائيةو الصيدلانية بسبب امتلاكه لمركب اللاكتون الذي يعطيه الفعل المطهر أو المعقم والطبية والنسيجية والجلدية والمنظفات والاعلاف والصناعات الاخرى (15،16).ينتج حامض الكلوكونيك من قبل الاحياء المجهرية : البكتريا والخمائر والاعفان الا ان انتاجه من قبل الاعفان حظي باهتمام العديد من الباحثين وخاصة عفن *Aspergillus niger* وذلك لكونه واسع الانتشار ويستطيع النمو على انواع عديدة من المواد الخاضعة فضلاً عن المتطلبات التغذوية البسيطة للاعفان وامكانية استعمال مواد رخيصة الثمن ومتوفرة على مدار السنة مما يقلل كلف الانتاج ويجعله اقتصادياً كما ينتج جميع الانزيمات المطلوبة لتحويل الكلوكوز الى حامض الكلوكونيك

(10). هدفت الدراسة الحالية الى عزل وتشخيص العديد من الأعفان من مصادرها الطبيعية واستبعاد الأنواع المنتجة للذيفانات (السموم) الفطرية واختبار قابلية العزلات غير السمية على إنتاج حامض الكلوكونيك.

المواد وطرائق العمل

مصادر العزلات الفطرية

استعملت المصادر الطبيعية المختلفة التالية لعزل الفطريات: ذرة صفراء، رز، فستق الحقل، دخن، خبز، تربة، عنجاص، خوخ، موز، تفاح، ليمون، رمان، برتقال. جمعت التربة في مدينة البصرة اذ وضعت في اكياس بولي اثيلين ونقلت للمختبر لعزل الفطريات منها اما بقية المصادر فقد تم الحصول عليها من السوق المحلية لمدينة البصرة وتم نقلها الى المختبر باكياس من البولي اثيلين كلاً على حده وتركت مدة معينة لاتاحة الفرصة لنمو الاعفان عليها.

عزل الفطريات Isolation of fungi العزل من التربة وفستق الحقل والدخن

استعملت التخافيف العشرية (Decimal dilution) باتباع طريقة (3)، ثم زرع 0.1 مل من كل تخفيف واستعملت طريقة النشر Spreading method اذ استعمل الوسط الزرعي PDA مع وضع طبق للمقارنة Control من دون تلقيح . حضنت الاطباق بعد تصلبها عند درجة حرارة 30 م لمدة 5 أيام .

العزل من الحبوب والخبز والفواكه

عزلت الفطريات باخذ عينة من المادة الغذائية النامي عليها الفطر بوساطة ملقط معقم ووضعت على وسط PDA الذي صب مسبقا في اطباق بتري معقمة ، بعدها حضنت الاطباق عند درجة حرارة 30 م لمدة 5 أيام.

تنقية العزلات الفطرية

نقلت الأعفان النامية بوساطة الابرة Needle الى أطباق بتري معقمة أخرى حاوية على الوسط مستخلص دكستروز البطاطا PDA (كل مستعمرة في طبق) وحضنت عند الظروف الزرعية نفسها وكررت العملية لحين الحصول على عزلات نقية من العفن وحفظت المستعمرات النقية على أوساط زرعية مائلة slant عند درجة حرارة 4 °م.

تشخيص العزلات الفطرية

شخصت العزلات على مستوى الجنس والنوع وفقاً للمفاتيح التصنيفية المذكورة في (6،7،9) وبالاستعانة بذوي الاختصاص . فحصت العزلات الفطرية لدراسة شكل المستعمرات وحضرت شرائح زجاجية باستعمال محلول اللاكتوفينول المحتوي على صبغة ازرق القطن لغرض الفحص المجهري.

الكشف عن سموم الافلاتوكسين

اعتمدت طريقة بخار الامونيا ammonia vapor استناداً الى (12) لاختبار قابلية العزلات الفطرية التي تم عزلها من المصادر المختلفة في انتاج الافلاتوكسين وباستعمال وسط مستخلص جوز الهند coconut extract agar (CEA).

غربلة العزلات الفطرية لانتاج حامض الكلوكونيك

اعتمد الوسط الغذائي الذي ذكره Singh *et al.* (2003) والمبينة مكوناته ادناه :

جدول (1): تركيب الوسط الزرعي الذي اعتمد في انتاج حامض الكلوكونيك.

المادة	الكمية غم/لتر
كلوكوز glucose	120
فوسفات الامونيوم احادية الهيدروجين $(NH4)_2HPO_4$	1
فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4	0.5
كبريتات المغنيسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$	0.15
كاربونات الكالسيوم $CaCO_3$	40
ماء مقطر Dist. Water	1000 مل

لاختبار قابلية العزلات الفطرية النقية (التي اختيرت لعدم قدرتها على انتاج سموم الافلاتوكسين) على انتاج حامض الكلوكونيك . اتبع نظام الدفعة Batch للمزارع المغمورة Submerged cultures باستعمال الحاضنة الهزازة Shaking incubator المجهزة من شركة sartorius، ضبطت الدالة الحامضية الى 6.6 ± 0.1 وبعد تبريد الدوارق لقحت جميعها بمقدار 5 مل من اللقاح السبوري وبواقع (10^{10} – 10^{12}) سبور/مل وتحت ظروف التعقيم ، حضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة التي ضبطت سرعة الاهتزاز فيها الى 150 دورة/دقيقة عند 30 م لمدة 8 أيام

تهيئة الانموذج لتقدير الحامض المنتج

بعد انتهاء مدة التخمر المحددة اعلاه تم فصل الكتلة الحيوية النامية باستعمال منظومة ترشيح استعمل فيها ورق الترشيح Whatman No.1 وتحت التفريغ ثم اجريت الاختبارات التالية :

تقدير الحموضة الكلية

قدرت الحموضة الكلية بطريقة التسحيح كما ذكر (8،5) واحتسابها كحامض كلوكونيك ، إذ اخذ 5 مل من الراشح في دورق صغير سعة 50 مل واضيف اليه قطرات من دليل الفينونفثالين 1% وسحح ضد القاعدة NaOH 0.1 عياري حتى تغير اللون الى اللون الوردي الفاتح.

قياس الدالة الحامضية النهائية

استعمل جهاز قياس الدالة الحامضية من النوع الرقمي Digital pH - meter المجهز من شركة sartorius .

تقدير وزن الكتلة الحيوية الجاف

قدر الوزن الجاف للكتلة الحيوية حسب الطريقة التي اوردها (14) ، فبعد ترشيح الوسط المتخمر على اوراق ترشيح نوع (Whatman N0.1) تم غسل الكتلة الحيوية بالماء المقطر ثم جففت على 75 م باستعمال فرن oven المجهز من شركة termaks لحين ثبوت وزنها اذ وزنت بميزان حساس المجهز من شركة denver .

تقدير وتشخيص حامض الكلوكونيك بوساطة تقنية الكروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة (HPLC)

استعملت تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC في تشخيص حامض الكلوكونيك المنتج من قبل العزلات المنتخبة وقد اجري التقدير النوعي

والكمي للحامض حسب الطريقة التي اوردها (14) : استعمل جهاز الكروماتوغرافي السائل عالي الكفاءة المجهز من شركة SHIMADZU اليابانية والتابع للشركة العامة للزيوت النباتية/وزارة الصناعة والمعادن/بغداد لتقدير نوع وتركيز حامض الكلوكونيك وذلك

باستعمال عمود الطور المعكوس ODS_2 C_{18} ذو الابعاد 4.6×250 ملم ، وكان حجم الأنموذج المحقون 10 مايكرولتر وعلى طول موجي 210 نانومتر.

اجري الفصل باستعمال الطور المتحرك المتكون من خليط من Acetonitrile:H_2O (3:7) (حجم:حجم) وتم اجراء الفصل عند درجة حرارة الغرفة وبسرعة جريان 0.8 مل/دقيقة.

النتائج والمناقشة

العزل

تعد عملية العزل لانتخاب الكائن المجهري في دراسة كهذه ومثيلاتها المرتكز الاساس والخطوة الاولى المهمة في عملية الانتاج والتي تتفرع منها وعلى ضوءها المحاور الاخرى للدراسة . لعزل عفن منتج لحامض الكلوكونيك كان لا بد من البحث عنه في المصادر الطبيعية اذ امكن الحصول في هذه الدراسة على 23 عزلة نقية من الاعفان تعود الى 5 اجناس وذلك من خلال اعتماد الحبوب والفواكة كمصادر عزل رئيسية فضلاً عن استعمال التربة والتي تمثل المخزن المتنوع الطبيعي للأحياء المجهرية .

جدول (2): مصادر العلات المحلية للاعفان التي تم اعتمادها.

المصدر	عدد العزلات
ذرة صفراء	3
رز	1
فستق الحقل	2
دخن	1
تربة	3
خبز	1
عنجاص	3
خوخ	2
موز	2
تفاح	1
ليمون	1
رمان	1
برتقال	2
المجموع	**23**

تشخيص العزلات الفطرية

يوضح الجدول (3) العزلات المشخصة حسب المراجع المعتمدة وهذا يعني ان عدد اجناس الاعفان التي تم عزلها كان 5 وكان جنس *Aspergillus* هو السائد بانواعه *A.niger* و *A.flavus* و *A.terreus* و *A.fumigatus* وهذا يتفق مع ما توصلت اليه (1) عند عزلها لاعفان خيطية محلية لغرض انتخاب افضلها في انتاج

انزيم الكلوكواميليز ، اذ تم الحصول على 8 عزلات من عفن *Aspergillus niger* ويوضح الشكل (1) مظهر العزلة المحلية لعفن *A.niger* التي مصدرها ثمرة الخوخ وعزلة واحدة من عفن *Fusarium sachari* و8 عزلات من عفن *Aspegillus flavus* وعزلة واحدة من عفن *Aspergillus fumigatus* وعزلة واحدة من عفن *Alternaria alternata* وعزلة واحدة من عفن *Rhizopus sp* وعزلة واحدة من عفن *Mucor sp* وعزلتان من عفن *Aspergillus terreus* .

اختبار العزلات الفطرية لانتاج سموم الافلاتوكسين

أظهرت نتائج الاختبار ان جميع عزلات الفطر *Aspergillus flavus* و *Aspergillus terreus* و *Aspergillus fumigatus* كانت موجبة لافراز الافلاتوكسين على وسط جوز الهند اذ تغير لون الوسط من الابيض الى الوردي بعد

جدول (3) اعداد عزلات الاعفان المشخصة بالنسبة الى مصادرها.

المصادر	العزلات الفطرية								المجموع
	Aspergillus niger	*Fusarium sachari*	*Aspergillus flavus*	*Aspergillus fumigatus*	*Alternaria alternata*	*Rhizopus sp*	*Mucor sp*	*Aspergillus terreus*	
ذرة صفراء	1	1	1	-	-	-	-	-	3
رز	-	-	1	-	-	-	-	-	1
فستق الخقل	-	-	1	1	-	-	-	-	2
دخن	-	-	-	-	-	-	-	1	1
تربة	1	-	-	-	-	-	1	1	3
خبز	-	-	1	-	-	-	-	-	1
عنجاص	1	-	1	-	1	-	-	-	3
خوخ	1	-	1	-	-	-	-	-	2
موز	-	-	1	-	-	1	-	-	2
تفاح	1	-	-	-	-	-	-	-	1
ليمون	1	-	-	-	-	-	-	-	1
رمان	1	-	-	-	-	-	-	-	1
برتقال	1	-	1	-	-	-	-	-	2
المجموع	8	1	8	1	1	1	1	2	23

شكل (1): العزلة المحلية An3 لعفن *Aspergillus niger* التي مصدرها ثمرة الخوخ.

مرور 1 ساعة من الحضن وكذلك بعد مرور 24 ساعة من الحضن مع بخار الامونيا عند درجة حرارة 30 م . وتعد هذه النتيجة كشفاً تأكيدياً لقابلية الفطريات على انتاج سموم الافلاتوكسين. اما العزلات الاخرى فقد اعطت نتائجاً سلبية وهي *Aspergillus niger* و *Fusarium sachari* و *Alternaria alternata* و *Rhizopus sp* و *Mucor sp* وقد توافقت النتائج مع (2،1،12).

غربلة العزلات الفطرية لانتاج حامض الكلوكونيك

للغربلة دوراً فاعلاً في تحديد وانتقاء العزلة الأكفأ في تحقيق الهدف المطلوب وهو انتاج حامض الكلوكونيك اذ اختيرت 12 عزلة فطرية غير منتجة لسموم الافلاتوكسين والمعزولة من مصادر مختلفة حول قابليتها لانتاج حامض الكلوكونيك ، ويوضح الجدول (4) رمز العزلة واسم العزلة الفطرية المشخصة ومصدر العزل.

أ.عفن *Aspergillus fumigatus* قبل الاختبار

ب.عفن *Aspergillus fumigatus* بعد الاختبار

شكل (2): اختبار بخار الامونيا للكشف عن قابلية العزلات الفطرية على انتاج ذيفان الافلاتوكسين.

اجريت الغربلة على العزلات الاثنى عشر كعزلات منتجة للحامض باستعمال تخمرات المزارع المغمورة Submerged culture . اما الجدول (5) فيوضح العزلات الفطرية والدالة الحامضية النهائية للوسط وكمية الكتلة الحيوية المنتجة الحموضة الكلية% مقدرة كحامض كلوكونيك وكمية الحامض المنتج والمقدرة بوساطة جهاز HPLC ويلاحظ من النتائج المبينة في الجدول (5) ان هناك تفاوتاً بين العزلات الفطرية في انتاج حامض الكلوكونيك وهذا يعزى الى اختلاف اجناس العزلات الفطرية وكذلك وجود تباين وراثي بين الانواع المختلفة للجنس نفسه اضافة الى تباين مصادر العزلات وكانت العزلة *Aspergillus niger* المعزولة من الخوخ والتي سميت An3 هي افضل العزلات الفطرية اذ بلغت كمية الحامض المنتجة 38.38 غم/لتر لذا تم اختيارها واعتمادها في الخطوات اللاحقة للدراسة وهذا يتفق مع ما ذكره (13) اذ قاموا بعزل 41 عزلة فطرية من مصادر مختلفة من ضمنها 15 عزلة فطرية معزولة من التربة المصرية ومخلفات قصب السكر وعند اختبارها لانتاج حامض الكلوكونيك باستعمال وسط الزابك دوكس السائل المحور لاحظ الباحثون ان العزلات الفطرية قد اظهرت تفاوتاً كبيراً فيما بينها في الكفاءة التخمرية وانتاج حامض الكلوكونيك وكانت عزلة العفن *Aspergillus niger* الاكثر كفاءة تخمرية وانتاجية عالية من حامض الكلوكونيك بلغت 58.46 غم/لتر وان هناك علاقة طردية بين كمية الحامض المنتج وكمية الكتلة الحيوية المنتجة فكلما زادت كمية الحامض المنتج زادت كمية الكتلة الحيوية المنتجة وان افضل معدل للدالة الحامضية الابتدائية لانتاج حامض الكلوكونيك يتراوح من 5-7.

تشخيص حامض الكلوكونيك بتقنية HPLC :

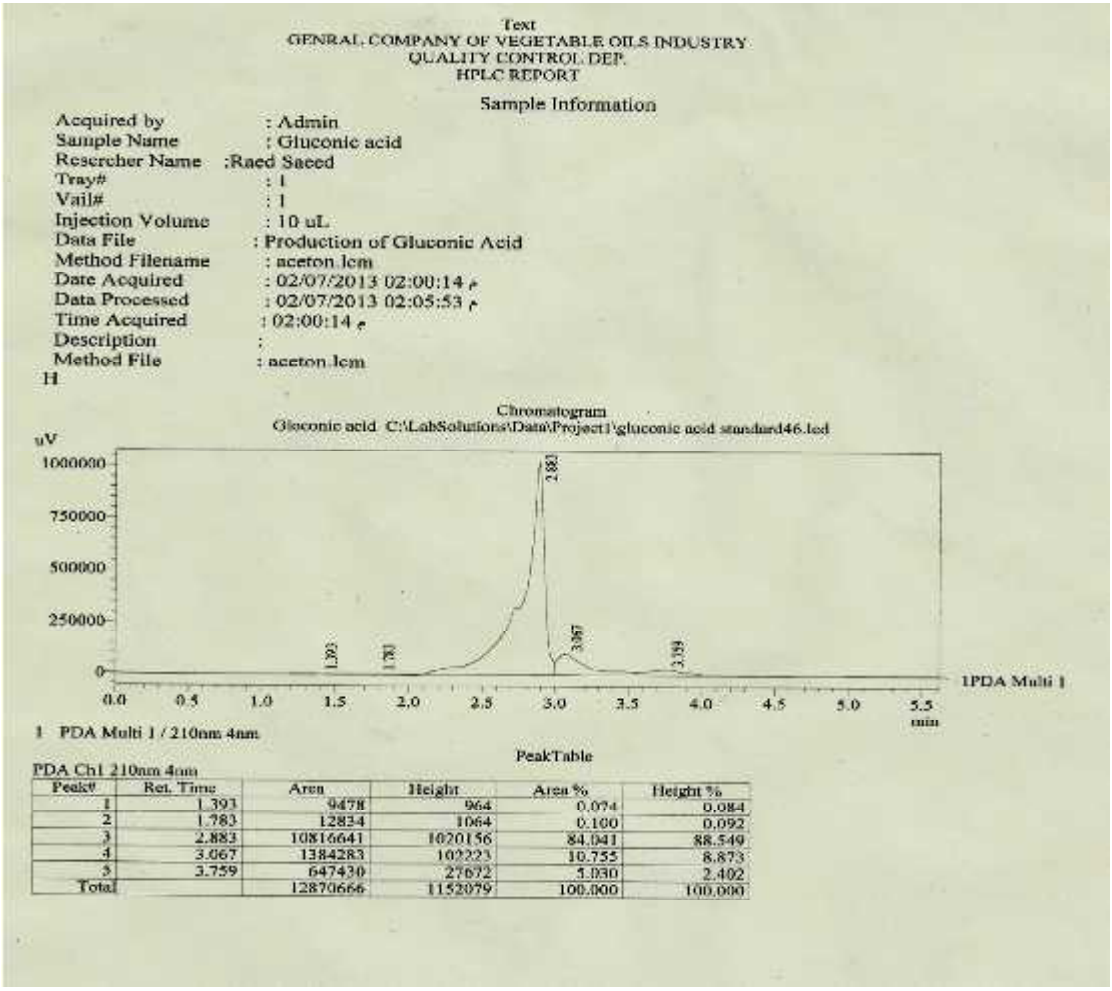
جرى التشخيص لوصفي لحامض الكلوكونيك المنتج من العزلة المحلية An3 باستعمال جهاز HPLC فقد احتوى وسط التخمر على العديد من المركبات والتي لوحظ لدى مقارنة وقت ظهورها مع وقت الظهور لحامض الكلوكونيك القياسي شكل (3) ظهور احدى القمم بوقت 2.883 وهو مقارب جداً لوقت ظهور حامض الكلوكونيك القياسي والبالغ 2.798 شكل (4).

جدول (4): رمز واسم العزلات الفطرية المشخصة ومصدر العزل.

رمز العزلة	اسم العزلة	مصدر العزلة
An1	*Aspergillus niger*	ذرة صفراء
Fs	*Fusarium sachari*	ذرة صفراء
An2	*Aspergillus niger*	عنجاص
Aa	*Alternaria alternate*	عنجاص
An3	*Aspergillus niger*	خوخ
R	*Rhizopus sp*	موز
M	*Mucor sp*	تربة
An4	*Aspergillus niger*	تربة
An5	*Aspergillus niger*	تفاح
An6	*Aspergillus niger*	رمان
An7	*Aspergillus niger*	ليمون
An8	*Aspergillus niger*	برتقال

جدول (5): الدالة الحامضية النهائية والحموضة الكلية% مقدرة كحامض كلوكونيك وكمية حامض الكلوكونيك المنتج والكتلة الحيوية للعزلات الفطرية المحلية.

العزلة الفطرية	الدالة الحامضية النهائية	الكتلة الحيوية غم/لتر	الحموضة الكلية% مقدرة كحامض كلوكونيك	الحامض المنتج غم/لتر
An1	5.7	20.5	0.43	31.08
Fs	5.6	40.3	0.39	19.51
An2	5.9	22.1	0.39	11.36
Aa	6.4	50.9	0.11	0
An3	6.2	19.7	0.15	38.38
R	6.4	10.5	0.19	0
M	6.4	44.3	0.19	14.09
An4	5.7	27	0.31	4.96
An5	5.8	21.9	0.27	0
An6	5.9	36	0.39	0
An7	5.5	23.4	0.39	0
An8	5.7	20	0.39	0



Text
GENRAL COMPANY OF VEGETABLE OILS INDUSTRY
QUALITY CONTROL DEP.
HPLC REPORT

Sample Information

Acquired by	: Admin
Sample Name	: Gluconic acid
Researcher Name	:Raed Saeed
Tray#	: 1
Vail#	: 1
Injection Volume	: 10 uL
Data File	: Production of Gluconic Acid
Method Filename	: aceton.lcm
Date Acquired	: 02/07/2013 02:00:14 م
Data Processed	: 02/07/2013 02:05:53 م
Time Acquired	: 02:00:14 م
Description	:
Method File	: aceton.lcm

H

Chromatogram
Gluconic acid C:\LabSolutions\Data\Project1\gluconic acid standard46.lcd

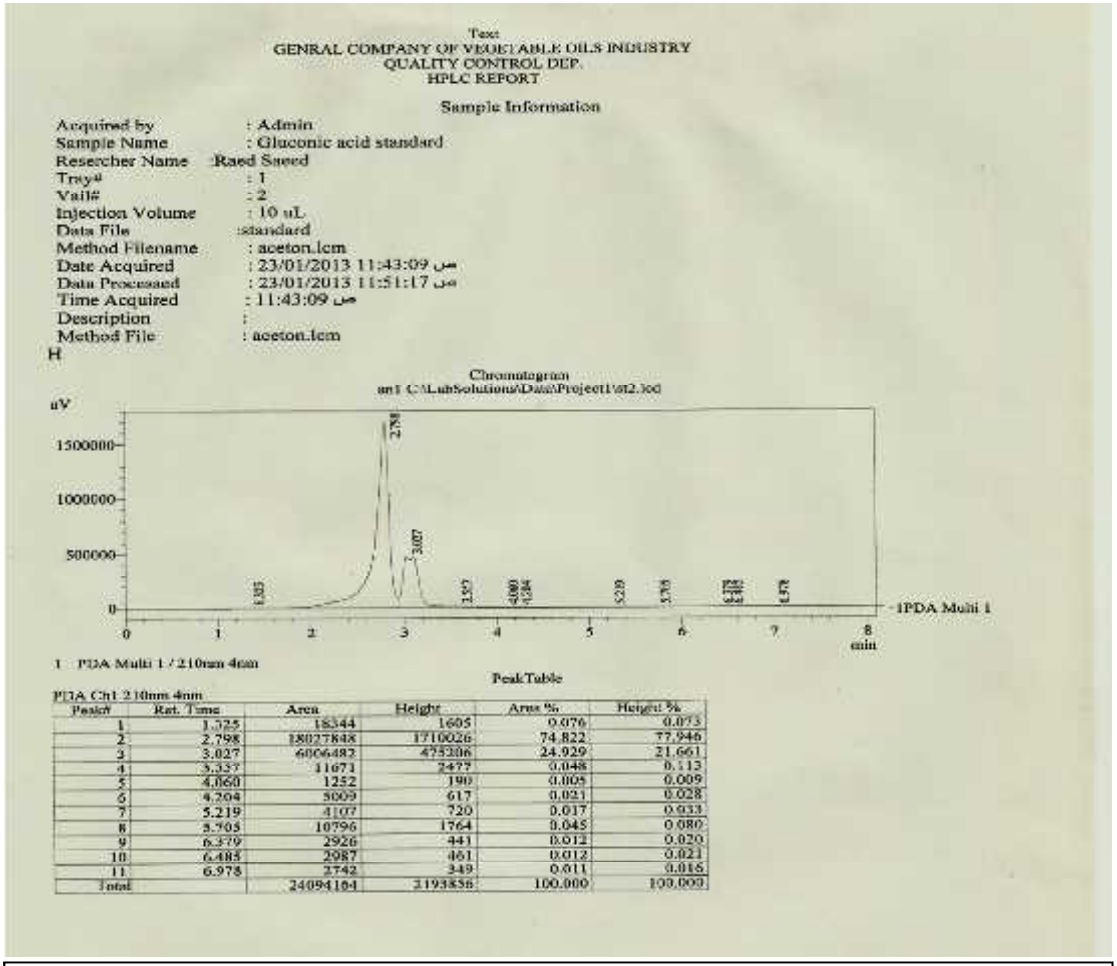
1 PDA Multi 1 / 210nm 4nm

PeakTable

PDA Ch1 210nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.393	9478	964	0.074	0.084
2	1.783	12834	1064	0.100	0.092
3	2.883	10816641	1020156	84.041	88.549
4	3.067	1384283	102223	10.755	8.873
5	3.759	647430	27672	5.030	2.402
Total		12870666	1152079	100.000	100.000

شكل (3) كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC لحامض الكلوكونيك الخام crude المنتج بوساطة العزلة المحلية An3 لعفن *Aspergillus niger*


Test
GENRAL COMPANY OF VEGETABLE OILS INDUSTRY
QUALITY CONTROL DEP.
HPLC REPORT

Sample Information

Acquired by	: Admin
Sample Name	: Gluconic acid standard
Researcher Name	:Raed Saeed
Tray#	: 1
Vail#	: 2
Injection Volume	: 10 uL
Data File	:standard
Method Filename	: aceton.lcm
Date Acquired	: 23/01/2013 11:43:09 ص
Data Processed	: 23/01/2013 11:51:17 ص
Time Acquired	: 11:43:09 ص
Description	:
Method File	: aceton.lcm

H

Chromatogram
an1 C:\LabSolutions\Data\Project1\st2.lcd

1 PDA Multi 1 / 210nm 4nm

PeakTable

PDA Ch1 210nm 4nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	1.325	18344	1605	0.076	0.073
2	2.798	18027848	1710026	74.822	77.946
3	3.027	6006482	475306	24.929	21.661
4	3.337	11671	2477	0.048	0.113
5	4.060	1252	190	0.005	0.009
6	4.204	5009	617	0.021	0.028
7	5.219	4107	720	0.017	0.033
8	5.703	10796	1764	0.045	0.080
9	6.379	2926	441	0.012	0.020
10	6.485	2987	461	0.012	0.021
11	6.978	2742	349	0.011	0.016
Total		24094104	2193836	100.000	100.000

شكل (4): كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC لحامض الكلوكونيك القياسي 49- 53%

المصادر

1-عبدالكريم، ندى فوزي (2011). تنقية وتوصيف انزيم الكلوكواميليز المنتج من عزلة محلية لعفن *Aspergillus niger*. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة البصرة. 129 صفحة.

2-عيسى، محمد عبد الصاحب (2013). دراسة قابلية إنتاج الأحماض الدهنية المتعددة عدم التشبع المزدوجة الأواصر (أوميكا-3 و أوميكا-6) من عزلة محلية للعفن *Mucor* sp. وتأثير بعض ظروف النمو في زيادة الإنتاجية كماً ونوعاً. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة ذي قار. 153 صفحة.

3-APHA: American Public Health Association. (1978). Standard methods for the examination of dairy products. 14th Ed. Washingtion, DC, USA. 449 p.

4-Anastassiadis, S.; Aivasidis, A. and Wandrey, C. (2003). Continuous gluconic acid production by isolated yeast like mould strains of

Aureobasidium pullulans. Applied of Microbiology and Biotechnology, 61: 110-117.

5-El-Ktateny, M. S. (1978). Studies on the production of organic acid by some locally isolate fungi. M. Sci. Thesis, Bot. Dept., Fac., Sci., Assiut Univ., Egypt.

6-Hoog, G. S.; Guarro, J.; Tan, C. S.; Wintermans, R. G. F. and Gene, J. (1995). Atlas of clinical fungi. Centraabureauvoor Schimelcultures, Netherland. 707pp.

7-Mcgiinnis, M. R. (1980). Laboratory handbook of medical mycology. Academic Press, Inc., New York, 587 pp.

8-Peppler, H.G. (1967). Microbial technology. Reinhold Pub. Corp., New York.

9-Pitt, J. I. and Hooking, A. D. (1997). Fungi and food spoilage. Blackie Academic Professional. New York. 519 pp.

10-Ramachandran, S. (2008). Use of spores of *Aspergillus niger* obtained by solid-state fermentation for the production of gluconic acid. *Ph.D. Thesis*. University of Blaise Pascal. France. 175p.

11-Ramachandran, S. Fontanille, P. Pandey, A. and Larroche, C. (2006). Gluconic acid: properties, applications and microbial production. Food Technol. Biotechnol., 44(2): 185-195.

12-Saito, M. and Mechida, S. (1999). A rapid identification method for aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by ammonia vapor. Mycoscience, 40: 205-208.

13-Shindia, A. A.; Al-Sherbeny, G. A.; El-Esawy, A. E. and Sheriff, Y. M. M. M. (2006). Producrion of gluconic acid by some local fungi. *Mycobiology*, 34(1): 22-29.

14-Singh, O. V.; Jain, R. K. and Singh, R. P. (2003). Gluconic acid production under varying fermentation condition by *Aspergillus niger*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 78: 208-212.

15-Singh, O. V. Kapur, N. and Singh, R. P. (2005). Evalution of agro-food by products for gluconic acid production by *Aspergillus niger* ORS-4.410. *World Journal of* Microbiology and Biotechnology, 21: 519-524.

16-Zand, H.; Markos, J. and Bales, V. (2004). Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger* growth and non-growth condition. Process Biochemistry, 39(11): 1341-1345.

Isolation and Identification of *Aspergillus niger* and Determination it's Ability for Gluconic Acid Production

Raed S. Khudair and Amal S. Gadhban

Department of Food Sciences, College of Education for Pure Sciences, University of Thi Qar, Iraq

Abstract: Twenty three of moulds were local isolates of from different sources (maize, rice, peanuts field, millet, bread, soil, anjas, peach, bananas, apples, lemons, pomegranates and oranges), these isolates were purified and identified, it comprised of 8 isolates *Aspergillus niger*, 1 *Fusarium sachari*, 8 *Aspergillus flavus*, 1 *Aspergillus fumigatus*, 1 *Alternaria alternata*,1 *Rhizopus sp*, 1 *Mucor sp* and 2 *Aspergillus terreus*. These isolates were examined for their abilities for aflatoxin production, so the toxic isolates which excluded were *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus*. The non-toxic isolates were 12 isolates, they screened for production the gluconic acid. The isolate An3 of *Aspergillus niger* which had been isolated from peaches was the best producer, it gave 38.38g/l gluconic acid . The second one was the isolate An1 which isolated from maize it gave 31.08 g/l . The submerged culture with shaking flask was used for production of gluconic acid.